



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DEL VIGOR EN PLÁNTULAS DE *Erythrina coralloides*.
INOCULADAS CON HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES.**

TESIS INDIVIDUAL

Que como parte de los requisitos para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presenta:

Yazmín Hailen Ugalde De la Cruz

Director de tesis:

Dra. Guadalupe X. Malda Barrera

SINODALES

Dra. Guadalupe X. Malda Barrera
Presidente

Firma

Dr. Oscar R. García Rubio
Secretario

Firma

Ing. Mónica Figueroa Cabañas
Vocal

Firma

Luis G. Hernández Sandoval
Suplente

Firma

Campus Juriquilla
Querétaro, Qro.
Febrero del 2011
México

Resumen

Este estudio evaluó durante 9 meses los cambios en los parámetros de vigor los cuales fueron el grosor, el número de hojas, la cantidad relativa de clorofila y la biomasa seca; así mismo se estimó el Índice de Calidad de Dickson (ICD) y la Dependencia Micorrízica (DM), a plantas de *Erythrina coralloides* producidas en vivero. Las muestras de suelo para la selección del inóculo fueron recolectadas en el parque nacional “El Cimatario”. La inoculación con el consorcio de hongos micorrizicos arbusculares se hizo mediante dos técnicas: el primer bloque de inoculación consistió en la incorporación de suelo nativo de la rizosfera de macollos de *Melinis repens* con esporas (T1), el segundo bloque fue inoculado directamente con esporas aisladas de las muestras de suelo nativo de la rizosfera de *M. repens* y el tercer bloque se estableció solo con sustrato comercial (control: C). A los grupos de tratamientos además se les cuantifico el porcentaje de colonización, para lo cual se hizo la tinción de raíces de las plantas por el método de Phillips y Hayman (1970).

Se encontró que para las muestras de suelo sin vegetación el número de esporas fue de 1532 ± 272.24 , mientras que para las muestras de suelo nativo de la rizosfera de *Melinis repens* el número de esporas fue por mucho superior (3703.60 ± 517.90). Para el caso del porcentaje de colonización para ambas técnicas de inoculación (T1 y T2) el valor promedio obtenido fue superior al 75% contra 24% exhibido por el bloque del control, correspondiendo así a una colonización tipo 4 considerada como alta colonización. De la evaluación del grosor los valores promedio máximos mostrados por ambos métodos de inoculación (T1 y T2) fueron 6.16 ± 0.80 , mientras que para el control fue de 4.89 ± 0.44 ; para el final del experimento en la cuantificación del número de hojas, los tratamientos 1 y 2 mostraron un valor promedio de 12.89 ± 1 , y en el bloque del control fue de 9 ± 1.14 ; por otro lado los valores promedio máximos, obtenidos igualmente al final del experimento, para la cantidad relativa de clorofila, los valores más altos se encontraron en los tratamientos 1 y 2 (27.22 ± 2.36 y 28.80 ± 2.36 , respectivamente), en comparación con el control (23.54 ± 2.36). La biomasa seca producida por las plantas pertenecientes a los tratamientos 1 y 2 exhibieron valores promedio más altos (aéreo= 8.73 y raíz= 4.96), en comparación con el control (aéreo= 4.96 y raíz= 1.9); para el índice de calidad de Dickson estimado mostraron los valores más altos, en comparación con el bloque control. Por último de la estimación de la dependencia micorrízica se encontró que las plantas de *E. coralloides* son moderadamente dependientes. Por lo tanto se concluye que la inoculación con micorrizas, mediante las dos técnicas diferentes, no mostró diferencias significativas en los parámetros de vigor evaluados.

Palabras clave: *Erythrina coralloides*, HMA, Índice de Calidad de Dickson, Dependencia Micorrízica

Abstrac

This study evaluated during 9 months, changes in the parameters of force which were the thickness, the number of leaves, the amount of chlorophyll and biomass, and it was estimated Dickson Quality Index (DCI) and mycorrhizal dependency (DM), to *Erythrina coralloides* plants produced in and nursery. Soil samples for the selection of the inoculum were collected in the national park "The Cimatario." Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi consortium was made by two techniques: the first block of inoculation was the incorporation of native soil from the rhizosphere of bunches of spores *Melinis repens* (T1), the second block was inoculated directly with spores isolated samples of native soil from the rhizosphere of *M. repens* and the third block was established with commercial substrate only (control: C). A every group was also quantified the percentage of colonization, for which staining was plant roots by the method of Phillips and Hayman (1970).

We found that for the bare soil samples the number of spores was $+272.24$ 1532 , while for native soil samples from the rhizosphere of *Melinis repens* the number of spores was much higher (3703.60 $+517.90$). In the case of the percentage of colonization for both inoculation techniques (T1 and T2) the average score was over 75% to 24% exhibited by the control block, thus corresponding to a colonization type 4 considered high colonization. The evaluation of the maximum average thickness values shown by both methods of inoculation (T1 and T2) were 6.16 $+0.80$, while for the control was 4.89 $+0.44$, for the end of the experiment in terms of number of leaves, treatments 1 and 2 showed a mean value of 12.89 $+1$, and the control block was 9 $+1.14$, on the other hand, the maximum average values, also obtained at the end of the experiment, for the amount of chlorophyll, the highest values were found in treatments 1 and 2 (27.22 $+2.36$ and 28.80 $+2.36$, respectively) compared with control (23.54 $+2.36$). The dry biomass produced by plants belonging to treatments 1 and 2 showed higher average values (air = 8.73 and root = 4.96), compared with control (shoot and root $1.9 = 4.96$), for the quality index Dickson estimates showed higher values compared with the control block. Finally the estimation of mycorrhizal dependency was found that plants of *E. coralloides* are moderately dependent. It is therefore concluded that inoculation with mycorrhizal fungi, using the two different techniques showed no significant differences in force parameters evaluated.

Keywords: *Erythrina coralloides*, VAM, Dickson Quality Index, Mycorrhizal Dependency.

Agradecimientos

Gracias Papá porque de niña sentada en tus hombros, me enseñaste que podía ver más allá del horizonte y que sin saberlo esa naturaleza que me rodeaba sería hoy por hoy la que marcará mi vida de una manera muy peculiar, gracias por confiar en mí, por estar ahí cuando más te he necesitado, por ser mi compañero de ida y vuelta a la escuela, por escuchar mis aventuras en campo y porque me has enseñado a luchar por las cosas que anhelo; y que sin importar las circunstancias no debo detenerme hasta alcanzar el éxito.

Mamá muchas gracias por llevarme a esas interminables caminatas al cerro en las que me enseñabas todo tu conocimiento empírico del campo y que gracias a ello despertaste mi curiosidad por el mundo que me rodeaba. Gracias por tu amor incondicional, por creer en mí, por tu paciencia, por estar ahí en mis noches de desvelo, y por tus ocurrencias que siempre alegraron mis días.

A mis Hermanos Irais, Eder, Emir y a mi cuñada Miriam, que es como una hermana para mí, les estoy infinitamente agradecida por su incondicional apoyo, que me hace cada vez más fuerte, por mantener la unión familiar, pero sobre todo gracias por dejar una huella imborrable en mi corazón, porque gracias a ello los llevo conmigo a donde quiera que esté.

Expreso mi gratitud a mi alma Mater la Universidad Autónoma de Querétaro que me abrió las puertas de sus aulas llenas de conocimiento que día a día saciaron mi sed de aprendizaje, gracias por hacer de mí una bióloga con más preguntas que respuestas.

Gracias a la Dra. Guadalupe Malda por abrirme las puertas de su laboratorio, por orientar mi camino cuando me sentí perdida, por compartir su conocimiento conmigo pero sobre todo por brindarme su amistad.

Gracias Dr. Oscar García por sus enseñanzas en el laboratorio y en campo, gracias por compartir sus choco-aventuras y por sus ocurrencias que hicieron del laboratorio un lugar agradable para trabajar.

Le agradezco a la Ing. Mónica Figueroa por su desinteresada ayuda en mis alucinados análisis estadísticos que sin ella no hubieran sido posibles, por siempre regalarme una sonrisa y permitirme ser su amiga y compañera.

Mis más profundo agradecimiento al Dr. Luis Hernández por compartir su sabiduría en el aula y en campo, donde encontrábamos toda clase de “maravillas”, gracias por confiar en mi y porque el sabe que sin el yo no estaría aquí, y para mi “siempre será lo máximo”.

Gracias a mis amigos y compañeros del laboratorio por hacer única y agradable mi estancia y por esas convivencias gourmet.

Gracias a mis amigos biólogos por esas discusiones y alucinadas ideas sobre la vida, gracias también por compartir el mismo camino que nos llevo a ser biólogos, y por esas interminables caminatas que siempre recompensaba nuestros ojos con hermosos paisajes, recorridos de Norte a Sur y de Este a Oeste, pero sobre todo gracias por la convivencia familiar entre casas de campaña, zucaritas en bolsita y latas de atún. Y Se que tenemos un camino en común y nos volveremos a encontrar.

Le agradezco inmensamente a mi mejor amigo y alma gemela Juan Pablo que siempre creyó en mí, a el que siempre esta conmigo en las buenas, en las malas y en las peores; gracias por alegrarme la vida, por escuchar mis guías de estudio aunque no entendieras de lo que te hablara, y sobre todo por compartir conmigo esta etapa tan importante de mi vida.

Índice

| | Página |
|--|---------------|
| Resumen | i |
| Abstrac | ii |
| Agradecimientos | iii |
| Índice | v |
| Índice de tablas | vii |
| Índice de figuras | viii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1. Micorrizas. | 3 |
| 2.1.2. Subdivisiones de las micorrizas arbusculares. | 3 |
| 2.1.3. Características morfológicas de los hongos micorrizicos arbusculares (HMA). | 5 |
| 2.1.4. Tipos morfológicos de las micorrizas. | 5 |
| 2.1.5. Taxonomía de los hongos micorrízicos arbusculares. | 6 |
| 2.1.6. Beneficios de los HMA. | 7 |
| 2.1.7. Dependencia micorrízica. | 9 |
| 2.1.8. Las plantas nativas y los HMA. | 9 |
| 2.1.9. Problemática | 14 |
| 2.2. Caso de estudio: <i>Erythrina coralloides</i> . | 15 |
| 2.2.1. <i>Erythrina coralloides</i> . | 15 |
| III. HIPÓTESIS | 18 |
| IV. OBJETIVOS GENERALES | 19 |
| V. OBJETIVOS PARTICULARES | 19 |
| VI. MÉTODOS | 20 |
| 6.1. Sitio de estudio. | 20 |
| 6.2. Colecta de Germoplasma. | 21 |
| 6.3. Establecimiento de lotes de plantas de <i>Erythrina coralloides</i> . | 21 |
| 6.4. Preparación de inóculo. | 22 |
| 6.5. Inoculación del sistema radical. | 23 |

| | |
|---|----|
| 6.6. Tinción en raíces y evaluación del grado de colonización micorrízica arbuscular. | 23 |
| 6.7. Evaluación del vigor en plántulas. | 25 |
| 6.8. Análisis estadístico. | 26 |
| VII. RESULTADOS | 28 |
| 7.1. Cuantificación para la selección de inóculo. | 28 |
| 7.2. Porcentaje de colonización. | 29 |
| 7.3. Evaluación del vigor de plantas juveniles. | 35 |
| 7.3.1. Grosor. | 35 |
| 7.3.2. Número de hojas. | 36 |
| 7.3.3. Cantidad relativa de clorofila. | 37 |
| 7.4. Rendimiento en peso seco (aéreo/raíz). | 41 |
| VIII. DISCUSIONES | 44 |
| 8.1. Comparación del número de esporas en dos tipos de muestras de suelo. | 44 |
| 8.2. Porcentaje de colonización de plántulas con y sin inóculo. | 45 |
| 8.3. Efecto del inóculo de HMA sobre el vigor de plántulas de <i>E. coralloides</i> . | 47 |
| IX. CONCLUSIONES. | 51 |
| X. Bibliografía. | 53 |

Índice de tablas

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| 1 | Dependencia micorrízica e Índice de Calidad de Dickson obtenidos de los grupos de tratamientos (T1 y T2). | 43 |

Índice de figuras

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Representación esquemática de las principales estructuras de las dos subdivisiones de las micorrizas. a) ectomicorrizas y b) endomicorrizas (HMA) | 4 |
| 2 | Síntesis de las dos clases estructurales de HMA que fueron descritos por Gallaud | 6 |
| 3 | Número de esporas encontradas en muestras de suelo nativo sin vegetación y suelo de la rizósfera de <i>Melinis repenes</i> , colectadas en época de sequía. | 28 |
| 4 | Porcentaje de colonización total de plántulas de <i>E. coralloides</i> . | 31 |
| 5 | Porcentaje de colonización de hifas en plántulas de <i>E. coralloides</i> | 32 |
| 6 | Porcentaje de colonización de vesículas en plántulas de <i>E. coralloides</i> . | 33 |
| 7 | Estructuras diagnósticas de HMA (esporas, hifas, vesículas y arbusculos). | 34 |
| 8 | Colonización de plántulas de <i>E. coralloides</i> | 35 |
| 9 | Efecto sobre el grosor promedio de las plántulas de <i>Erythrina coralloides</i> , inoculadas durante 19 quincenas con HMA nativos inoculados por dos técnicas (T1: suelo nativo con vegetación que contiene esporas y T2: Con esporas aisladas del suelo nativo). | 38 |
| 10 | Cambio en el n° de hojas en <i>Erythrina coralloides</i> D.C., por efecto de la inoculación con un consorcio de HMA nativos, aislados de la rizosfera de <i>Melinis repens</i> en época de sequía. | 39 |
| 11 | Efecto del método de inoculación de un consorcio de HMA nativos sobre el grosor promedio de <i>Erythrina coralloides</i> (P<0.0001). T1= tratamiento1 (inoculación suelo nativo con esporas de rizosfera de <i>Melinis repens</i>), T2= tratamiento2 (inoculación con esporas aisladas del suelo) y C= control (sin HMA) | 40 |
| 12 | Valores promedio del peso de tallos y de raíz de las plántulas de <i>Erythrina coralloides</i> , sometidas a tres tratamientos diferentes. | 42 |

I. INTRODUCCIÓN

En todo proceso biológico se establecen interacciones entre los organismos, mismas que contribuyen en el beneficio o detrimento de alguno de ellos. Estas interacciones pueden ser positivas o negativas, y hay cuatro tipos generales de interacciones: dentro de las negativas están la competencia (-/-) y depredación (+/-); y en las positivas se incluyen el comensalismo (+/0) y mutualismo (+/+) (Krebs, 1978). Esta última es una relación recíproca donde ambas especies se benefician de la asociación (Smith, 1996).

El mutualismo puede o no ser simbiótico, obligado o facultativo (Morin, 1999). Dentro de las formas de relaciones mutualistas simbióticas obligatorias, están los líquenes, que es la asociación entre un alga y un hongo; una forma muy común en muchos árboles tropicales son las ectomicorrizas, la cual consiste en un vaina bien desarrollada de una red de hifas que está conectada por fuera de la raíz; y otra forma son las endomicorrizas. Estas últimas están asociadas en un amplio rango de plantas de importancia agrícola y nativas (Smith, 1996). Las endomicorrizas se establecen entre el sistema radical y un grupo de hongos. Tal asociación desarrolla una estructura compleja especializada denominada micorriza.

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son los más ampliamente distribuidos y generalistas porque se encuentran en la mayoría de los hábitats naturales (Álvarez-Sánchez y Ramos-Zapata, 2004), alrededor de un 80% de todas las plantas terrestres forman este tipo de simbiosis (Smith y Read, 2008) y 95% de las especies presentes en el mundo de plantas vasculares pertenecen a familias que tienen la potencialidad de ser micorrizables (Cuenca *et al.* 2007; Quilambo, 2003). Por mencionar algunas están las Fabaceae-Mimosoideae, Verbenaceae, Meliaceae, Caesalpinoideae, Bombacaceae (Salas, 2004).

La presencia de estos HMA proporciona ventajas dirigidas hacia el mejoramiento del suelo (Ramos-Zapata y Guadarrama, 2004; Camargo, 1999; Calleros *et al.*

2006), así como a la planta hospedera, que tienen que ver con respuestas fisiológicas consideradas como indicadores de su adecuación que implican sobrevivencia, variables de crecimiento, N° de Hojas y de semillas (Guadarrama, *et al.* 2008).

Se sabe que en los diferentes ecosistemas terrestres hay alrededor de un 80% de plantas asociadas con HMA. En áreas perturbadas, donde las condiciones abióticas (incidencia de rayos solares y evapotranspiración) y bióticas (presencia de hongos micorrizógenos) se han modificado. Las plantas colonizadoras o de sucesión secundaria, en su mayoría, no forman asociación micorrízica debido a sus características de historia de vida (Janos 1980) y a la disminución de inóculo micorrízico (hifas extrarradicales y esporas) en el suelo (Ramos y Guadarrama, 2004).

El conocimiento de esta asociación simbiótica no solo debe de interesarle a los investigadores, sino a todos los involucrados en el manejo forestal, como insumo en la búsqueda de alternativas a un manejo sostenible de los recursos naturales, especialmente como ya se mencionó, en los ecosistemas perturbados (Salas, 2004). Es por ello que diversos estudios señalan que la aplicación de inóculos de HMA es una alternativa viable para favorecer la aclimatación de plántulas (Monroy-Ata *et al.* 2007). Por lo que el siguiente trabajo tiene un enfoque dirigido hacia la generación de conocimiento básico, acerca de la aplicación de HMA. Como una herramienta que pueda facilitar el establecimiento de plántulas subtropicales como *Erythrina coralloides*, en la etapa crítica de su desarrollo que es la fase de crecimiento, para de esta manera incrementar el porcentaje de sobrevivencia, al ser empleadas para la forestación y reforestación de sitios que han sido perturbados.

