

INOCULACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EN LA PRODUCCIÓN DE PLANTAS DE SELVA BAJA CADUCIFOLIA EN VIVERO

ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI INOCULATION OF TROPICAL DECIDUOUS FOREST TREES PRODUCTION IN NURSERY

Denisse Acosta-Peñaloza

Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Facultad de Ciencias Biológicas. Cuernavaca, Morelos, México.

E-mail: denice.acosta@uaem.mx

RESUMEN

La reducción de la cubierta vegetal causa la pérdida de hábitats y de la biodiversidad. La mejor estrategia para la recuperación de la selva baja caducifolia (SBC) es la reforestación con plantas nativas, por lo que la producción de plantas de vivero es de suma importancia. Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son constituyentes de la microbiota del suelo en ecosistemas naturales y tienen gran importancia en los procesos de propagación de plantas, sobre todo en aquellas producidas en vivero. La inoculación con HMA en vivero incrementa la calidad de las plantas optimizando su crecimiento, por lo que el objetivo de este trabajo, fue evaluar el efecto de la inoculación de HMA en plantas nativas de SBC producidas en vivero, en el estado de Morelos. Se recolectaron

muestras de suelo y de raíces de la rizósfera de árboles de caobilla (*Swietenia humilis*), palo dulce (*Eyshendhartya polistachya*) y guaje (*Leucaena leucocephala*), y fueron procesadas para la extracción de esporas por el método de tamizado húmedo y decantación. Para medir la colonización micorrízica, las raíces fueron sometidas a un procedimiento de clareo y tinción. Se propagó el inóculo mediante un cultivo trampa de sorgo utilizando inóculo proveniente de la rizósfera de las diferentes especies. Para evaluar el efecto de la inoculación con HMA, por separado, se sembraron semillas de caobilla, palo dulce y guaje y se manejaron como se hace comúnmente en el vivero. A los 120 días después de la siembra, se tomaron datos a los que se aplicó análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar de cinco tratamientos y seis repeticiones. La unidad

experimental fue de una maceta con una planta. Las medias se separaron mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$). El número de esporas cuantificadas en las muestras de suelo de la rizósfera fueron de 68.56, 51.00 y 31.63 esporas/100g de suelo para caobilla, palo dulce y guaje, respectivamente. Los porcentajes de colonización de los HMA observados fueron de 17.21%, 70.55% y 58.32% para caobilla, palo dulce y guaje, respectivamente. Los resultados mostraron diferencias significativas en el peso seco de vástago y de raíz en caobilla; en guaje no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables; y en palo dulce se observaron diferencias en la altura de planta, en el peso seco de vástago y en el peso seco de raíz. En la evaluación de la inoculación de las plantas en vivero, los porcentajes de colonización de los tratamientos micorrizados fueron estadísticamente iguales entre sí y superiores a los no micorrizados, y en el caso de los parámetros de crecimiento, la respuesta fue diferente en cada especie evaluada.

Palabras clave: Reforestación, Selva Baja Caducifolia, hongos micorrízicos arbusculares, vivero.

ABSTRACT

The reduction of vegetation cover causes the loss of habitats and biodiversity. The best strategy for the recovery of the tropical deciduous forest (TDF) is the reforestation with native plants, so the production of nursery plants is very important. The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are constituents of the soil microbiota in natural ecosystems and have great importance in the propagation processes of plants, especially those produced in nursery. Inoculation with AMF in nursery plants, increases the quality of the plants optimizing their growth, so the objective of this work was to evaluate the effect of the inoculation of AMF in native plants of TDF produced in nursery, in Morelos State, México. Soil and roots samples, from the rhizosphere of "caobilla" (*Swietenia humilis*), "palo dulce"

(*Eyshendhartya polistachya*) and "guaje" (*Leucaena leucocephala*) trees, were collected and processed for the extraction of spores by wet sieving and decantation method. To measure mycorrhizal colonization, the roots were subject, to a thinning and staining procedure. Inoculum was propagate using a sorghum trap culture with inoculum from the rhizosphere of the species to study. To evaluate the effect of inoculation with AMF, separately, seeds of caobilla, palo dulce and guaje, were sow and handle as is commonly done in nursery. At 120 days after sowing, data were taken to which, analysis of variance was applied under a completely randomized design of five treatments and six repetitions. The experimental unit was a pot with a plant. The means were separated by the Tukey test ($P < 0.05$). The number of spores quantified in the soil samples of the rhizosphere were 68.56, 51.00 and 31.63 spores/100 g of soil, for caobilla, palo dulce and guaje, respectively. The percentages of colonization of the AMF observed were 17.21%, 70.55% and 58.32% for caobilla, palo dulce and guaje, respectively. The results showed significant differences in the dry weight of stem and root in caobilla; in guaje no significant differences were observed in any of the variables; and in palo dulce differences were observed in plant height, dry stem weight and root dry weight. In the evaluation of the inoculation of the plants in nursery, the colonization percentages of the mycorrhizal treatments were statistically equal to each other and superior to the non-mycorrhized ones, and in the case of the growth parameters, the response was different in each evaluated species.

Keywords: Reforestation, tropical deciduous forest, arbuscular mycorrhizal fungi, nursery.

INTRODUCCIÓN

Las selvas bajas caducifolias (SBC) representan el 42% de los ecosistemas tropicales a nivel mundial. En México, el trópico seco ocupa el 11.6% del territorio nacional (Challenger y Soberón, 2008).

Mientras que en Morelos, la superficie de las selvas bajas caducifolias corresponde al 28.4% de la superficie estatal, se compone por solo un tipo de vegetación y se distribuye en 29 de los 33 municipios de la entidad (SEMARNAT, 2013b).