II. ANTECEDENTES

2.1. Micorriza

2.1.1. Definición

El término micorriza fue usado por primera vez por Frank en 1877 para describir la asociación mutualista que se presenta entre plantas y hongos (Allen, 1991). Una definición más actual, aceptada y que hace referencia a su comportamiento fisiológico, es la de Brundrett (2004), que define a las micorrizas como: “una asociación simbiótica esencial para uno o ambos socios, entre un hongo (especializado para vivir en el suelo y en las plantas) y una raíz (u otro órgano de contacto con el sustrato) de una planta viva, que es primariamente responsable para la transferencia de nutrientes. Las micorrizas ocurren en un órgano especializado de la planta donde el contacto íntimo resulta de un desarrollo sincronizado planta–hongo”.

2.1.2. Subdivisiones de las micorrizas arbusculares

Hay dos subdivisiones generales de las micorrizas, las ectomicorrizas y las endomicorrizas (Fig.1). La primera, como previamente se mencionó, se caracteriza por la formación de un manto, denominado red de Hartig, que no es más que un vaina de hifas intercelulares en las raíces de especies de árboles predominantemente (Paterson *et al.* 2004). Las endomicorrizas en términos generales son característicamente encontrados en ecosistemas con riqueza de especies predominando en especies herbáceas y arbóreas; en contraste con las ectomicorrizas, las cuales predominan en ecosistemas de bosque donde solo pocas especies hospederas están presentes, encontrándose en mayor proporción en las Pináceas (Smith y Read, 2008).

Las endomicorrizas han sido por tanto clasificadas con base en criterios morfológicos, anatómicos y sistemáticos en seis tipos: vesículo – arbusculares,

ericoides, arbutoides, monotropoides, ectendomicorrizas y orquidioides. Cada una de estas categorías se caracterizan por la invasión de las células corticales por hifas fúngicas, y por diferencias estructurales que se producen en el desarrollo intracelular de las hifas (Paterson *et al.* 2004 y Smith y Read, 2008).

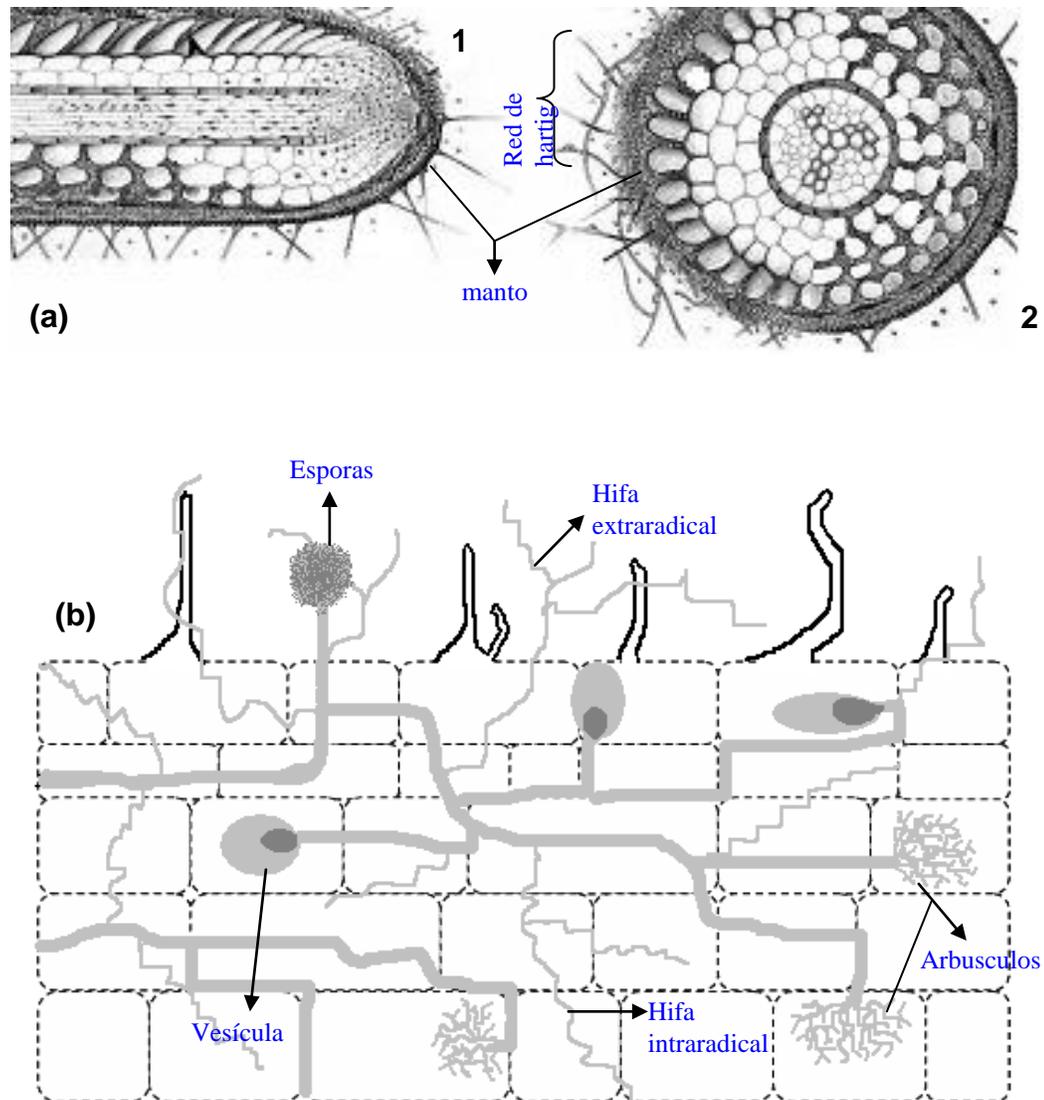


Figura.1. Representación esquemática de las principales estructuras de las dos subdivisiones de las micorrizas. a) ectomicorrizas, corte longitudinal (1) y transversal (2), b) endomicorrizas (específicamente las micorrizas vesículo - arbusculares). Tomado de Paterson *et al.* 2004 y Chung, 2005.

Las micorrizas arbusculares (formalmente referidos como micorrizas vesículo – arbusculares) son el tipo de micorrizas más común. Estas están formadas por una amplia variedad de plantas hospederas por hongos simbióticos obligados; dentro de las plantas se incluyen angiospermas, gimnospermas y los esporofitos de las pteridofitas (Read *et al.* 2000; en Smith y Read, 2008).

2.1.3. Características morfológicas de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA).

El nombre original de hongo micorrízico arbuscular (HMA), también denominado micorriza vesículo - arbuscular, es derivado de las estructuras características en forma de árboles, denominados arbusculos (hifas finamente ramificadas involucradas en el intercambio de nutrientes como el carbono y el fósforo) (Cuenca *et al.* 2007; Paterson *et al.* 2004). Los cuales ocurren dentro de las células corticales de las raíces de las plantas (Smith y Read, 2008), al igual que las vesículas de almacenamiento (porción alargada de hifas que se llenan con cuerpos lipídicos, y participan en menor proporción en la liberación de fosfato), localizadas entre o dentro de las células corticales. Estas dos características así como hifas inter e intracelulares y la producción de esporas en las hifas intra y extracelulares, son consideradas características diagnósticas para las micorrizas arbusculares (Paterson *et al.* 2004). Cuando se establece la interacción, los hongos por lo general modifican la morfología de la raíz, desarrollando nuevas estructuras que caracterizan a los diferentes tipos de micorrizas (Aguilera *et al.* 2007).

2.1.4. Tipos morfológicos de las micorrizas arbusculares.

Gallaud (1905) describe dos grandes clases de estructurales de HMA a las cuales denominó como tipo *Arum* y tipo *Paris* (Fig.2). Estos tipos fueron nombrados después de describir las plantas en las cuales fueron primero encontrados, *Arum maculatum* y *Paris quadrifolia* (Cavagnaro *et al.* 2001).

El tipo *Arum* fue definido por la existencia de hifas intercelulares amplias, que subyacen a esta fase inicial de colonización, después de lo cual sigue la penetración dentro de las células corticales, los arbusculos son formados normalmente como estructuras terminales denominadas hifas tronco; las vesículas pueden ser intercelulares o intracelulares y no son formadas por todos los HMA (Smith y Smith, 1997). Y el tipo *Paris* se caracteriza por la ausencia de hifas intercelulares, por lo que en su lugar, tiene terminales de hifas intracelulares amplias dentro de las células corticales desde los cuales los arbusculos son normalmente formados como estructuras intercalares (Gallaud, 1905; en Smith y Smith, 1997). Se sabe que 30 familias forman tipo *Arum*, 41 forman tipo *Paris* y 21 forman un intermedio de ambos (Cavagnaro *et al.* 2001).

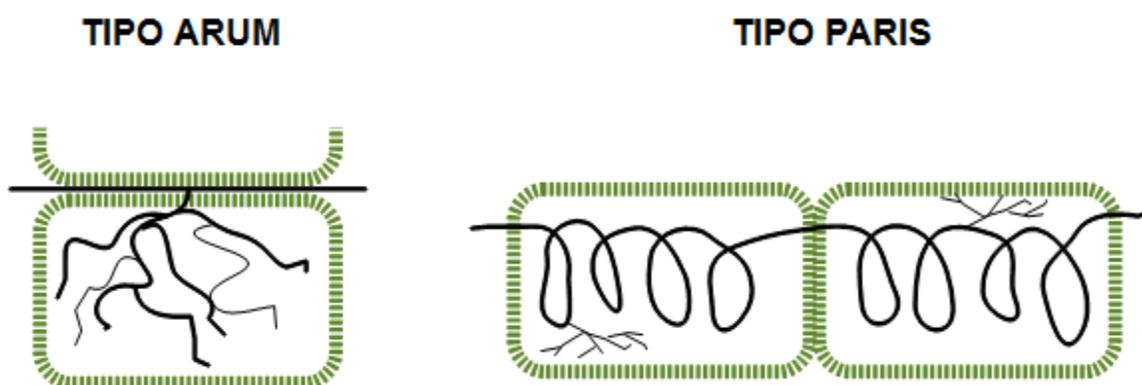


Figura 2. Síntesis de las dos clases estructurales de HMA que fueron descritos por Gallaud (1905).

2.1.5. Taxonomía de los hongos micorrízicos arbusculares

Los hongos involucrados en esta simbiosis son organismos ubicuos que se encuentran en el suelo, pertenecientes al Phylum Glomeromycota; clase Glomeromycetes; dentro del suborden Glomineae se ubican las familias Glomaceae con un único género *Glomus*, la familia Acaulosporaceae con el

género *Archaeospora* y familia Paraglomaceae con el género *Paraglomus*. El suborden Gigasporaceae abarca una única familia, denominada con el mismo nombre, que contiene dos géneros *Gigaspora* y *Scutellospora*, caracterizados por no formar vesículas intraradicales en la planta huésped, a cambio, forma células auxiliares externas que al parecer cumplen la misma función de las vesículas (Peña-Venegas *et al.* 2006). Los ocho géneros mencionados incluyen aproximadamente 150 especies (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999; Paterson *et al.* 2004)

2.1.6. Beneficios de los HMA.

El beneficio que aporta la simbiosis micorrízica a las plantas va a estar determinado por la actividad del micelio extraradical del hongo, cuya principal función es la toma y traslocación de nutrientes minerales esenciales del suelo (Paterson *et al.* 2004), los cuales son incorporados a los tejidos de las plantas.

Por tanto existe un movimiento bidireccional simultáneo de materiales a través de la interfase planta-hongo, que es selectivo y polar. Selectivo porque solo ciertas, no todo el contenido soluble de las hifas y de las células, parece trasladarse. Y polar porque el carbono pasa de la planta hacia el hongo (Herrera y Ulloa, 1990), utilizando entre 10-20% del CO₂ asimilado por las plantas (Reyes-Jaramillo, 2002) y en dirección contraria (hongo-planta), pasan los nutrimentos del suelo, principalmente los poco móviles como el fósforo, magnesio, zinc, cobre, fierro (Camargo, 1999). Y recientemente se ha prestado atención entorno al nitrógeno en forma de amonio (NH₄) (Herrera y Ulloa, 1990; Smith y Read, 2008). Los HMA funcionan como una extensión del sistema radical y aumentan la asimilación de nutrimentos del suelo, debido al diámetro (3 a 30 µm) y longitud de sus hifas (0.03 a 6.95mg-1 de suelo), que les permite explorar un mayor volumen del ambiente edáfico (Smith y Read, 2008, y Ramos-Zapata y Guadarrama-Chávez, 2004).

La presencia de las micorrizas arbusculares proporcionan ventajas que van dirigidos hacia el mejoramiento de las propiedades físicas y químicas del suelo;

como la agregación de las partículas del suelo (que se da gracias a las propiedades químicas de la glomalina producida por los HMA) (Rilling, 2003; Cuenca *et al.* 2007; Ramos-Zapata y Guadarrama-Chávez, 2004), generando enriquecimiento en materia orgánica, rehabilitación de suelos que contengan metales pesados (Camargo-Ricalde, 1999) y mejoran las relaciones hídricas (Calleros-Gil *et al.* 2006), lo cual de manera indirecta, determina la composición vegetal, productividad, diversidad y sustentabilidad en diferentes ecosistemas; (Van der Heijden *et al.* 1998).

Los beneficios también están dirigidos hacia la planta hospedera, incrementando la superficie de absorción de nutrimentos y agua de la raíz. Estimula la acumulación de biomasa, (Guadarrama, 2008), incrementa la tasa fotosintética, estimula la actividad de sustancias reguladoras de crecimiento (Salas, 2004), aumenta la resistencia al estrés hídrico (Auge, 2001), y tienen una función importante como agente de biocontrol al ataque de patógenos de hábito radical (Carreón *et al.* 2007).

Estos mecanismos son considerados como indicadores de la adecuación de plantas micorrizadas, así como la determinación de sobrevivencia, establecimiento, variables de crecimiento (peso seco total, tasa relativa de crecimiento, área foliar específica, diámetro del tallo), número de semillas, número de hojas, resistencia a herbívoros, entre otros (Guadarrama *et al.* 2007). Por lo que es ampliamente reconocido que las especies vegetales con HMA tienen una fisiología y una ecología diferentes de aquéllas que no las presentan (Camargo, 1999).

Dado que las especies pioneras no requieren de la asociación micorrízica para su desempeño y son altamente competitivas, impiden el establecimiento de especies vegetales que sí dependen de esta asociación, disminuyendo así la diversidad vegetal (van der Heijden *et al.* 1998). A la dependencia micorrízica se le define como “el grado en el cual la planta depende de la condición de estar colonizada

con HMA, para que produzca su crecimiento máximo a un nivel dado de fertilidad del suelo”.

2.1.7. Dependencia micorrízica

La dependencia micorrízica se define como: “el grado en el cual la planta depende de la condición de estar colonizada con hongos micorrízicos arbusculares para que produzca su crecimiento máximo a nivel dado de fertilidad del suelo” (Sieverding, 1991).

Las plantas exhiben diferentes grados de dependencia frente a la micorriza. Algunas son micótrofas obligadas, y por tanto, ven severamente disminuido su desarrollo si no cuentan con esta asociación. Otras son micótrofas facultativas pues no precisan obligadamente de la micorriza, pero bajo determinadas condiciones crecen mejor con ella (bajo contenido de fósforo en el suelo) (Román, 2003). Finalmente unas pocas no forman ningún tipo de micorriza, tal es el caso de la mayoría de las Cyperaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, Commelinaceae, Urticaceae, Juncaceae y Polygonaceae (Brundrett, 2002, Paterson *et al.* 2004 y Smith y Read, 2008).

2.1.8. Las plantas nativas y los HMA.

Para poder llevar a cabo un programa de restauración en un ecosistema perturbado, es importante considerar las condiciones físicas y químicas del suelo, además del componente vegetal, que incluye, las condiciones biológicas y microbianas del suelo, así como la adaptación del hongo al hábitat normal de la planta, ya que de ello dependerá el éxito de la persistencia del hongo en convivencia con la planta.

Algunas prácticas de recuperación en las que se han empleado plantas germinadas en vivero e inoculadas con hongos micorrízicos son prueba de ello (Cuenca *et al.* 1998). Ya que dichas plantas tienen mayor capacidad de

establecimiento y supervivencia, cuando se comparan con plantas que no presentan asociación con estos hongos (Ramos y Guadarrama, 2004). En la mayoría de los trabajos llevados a cabo sobre la aplicación de las micorrizas como un biofertilizante, se han dirigido hacia la aplicación en plantas de importancia económica como los cítricos, plátano, guanábana, papaya, café, mango, alfalfa, arroz, melón, aguacate, chile; entre otros (Alemán *et al.* 1997). El resultado general sobre las plantas de importancia económica inoculadas con HMA, es el incremento del rendimiento, lo que las sitúa como un “biofertilizante” efectivo que asegura un alza en la producción.

Alrededor del mundo diversos institutos y universidades han generado conocimiento acerca de la biología, fisiología y ecología de las interacciones simbióticas mutualistas como las micorrizas. En Uruguay, Frioni *et al.* (1999) estudiaron el nivel de colonización por ectomicorrizas y HMA de 23 especies de árboles nativos y arbustos de leguminosas. Los resultados demostraron que todas las especies estudiadas tuvieron un alto nivel de colonización de HMA. En la subfamilia Papilionoidea varía entre 62 y 78%, en Mimosoideae entre 18 y 69% y en Caesalpinioideae el valor fue más grande de 6 y 79%. Lo que demuestra un claro efecto sobre las plantas colonizadas.

Pereira *et al.* (2001) probaron el efecto en el crecimiento de *Eucalyptus camaldulensis* que es empleado en Chile para reforestación. En condiciones de vivero empleando dos hongos micorrízicos. Se mostró un mejor resultado en crecimiento (altura), absorción de nutrientes, peso aéreo de las plantas, área foliar y contenido relativo de clorofila en hojas, en plantas inoculadas con *Glomus intraradices*.