Las consecuencias de la pérdida de la cubierta vegetal son severas, pues no sólo implica la pérdida de un recurso económico potencial, sino que causa graves daños al medio ambiente provocando la pérdida de hábitats y de la biodiversidad (Cervantes, 1996). En México, la superficie de la SBC se ha reducido significativamente por la ganadería extensiva, la extracción de madera, la agricultura y a los incendios forestales (SEMARNAT, 2013a), al grado de que se requiere urgentemente establecer políticas para recuperación de este ecosistema.

El método de restauración que representa la mayor probabilidad de éxito en el menor tiempo posible es la introducción directa de plántulas de especies nativas. La mejor estrategia para la recuperación de la SBC es la reforestación con plantas nativas, por lo que la producción de plantas de vivero es de suma importancia. Y para asegurar el éxito de las plantaciones futuras es importante considerar las condiciones óptimas para el desarrollo adecuado de las plantas en su hábitat natural. Entre estas condiciones destacan las relaciones benéficas con las poblaciones microbianas del suelo que son capaces de mejorar las condiciones del desarrollo vegetal y promover directamente el crecimiento (Aguilar-Benítez, 1990).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son constituyentes esenciales de la microbiota natural del suelo en ecosistemas naturales y probablemente colonicen más tejidos vegetales que cualquier otro tipo de organismos. Los HMA juegan un papel importante en la fertilidad de los suelos, debido a que estos organismos funcionan asociados a las raíces de las plantas (Barrer, 2009), se estima que el 95% de las especies arbóreas tropicales forman

asociaciones simbióticas mutualistas con este tipo de hongos (LeTacon *et al.*, 1998), cuyo papel es esencial para el buen funcionamiento y mantenimiento en sus ecosistemas naturales (Salas, 2004).

El tipo de asociación hongo-raíz más extendido en la naturaleza tal vez sea la llamada endomicorriza o micorriza arbuscular, formada por hongos del Phylum Glomeromycota, los cuales no desarrollan red de Hartig y colonizan intracelularmente la corteza de la raíz por medio de estructuras especializadas denominadas arbusculos, que actúan como órganos de intercambio de nutrimentos entre la célula vegetal y el huésped. Algunos géneros de estos hongos forman también otro tipo de estructuras llamadas vesículas, compuestas principalmente por lípidos. Estas vesículas están presentes intercelularmente en la corteza de la raíz y se consideran reservorios de nutrimentos para el hongo (Aguilera-Gómez *et al.*, 2007).

Las micorrizas tienen aplicaciones inmediatas para resolver problemas a escala de los ecosistemas. Se ha señalado que la tasa de sucesión o restauración de un ecosistema degradado podría acelerarse mediante la inoculación de HMA o la manipulación de sus poblaciones (Allen, 1991).

En la agricultura, el uso de HMA tiene un gran potencial debido a que facilitan la disponibilidad de nutrientes para las plantas como los de poca movilidad (fósforo), mayor absorción de agua debido a la extensa red de hifas que el hongo forma, resistencia a patógenos de hábito radical como nemátodos. Por lo tanto, plantas micorrizadas poseen una ventaja importante con respecto a las plantas no micorrizadas; así mismo, cualquier especie de HMA puede colonizar o formar simbiosis con cualquier planta; sin embargo, el pH, la humedad del suelo y la disponibilidad de nutrientes, influyen tanto en la micorrización en diferentes cultivos como en las variedades de una misma especie vegetal, dando

diferentes respuestas en crecimiento y desarrollo de la planta (Barrer, 2009).

En los últimos años se le ha dado especial importancia a los HMA considerando los efectos benéficos de estos microsimbiontes hacia sus plantas hospedantes, por lo que el manejo de estos organismos tiene uso potencial en los diferentes procesos de propagación de plantas. Aunque pueden aplicarse en campo, la principal aplicación de estos hongos es en aquellas plantas que requieren una fase de vivero antes de que se establezcan en el campo (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999).

Con el fin de obtener inóculo nativo de HMA y determinar las condiciones más apropiadas para su producción a gran escala, Torres-Arias *et al.* (2017) probaron combinaciones de luz y temperatura en tres especies de plantas (*Calophyllum antillanum*, *Talipariti elatum* y *Paspalum notatum*). Evaluaron los parámetros de crecimiento y desarrollo, así como el funcionamiento micorrízico de las plántulas. El tratamiento con luz natural y alta temperatura promovió valores más altos de colonización de micorrizas de raíz, micelio externo y densidad de esporas. La condición L-H puede recomendarse para la producción de inóculo nativo, ya que promueve una mejor expresión de la simbiosis HMA y una producción elevada de propágulos micorrízicos.

Viera *et al.* (2017) evaluaron el uso de micorrizas nativas en el desarrollo de plántulas para patrones de tomate de árbol en Ecuador. Los mejores incrementos en cuanto al número de esporas (145) y porcentaje de colonización de raíces (127 %) se observaron usando micorrizas nativas, en comparación con la micorriza comercial (*Glomus* sp) que mostró un desempeño aceptable pero siempre por debajo de los resultados obtenidos con los inóculos de las cepas nativas.

Huante *et al.* (2012) evaluaron el efecto de dos fuentes diferentes de inóculos locales de HMA y un control no micorrizado,

en el crecimiento de seis especies leñosas. Se observó que las especies difieren en su habilidad para aprovechar los beneficios de HMA y la mayor capacidad de respuesta fue exhibida en la altura de planta y la producción de hojas de las especies evaluadas.

Hernández-Cuevas *et al.* (2011) propagaron e inocularon con HMA a *Amelanchier denticulata* (tlaxistle) y *Eysenhardtia polystachya* (palo dulce), plantas nativas de América, que forman micorriza arbuscular y crecen en México sobre suelos someros y con escasez de nutrimentos. La propagación se hizo a partir de semillas. La mitad de las plantas de cada especie se inoculó con una mezcla de tres cepas de HMA aisladas de suelos de Tlaxcala (México): *Glomus claroideum*, *Acaulospora laevis* y *A. morrowiae*. El tlaxistle y el palo dulce alcanzaron valores por arriba del 40% de germinación y del 80% de supervivencia al trasplante. Aunque, los porcentajes de colonización micorrízica fueron bajos en los dos casos, menores al 10% para palo dulce y de 20% para tlaxistle, los individuos micorrizados mostraron las mejores respuestas en diámetro, altura, biomasa aérea ($p < 0.001$) y contenido de fósforo. También se analizan algunas variables indicadoras de calidad de planta en relación a la micorrización. Se concluye que la propagación a partir de semillas es una buena estrategia para la obtención de plantas y que la micorrización favorece significativamente su desarrollo inicial, ya que mejora sus rasgos de crecimiento, lo que es crítico para las plantas que serán destinadas al campo en programas de restauración.

Con base en que la micorrización es una alternativa biológica de bajo costo, que puede contribuir al éxito de la repoblación forestal, Cuervo y Rivas (2007) analizaron muestras en diez sitios diferentes en los que cuantificaron las esporas y el porcentaje de colonización de raíces. Los resultados obtenidos permitieron concluir que, de la variedad de los géneros de HMA presentes en la muestra de suelo, que los que

demonstraron mejor comportamiento fueron *Glomus* sp y *Gigaspora* sp. Además para lograr un mayor crecimiento y desarrollo de los árboles, sugieren que es necesario favorecer la población micorrizal en las plantas en sus primeros días después de la emergencia.

Ramos-Zapata y Guadarrama (2004), discutieron los efectos de los HMA sobre el establecimiento y crecimiento de plantas. Señalan que las perturbaciones afectan la cantidad de inóculo micorrízico en el suelo, lo cual repercute negativamente en la recuperación de las comunidades vegetales. En el trabajo analizan las ventajas de las plantas inoculadas con HMA en su establecimiento y crecimiento exitoso, así como los problemas en la producción de inóculo a gran escala para zonas tropicales. Además, se argumenta la importancia de incluir a dichos hongos en los proyectos de restauración debido a que la asociación micorrízica es de gran importancia en el establecimiento, supervivencia y crecimiento de plántulas en el campo. A pesar de saber de antemano que muchas especies vegetales dependen de los HMA para completar su ciclo de vida, es indudable que falta información para el manejo y producción de inoculantes de HMA, por lo que es imprescindible tomar en cuenta la importancia de esta asociación en programas de manejo de ecosistemas naturales, como son la repoblación y restauración de ambientes deteriorados.

Por lo anterior, se considera que la inoculación de HMA en la producción de plantas nativas de selva baja caducifolia, inducirá mayor sobrevivencia, crecimiento y sanidad de plantas producidas en vivero por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en plantas nativas de selva baja caducifolia producidas en vivero, en el estado de Morelos, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) ubicado en campus Chamilpa de la UAEM y en las instalaciones del vivero forestal Huajintlán dependiente del Gobierno del Estado de Morelos, ubicado en la localidad de Huajintlán, Morelos (18°36'56"N, 99°25'32"W) situada a 920 msnm, con vegetación de selva baja caducifolia.

Muestras de suelo

Para la obtención de HMA, en el mes de abril de 2018, se colectaron muestras de suelo y raíces de la rizósfera de árboles de caobilla (*Swietenia humilis* Zucc), guaje (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.) y palo dulce (*Eysenhardtia polystachya* (Ortega) Sarg), por ser especies características de la SBC.

Se colectaron cuatro muestras de suelo y dos muestras de suelo de la rizósfera de árboles de SBC cultivados en contenedor, en las áreas mencionadas anteriormente. Para la obtención de las muestras se retiró la hojarasca de la superficie del suelo, se recolectó entre los 10 y 20 cm de profundidad en la zona de goteo del árbol, que se encuentra cerca del sistema radical. En cada sitio se tomaron cuatro submuestras de 500 g y luego se mezclaron para hacer una sola muestra (2 Kg). Las muestras de suelo fueron colocadas en bolsas de polipapel y trasladadas al laboratorio para su procesamiento.

Aislamiento de esporas micorrízicas arbusculares

Las muestras de suelo fueron procesadas para la extracción de esporas por el método de tamizado húmedo de Gerdemann y Nicolson (1963) de la siguiente manera:

Se tomó una muestra de suelo de 60 g y se tamizó separándolo en tres grupos de 20 g cada uno, los cuales se pusieron en

un liquidador eléctrico marca Oster® y se les agregó agua corriente, se licuaron durante 30 segundos y se tamizaron (590 µm, 250 µm y 105 µm). Este procedimiento se realizó 5 veces con cada una de las muestras de 20 g de suelo.

Se prepararon 2 tubos de centrifuga con sacarosa a los cuales se le agregó cuidadosamente sacarosa al 20% y al 60% en el mismo tubo. Al tubo uno se le agregó cuidadosamente el contenido del tamiz de 250 µm y al tubo dos se le agregó lo del tamiz de 105 µm, este procedimiento se hizo con cada una de las submuestras de suelo.

Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante dos minutos. Pasado este tiempo se sacaron cuidadosamente los tubos de la centrifuga y se vació por separado el contenido de cada uno de los tubos, en un tamiz de 37µm, en donde las esporas se lavaron con abundante agua destilada para eliminar el exceso de sacarosa y posteriormente se pusieron en una caja Petri para su análisis y separación de esporas en el microscopio estereoscópico.