En la Gran sabana de Venezuela, Cuenca *et al.* (2002) llevaron a cabo un estudio empleando arbustos nativos de esta región obtenidos por estacas y por semilla. Emplearon tratamientos sin inóculo (C), solo con fósforo (P), otro con *Glomus manihotis* (M1), cultivo mixto de HMA de la sabana (M2), Cultivo mixto de HMA de arbustal (M3), *Glomus manihotis* + fósforo (M1+P), cultivo mixto de HMA de la

sabana + fósforo (M2+P) y cultivo mixto de HMA del arbustal (M3+P). Y se midieron parámetros de sobrevivencia, crecimiento (altura), peso seco y porcentaje de colonización. Los resultados arrojados de este estudio mostraron que tanto en las plántulas como en las estacas los valores que mostraron mayor vigor en las plantas fue en el tratamiento M1+P, es decir aquel donde se empleo inoculo proveniente de las mismas condiciones ecológicas más una dosis de P.

Fisher y Jayachandran (2005), hicieron un estudio exploratorio sobre la presencia de HMA en el sistema radical de 27 especies del Sur de Florida, lo que podría establecer una base sólida sobre la comprensión biológica de las plantas, basado en el grado de micorrización, para así poder emplear especies nativas para la restauración de ecosistemas amenazados y el restablecimiento de plantas en peligro.

Manoharan *et al.* (2008) investigaron los efectos de los HMA sobre los cambios fisiológicos de plántulas de seis especies de árboles (*Cassia siamea*, *Delonix regia*, *Erythrina variegata*, *Samanea saman* y *Sterculia foetida*). Cuantificaron clorofila, carotenoides, azúcares, proteínas, almidón, nitratos, fosforo. Dichos parámetros incrementaron en las plantas micorrizadas comparadas con las no micorrizadas. *E. variegata* mostró los valores más altos en todas las categorías, aunque en todas las especies de árboles seleccionados mostraron una buena respuesta.

Diversos trabajos sobre los HMA se han desarrollado en ambientes tropicales que se distribuyen en México, ya que es justo en estos ambientes donde este tipo de hongos son más abundantes. Ramos-Zapata *et al.* (2006) llevaron acabo un estudio sobre el efecto de HMA nativos en el establecimiento de una palmera *Desmoncus orthacanthos*, nativa de los bosques tropicales en la Península de Yucatán, México, que tiene potencial para procesos de restauración. Dos lotes de plantas con y sin inoculo fueron introducidas en dos sitios con diferente edad sucesional, se evaluaron los efectos de la inoculación en el establecimiento y desarrollo de las plántulas, considerando parámetros de crecimiento y de

sobrevivencia. Los resultados demostraron que los HMA tuvieron claros efectos en la sobrevivencia en comparación con las plantas no inoculadas.

Por otro lado los trabajos desarrollados en ambientes áridos y semiáridos actualmente han tenido mayor importancia por el incremento de la desertificación en todo el mundo. Y es por ello la importancia del estudio de estos ambientes para entender la biología y ecología de los organismos que están en una continua interacción.

Montaño *et al.* (2007) observaron que la altura y materia seca de la parte aérea de tres leguminosas nativas de zonas áridas propagadas por semilla, respondieron diferencialmente a la incubación de 13 consorcios naturales de HMA aislados de la zona árida de Zacatecas del Altiplano Potosino-Zacatecano de México; *Dalea bicolor*, presentó mayor dependencia micorrízica en comparación con *Calliandra eriophylla* y *Acacia schaffneri*.

Huante *et al.* (1993) investigaron la influencia sobre el crecimiento de plántulas de *Caesalpinia eriostachys*, *Cordia alliodora*, *Ipomoea wolcottiana* y *Pithecelobium mangense* en un invernadero en la Estación Biológica de Chamela en la costa del Pacífico de México. Se cuantificó la producción de biomasa seca, la tasa de crecimiento relativo, el rango de brotes/raíz; y considerando los pesos secos de las plantas micorrizadas y no micorrizadas, se estimó la dependencia de micorriza, en plántulas de 75 días de edad. En todas excepto en *I. wolcottiana*, la infección por micorrizas resultó en un incremento de la producción de biomasa, lo mismo para la tasa de crecimiento relativo y área foliar, *C. alliodora* y *P. mangense*, mostraron una dependencia micorrízica más alta que *I. wolcottiana* y *C. eriostachys*.

Camargo-Ricalde *et al.* (2003) hicieron un estudio acerca del estado de especies xérico perennes de un matorral xerófilo y la comunidad del ecotono de selva baja caducifolia en el valle semiárido de Tehuacán-Cuicatlán, México. Se examinaron 50 especies dominantes/codominantes, de las cuales 45 fueron micorrizables.

Encontraron que de manera general la familia de las Cactaceae y las Fabaceae son micorrizables, lo que es de gran importancia debido a que varias leguminosas han sido reportadas como formadoras de islas de recursos.

En el Valle de Mezquital, Hidalgo; García-Sánchez (2005) llevo acabo un estudio para la restauración de los matorrales semiáridos, con el uso de plantas silvestres inoculadas con HMA provenientes del suelo de la misma zona de estudio. Las plantas micorrizadas de los géneros de *Prosopis*, *Bouteloa* y *Opuntia* en condiciones de invernadero mostraron una respuesta positiva en las variables de crecimiento y lo mismo en su sobrevivencia, una vez que fueron transplantas en campo. Mientras que *Acacia* y *Mimosa* no mostraron beneficios de mutualismo en el crecimiento pero si en otros parámetros de su desarrollo.

En el mismo estado pero en el Valle de Actopan, México; Monroy-Ata *et al.* (2007) evaluaron la supervivencia del mezquite (*Prosopis laevigata*) y huizache (*Acacia farnesiana*), las cuales fueron inoculadas con HMA que fue obtenido a partir de “cultivos trampa” compuestos de sustrato colectado de suelo de un matorral xerófilo poco perturbado, dominado por especies del género *Mimosa* y gramíneas. Las plantas fueron transplantadas a un matorral xerófilo deteriorado, con y sin inoculo se colocaron bajo una planta nodriza, los resultados obtenidos mostraron que las micorrizas en plantas de mezquite y de huizache aumentan de manera significativa la supervivencia incrementándose el porcentaje de 19 a 54% para mezquite y de huizache de 18 a 48%.

En el estado de Sonora Bashan *et al.* (2009), evaluaron tres leguminosas nativas del desierto de Sonora (*Prosopis articulata*, *Parkinsonia microphylla* y *Parkinsonia florida*), especies que son muy comúnmente empleadas para la reforestación y jardineras urbanas. Se establecieron tratamientos con bacterias promotoras de crecimiento (*Azospirillum* y *Bacillus*), HMA y composta. Monitorearon en cada tratamiento altura, número de ramas, grosor del tallo, sobrevivencia y peso seco. El resultado más favorable se obtuvo en *Prosopis articulata*, mientras que en

Parkinsonia microphylla y *Parkinsonia florida* los resultados fueron más variables y no significativos.

Por otro lado Camargo-Ricalde *et al.* (2010) monitorearon los efectos de las micorrizas en plántulas de seis especies del género *Mimosa* del Valle semiárido de Tehuacán-Cuicatlán, simulando las condiciones de campo en invernadero. Establecieron cuatro tratamientos (control, benomyl, fosforo y fosforo + benomyl). Encontrando que para cinco de las seis especies de mimosas la colonización influyó un incremento la producción de biomasa para el control, mientras que para los tratamientos con el fungicida Benomyl y Fosforo + benomyl redujeron drásticamente la colonización por HMA.

En la Actualidad en el estado de Querétaro no se han realizado estudios en los que sean aplicados los HMA en especies forestales nativas, a excepción de un trabajo hecho por García y Malda (2009) en el que llevaron acabo la micropropagación de una cactácea endémica de Querétaro (*Mamillaria mathildae*), con el propósito de reintroducirlas a su hábitat natural. Para ello se empleó un consorcio nativo de HMA como inoculante, del sistema radical de las cactáceas por medio de un cultivo aeropónico. Se monitorearon durante seis meses, obtuvieron que el 54% de las plantas control que no habían sido inoculadas murieron, mientras que las plantas colonizadas por HMA alcanzaron un 89% de sobrevivencia en campo.

2.1.9. Problemática

Para lograr la recuperación del ambiente se requiere de un recurso fundamental, que lo constituyen las especies vegetales tanto herbáceas como leñosas nativas que pueden tener el potencial de crecer en zonas alteradas y que, con el tiempo, desarrollen una vegetación protectora que permita la recuperación de la fertilidad del suelo, un microclima y un ciclo hidrológico, similares a los originales y el restablecimiento de al menos parte de la flora y fauna nativa del sitio (Vázquez *et al.* 1999).

Actualmente, los programas de forestación y reforestación desarrollados por los gobiernos estatales y dependencias de gobierno federal, han hecho uso de especies de árboles exóticos mundialmente conocidos y algunas especies nativas biológicamente mal conocidas, lo que se ha interpuesto, para lograr el éxito de la recuperación de la vegetación.

Al reforestar con especies exóticas se resuelven los problemas de domesticación y disponibilidad de propágulos, pero no se recuperan las condiciones naturales de sitio, y es por ello que es necesaria la domesticación y la propagación de especies nativas que presenten las propiedades biológicas y ecológicas más adecuadas para cada clima y condición ambiental del país. Por lo que, para hacer un uso exitoso de las especies ya sea para fines de restauración ecológica, forestación y reforestación, es indispensable profundizar nuestro conocimiento sobre la biología, ecología, propagación y el manejo de las especies disponibles (Vázquez *et al.* 1999). Además es importante también tomar en consideración la utilidad y servicios ecológicos de las especies para la población local, ya que ello redundará en una mejor conservación de las zonas restauradas.

2.2. Caso de estudio: *Erythrina coralloides*

2.2.1. *Erythrina coralloides*.

Son árboles armados de espinas; las hojas características se componen de 3 foliolos anchos y ovados, ápice acuminado, margen entero, reunidos en un peciolo largo, tronco recto a poco sinuoso; inflorescencia en racimos terminales, flores en grupos de tres, corola rojo intenso; los frutos son unas vainas bivalvadas, leñosas, café oscuro a casi negro, constreñida entre las semillas, dehiscente; las semillas son reniformes y rojas (Calderon y Rzedowski, 2005., Geilfus, 1994., Terrones-Rincón *et al.* 2004). Es una especie que satisface las necesidades de alimentación, combustible, forraje, medicina y construcción (Guevara-Escobar *et al.* 2008).

Esta planta por sus cualidades es valiosa para la restauración y reforestación, ya que provee de servicios ambientales tales como: control de la erosión, infiltran agua de lluvia, mejoran los suelos con su hojarasca, alimento para fauna silvestre, cortina rompe-vientos, seto vivo, brinda sombra, son ornamentales en calles y parques, además son excelentes fijadoras de nitrógeno (Terrones-Rincón *et al.* 2004).

Esta especie es de distribución pantropical, se conocen cerca de 100 especies, el mayor número de especies de *Erythrina* se encuentra en el sureste de México (27 spp.) y en América central (4-8 spp.) Estas plantas forman parte del bosque tropical caducifolio y encinares, crecen en laderas predregosas o en terrenos planos a la orilla de los drenajes, en altitudes de 1650 a 2000 msnm. Se desarrolla en suelos someros, calizos, arenosos, pedregosos, bien drenados; toleran suelos ácidos, sequías y heladas. En los estados de Guanajuato y Querétaro, se observan pocos ejemplares en forma silvestre debido sobre todo a la desertificación de sus ecosistemas naturales, por lo tanto de acuerdo a la NOM-ECOL-059-2001 es considerada como amenazada (Terrones-Rincón *et al.* 2004).

El empleo de especies nativas como es el caso de *Erythrina coralloides* para forestación y reforestación, pueden requerir de periodos de crecimiento a nivel de vivero, para posteriormente ser trasplantadas a campo donde se lleva a cabo la fase denominada de aclimatación, que es la etapa final necesaria en todos los esquemas de propagación.

Dicha fase es en la que muchas plantas son susceptibles a adaptarse a las condiciones del ambiente natural (temperatura, humedad y disponibilidad de nutrientes) y un gran porcentaje de estas mueren. Por lo que la aplicación y manejo de hongos micorrízicos a nivel de vivero, puede ser de gran ayuda en el manejo de esta especie nativa con potencial forestal. Debido a que las micorrizas representan un alto potencial, ya que, como se ha mencionado, la micorriza puede actuar como promotor del crecimiento, por lo que se pueden obtener plantas con mayor calidad (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999).

Esta calidad es preferida debido a que ofrece ventajas para proyectos de restauración de la cubierta vegetal. Las plantas cultivadas deben de integrar cuatro componentes de calidad; 1) genética, 2) sanitaria, 3) morfológica y 4) fisiológica (Rey-Benayas *et al.* 2003). Y es en esta última donde los hongos micorrízicos se involucran inicialmente para finalmente reflejar sus efectos en atributos morfológicos que pueden ser cuantificables (Rey-Benayas *et al.* 2003). Además la aplicación de HMA en prácticas culturales de vivero y agrícolas, ha permitido la disminución de fertilizantes químicos, que a largo plazo empobrecen el suelo y llegan a convertirse en serios contaminantes de cuerpos de agua subterráneos (Martínez y Pérez *et al.* 2009)

III. HIPÓTESIS:

La aplicación de un consorcio de HMA nativos, obtenido de suelo de la rizosfera de *Melinis repens*, favorecerá al mantenimiento del crecimiento y vigor en plántulas de *Erythrina coralloides* en su fase de crecimiento en vivero.

IV. OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar el vigor potencial de plántulas de *Erythrina coralloides* producidas y crecidas en vivero, inoculadas con hongos micorrizicos arbusculares nativos.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Comparar el número de esporas contenido en el suelo nativo desnudo (suelo despejado de vegetación) y suelo con vegetación (suelo circundante a la rizósfera de los macollos de *Melinis repenes*).
- Determinar el grado de micorrización entre plantas juveniles inoculadas con suelo nativo con vegetación (contiene esporas), plantas inoculadas con esporas aisladas del suelo y plántulas no inoculadas.
- Evaluar los parámetros de grosor del tallo, número de hojas, cantidad relativa de clorofila, y la biomasa seca, así mismo se estimo el ICD (Índice de Calidad de Dickson) y la DM (Dependencia Micorrízica) de las plantas inoculadas con suelo nativo con vegetación (contiene esporas), plántulas inoculadas con esporas aisladas del suelo nativo y plántulas sin inóculo.

VI. MÉTODOS

6.1. Sitio de estudio

El Parque Nacional “El Cimatario” se localiza en el estado de Querétaro de Arteaga. Está ubicado hacia la parte sur de la ciudad, a los 20°32’ de latitud norte y los 100°22’ de longitud oeste (INEGI, 1997, en Baltazar *et al.* 2004). Tiene una altura máxima de 2,395 msnm. “El Cimatario” se encuentra en la provincia del Eje Neovolcánico. Se conforma principalmente por rocas ígneas extrusivas del tipo basalto-brecha volcánica básica. El tipo de suelo que se encuentra presente es litosol con feozem, y hacia los alrededores es vertisol pélico de textura fina (Baltazar *et al.* 2004). Posee un clima predominantemente del tipo BS1k (semiseco templado), con lluvias en verano. Con una precipitación anual de 549.3 mm. Tiene una temperatura media anual de 18°C, una máxima de 22°C (Baltazar *et al.* 2004).

La vegetación que se desarrolla en la zona del “El Cimatario” presenta cuatro variantes, que son: bosque de encinos, pastizal, matorral crasicaule y bosque tropical caducifolio. En este último se encuentran comunidades dominadas por árboles de baja altura (entre 4 y 12 m) que tienden a perder las hojas en época de seca, durando así entre 6 y 7 meses. Varias de las especies tienen cortezas exfoliantes de colores vivos y claros. Es una vegetación que tiene contrastes fuertes entre la época de secas y la época de lluvias (Zamudio *et al.* 1992).

El estrato arbóreo se encuentra dominado por *Bursera fagaroides*, *Bursera palmeri*, *Ipomoea murucoides*, *Lysiloma micorphylla*, *Senna polyantha* y *Zanthoxylum fagara* (Baltazar *et al.* 2004). Además cuenta con varios elementos arbóreos nativos del Bosque tropical caducifolio como *Albizia plurijuga*, *Cedrela dugesii* y *Erythrina coralloides*, que hoy se encuentra bajo el régimen de protección ecológica por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001

6.2. Colecta de germoplasma y suelo

Se colectaron 20 muestras de suelo del sitio de estudio, 10 correspondientes al suelo nativo proveniente de la rizósfera de los macollos de *Melinis repens* en estado senescente circundante a las plantas de *E. coralloides*, y 10 de suelo nativo desprovisto de vegetación al momento de hacer el estudio; ambas muestras se emplearon para la cuantificación, comparación y selección del inóculo.

Para la obtención de las muestras de suelo, se retiró la hojarasca de la superficie para proceder a la extracción y colecta del suelo que se encontraba cerca del sistema radical. En el caso del suelo colectado de las gramíneas y del suelo desprovisto de vegetación se tomó a partir de los 0 y 20 cm de profundidad, y enseguida las muestras fueron colocadas en papel aluminio y refrigeradas para su posterior empleo de las muestras. Asimismo se colectaron semillas de las plantas muestreadas, las cuales posteriormente fueron empleadas para la germinación y obtención de plántulas para los tratamientos experimentales.

6.3. Establecimiento de lotes de plantas de *Erythrina coralloides*

Las semillas de *E. coralloides* se sometieron a germinación en condiciones de invernadero, y fueron sembradas en charolas plásticas, con una mezcla de sustrato comercial, esterilizado por el método de solarización, obteniendo cuatro lotes con 24 semillas cada uno. Una semana después de que emergieron, cada una se trasplantó por separado, en macetas de plástico con capacidad de 500 mL con la misma mezcla de sustrato estéril, se mantuvieron en invernadero con riegos constantes de agua.

Se establecieron tres lotes con 20 plantas cada uno, en macetas con capacidad de 2L. Los lotes fueron crecidos sin adición de nutrientes bajo condiciones de luz natural en un vivero. El agua se agregó según fuera necesario, para mantener el sustrato de acuerdo con su capacidad de retención de agua.