Para el cálculo del número de esporas por 100 g de suelo seco se utilizó la fórmula:

$$NE = \frac{\text{Número de esporas observadas}}{\text{Peso seco de la muestra de suelo}} \times 100$$

Donde:

NE= Número de esporas/100 g de suelo seco

Colonización micorrízica

En contraste con las asociaciones ectomicorrízicas, la colonización de las células corticales de la raíz por HMA, no altera la morfología de la raíz, por lo tanto,

para detectar y medir la colonización micorrízica, las raíces fueron sometidas a un procedimiento de clareo y tinción (Philips y Hayman, 1970).

Se tamizó el suelo y se tomaron las raíces que se encontraban en la muestra de suelo, se lavaron con abundante agua corriente y se pusieron a remojar en un matraz con agua para eliminar el exceso de suelo, con la ayuda de un tamiz de 250 µm se les quitó el agua. Posteriormente se pusieron las raíces en un matraz y se les agregó KOH al 10% y se dejaron 24 h a temperatura ambiente, después de este tiempo con la ayuda del tamiz se enjuagaron con suficiente agua corriente. Las raíces se pusieron en peróxido alcalinado durante 15 min y con la ayuda del tamiz de 250 µm se lavaron con agua corriente.

Posteriormente las raíces se colocaron en HCL al 10% durante 15 min, pasado este tiempo y con la ayuda del tamiz de 250 µm y sin enjuagar se pusieron en el colorante (50 mL de ácido láctico + 100 mL de glicerina + 50 mL de agua destilada + 1 g de azul de tripán). Las raíces se dejaron en el colorante durante 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente las raíces se escurrieron en el tamiz de 250 µm y se pusieron en la solución desteñidora y ahí se conservaron para su análisis posterior.

Las raíces teñidas se cortaron en secciones de aproximadamente un centímetro de longitud, se tomaron al azar 20 segmentos y se colocaron en forma paralela a lo largo de un portaobjetos con solución PVLG y mediante "squash"² se les colocó un cubreobjetos. Las muestras se dejaron secar durante 48 h y posteriormente se observaron en un microscopio óptico marca Nikon® (10x y 40x). Cada muestra se elaboró por triplicado.

El porcentaje de colonización se determinó mediante la fórmula:

² Squash= Técnica de aplastamiento que consiste en aplastar el objeto de estudio entre el portaobjetos y el cubreobjetos.

$$NE = \frac{\text{Número de campos colonizados}}{\text{Número de campos observados}} \times 100$$

Donde:

PC= Porcentaje de colonización

Propagación del inóculo en cultivo trampa

Para el cultivo trampa se preparó un sustrato compuesto por partes iguales de agrolita + vermiculita + fibra de coco + composta estéril (sustrato general). Para asegurar la presencia de HMA proveniente de las especies seleccionadas se utilizaron como inóculo, 50 g de suelo proveniente de las muestras de suelo de la rizósfera de cada una de las tres especies en estudio, y una mezcla de las muestras de suelo de seis sitios diferentes tomadas en Huajintlán, Morelos. El sustrato se mezcló con el inóculo y se llenaron macetas de unicel de 473 mL de capacidad. Se utilizó semilla de sorgo como planta indicadora para el desarrollo del cultivo trampa. A las semillas se les dio un tratamiento de esterilización superficial, empleando una solución de hipoclorito de sodio al 10 % por 10 minutos.

Se sembraron diez semillas de sorgo por maceta a una profundidad de 0.5 cm. Las macetas se mantuvieron en la oscuridad durante una semana y posteriormente se colocaron a la intemperie. Se regaron cada tercer día para mantener la humedad.

Inoculación de plantas nativas con HMA

Para evaluar el efecto de la inoculación con micorrizas en las plantas, se sembraron por separado, semillas de cada una de las especies vegetales seleccionadas

(*S. humilis*, *E. polistachya* y *L. leucocephala*). Se colocaron contenedores de un litro de capacidad conteniendo cada uno de los tratamientos que se describen en el cuadro 2. A la mezcla que se utiliza de manera rutinaria en el vivero, se le denominó sustrato Huajintlán, que consiste en Atocle + Aserrín + Composta, en proporción 2:1:1. La esterilización de los sustratos se realizó en autoclave (dos ciclos de 30 min a 150 °C y 15 lb de presión). La inoculación se realizó con 50 g de suelo del cultivo trampa por maceta.

Se realizó a siembra directa. Se colocaron tres semillas por contenedor, los cuales se mantuvieron a cielo abierto como se hace comúnmente en el vivero. Las macetas se regaron de manera manual cada tercer día. No se utilizaron productos químicos como: fertilizantes, insecticidas ni fungicidas. Este procedimiento se realizó por separado para cada una de las especies seleccionadas.

Variables a evaluar

A los 120 días después de la siembra, se registraron los datos de: altura de la planta, peso seco del vástago, peso seco de la raíz y porcentaje de colonización de HMA. Para cada planta el porcentaje de colonización por los HMA se calculó en muestras de raíces que se procesaron por el método de Phillips y Hayman (1970).

Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos por separado, en cada una de las especies vegetales seleccionadas. Se utilizó análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar de cinco tratamientos y seis repeticiones. La unidad experimental fue de una maceta con una planta. Las medias se separaron mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Cuadro 1. Origen del inóculo en el sustrato del cultivo trampa, para el experimento de inoculación de HMA en plantas nativas de SBC en vivero, en Morelos, México.

| Descripción |
|---|
| Suelo nativo de caobilla (<i>S. humilis</i>) + agrolita + vermiculita + fibra de coco + composta. |
| Suelo nativo de palo dulce (<i>E. polistachya</i>) + agrolita + vermiculita + fibra de coco + composta. |
| Suelo nativo de guaje (<i>L. leucocephala</i>) + agrolita + vermiculita + fibra de coco + composta. |
| Mezcla de suelo nativo + agrolita + vermiculita + fibra de coco + composta. |

Cuadro 2. Tratamientos para el experimento de inoculación de HMA en plantas nativas de SBC en vivero, en Morelos, México.

| Tratamiento | Descripción |
|-------------|---|
| SH | Sustrato Huajintlán |
| SHE | Sustrato Huajintlán estéril |
| SH+I | Sustrato Huajintlán + inóculo de cultivo trampa |
| SHE+I | Sustrato Huajintlán estéril + inóculo de cultivo trampa |
| SHE+IE | Sustrato Huajintlán estéril + inóculo de cultivo trampa estéril |

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de esporas de HMA

De las muestras de suelo de plantas de caobilla, palo dulce y guaje de Huajintlán, Morelos, se aislaron diferentes esporas de HMA. Los resultados muestran que en el número de esporas de HMA son diferentes en cada especie (Cuadro 3). El mayor número de esporas (68.56 /100 g de suelo seco) se observó en la muestra de suelo tomada de caobilla, en palo dulce se observaron 51 esporas/100 g de suelo seco y en las muestras de suelo tomadas de guaje se observó el menor número de esporas (31.63 /100 g de suelo seco).

El número de esporas tiene diferencias importantes de acuerdo al lugar de donde se tomen las muestras. Diversos autores han reportado variaciones en la cuantificación del número de esporas; Viera *et al.* (2017) observaron de 1544 a 2100 esporas/100 g de suelo en muestras de

suelo y de 1875 a 2615 en cultivos trampa con sorgo, sin embargo en muestras del tratamiento control (arena estéril) encontraron 60.6 esporas /100 g de suelo; en otro estudio Salgado-García *et al.* (2014) encontró de 4 a 2000 esporas /100 g de suelo, en suelos cultivados con caña de azúcar; por otro lado Caballar-Hernández *et al.* (2017) encontraron entre 30 y 153 esporas /100 g de suelo; Cuervo y Rivas (2007) encontraron diferencias significativas entre especies, siendo *Cordia alliodora* la que presentó el mayor número de esporas, con un promedio de 558/100 g de suelo comparada con *Tabebuia rosea* que fue de 514/100 g de suelo.

Estas diferencias pueden ser explicadas por que aparentemente existe una selectividad ecológica de las especies de HMA, en la que las características físicas y químicas del suelo como el pH, la humedad, la disponibilidad de nutrientes principalmente del fósforo y del nitrógeno, afectan considerablemente la densidad, la

distribución y la riqueza de especies de HMA en el suelo (Khanam *et al.*, 2006; Caballar-Hernández *et al.*, 2017).

Porcentaje de colonización de raíces

En la colonización de raíces, hay diferencias en cuanto a la muestra tomada en las diferentes especies (Cuadro 3). El mayor porcentaje de colonización se observó en palo dulce (70.55%) y el menor en caobilla (17.21%). Con respecto al porcentaje de colonización, se han observado resultados muy variables, Hernández-Cuevas *et al.* (2011) observaron 6% en palo dulce, pero en otras especies leñosas se han observado porcentajes de colonización de 3.5% a 76% (Monroy-Ata *et al.*, 2007; García-Sánchez *et al.*, 2008; García-Gallegos *et al.*, 2009).

Cuervo y Rivas (2007) observaron un porcentaje de colonización más alto en *Cordia alliodora* con un promedio de 71.5%; comparado con el porcentaje de colonización de *Tabebuia rosea* que fue de 61.5%. El porcentaje de colonización, para las dos especies, no presentó correlación con el número de esporas, lo cual indica que una alta colonización no está siempre relacionada con un alto número de esporas.

Colonización y vesículas en raíces teñidas

Los HMA desarrollan sus estructuras dentro y entre las células corticales de la raíz, dichas estructuras favorecen a las plantas que colonizan; sin embargo, el porcentaje de colonización o micorrización es diferente en cada especie vegetal. En las raíces procedentes de las muestras de suelo tomadas en Huajintlán se observaron las estructuras de los HMA tal como se muestra en las Figuras 1, 2 y 3.

Inoculación de plantas nativas con HMA

Los resultados muestran diferencias significativas en las tres especies evaluadas, en varios de los parámetros analizados.

En caobilla se registraron diferencias significativas en altura de planta, peso seco de vástago y peso seco de raíz (Cuadro 4). En la altura de planta el tratamiento SHE+I superó significativamente al tratamiento SHE+IE en el que no se encontraban microorganismos. Aunque el tratamiento SHE+I fue estadísticamente similar a los tratamientos SH, SHE y SH+I, pero se observó un incremento en el número de hojas de 9.63%, 14.11% y 22.04% respectivamente sobre esos tratamientos. En el peso seco del vástago y de la raíz, los tratamientos SH y SHE+I fueron estadísticamente iguales entre sí y superiores a los otros tres tratamientos, que a su vez fueron estadísticamente iguales entre sí. En el porcentaje de colonización no se observaron diferencias entre los tratamientos con micorrizas (SH, SH+I y SHE+I), pero si hubo diferencias comparados con los tratamientos estériles (SHE y SHE+IE) que fueron iguales entre sí.

Los resultados mostraron un incremento del porcentaje de colonización entre las muestras de suelo originales (17.21%) y las muestras inoculadas que fueron de 18.30%, 21.60% y 28.30%, en los tratamientos SH, SH+I y SHE+I respectivamente.

En el crecimiento de guaje no se observaron diferencias significativas en la altura de planta, peso seco de vástago y peso seco de raíz, aunque en el porcentaje de colonización se observaron diferencias entre los tratamientos con micorrizas comparados con los estériles (Cuadro 5). En general los tratamientos que contenían micorrizas superaron numéricamente a los que no las tenían; En la altura de planta los superaron en 83% en promedio, y en el peso seco de vástago y de raíz, los superaron en 150% en promedio. En el porcentaje de colonización los tratamientos SH, SH+I y SHE+I fueron estadísticamente iguales entre sí y superiores a los tratamientos SHE y SHE+IE.