6.4. Preparación de inóculo

A las 20 muestras de suelo colectadas, se les determinó el número de esporas por el método de Gerdeman y Nicolson (1963) que se describe como sigue:

Se tomó una muestra representativa de 50 gr de suelo proveniente de las colectas realizadas en el sitio de estudio. Este suelo fue depositado en un vaso de precipitado al cual se le agregaron 2 L de agua corriente y se procedió a agitar vigorosamente por tres minutos. Se dejó reposar un minuto. Se decantó el sobrenadante sobre los tamices, previamente colocados en orden descendente (37 μm , 420 μm , 1000 μm y 2 mm), al suelo restante se le agregó agua corriente y se repitió el procedimiento antes descrito una vez más, esto debido a que el suelo era muy arcilloso. La fracción recuperada en el tamiz de 37 μm se colocó en tubos de centrifuga. Para ello se lavó cuidadosamente con agua corriente (usando una piceta).

Una vez que fueron recuperadas las muestras, estas se dividieron en varios tubos (según fuera necesario), las muestras se llevaron a un volumen final de 12 mL, de tal forma que quedarán balanceados para centrifugar a 2500 rpm durante 3 min. Se descartó el sobrenadante, posteriormente la pastilla se resuspendió con un vortex en una solución de sacarosa al 40%, llevando la muestra a un volumen final de 12 mL. Se balancearon los tubos y se centrifugaron a 2500 rpm por 15 segundos, enseguida el sobrenadante se vertió sobre el tamiz de 37 μm y se lavó con agua corriente (usando una piseta) hasta eliminar la sacarosa. Posteriormente se recuperaron el tamiz los restos del sustrato para proceder a su conteo.

El conteo se hizo empleando un microscopio estereoscópico Zeiss stemi DV4 a 30X. Una vez determinado el número de esporas, se consideraron para la inoculación las muestras que por sitio presentaron mayor número de esporas, para nuevamente realizar la extracción de esporas en 20 submuestras, para posteriormente conservarlas a 4°C.

6.5. Inoculación del sistema radicular

Se probaron diferentes maneras de la aplicación del inóculo. Un lote de plantas se estableció únicamente con un sustrato de mezcla comercial sin inóculo (control), el segundo con mezcla comercial más 50 gr de suelo nativo de la rizósfera de macollos de *Melinis repens* con esporas (tratamiento1) y el tercero plántulas inoculadas directamente sobre el sistema radical con esporas aisladas de las muestras de suelo nativo de la rizósfera de *Melinis repens* (tratamiento 2).

Para el establecimiento del tratamiento 1, se pesaron 50 gr de suelo de la rizósfera de *Melinis repens* con esporas, previamente cuantificadas, para ser depositados cerca del sistema radical de 20 plántulas. El tratamiento 2 se hizo con esporas extraídas de las 20 submuestras, igualmente provenientes de las muestras tomadas de la rizósfera de *Melinis repens*, que fueron almacenadas en tubos para centrífuga clínica con 10 mL de agua destilada a 4°C. A cada una de las muestras se les adicionó alginato de sodio al 1.5% e inmediatamente se agitó en vórtex para obtener una solución homogénea. Se vertieron 1000 µl de la suspensión con esporas en las raíces secundarias del sistema radical de cada una de las 20 plántulas, se sumergieron en una solución de CaCl₂ 1M, para polimerizar el alginato y dejar atrapadas a las esporas junto a las raíces, se colocaron en su respectivo contenedor con sustrato. Cabe mencionar que para la inoculación mediante las dos técnicas empleadas, no se aisló una especie ó género en particular de hongo micorrizico arbuscular, simplemente se tomo la diversidad de esporas encontrada en las muestras de suelo, si discriminar la presencia de otros microorganismos.

6.6. Tinción en raíces y evaluación de grado de colonización micorrízica arbuscular

Para esta prueba se emplearon 15 de las plantas producidas e inoculadas en vivero (5 control, 5 inoculadas con suelo nativo con esporas y 5 inoculación directa con esporas), se separaron las raíces del sustrato de las plantas, se limpió el

sistema radical con un pincel y agua corriente a manera de lavado, posteriormente se separaron las raíces más finas a tres niveles (siendo el nivel “a” en las raíces cercanas a la base del tallo, “b” en la parte media y “c” en la punta del sistema radical), la cantidad de raíces para cada nivel fue de aproximadamente 1gr, a manera que nos salieran 30 fragmentos de 1cm de longitud por nivel para la tinción, para lo cual se empleó el método de Phillips y Hayman (1970) que se describe como sigue:

Los fragmentos de raíces fueron colocados en tubos de ensayo para ser clarificados con una solución de KOH 10% durante aproximadamente 30 minutos a baño maría a 90°C, concluido el tiempo se procedió a hacer un lavado de las raíces con agua destilada para eliminar el KOH, enseguida se les añadió HCl 1% por 30 min, finalizado el tiempo se decantó el HCl 1%, para enseguida añadir el colorante azul de tripano al 0.05% por 30 minutos a baño maría a 90°C; finalmente se enjuagan con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, para finalmente conservarlas en lactoglicerol a 4°C para su posterior análisis.

Para el análisis, los 30 fragmentos de cada nivel (a, b y c), para cada uno de los individuos muestreados de cada lote experimental, se arreglaron en portaobjetos, y con ayuda del microscopio óptico se observaron a lo largo de cada segmento la presencia o ausencia de las estructuras fúngicas. El porcentaje de colonización endomicorrízica por estructuras y total, se obtuvo mediante las formulas siguientes formulas:

$$\% \text{ de colonización} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de segmentos colonizados}}{\text{N}^\circ \text{ de segmentos totales}} \times 100$$

6.7. Evaluación del vigor en plántulas

A cada tratamiento experimental, se les hicieron observaciones quincenales del grosor, el cual se midió en la base del tallo, número de hojas y se determinó el contenido relativo de clorofila en unidades SPAD (Soild Plant análisis Development por sus siglas en ingles), en tres hojas apicales de cada uno de los individuos con el clorofilómetro SPAD-502® (Minolta Camera Co., Ltd., Japan). Los valores SPAD indican el contenido relativo de clorofila de las hojas.

Para la evaluación de la biomasa, después de 9 meses de crecimiento en vivero, se extrajeron 15 plántulas (5 por cada tratamiento), eliminando el sustrato adherido al sistema radical, para posteriormente pesar en fresco la parte aérea y la de raíz, por separado. Para así continuar con el secado del material a 80°C por 48hrs, transcurrido este tiempo, se pesaron por separado la parte aérea y la parte radical en una balanza analítica. Para estimar el rendimiento en peso seco de las plantas inoculadas y las no inoculadas, se hizo el cálculo de la relación peso seco raíz/ peso seco brote. Además se estimó el Índice de Calidad de Dickson (ICD), para lo cual se integraron los valores de peso seco total, la altura, el diámetro del tallo y la relación parte aérea/raíz (Dickson *et al.* 1960), del modo siguiente:

$$\text{ICD} = \frac{\text{Peso seco total (g)}}{\frac{\text{altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{peso seco aéreo (g)}}{\text{peso seco radical (g)}}}$$

Por otro lado se calculó la dependencia micorrízica (DM), parámetro que integra los valores de peso seco de la planta micorrizada y el peso seco de la planta no micorrizada y se empleó la fórmula propuesta por Plenchette *et al.* (1983), luego se consideró la clasificación de DM propuesta por Habte y Manjunath (1991)

$$DM = \frac{\text{Peso seco planta micorrizada} - \text{Peso seco planta no micorrizada}}{\text{Peso seco del tallo planta micorrizada}} \times 100$$

6.8. Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas en las medias de número de esporas entre el suelo nativo desnudo y el suelo nativo de herbáceas se hizo un análisis de varianza. Debido a que la variable de conteos es una variable discreta se transformó a través de raíz cuadrada para cumplir con los supuestos del modelo lineal empleado.

Para comparar el grado de micorrización entre los diferentes tratamientos se hizo un análisis de varianza y una comparación de medias de Tukey. Para cumplir con los supuestos de este modelo se hizo una transformación de Box-Cox (Montgomery, 2006).

Se utilizó para cada una de las variables componentes del vigor (grosor del tallo, número de hojas y cantidad relativa de clorofila), un modelo de mediciones repetidas (cita libro monica) para su análisis que se describe enseguida:

$$Y_{ij} = \alpha_j + \beta_i(\alpha) + \gamma + \alpha\gamma + \varepsilon_{ij}$$

α = Tratamiento

$\beta(\alpha)$ = Planta (Tratamiento)

γ = Tiempo

$\alpha\gamma$ = Tratamiento * Tiempo

A la variable de número de hojas se le transformó a través de la raíz cuadrada para cumplir con los supuestos del modelo.

Todos los análisis se hicieron con el paquete estadístico JMP 7.0.1 (SAS Institute Inc., 2007). Los datos de la media y el error estándar se graficaron con la aplicación SigmaPlot versión 11.0.

VII. RESULTADOS

7.1. Abundancia de esporas en el suelo, cuantificadas para la selección de inóculo.

Con respecto a la abundancia de esporas en las muestras de suelo colectadas en el parque “El Cimatario”, encontramos diferencias altamente significativas ($F = 17.240$, $P = 0.0006$) entre las muestras de suelo nativo sin vegetación aparente, donde se el número de esporas cuantificado fue de 1532.80 ± 272.24 y las de suelo nativo de la rizósfera de los macollos de *Melinis repens*, donde la abundancia de esporas encontrada fue de 3703.60 ± 517.90 , (Figura 3). Razón por la cual las muestras empleadas para la inoculación fueron las de suelo de la rizósfera de los macollos de *Melinis repens*, en donde las esporas aisladas no pertenecieron a una especie ó género particular de hongo micorrízico.

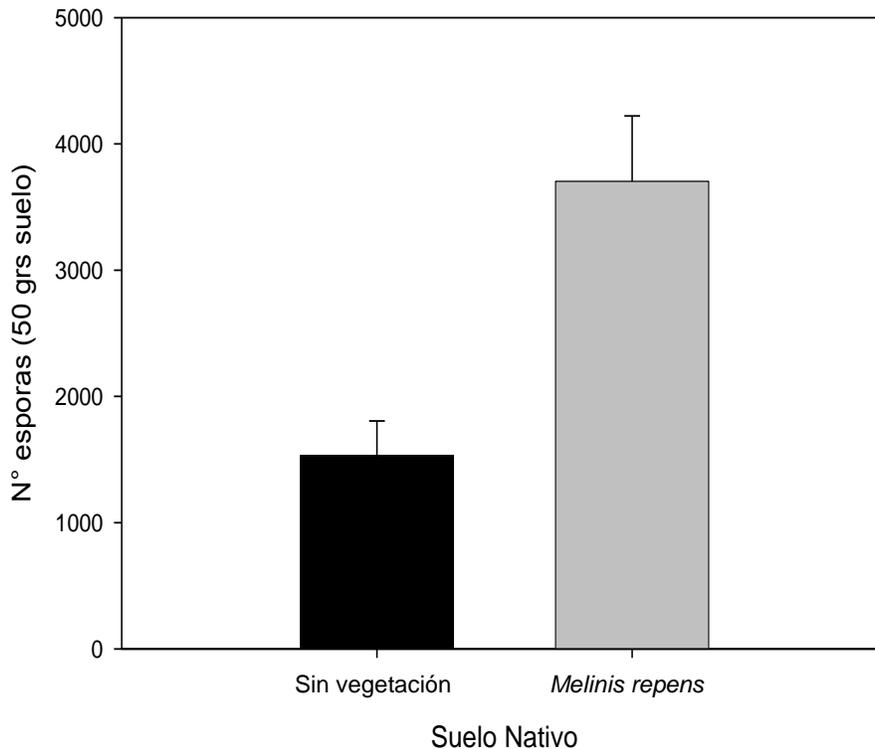


Figura 3. Número de esporas encontradas en muestras de suelo nativo sin vegetación y suelo de la rizósfera de *Melinis repenes*, colectadas en época de sequía. $n=10$, $P = 0.0006$.

7.2. Porcentaje de colonización

En cuanto al grado de colonización total, que presentaron las plántulas inoculadas con suelo de la rizosfera de *M. repens* con esporas y las inoculadas con esporas aisladas del suelo, no presentaron diferencias significativas entre si, pero si ambos contra el bloque de plantas no inoculadas ($F= 18.43$, $P < 0.0001$). El mayor porcentaje de colonización total (75.99 ± 8.2) ocurrió en las puntas de las raíces de las plantas inoculadas con esporas aisladas del suelo, mientras que en la inoculación con suelo nativo de la rizosfera de *M. repens* con esporas, alcanzó también un 75.99 ± 7.4 de colonización, pero a nivel de las raíces localizadas en la base del tallo. Por otro lado, en la parte media del sistema radical de las plantas, se colonizó más efectivamente cuando las plantas se inocularon con suelo nativo de la rizosfera de *M. repens* que contenía esporas (Figura 4).

La tendencia del porcentaje de colonización tanto de hifas ($F = 18.57$, $P < 0.0001$), como de vesículas ($F = 16.30$, $P < 0.0001$) (Figura 5 y 6 respectivamente), se comportaron de manera similar que el porcentaje de colonización total. El mayor porcentaje de colonización, se presentó en las puntas de las raíces (68.66 ± 13.72) de las plantas inoculadas con esporas aisladas del suelo y en las raíces ubicadas en la parte basal del tallo (68.66 ± 10.46), inoculadas con suelo nativo de la rizosfera de *M. repens*, fue en este último, donde la colonización de las raíces de la parte media del sistema radical tuvieron mayor porcentaje de colonización por hifas (59.33 ± 10.18). El comportamiento de la infección por vesículas, fue mayor en las raíces ubicadas en la parte de la punta del sistema radical (63.32 ± 11.15) de las plantas inoculadas con esporas aisladas del suelo, seguidas por un porcentaje de 56.66 ± 9.77 encontrado en las raíces ubicadas en la zona basal del tallo de plantas inoculadas con suelo nativo de la rizosfera de *M. repens* con esporas, mientras que en la zona media del sistema radical, en ambos tratamientos, el promedio de la infección por vesículas resultó por mucho superior (43.26 ± 14) a la encontrada en las plantas que no fueron inoculadas (3.33 ± 1.05).

Tras la observación de las estructuras micorrízicas presentes en las raíces solo se observó la presencia de hifas inter y extraradicales (figura 7e y 8b), que se cuantificaron por igual, además se encontraron vesículas (figura 7c y 8b). Solo en 6 plantas, de las 15 muestreadas, hubo presencia de arbuscúlos (figura 7d) que no se podían distinguir con claridad, por lo que no fueron tomados en cuenta para el porcentaje de colonización. Más sin embargo la presencia de dichas estructuras existía. También se llegaron a apreciar claras estructuras de esporas adheridas a la pared celular de algunas raíces secundarias (7a y b), estas estructuras se diferenciaban bien porque en el interior no presentaban cuerpos lipídicos como en las vesículas, además de que estaban teñidas de un azul más intenso que el de las vesículas u otras estructuras halladas en las raíces.

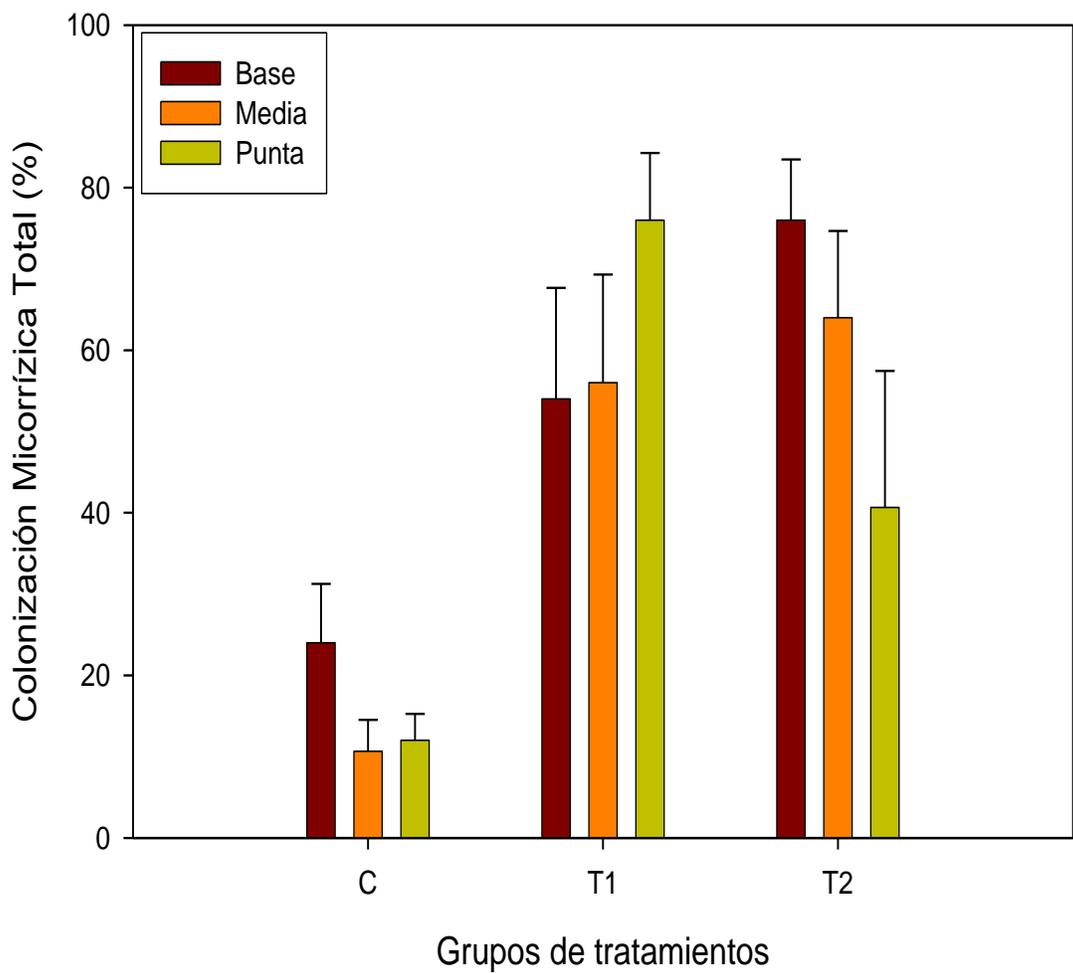


Figura 4. Porcentaje de colonización total de plántulas de *E. coralloides*. El gráfico muestra claramente que los dos tratamientos (T1 y T2) entre sí, no muestran diferencias, pero si comparados contra el control (C), mostrándose estadísticamente diferentes ($P > 0.0001$).