Cuadro 3. Número de esporas y porcentaje de colonización en muestras de suelo de tres especies de selva baja caducifolia, observados en el experimento de inoculación de HMA en plantas nativas de SBC en vivero, en Morelos.

| Muestra de suelo | Número de esporas / 100 g de suelo seco | Colonización (%) |
|------------------------------------|---|------------------|
| <i>S. humilis</i> (caobilla) | 68.56 | 17.21 |
| <i>E. polistachya</i> (palo dulce) | 51.00 | 70.55 |
| <i>L. leucocephala</i> (guaje) | 31.63 | 58.32 |

Los datos son el promedio de tres repeticiones.

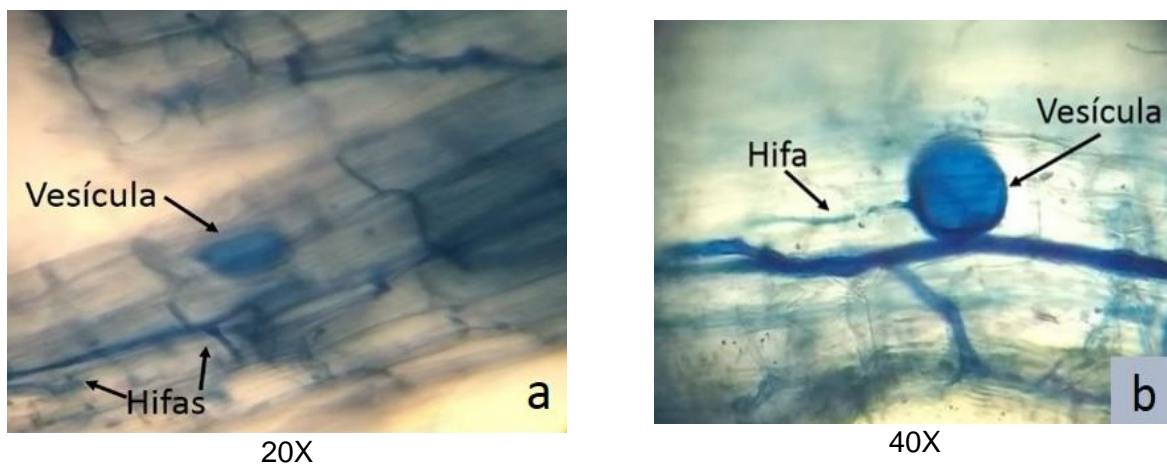


Figura 1. Microfotografías de las raíces de caobilla (*S. humilis*) mostrando (a y b) en su interior las hifas y las vesículas de HMA, obtenidas en el experimento de inoculación de HMA en plantas nativas de SBC en vivero, en Morelos, México.

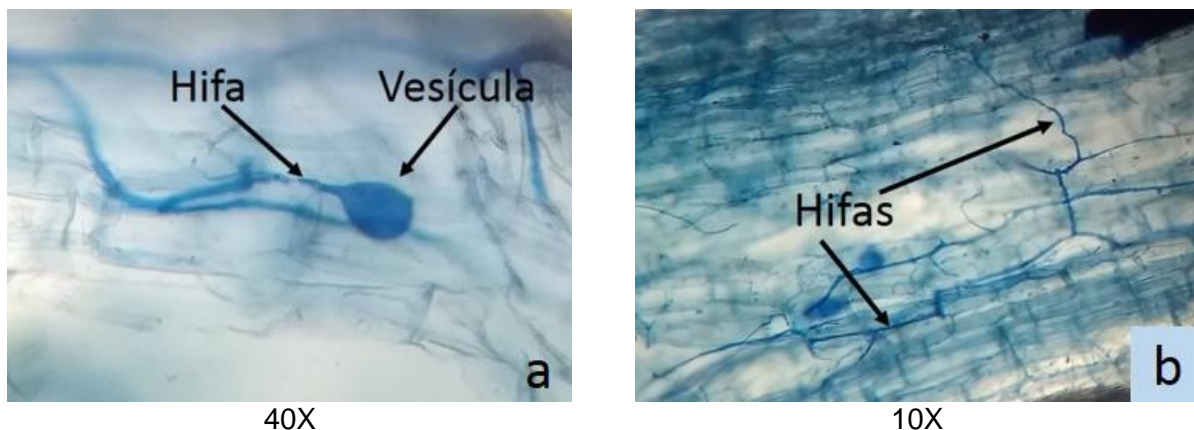


Figura 2. Microfotografías de las raíces de palo dulce (*E. polistachya*) mostrando en su interior hifas y vesículas (a) e hifas (b) de HMA, obtenidas en el experimento de inoculación de HMA en plantas nativas de SBC en vivero, en Morelos, México.