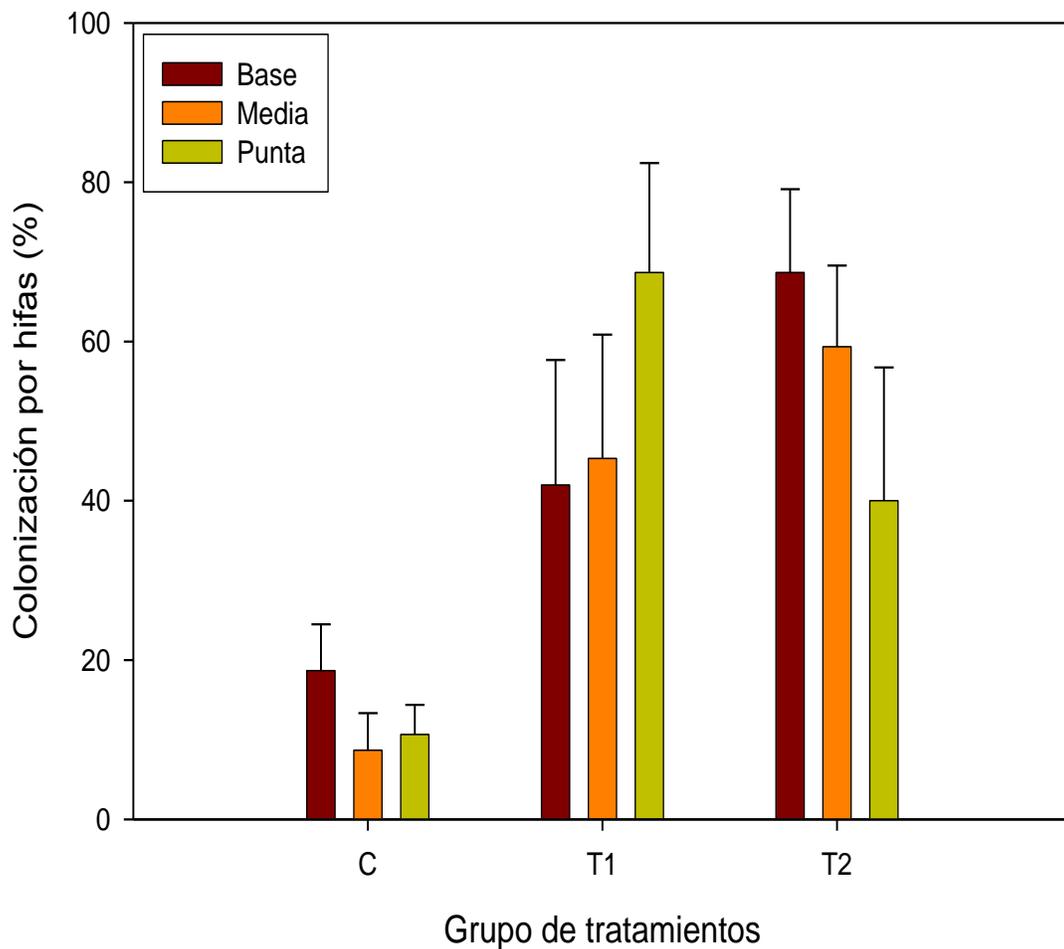


Figura 5. Porcentaje de colonización de hifas en plántulas de *E. coralloides*. El gráfico muestra los datos originales (sin transformar), y los datos estadísticos presentados corresponden a un análisis de ANOVA realizado con los datos sometidos a una transformación de Box Cox. Se aprecia claramente que los dos tratamientos (T1 y T2) entre sí, no muestran diferencias, pero comparados contra el control (C), son estadísticamente diferentes ($P > 0.0001$).

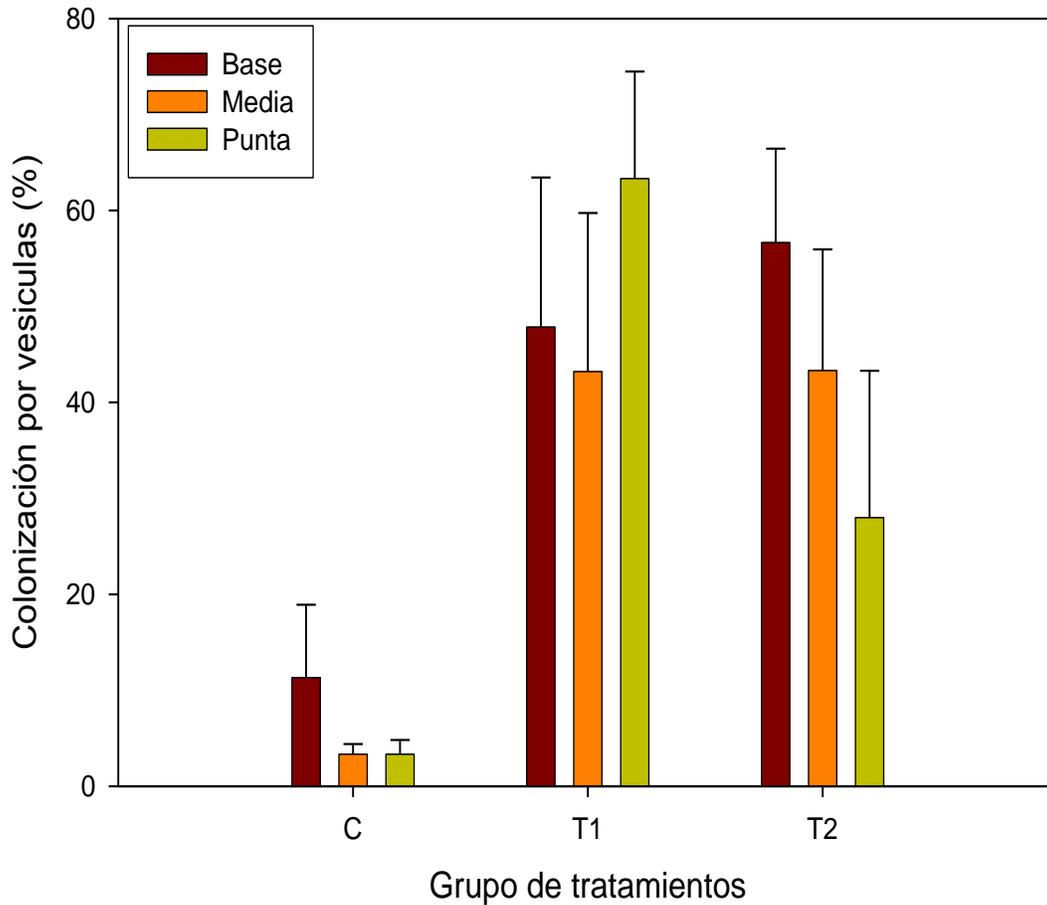


Figura 6. Porcentaje de colonización de vesículas en plántulas de *E. coralloides*. El gráfico muestra los datos originales (sin transformar), y los datos estadísticos aquí presentados corresponden a un análisis de ANOVA realizado con los datos sometidos a una transformación de Box Cox. Se muestra claramente que los dos tratamientos (T1 y T2) de manera general sin considerar el nivel, entre sí no muestran diferencias, pero comparados contra el control (C), si hay una diferencia significativa ($P > 0.0001$).

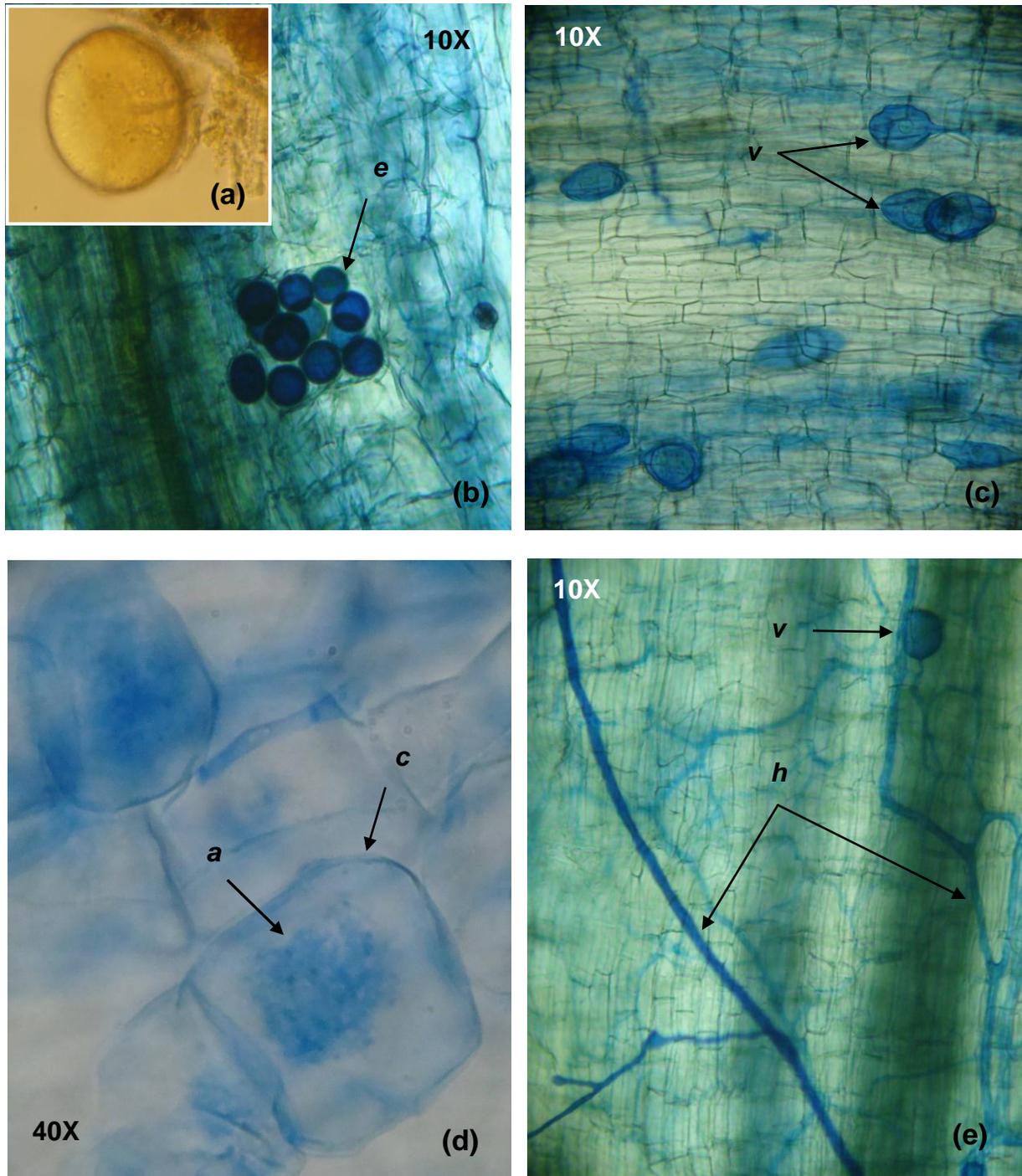


Figura 7. Estructuras diagnósticas de HMA en raíces infectadas por micorrizas. a) espora aislada en muestra de suelo, b) esporas teñidas con azul de tripano en muestra de raíz de planta colonizada con esporas aisladas de suelo, c) en un segmento de raíz de observa una cantidad considerable de vesículas, d) en el interior de una célula se observa un arbusculo un poco viejo y colapsado, e) la característica de una micorriza vesículo-arbuscular, es la presencia de hifas cenocíticas. e= espora; v= vesícula; a= arbusculo; c= célula; h= hifa.

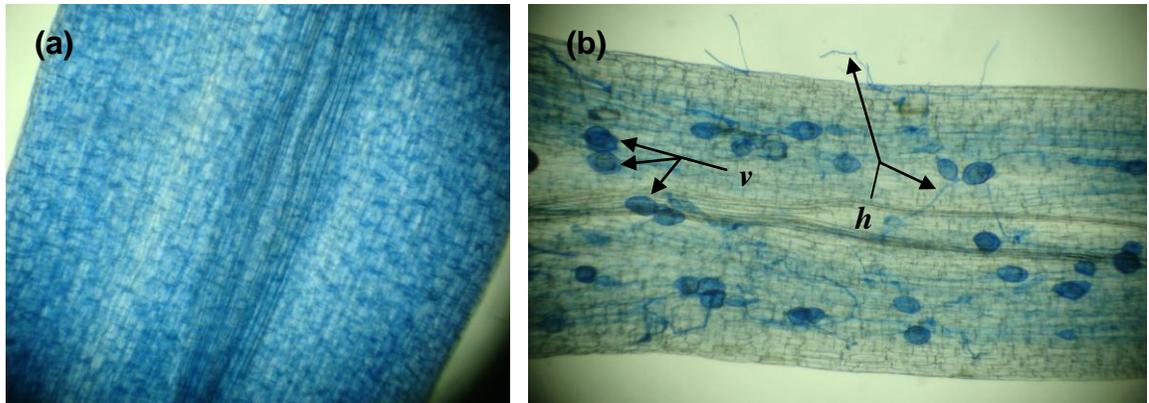


Figura 8. Colonización de plántulas de *Erythrina coralloides*. Se aprecia claramente la diferencia entre una raíz de una planta control no colonizada por HMA (a) y una si colonizada del tratamiento de inoculación con suelo de rizosfera de *M. repens* con esporas (b), esta última muestra estructuras típicas de una colonización micorrízica, teñidas de azul, como lo son las hifas y las vesículas. *v*= vesícula; *h*= hifa.

7.3. Evaluación del vigor de plantas juveniles de *E. coralloides*.

7.3.1. Grosor

La variable “tratamientos” incluida en el modelo de mediciones repetidas, empleado para el análisis del grosor y sometido a análisis de varianza, arrojó datos estadísticamente significativos entre las tres condiciones de inoculación implementadas ($F= 298.2$ y $P< 0.001$). Si se observa la figura 9, se pueden apreciar los valores máximos del grosor alcanzados al final de experimento, obteniendo para C 6.16 ± 0.80 , para T1 6.93 ± 0.80 y para T2 7.50 ± 0.80 , por lo que resultó evidente que el bloque de plantas inoculadas con suelo nativo de rizosfera de *M. repenes* que contenía esporas, presentó mayor crecimiento durante el experimento a pesar de las oscilaciones evidentes entre la quincena 3 y 9.

Por otro lado para la variable “planta [tratamiento]”, que fue igualmente considerada dentro del modelo de mediciones repetidas, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($F= 83.15$ y $P< 0.0001$). Independientemente de la condición de inoculación, que marcó diferencias en el incremento del grosor de las

plantas inoculadas, las plantas no mostraron lecturas uniformes durante el periodo de experimentación, es decir, que cada una de las plantas correspondientes a cada uno de los tres bloques de inoculación, las plantas mostraron variaciones a pesar de estar sometidas a las mismas condiciones por bloques (luz, temperatura y disponibilidad de agua).

El componente “tiempo” del modelo, también resulto altamente significativo ($F=12.47$ y $P<0.0001$), al observar la figura 9, podemos apreciar un incremento del grosor en las plantas sometidas a las tres condiciones de inoculación, a partir de la quincena 1 hasta la 8 (de 4.84 ± 0.44 a 6.19 ± 1.27 sin inoculación, de 6.01 ± 0.44 a 7.03 ± 1.27 inoculación con esporas aisladas de suelo y 5.97 ± 0.44 a 8.52 ± 1.27 inoculación con suelo nativo de la rizosfera de *M. repens*). Seguido por un decremento del grosor, establecido en la quincena 9 (sin inóculo 5.82 ± 0.81 , 6.67 ± 0.81 para las inoculadas con esporas aisladas del suelo y 7.41 ± 0.81 en las inoculadas con suelo nativo de la rizosfera de *M. repens* con esporas), manteniéndose así hasta la quincena 16, para finalmente en la quincena 18, registrar nuevamente un incremento del grosor (6 ± 0.8 para plantas sin inóculo, de 6.7 ± 0.81 las inoculadas con esporas aisladas del suelo y para las inoculadas con suelo nativo de rizosfera de *M. repens* 7.2 ± 0.80).

A pesar de que las variables “planta [tratamiento]” y “tiempo” del modelo mostraron diferencias significativas en la variación del grosor. La variable “tratamientos” tuvo una mayor influencia en el incremento del grosor inducida por las técnicas de inoculación aplicadas a las plantas.

7.3.2. Número de hojas

En lo que respecta al número de hojas, cuantificado en las plantas durante las 19 quincenas, el modelo sometido a análisis de varianza con los datos de número de hojas transformados, arrojó datos estadísticamente significativos para la variable “tratamiento” ($F=22.35$ y $P<0.0001$), se puede apreciar en la figura 10, la tendencia de los valores promedio de los datos originales (sin transformar) del

número de hojas, en donde el valor promedio máximo de hojas producido al final del experimento (12.89 ± 1.05), fue obtenido por las plantas inoculadas con suelo nativo de la rizosfera de *M. repens* que contenía esporas, seguido por las plantas inoculadas con esporas aisladas (12 ± 1.09); mientras que las plantas sin inóculo exhibieron un valor promedio de 9 ± 1.14 .

Por otro lado la variable “planta [tratamiento]” del modelo evaluado también resultó estadísticamente significativa ($F=7.82$ y $P < 0.0001$), a pesar de que las plantas mostraron un incremento en la producción de hojas dependiendo de la condición de inoculación, las plantas se mostraron diferentes entre si con respecto a la producción de hojas a pesar de que los bloques de tratamientos se encontraban bajo las mismas condiciones de acuerdo con la técnica de inoculación empleada.

Con respecto a la variable “tiempo” considerada en el modelo de mediciones repetidas, la figura 10 muestra la clara influencia del tiempo sobre la pérdida de hojas establecida de la quincena 1 a la 9, al punto de pérdida total del follaje y la producción de hojas abarcó de la quincena 14 a la 19.

7.3.3. Cantidad relativa de clorofila

En lo que concierne a la cantidad de clorofila, la cual se cuantifico en unidades SPAD, la variable “tratamiento” considerada en el modelo, mostró alta significancia ($F= 16.32$ y $P < 0.0001$), en la figura 11, se presentan los valores promedio obtenidos al final del experimento, para las plantas no inoculadas (C) fue de 23.54 ± 2.36 , para el caso de las plantas que fueron inoculadas con esporas aisladas del suelo (T1), exhibieron una cantidad promedio de clorofila de 27.22 ± 2.36 y las plantas que fueron inoculadas con suelo nativo de la rizosfera de *M. repens* (T2), se registró un valor promedio de 28.80 ± 2.36 , siendo estas últimas las que exhibieron el valor promedio de clorofila en las hojas más alto.

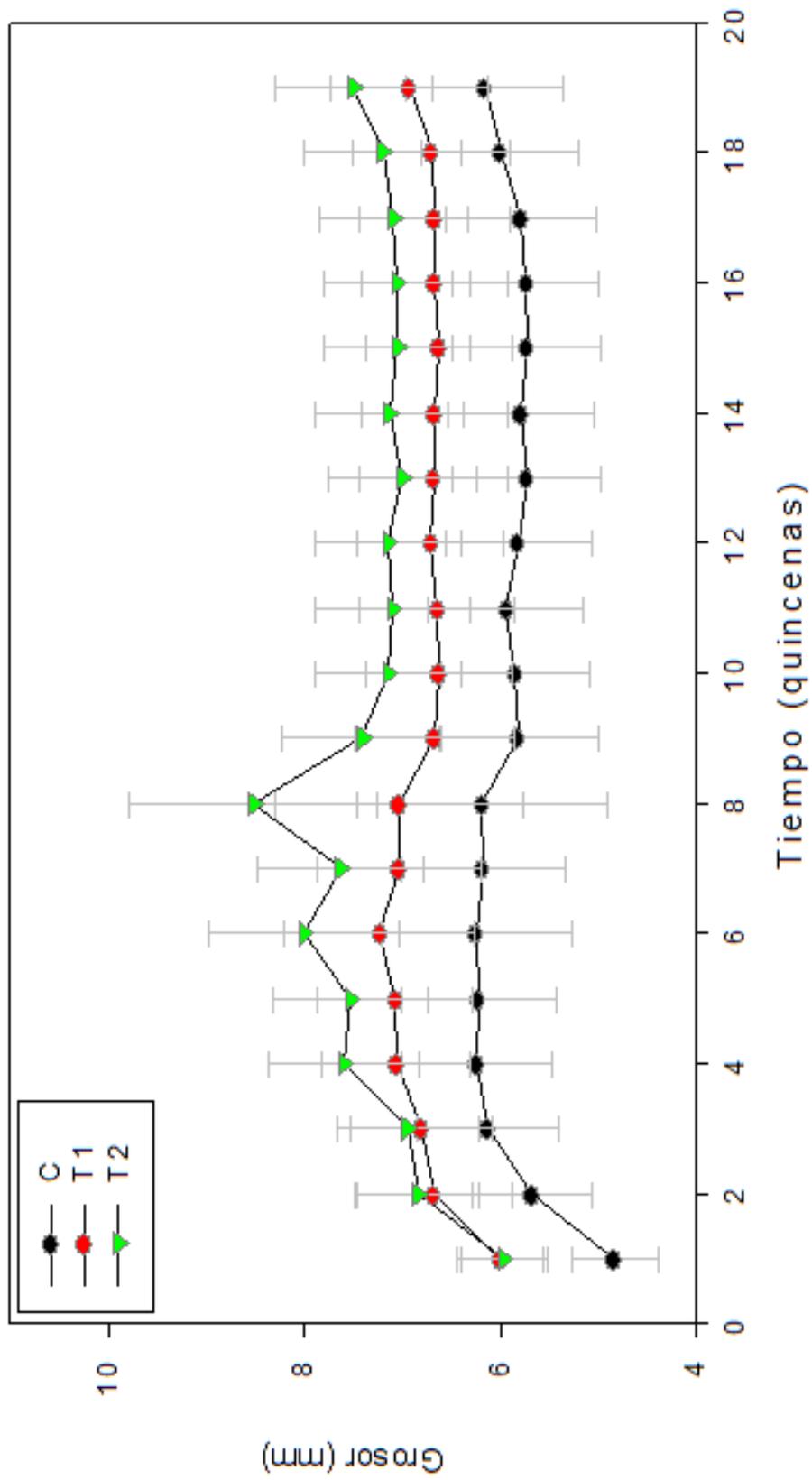


Figura 9. Efecto sobre el grosor promedio de las plántulas de *Erythrina coralloides*, inoculadas durante 19 quincenas con HMA nativos inoculados por dos técnicas (T1: suelo nativo con vegetación que contiene esporas y T2: Con esporas aisladas del suelo nativo). P (<0.0001).

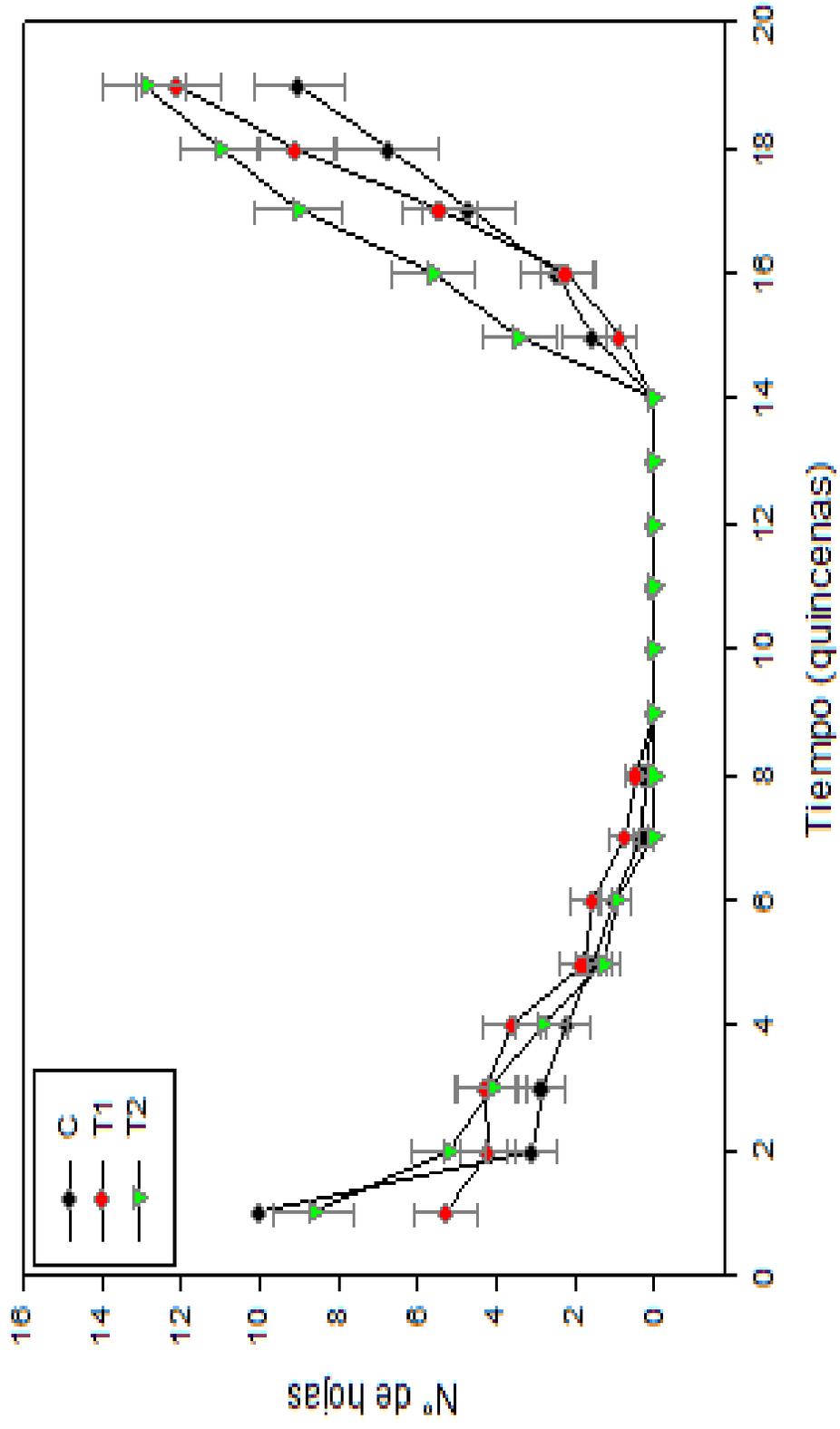


Figura 10. Cambio en el n° de hojas en *Eritrina coralloides* D.C., por efecto de la inoculación con un consorcio de HMA nativos, aislados de la rizosfera de *Melinis repens* en época de sequía. n = 19, P(<0.0001).

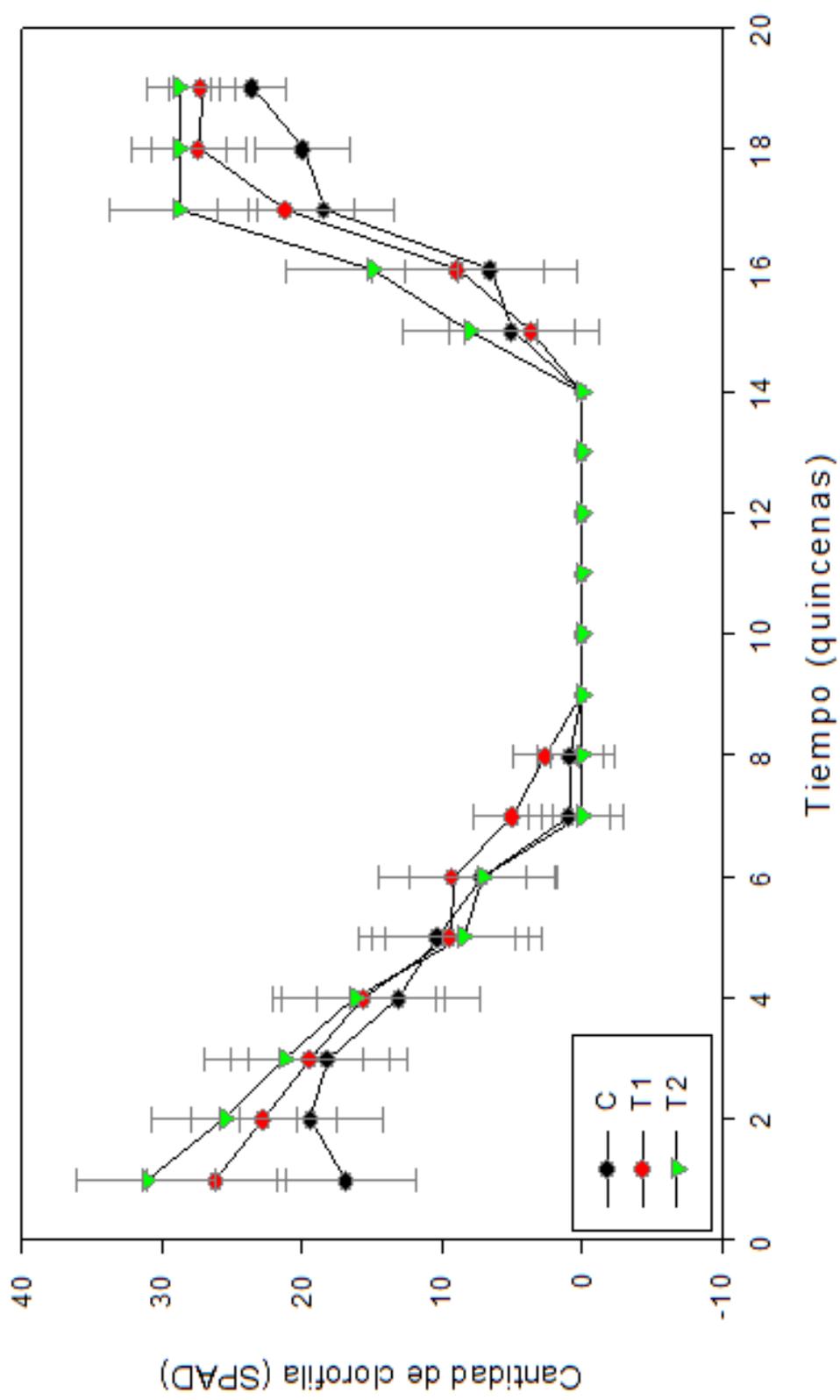


Figura 11. Efecto del método de inoculación de un consorcio de HMA nativos sobre el grosor promedio de *Eritrina coraloides* ($P < 0.0001$). T1= tratamiento1 (inoculación suelo nativo con esporas de rizosfera de *Melinis repens*), T2= tratamiento2 (inoculación con esporas aisladas del suelo) y C= control (sin HMA).

El efecto de la variable “planta [tratamiento]” en el modelo, exhibió altas diferencias significativas ($F= 7.13$ y $P< 0.0001$). Si bien la tendencia del incremento de la cantidad relativa de clorofila, fue determinada por el método de inoculación empleado en cada uno de los tres bloques, cabe mencionar que los individuos en cada uno de los tratamientos, no mostraron una tendencia uniforme ante la producción relativa de clorofila.

La variable “tiempo” considerada en el modelo, igualmente resultó estadísticamente significativa ($F= 111.49$ y $P< 0.0001$), en la figura 11, se puede observar que el comportamiento de las oscilaciones en la cantidad de clorofila, que si bien fue determinado por la técnica de inoculación, esta sigue el mismo patrón de la defoliación y el rebrote de follaje, es decir, que hubo un periodo de descenso (de la quincena 1 a la 9), un periodo refractario en el que no hubieron lecturas de clorofila (de la quincena 9 a la 14), seguido por un periodo de ascenso (de la quincena 14 a la 19), y solo en el caso de las plantas inoculadas con esporas aisladas del suelo y las inoculadas con suelo nativo de la rizósfera de *M. repens*, nuevamente llegó a un periodo en el que ya no hubo mayor producción de clorofila por parte de las hojas.

7.4. Rendimiento en peso seco (raíz/brote).

Como se muestra en la figura 12, las diferencias de la razón raíz/ brote, entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas se exhiben estadísticamente significativas ($F= 4.4567$ y $P> 0.0357$). El valor promedio más bajo de la razón raíz/brote obtenido para las plantas no inoculadas fue de 0.3935 ± 0.05 , seguido por las plantas inoculadas con suelo nativo de la rizosfera de los macollos de *M. repens* con esporas, con un 0.4495 ± 0.04 , mientras que las plantas inoculadas con esporas aisladas de suelo de macollos de *M. repens* mostraron un valor promedio de 0.6245 ± 0.07 , siendo este último valor el más alto.

Los valores promedios obtenidos del Índice de Calidad de Dickson (ICD), se pueden apreciar en la tabla 1, donde se muestra que para las plantas no

inoculadas, el valor promedio fue de 1.78 ± 1.76 , valor que fue por mucho el más bajo, comparado con los obtenidos, tanto para las plantas inoculadas con esporas aisladas del suelo de los macollos de *M. repens*, el cual fue de 5.72 ± 1.76 , como para las plantas inoculadas con suelo nativo proveniente de los macollos de *M. repens* con esporas el cual fue de 3.97 ± 1.76 . Por otro lado del cálculo de la dependencia micorrízica (DM) para los dos tratamientos de plantas inoculadas, se obtuvieron los siguientes valores: para las plantas inoculadas con esporas aisladas del suelo de la rizosfera de los macollos de *M. repens* fue de 37.68 ± 10.95 , mientras que para las plantas inoculadas con suelo nativo de la rizosfera de los macollos de *M. repens* fue de 50.39 ± 7.35 (tabla 1)

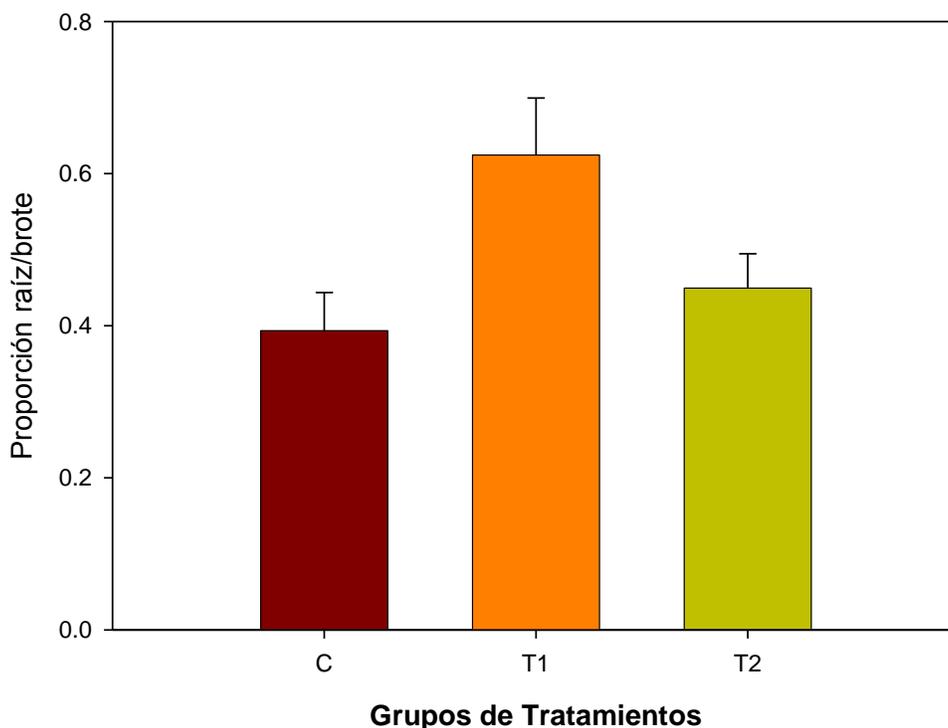


Figura 12. Valores promedio del peso de tallos y de raíz de las plántulas de *Erythrina coralloides*, sometidas a tres tratamientos diferentes. n= 5. Peso de tallos F = 1.27, P = 0.31 y peso de raíz 1.45, P = 0.27.