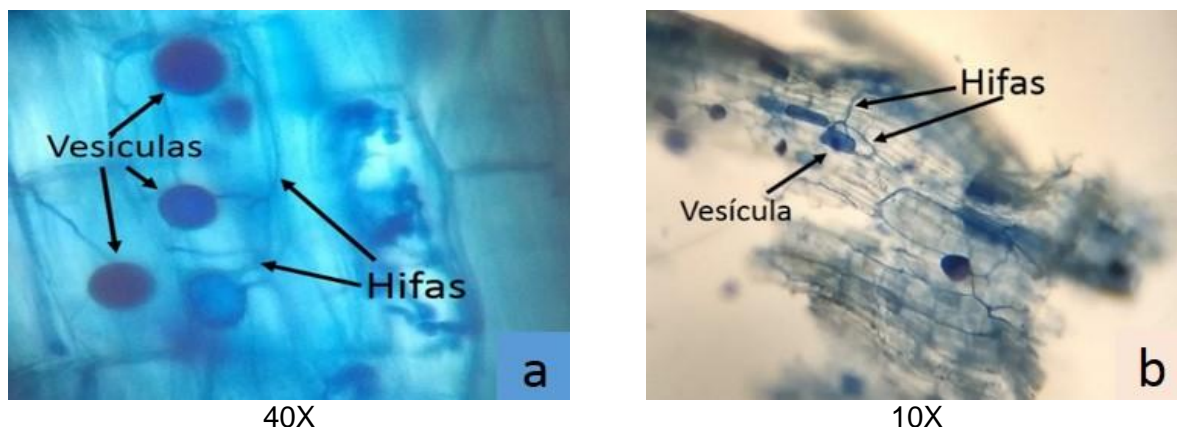


Figura 3. Microfotografías de las raíces de guaje (*L. leucocephala*) mostrando en su interior hifas y vesículas (a y b) de HMA, obtenidas en el experimento de inoculación de HMA en plantas nativas de SBC en vivero, en Morelos, México.

Cuadro 4. Parámetros de crecimiento de caobilla (*S. humilis*) a los 120 días después de la siembra, en el experimento de inoculación de HMA en plantas nativas de SBC en vivero, en Morelos, México.

| Tratamiento | Altura de planta (cm) | Peso seco de vástago (g) | Peso seco de raíz (g) | Colonización por HMA (%) |
|-------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| SH | 14.75 ab [§] | 2.38 a | 1.48 a | 18.30 a |
| SHE | 14.17 ab | 1.38 b | 0.90 b | 0.00 b |
| SH+I | 13.25 ab | 1.65 b | 0.73 b | 21.60 a |
| SHE + I | 16.17 a | 2.48 a | 1.57 a | 28.30 a |
| SHE + IE | 10.50 b | 1.03 b | 0.62 b | 0.00 b |

SH= Sustrato Huajintlán; SHE= Sustrato Huajintlán estéril; SH+I= Sustrato Huajintlán + inóculo cultivo trampa; SHE+I= Sustrato Huajintlán estéril + inóculo cultivo trampa; SHE+IE= Sustrato Huajintlán estéril + inóculo cultivo trampa estéril. ([§]En las columnas, letras iguales indican igualdad estadística).

Cuadro 5. Parámetros de crecimiento del vástago de guaje (*L. leucocephala*) a los 120 días después de la siembra, en el experimento de inoculación de HMA en plantas nativas de SBC en vivero, en Morelos, México.

| Tratamiento | Altura de planta (cm) | Peso seco de vástago (g) | Peso seco de raíz (g) | Colonización por HMA (%) |
|-------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| SH | 41.50 a [§] | 3.48 a | 2.22 a | 25.10 a |
| SHE | 37.33 a | 1.75 a | 0.86 a | 0.00 b |
| SH+I | 40.60 a | 1.92 a | 1.28 a | 20.00 a |
| SHE + I | 44.92 a | 3.68 a | 1.92 a | 25.00 a |
| SHE + IE | 32.08 a | 1.88 a | 1.30 a | 0.00 b |

SH= Sustrato Huajintlán; SHE= Sustrato Huajintlán estéril; SH+I= Sustrato Huajintlán + inóculo cultivo trampa; SHE+I= Sustrato Huajintlán estéril + inóculo cultivo trampa; SHE+IE= Sustrato Huajintlán estéril + inóculo cultivo trampa estéril. ([§]En las columnas, letras iguales indican igualdad estadística).

Para el caso de palo dulce se observaron diferencias en la altura de planta, peso seco de vástago y peso seco de raíz. El porcentaje de colonización fue diferente entre los tratamientos micorrizados y no micorrizados (Cuadro 6). En la altura de planta, peso seco de vástago y peso seco de raíz el tratamiento SHE+I fue estadísticamente superior a los otros cuatro tratamientos que fueron iguales entre sí. En el porcentaje de colonización los tratamientos SH, SH+I y SHE+I fueron iguales entre si y superiores al SHE y al SHE+IE.

Hernández-Cuevas *et al.* (2011) propagaron e inocularon con HMA a *Amelanchier denticulata* (tlaxistle) y *E. polystachya* (palo dulce), plantas nativas que forman micorriza arbuscular. Las plantas se inocularon con una mezcla de tres cepas de HMA aisladas de suelos de Tlaxcala: *Glomus claroideum*, *Acaulospora laevis* y *A. morrowiae*. En el tlaxistle y el palo dulce los porcentajes de colonización micorrízica fueron bajos (menores de 20% para tlaxistle y de 10% para palo dulce), pero los individuos micorrizados mostraron las mejores respuestas en altura de planta y biomasa aérea ($p < 0.001$).

Los resultados en cuanto a porcentaje de colonización reportados por otros autores tienen variaciones importantes y parece que no se correlacionan con los resultados del crecimiento de las plantas. Jiménez *et al.* (2017) reportaron diferentes porcentajes de colonización en Chile, cuando se inoculó con *Scutellospora fulgida* (26.31%), *Funneliformis mosseae* (58.47%) y *Glomus manihotis* (9.31%) observando a *F. mosseae* como estadísticamente superior; aunque en los parámetros de crecimiento de la planta *S. fulgida* fue superior en la altura de planta, *F. mosseae* fue superior en biomasa seca aérea y *F. mosseae* y *S. fulgida* fueron superiores en la masa seca de raíz. En otro estudio en papaya, Pirela-Almanza *et al.* (2018) utilizando inóculos de *S. fulgida*, *F. mosseae* y *G. manihotis*,

encontraron diferencia estadística en el porcentaje de colonización, que fue de 36.6%, 47.0% y 38.6% respectivamente; pero en la altura de planta y en la biomasa aérea no observaron diferencias significativas.