Tabla 1. Dependencia micorrízica e Índice de Calidad de Dickson obtenidos de los grupos de tratamientos (T1 y T2).

| <i>Tratamientos</i> | <i>ICD</i> | <i>Dependencia Micorrízica (%)</i> |
|----------------------------|-------------------|---|
| C | 1.78 ± 1.76 | - |
| T1 | 5.72 ± 1.76 | 37.68±10.95 |
| T2 | 3.97 ± 1.76 | 50.39±7.35 |

Los valores dados para el ICD y DM son de la media y el error estándar.

VIII. DISCUSIONES

8.1 Comparación del número de esporas en dos tipos de muestras de suelo.

Las diferencias resultantes de la comparación del número de esporas entre el suelo nativo “desnudo” (desprovisto de vegetación al momento del muestreo) y el suelo nativo de la rizosfera de *M. repens*, fueron más que evidentes. Destacando con un mayor número de esporas el suelo nativo de la rizosfera de *M. repens* con un promedio de 3703.60 ± 517.90 esporas en 50 gr de suelo. Dicha cantidad de esporas resultó por mucho superior a las cuantificadas en el suelo nativo “desnudo” (sin vegetación aparente al momento del muestreo) (1532 ± 272.24). Además el número de esporas obtenido directamente del suelo nativo de la rizosfera de *M. repens* de este estudio resulta superior, comparado con el obtenido por García y Malda (2009), quienes cuantificaron un número de esporas muy bajo (1553.5 esporas en 50 gr de suelo) en los cultivos trampa iniciados con muestra de suelo de rizosfera de *M. repens*.

La diferencia entre las esporas contabilizadas en este estudio y las señaladas por García y Malda (2009), puede deberse a la diferente composición vegetal entre los sitios de estudio. Así mismo la colecta del suelo empleado para la inoculación de las plantas en este estudio, se hizo en septiembre, época en la que el pasto (*M. repens*) se encontraba seco. Por lo anterior, el suelo nativo proveniente de la rizosfera de *Melinis repens* en época se sequía podría ser considerado como un “cultivo trampa natural” que proporcione una buena fuente de inóculo, ya que como se menciono anteriormente, los valores obtenidos en las muestras del suelo de la rizosfera de *M. repens* resultó considerablemente superior, comparado con el número de esporas obtenidos de “cultivos trampa” realizado por García y Malda (2009). Además se sabe que la inoculación por medio de esporas puede ser relativamente más benéfico para las plántulas que la inoculación por una vía intacta de red de hifas (Moora, 2004).

Por otro lado, Klironomos y Hart (2002), encontraron que los géneros de *Glomus* y *Acaulospora* pueden colonizar mediante esporas, fragmentos de raíz colonizada e hifas, mientras que los géneros *Gigaspora* y *Scutelospora*, colonizan principalmente por espora, limitándose a la colonización a partir de fragmentos de raíces infectadas. Lo que nos da la idea de que el considerar tomar una porción de suelo de un sitio como fuente de inóculo, podría considerarse ventajoso desde el punto de vista en el que el tomar una muestra de suelo se podría encontrar cualquiera de los cuatro géneros existentes de endomicorrizas, en forma de espora, en raíces infectadas o en una red de hifas, lo que podría elevar el porcentaje de colonización de los hospederos empleados. Además se sabe que el mantenimiento de la diversidad vegetal, variabilidad y productividad de los ecosistemas pueden ser factores condicionados por la diversidad del hongo simbiote (van der Heijden *et al.* 1998).

El utilizar inóculos mixtos y nativos se justifica plenamente, debido a que en condiciones naturales las plantas están expuestas a una mezcla de especies de HMA (van der Heijden *et al.* 1998). Adicionalmente al utilizar inóculos mixtos se aumentan las probabilidades de que los hongos más apropiados se hagan dominantes en la eventualidad de que las condiciones del suelo cambien con las diferentes etapas sucesionales (Cuenca *et al.* 2003).

Además las cepas nativas están adaptadas y aclimatadas a las condiciones del sitio por lo que las interacciones con los organismos del sitio no se verían afectadas, que en contraste, cepas alóctonas pueden atacar a los microorganismos nativos por competencia y desplazamiento de los nativos, por otro lado sumemos que un hongo alóctono puede no siempre ser benéfico, lo que además puede deberse a la selectividad del hospedero del hongo micorrízico.

8.2. Porcentaje de colonización de plántulas con y sin inóculo.

La efectividad de las técnicas de inoculación en este trabajo fue notable. Es evidente al comparar la inoculación con esporas aisladas del suelo de la rizosfera

de *M. repens* y la inoculación con suelo nativo de la rizosfera de *M. repens* que contenía esporas, que presentaron un valor promedio superior al 75% de colonización, contra el valor promedio de 24% exhibido por las plantas no inoculadas. El comportamiento para el porcentaje de colonización por hifas tanto como para el porcentaje de colonización por vesículas fue muy similar al porcentaje de colonización total. El porcentaje de colonización fue elevado comparado con los trabajos de Frioni *et al.* (1999), García-Sánchez (2005) y Monroy-Ata *et al.* (2007), quienes reportan valores que oscilan entre 62% y 36% para las especies de *Erythrina crista-galli* (nativa de Uruguay), *Prosopis* sp., *Acacia* sp., y *Mimosa* sp.

El hecho de que el comportamiento de la colonización micorrízica resultara similar en ambas técnicas de inoculación, nos indica que sin importar la técnica empleada para la inoculación, para la especie *Erythrina coralloides*, el uso de estos HMA es favorable. La presencia de micorrizas en el control, a pesar de haber empleado una mezcla comercial, como sustrato inerte, indica que aún en condiciones de vivero puede haber la presencia de micorrizas que lleguen a infectar las raíces, por lo que podríamos estar hablando de una dispersión anemófila de esporas dentro del vivero, lo que inició la colonización de las plantas control.

Existe una categorización de la colonización de las raíces, establecida por Kormanik y McGraw (1982), en la que definen cinco clases de colonización, y de acuerdo a esta clasificación, ambos tratamientos (T1 y T2) entran en la clase 4 (51 – 75%), que podría considerarse como una alta colonización, mientras que nuestro grupo control se ubicaría en la clase 2 (6 – 25%) considerándose como baja, esto nos sirve como referencia para asegurar que la colonización de las plántulas de ambos tratamientos se estableció adecuadamente.

Las plántulas con una colonización clase 4, presenta una cantidad alta de vesículas que podría incrementar la infección y continuar la dispersión del hongo, ya que existe evidencia de que las vesículas intraradicales por si solas, pueden

actuar como propagulos y contribuir significativamente para la infección de las raíces más próximas (Biermann y Linderman, 1983).

8.3. Efecto del inóculo de HMA sobre el vigor de plántulas de *E. coralloides*.

Dentro de los parámetros considerados para la evaluación del vigor fueron el grosor de la base del tallo, la cantidad de hojas, la cantidad de clorofila de las hojas y la biomasa seca en razón raíz/brote. Además de estimaron el Índice de Calidad de Dickson y la Dependencia Micorrízica.

La inoculación con el consorcio de HMA en *E. coralloides*, con los dos métodos de inoculación descritos, resultó en un incremento del grosor de la base del tallo de los tratamientos 1 y 2 (6.93 ± 0.80 y 7.50 ± 0.80 , respectivamente), los cuales fueron superiores al control (6.16 ± 0.80), lo que sin duda nos indica que los HMA favorecieron para un mayor almacenamiento de agua a nivel del tallo. El aumento gradual del grosor de la base del tallo, en las primeras 9 quincenas de iniciada la inoculación, en las plántulas de 9 meses de edad, se debe a que todos los nutrientes de las hojas próximas a senecer son movilizados al tallo, donde se almacenan suficientes nutrientes para que estos funcionen como reserva, una vez que la planta deje de tener hojas.

Este comportamiento del incremento del grosor por efecto de la inoculación también ha sido observado en otras leguminosas tales como *Acacia mangium*, plantas que después de 160 días de haber sido inoculadas con una mezcla de HMA mostraron un incremento en el grosor final de 2.28 cm mientras que las plantas control presentaron un valor de 2.4 cm (Satter *et al.* 2007). En otro estudio en el que emplearon el mezquite amargo (*Prosopis articulata*), al ser inoculado con HMA, mostró un incremento de 40 mm al final de 10 meses de experimentación en vivero (Bashan *et al.* 2009). Si comparamos los valores obtenidos para *E. coralloides* y los reportados por Bashan *et al.* (2009) y Satter *et al.* (2007), los de *E. coralloides* resultan por mucho superiores. Pero hay que

considerar que *Prosopis articulata* y *Acacia mangium* son de crecimiento lento debido a la producción de madera en sus tallos que es más gruesa y dura que la producida por *E. coralloides*, lo que favorece a un crecimiento más rápido. Se ha documentado en *Circidium mycrophilum* que el aumento del diámetro del tallo es un indicador de la buena salud de las plántulas (Bowers y Turner, 2001).

El ciclo de caída y renovación de follaje de una típica planta caducifolia se ilustra claramente en la figura 11. Es muy evidente la diferencia en la cantidad de hojas de ambos tratamientos (T1 y T2), comparados con los cuantificados en el grupo control. El hecho de que, al iniciarse el nuevo ciclo de crecimiento hubiera una mayor producción de hojas por parte de las plantas que fueron inoculadas, concuerda con lo citado por Daft y Nicolson (1969), quienes demostraron que a mayor porcentaje de colonización y mayor número de esporas, hay una mayor producción de hojas apicales y mayor retención de las hojas inferiores, por lo que infirieron que las micorrizas estimulan la ontogenia y el retraso de la senescencia de las hojas, esto último podríamos esperarlo si prolongamos el experimento al siguiente ciclo de senescencia de las plantas. La mayor abundancia de hojas en plantas inoculadas es un factor positivo para el aporte de nutrimentos al suelo circundante (Terrones *et al.* 2004). Además de que el poseer un mayor número de hojas, aumenta la superficie fotosintéticamente activa de la planta, permitiendo una mayor fijación de CO₂ que efectuará fotosíntesis.

El comportamiento de la concentración relativa de clorofila (SPAD) a lo largo del tiempo, al igual que el número de hojas, es un comportamiento típico de las caducifolias. El incremento de la cantidad relativa de clorofila, para el final del experimento, para el tratamiento T1 y T2 (27.22 ± 2.36 y 28.80 ± 2.36 , respectivamente), en comparación con el control (23.54 ± 2.36), fue más que evidente. El incremento de la cantidad de clorofila en plantas inoculadas contra plantas no inoculadas, también ha sido señalado por Pereira *et al.* (2001), quienes registraron un incremento en el contenido de clorofila en plántulas de *Eucalyptus camaldulensis* (30-37 unidades SPAD) que fueron inoculadas con dos especies de micorrizas (*G. intraradices* y *G. mosseae*), en comparación con las plantas sin

inoculo (24 unidades SPAD). Por otro lado también Satter *et al.* (2007) registraron en plantas de *Acacia mangium* inoculadas con una mezcla de HMA, durante 160 días, un valor de 45 unidades SPAD contra un 41 unidades SPAD para las plantas sin inóculo.

Cabe mencionar que se ha demostrado que la asociación de HMA en las raíces de las plantas producen diversos cambios y/o modificaciones a nivel fisiológico, entre los que destacan los incrementos de la actividad fotosintética por efecto de la mayor capacidad de fijación de CO₂ y por consiguiente, el incremento de las tasas de crecimiento y biomasa producida, que las plantas micorrizadas presentan en comparación con plantas control (Alarcón y Ferrera, 1999). Además se ha encontrado una alta correlación entre los valores SPAD y el contenido de nitrógeno en las hojas de plantas de importancia agrícola como el tomate (Rodríguez Mendoza *et al.* 1998), en sorgo (Rangel *et al.* 2002), en papa (Wu *et al.* 2007), en maíz (Sánchez *et al.* 2009) y en arroz (Gholozadeh *et al.* 2009).

Del cálculo de la proporción raíz/brote de las plantas de *E. coralloides*, resultó en diferencias estadísticamente significativas ($F= 4.4567$, $P> 0.0357$), entre la comparación de las técnicas de inoculación de las plántulas y las no inoculadas. La alta proporción raíz/brote en la plantas inoculadas puede ser atribuido al efecto de la infección por HMA, los cuales podrían haber incrementado la absorción de nutrientes, dando lugar a un alto incremento de la biomasa de raíz/brote con un crecimiento uniforme (Kung'u, 2004). Hay diversos trabajos realizados con plantas nativas alrededor del mundo, en los que por efecto de la inoculación con micorrizas se produce un alto incremento de la biomasa de raíz y brote en plántulas de entre 2 y 7 meses de iniciada la inoculación (Huante *et al.* 1993; Gardezi *et al.* 2000; Pereira *et al.* 2001; Kung'u, 2004; Onguene y Kuyper, 2005; Camargo-Ricalde *et al.* 2010).

El Índice de Calidad de Dickson se ha utilizado exitosamente para la selección de plántulas que tengan el potencial para ser empleadas para reforestación (Alonso, 2005). En este estudio es claro que las plantas inoculadas dieron los valores más

altos, en comparación con las plantas no inoculadas, esto es bueno ya que lo deseable es que la planta alcance valores máximos, lo cual implica que por una parte el desarrollo de la planta es grande, y que al mismo tiempo las fracciones aéreas y radical están equilibradas (Reyes-Reyes *et al.* 2005).

Considerando el valor obtenido de la fórmula de la Dependencia micorrízica (DM) para ambos tratamientos de inoculación y basándonos en las cinco categorías propuestas por Habte y Manjunath (1991), los valores numéricos de T1 y T2 entran en la tercera categoría la cual corresponde a las plantas moderadamente dependientes, es decir, que no precisan obligadamente de la micorriza, pero bajo determinadas condiciones (como lo sería un bajo contenido de fósforo en el suelo) crecen mejor con ella (Román, 2003) . Lo que se encontró en este estudio es comparable con los resultados de Habte y Manjunath (1991) donde *Leucaena retusa* y *Sesbania grandiflora* se ubican en la misma categoría que *E. coralloides*.

El hecho de que esta especie de leguminosa fuera micótrofa es importante debido a que las leguminosas son una fuente importante como formadoras de “islas de recursos”, las cuales son encargadas de acelerar en cierta medida el proceso sucesional; además de que estas especies vegetales son una fuente importante de aportación de nitrógeno al suelo. Y en contraste plantas no micótrofas en sitios donde el reingreso de los propágulos de MA es muy lento, el proceso sucesional puede estancarse obstaculizando el funcionamiento adecuado de plantas que si requieren de la micorrización (Camargo-Ricalde y Dhillion, 2003).

Por otro lado las micorrizas pueden ser pre-requisitos para la nodulación de las leguminosas en suelos con bajos estatus de fósforo, porque *Rhizobium* sp., requiere de la asociación con HMA para satisfacer la alta demanda de fósforo para la nodulación y fijación de N₂ (Camargo-Ricalde *et al.* 2010).

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir, que de la comparación entre las muestras de suelo sin vegetación y las muestras de suelo nativo de la rizósfera de *Melinis repens*, de esta última se contabilizó el mayor número de esporas (3703.60 ± 517.90). Con lo que respecta al porcentaje de colonización, tanto para la inoculación con esporas asiladas del suelo de la rizósfera de *Melinis repens* como para la inoculación con suelo nativo de la rizósfera de *Melinis repens* que contenía esporas, el valor promedio obtenido fue superior al 75%, contra un 24% exhibido por el bloque del control, correspondiendo así a una colonización tipo 4 considerada como alta colonización.

La implementación de dos diferentes técnicas de inoculación con HMA, tuvo un efecto significativo, al final de los 9.5 meses de crecimiento y experimentación, sobre el vigor de las plántulas de *E. coralloides* que fueron colonizadas, en comparación con las plántulas no inoculadas (control). La colonización del sistema radical incrementó el grosor de la base del tallo (6.16 ± 0.80), el número de hojas se exhibió superior (12.89 ± 1) y en los valores de la cantidad relativa de clorofila en las hojas, el tratamiento 1 y 2 se mostraron evidentemente más altos (27.22 ± 2.36 y 28.80 ± 2.36 , respectivamente) en comparación con el bloque de plantas no inoculadas.

Con respecto a la proporción raíz/brote igualmente los valores más altos fueron exhibidos por las plantas inoculadas ($T1 = 0.6245$ y $T2 = 0.4495$). Para el índice de calidad de Dickson estimado, mostraron los valores más altos las plantas inoculadas, en comparación con el bloque control. Por último, de la estimación de la dependencia micorrízica se encontró que las plantas de *E. coralloides* inoculadas son moderadamente dependientes con un valor de entre 37 y 50% de dependencia.

Para fines prácticos en la implementación de inoculación de plantas de *Erythrina coralloides*, consideramos que la aplicación de suelo nativo de la rizósfera de *Melinis repens* con esporas es la más conveniente, ya que además de adicionar esporas para producir la colonización, esta técnica además proporciona suelo nativo del sitio lo podría ayudar a que la planta se adapte más fácilmente a las condiciones ambientales y edáficas. Además de que las esporas son menos manipuladas con esta técnica.

X. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera L. I., V. Olalde Portugal, M. R. Arriega, R. Contreras Alonso., (2007), Micorrizas arbusculares, en *Ciencia Ergo Sum*, 14 (003): 300-306.

Alarcón A. y R. Ferrera Cerrato, (1999), Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas., en *Terra Latinoamericana*, 17(003): 179-191.

Alemán J. C., A. Alarcón., R. Ferrera-Cerrato., (1997), Aspectos sobre el uso de la endomicoriza arbuscular en aguacate (*Persea americana* Mill), en línea: www.avocadosource.com/Journals/CICTAMEX/.../ecol_2_97.pdf , 2009.

Allen M. F., (1991), *The ecology of mycorrhizae*, Cambridge, University Press, California, USA.

Alonso Oyarzo C. G., (2005), Determinación de la eficiencia de la micorrización con cepas de *Descolea antártica* Singer., en plántulas de *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst., cultivadas en condiciones de sombreadero, en Tesis Ciencias biológicas.

Álvarez-Sánchez J. & J. Ramos-Zapata., 2004, Hongos y plantas, beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares, en *Ciencias*, 73: 39-45.

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

Barajas-Rodríguez J.E, A. Aldrete y J. J. Vargas-Hernández., (2004), La poda química en Vivero incrementa la diversidad de raíces en árboles jóvenes en *Pinus greggii*, en *Agrociencia*, 38(005): 545-553.

Bashan Y., B. Salazar y M. E. Puente., (2009), Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house., en *Biol. Fertil Soils*, 45: 655-662.

Biermann B. y R. G. Linderman., (1983), Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum, en *New Phytol* 95: 97-105.

Bowers J. E. y Turner R. M., (2001), Dieback and episodic mortality of *Cercidium microphyllum* (foothill paloverde), a dominant Sonoran desert tree., en *J Torrey Bot Soc* 128:128–140.

Brundrett M. C., (2002), Tansley review N° 134, Coevolution of root and micorrizas of land plants, en *New Phytologist*, 154:275-304.

Brundrett M., (2004), Diversity and classification of mycorrhizal associations, en *Biol. Rev.*, 79: 473-495.

Calderón de Rzedowski G. y J. Rzedowski., (2005), Flora Fanerogámica del Valle de México, 2ª. Ed., 1ª reimp., Instituto de Ecología A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad., México, Michoacan, pp. 1406.

Calleros-Gil V., L. R. Hernández-Díaz., F. Díaz-Gutiérrez, S. Cordero-Mendoza, A. Ramos-Flores, R. Valencia-Flores, J. Medrano-Hernández y J. Moreno-Muñoz. (2006), Influencia de *Azospirillum sp*, *Bacillus subtilis*, micorrizas y composta en el rendimiento de melón cantaloupe (*Cucumis melo*). Avances en la investigación científica en el CUCBA. Guadalajara Jalisco.

Camargo-Ricalde S. L. y S. S. Dhillion., (2003), Endemic *Mimosa* species can serve as mycorrhizal “Resource islands” within semiarid communities of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico., en *Mycorrhiza*, 13:129-136.

Camargo-Ricalde S. L., (1999), Hongos Micorrizógenos Arbusculares, en *ContactoS*, núm. 31: 62-67, México, DF.

Camargo-Ricalde S. L., N. M. Montaña, I. Reyes-Jaramillo, C. Jiménez.González, y S. S. Dhillion., (2010), Effect of mycorrhizae on seedling of six endemic *Mimosa* L. species (Leguminosae-Mimosoideae) from the semi-arid Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico., en *Trees*, 24:67-78.

Camargo-Ricalde S. L., S. Dhillion, y C. Jiménez-González., (2003), Mycorrhizal perennials of the “matorral xerófilo” and the “selva baja caducifolia” communities in the semiarid Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico., en *Mycorrhiza*, 13: 77-83.

Carreón Abud Y., N. Gómez Dorante y M. Martínez Trujillo., (2007), Hongos micorrizógenos arbusculares y su uso como fertilizantes., Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. 1ra Edición.,

Cavagnaro T.R., L-L. Gao, F. A. Smith y S.E. Smith, (2001), Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity, en *New Phytologist*, 151: 469–475.

Chung P., (2005) Hongos micorrízicos comestibles. Opcion productiva aplicada a las plantaciones forestales, Aspectos generales, en *INFOR* pp 55.

Cuenca G., A. Cáceres, G. Olrdobro, Z. Hasmy y C. Urdaneta, (2007), Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales, *Interciencia*, Caracas, Venezuela, 32 (001): 23-29.

Cuenca G., Z. Andrade, M. Lovera, L. Fajardo, Erasmo Meneses, M. Márquez y R. Machuca., (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, en *ECOTROPICOS*, 16 (1): 27-40.

Cuenca G., Z. Andrade., M. Lovera, L. Fajardo., E. Meneses., M. Márquez y R. Machuca., (2002), El uso de arbustos nativos micorrizados para la rehabilitación de áreas degradadas de la Gran Sabana, estado Bolívar, Venezuela., en *Interciencia*, 27(4): 165-172.

Cuenca G., Z. de Andrade, G. Escalante., (1998), Arbuscular mycorrhizae in the rehabilitation of fragile degraded tropical lanas, en *Biology and Fertility of Soils*, 26: 107-111.

Daft M. J. y T. H. Nicolson., (1969) Effect of endogone mycorrhiza on plant growth, III. Influence of inoculum concentración on growth and infection in tomato, en *New Phytol*, 68:953-963.

Dickson A., A. L. Leaf., J. F. Hosnerm., (1960), Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries, en *Chron*, 36: 10-13.

Fisher J. B. y K. Jayachandran., (2005), Preasence of arbuscular mycorrhizal fungi in sounth Florida native plants., en *Mycorrhizal*, 15: 580-588.

Frioni L., H. Minasian y R. Volfovicz., (1999), Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay, en *Forest Ecology and management*, 115: 41-47.

Gallaud (1905), en Smith F. A. y S. E. Smith., (1997), Structutal diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses, en *New Phytol*, 137 (96): 373-388.

García Rubio O. R., y G. X. Malda Barrera., (2009), Conservación *In Situ* y *Ex Situ* de *Mammillaria mathildae*, cactácea endémica en peligro de extinción de la ciudad de Querétaro., en *Ciencia@UAQ*, 2(1):3-16.

García-Sánchez R., (2005), Restauración de la cubierta vegetal de los matorrales semiáridos del Valle del Mezquital, Hidalgo, México., en línea, www.dama.gov.co.

Gardezi A. K., V. M. Cetina Alcalá, D. Talavera Magaña, R. Ferrera Cerrato, F. Rodríguez Neave y M. Larque Saavedra., (2000), Efecto de inoculación con endomicorriza arbuscular y dosis creciente de fertilización fosfatada en el crecimiento de chapulixtle (*Dodonea viscosa*). En *Terra Latinoamericana*, Universidad Autónoma de Chapingo, 18 (002):153-159.

Geilfus F., (1994), El árbol al servicio del agricultor. Manual de agroforestería para el desarrollo rural, Vol 2, Guia de especies, enda-caribe, Turrialba, Costa Rica.

Gerdemann J. W. y **Nicolson** T. H. (1963) Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Brit Myc Soc* 46:235-244.

Gholizadeh A., (2009), Evaluation of spad chlorophyll meter in two different rice growth stages and its temporal variability, en *European Journal of Scientific Research*, 37(4): 591-598.

González M. E., C. Donoso y B. Escobar., (1996), Efectos de distintos regímenes de manejo radical en el crecimiento de plantas de raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. Et Endl) Oerst.) 1-0 a raíz desnuda., en *Revista Bosque*, 17(1): 29-41. [en línea]: http://books.google.com.mx/books?id=JYTZkaoRK1oC&pg=PA33&lpg=PA33&dq=indice+de+calidad+de+dickson&source=bl&ots=JyEJwpQgTV&sig=-ZCr5AuQt9IRpSiCjKs9dnfPPW0&hl=es&ei=74B1TIKXJZCisAP2joyhDQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&ved=0CB4Q6AEwAjge#v=onepage&q=indice%20de%20calidad%20de%20dickson&f=false

Guadarrama-Chávez M. P., (2008), Tesis para obtener el grado de Doctora en ciencias, Diversidad y funcionalidad de los hongos micorrizógenos arbusculares en comunidades secundarias de selva baja caducifolia, Posgrado de ciencias Biológicas, UNAM, D.F, México.

Guadarrama-Chávez P., S. L. Camargo-Ricalde, L. Hernández-Cuevas & S. Castillo-Argüero., (2007), Los hongos micorrizógenos arbusculares de la Región de Nizanda, Oaxaca, México, en *Bol. Soc. Bot. Méx*, 81: 133-139.

Guevara-Escobar A., E. González-Sosa, H. Suzán-Azpiri, G. Malda-Barrera, M. Martínez y Díaz, M. Gómez-Sánchez, L. Hernández-Sandoval, Y. Pantoja-Hernández y D. Olvera-Valerio., (2008), Distribución potencial de algunas leguminosas arbustivas en el altiplano central de México, en *Agrociencia*, 42 (6): 703-716.

Habte M. y A. Manjunath, (1991), Categories of vesicular- arbuscular mycorrhizal dependency of host species, en *Mycorrhiza* 1: 3-12.

Herrera T. y M. Ulloa. (1990), El Reino de los hongos. Micología básica y aplicada. 1ª Edición. Fondo de Cultura Económica. México. DF.

Huante P., E. Rincón, y E. B. Allen., (1993), Effect of vesicular-arbuscular Mycorrhizae on seedling growth of four tree species from the tropical deciduous forest in Mexico, en *Mycorrhiza*., 2: 141-145.

Janos D. P., (1980), Vesicular arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant grow, en *Ecology*, 61: 151-162.

Klironomos J. N. y M. M. Hart., (2002), Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum, en *Mycorrhiza*, 12: 181-184.

Klironomos J. N., (2003), variation in plant response to native and exotic arbuscular mycorrhizal fungi, en *Ecology*, 84(9): 2292-2301.

Kormanic P. P. y A. C. McGraw., (1982), Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. In: Schenck NC (ed). *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, St. Paul. pp. 37-45.

Krebs C. J., (1978), Ecology. The experimental Analysis of distribution and Abundance, 2da edición, Harper International Edition, New York.

Kung'u J. B., (2004), Effect of vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) inoculation on growth performance of *Senna spectabilis*. In: Managing Nutrient Cycles to Sustain Soil Fertility., en Sub-Sahara Africa, Ed. A. Bationo. Academy Science, Publishers, Nairobi, Kenya.

Manoharan P. T., M. Pandi., V. Shanmugaiah., S. Gomathinayagan y N. Balasubramanian., (2008), Effects of vesicular arbuscular mycorrhizal fungus on the physiological and biochemical changes of five defferent tree seedlings grown under nursery conditions., en *AFRICAN Journal of Biotechnology*, 7(19): 3431-3436.

Martínez y Pérez J. L., L. V. Hernández Cuevas, M. G. Santiago Martínez, V. Guerra de la Cruz, y F. Legorreta Padilla, (2009), Manual para la propagación y micorrización de plantas arbustivas silvestres para la restauración de suelos degradados, UAT, pp.23

Monroy-Ata A., J. Estevez-Torres, R. García-Sánchez, R. Ríos-Gómez., (2007), Establecimiento de plantas mediante el uso de micorrizas y de islas de recursos en un matorral xerófilo deteriorado. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. México. DF.

Montaño N. M., S. L. Camargo-Ricalde., R. Garcia-Sánchez y A. Monroy-Ata, (2007), Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos (Arbuscular mycorrhizae in arid and semiarid ecosystems)., Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, Mundi.Prensa S.A. de C.V., UAM-Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM. D. F., México, pp. 460.

Montgomery D. C., (2006), Diseño y análisis de experimentos, 2° Ed., Universidad Estatal de Arizona, Limusa Wiley.

Moora M., M. Öpik, R. Sen y M. Zobel., (2004), Native arbuscular mycorrhizal fungal communities differentially influence the seedling performance of rare and common *Pulsatilla* species, en *Functional Ecology*, 18: 554-562.

Morin P. J., (1999), Community ecology, Blackwell Science, USA.

Onguene N. A y T. W. Kuyper., (2005), Growth response of three native timber species to soils with different arbuscular mycorrhizal inoculum potenciales un South Cameroon Indigenous inoculum and effect af addition of grass inoculum, en *Forest Ecology and Management*, 210: 283-290.

Paterson R. L., H. B. Massicotte, L. H. Melville, (2004), Mycorrhizae: Anatomy and cell biology, NRC. Research Press, Canada, Ottawa.

Peña-Venegas C. P., G. Cardona, A. Mazorra, J Arguellez y A. L. Arcos, (2006), Micorrizas arbusculares de la Amazonia colombiana, Catálogo ilustrado. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI.

Pereira G., M. Sánchez., D. Ríos., M. A. Herrera., (2001)., Micorrizas vesículo arbusculares y su incidencia en el crecimiento de plántulas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., en Bosque, 22(2): 39-44.

Phillips J. M. y D. S. Hayman., (1970), Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection., en Trans. Brit. Mycol. Soc. 55: 158-161.

Plenchette C., J. A. Fortin, V. Furlan., (1983). "Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P fertility. I. Mycorrhizal dependency under field conditions", en Plant. Soil. 70:199-209.

Quilambo O. A., (2003), The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. African Journal of Biotechnology. 2(12): 539-546. Mozambique.

Ramos-Zapata J. A., R. Orellana & E. B. Allen, (2006). Establishment of *Desmoncus orthacanthos* Martius (Arecaceae): effect of inoculation with arbuscular mycorrhizae, en Rev. Biol. Trop, 54 (1): 65-72.

Ramos-Zapata J. y P. Guadarrama-Chávez, (2004), Los hongos micorrizógenos arbusculares en La restauración de comunidades tropicales, en Universidad y Ciencia, Número especial, 1: 59-65.

Rangel J. A., G. Alcantar, J. Z. Castellanos, E. García, C. Trejo y H. Vaquera., (2002), Comparación de dos Pruebas para diagnosticar nitrógeno en sorgo., en Terra Latinoamericana, Universidad Autónoma Chapingo 20(004): 383-390.

Read D. J., J. G. Duckett, R. Francis, R. Ligrone, A. Russell., (2000), Symbiotic fungal association in "lower" land plants, Philosophical transactions of the royal Society of London series b, Biological Sciences, 355, 815-830.

Reyes-Jaramillo I., (2002), Asociaciones biológicas en el suelo: la micorriza arbuscular (M A), en ContactoS, 44: 5-10, México, DF.

Reyes-Reyes J., A. Aldrete, V. M. Cetina Alcalá y J. López Upton., (2005) Producción de plántulas de *Pinus pseudostrobus* var. Apulcensis en sustratos a base de aserrín, en Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente 11 (002): 105-110.

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

Rodríguez Ma. de las Nieves, G. Alcantar, A. Aguilar, J. Etchevers y J. Santizó., (1998), Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila, en Terra Latinoamericana, Universidad Autónoma Chapingo, 16(002): 135-141.

Román G. F., (2003), concentración de reguladores del desarrollo vegetal inducida por hongos endomicorrízicos en dos cultivares de chile (*Capsicum annum* L.), en Tesis Doctoral, Universidad de Colima.

Román Jiménez A. R., J. Vargas Hernández, G. Baca Castillo, A. Trinidad Santos, M. Alarcon Bustamante., (2001), Crecimiento de plántulas de *Pinus greggii* Engelm. En respuesta a la fertilización, en Rev. Ciencia Forestal en México, 26 (89): 19-43.

Salas E. (2004). Las Micorrizas y su Importancia para el Manejo y Conservación de los Árboles del Trópico, en Memoria del I Congreso Sobre Suelos Forestales y de Ordenación Territorial ¿Son los Suelos Forestales Diferentes? Universidad Nacional – INISEFOR. Heredia, Costa Rica.

Sánchez A., V. Rodríguez, J. Lorbes, L. Figueredo y A. Rivera., (2009), Calibración de lecturas de clorofilómetro en hojas de *Zea mays* L. en el valle medio del río Yaracuy, estado Yaracuy., en Rev. Unell. Cienc. Tec., 27: 83-94.

Satter M. A., M. M. Hanafi, T. M. Mahmud y H. Azizah., (2007), Performance of Arbuscular Mycorrhiza Inoculated *Acacia mangium* Seedlings on Degraded Land with Different Rates of Phosphorus., en Bangladesh J Microbiol, 24(1): 9-13.

Sieverding E., (1991), Vesicular-arbuscular mycorrhizal management in tropical agrosistemas, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Eschborn.

Smith F. A. y S. E. Smith., (1997), Tansley Review No. 96. Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses, en New Phytologist 137: 373-388.

Smith R. L., (1996), Ecology and field biology, Addison-Wesley Educational Publiser, USA, Virginia.

Smith S. E. y D. Read., (2008), Mycorrhizal Symbiosis, 3ra edición, Academic Press, ELSIEVE, New York.

Stahl P. D., S. E. Williams y M. Christensen., (1988), Efficacy of native vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after severe soil disturbance, en New Phytol, 110: 347-354.

Terrones-Rincón T. del R., C. González-Sánchez y S. A. Ríos-Ruíz., (2004), Arbustivas Nativas de Uso Múltiple en Guanajuato, en Libro técnico N° 2, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Celaya, Gto., México.

Van del Heijden M. G., J. N. Klironomos, M. Ursic, P. Moutoglis, R. Streitwolf-Engel, T. Boller, A. Wiemken y I. R. Sanders., (1998), Mycorrhizal fungal diversity determinates plant biodiversity ecosystem variability and productivity, en Nature, 396: 69-72.

Vázquez C., A. I. Batis, M. I. Alcocer, M. Gual y C. Sánchez., (1999), Árboles y Arbustos nativos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación, en Reporte técnico del proyecto JO84, Instituto de Ecología, UNAM. <http://xolo.conabio.gob-mx/arboles/intret-JO84.ntml>.

Wu J., D. Wang, C. J. Rosen, M. E. Bauer., (2007), Comparison of petiole nitrate concentrations, SPAD chlorophyll readings, and QuickBird satellite imagery in detecting nitrogen status of potato canopies., en *Field Crops Research*, 101: 96-103.

Zamudio R. S., J. Rzedowski, E. Carranza y G. Calderon de Rzedowki., (1992), *La vegetación en el Estado de Querétaro.*, Instituto de Ecología A.C., Centro Regional del Bajío., Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Querétaro, Querétaro, México.