Por otro lado, De Sousa-Lima y Da Silva-Sousa (2014) trabajando con eucalipto (*Eucalyptus grandis*) encontraron diferencias significativas en los porcentajes de colonización de cuatro inóculos, *Glomus etunicatum* (30.5%), *Glomus manihotis* (28.5%), *Acaulospora* sp. (18.5%) y *Entrophospora* (28.0%) siendo *Acaulospora* sp. inferior a los otros tres tratamientos y todos superiores al control; sin embargo en la altura de planta y la biomasa seca aérea los cuatro tratamientos inoculados fueron estadísticamente iguales y superiores al control (sin inóculo). En la biomasa seca de raíz no se observaron diferencias significativas.

El efecto de los tratamientos en cada una de las especies, mostró que la aplicación de micorrizas al sustrato mejora el desempeño de las plantas en contenedor. Los resultados muestran que en la mayoría de los casos el tratamiento de sustrato estéril más inóculo fue el que favoreció mejores rendimientos, posiblemente porque la presencia de los HMA en condiciones de esterilidad permitió que expresaran libremente sus cualidades. Por otro lado el tratamiento de sustrato de Huajintlán aportó las condiciones nativas del suelo en cuanto a la presencia tanto de HMA como de otros microorganismos.

En este trabajo, entre los tratamientos se observaron diferencias significativas en el peso seco de vástago y de raíz en caobilla; en guaje no se observaron diferencias significativas en ninguna de las variables; y en palo dulce se observaron diferencias en la altura de planta, en el peso seco de vástago y en el peso seco de raíz.

Cuadro 6. Parámetros de crecimiento del vástago de palo dulce (*E. polystachya*) a los 120 días después de la siembra, en el experimento de inoculación de HMA en plantas nativas de SBC en vivero, en Morelos, México.

| Tratamiento | Altura de planta (cm) | Peso seco de vástago (g) | Peso seco de raíz (g) | Colonización con HMA (%) |
|-------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
| SH | 23.33 b [§] | 0.89 b | 0.28 b | 43.30 a |
| SHE | 30.58 b | 0.95 b | 0.17 b | 0.00 b |
| SH+I | 38.75 b | 1.10 b | 0.30 b | 33.30 a |
| SHE + I | 59.00 a | 3.32 a | 1.17 a | 28.40 a |
| SHE + IE | 25.00 b | 0.53 b | 0.10 b | 0.00 b |

SH= Sustrato Huajintlán; SHE= Sustrato Huajintlán estéril; SH+I= Sustrato Huajintlán + inóculo cultivo trampa; SHE+I= Sustrato Huajintlán estéril + inóculo cultivo trampa; SHE+IE= Sustrato Huajintlán estéril + inóculo cultivo trampa estéril. (§En las columnas, letras iguales indican igualdad estadística).

En cada caso la respuesta de cada una de las especies, como lo indican varios autores, depende de la interacción que se presenta entre la especie vegetal y la especie del HMA, ya que esta interacción aparentemente tiene cierta especificidad entre ambos organismos.

CONCLUSIONES

En el proceso de aislamiento, se encontraron esporas de HMA con diferentes características en la rizosfera de caobilla (*Swietenia humilis*), guaje (*Leucaena leucocephala*) y palo dulce (*Eyshendhartya polistachya*).

Se detectaron diferencias en el número de esporas cuantificadas en las diferentes muestras de suelo de la rizósfera de los árboles en estudio, que fueron de 68.56, 51.00 y 31.63 esporas /100 g de suelo para caobilla, palo dulce y guaje, respectivamente.

Los porcentajes de colonización de los HMA observados en las diferentes muestras de suelo de la rizósfera de los árboles en estudio, fueron de 17.21%, 70.55% y 58.32%, para caobilla, palo dulce y guaje, respectivamente.

En la evaluación de la inoculación de las plantas en vivero, los porcentajes de colonización de los tratamientos micorrizados fueron estadísticamente iguales entre sí y superiores a los no micorrizados, y en el caso de los parámetros de crecimiento la respuesta fue diferente en cada especie evaluada.

En caobilla se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en el peso seco de vástago y de raíz, donde los tratamientos SH y SHE+I fueron superiores a los demás.

En guaje no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguna de las variables.

En palo dulce se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en la altura de planta, en el peso seco de vástago y en el peso seco de raíz, donde el tratamiento SHE+I fue superior al resto.

LITERATURA CITADA

Aguilar Benítez, S. 1990. Dimensiones ecológicas del estado de Morelos. Ed. CRIM-UNAM. México. 221 pp.

- Aguilera-Gómez, L.I., V. Olalde-Portugal, M.R. Arriaga y R. Contreras-Alonso. 2007. Micorrizas arbusculares. *Ciencia ergo sum*, 14(3): 300-306.
- Alarcón, A. y R. Ferrera-Cerrato. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra Latinoamericana* 17(3): 179-191.
- Allen, M.F. 1991. The Ecology of Mycorrhizae. Cambridge University Press. AMF Phylogeny (<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphyl o/>).
- Barrer, S. 2009. El uso de hongos micorrízicos arbusculares como una alternativa para la agricultura. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 7(1): 124-132, ISSN: 00071536.
- Carballar-Hernández, S., L.V. Hernández-Cuevas, N.M. Montaña, J. Larsen, R. Ferrera-Cerrato, O.R. Taboada-Gaytán, A.M. Montiel-González y A. Alarcón. 2017. Native communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Capsicum annuum* L. respond to soil properties and agronomic management under field conditions. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 245: 43-51.
- Cervantes, V. 1996. La reforestación en la montaña de Guerrero: Una estrategia alternativa con leguminosas nativas. Tesis de Maestría. México Facultad de Ciencias, UNAM. 127 pp.
- Challenger, A. y J. Soberón. 2008. Los ecosistemas terrestres. En: Capital Natural de México. Vol I: Conocimiento Actual de la Biodiversidad, México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. pp. 87-108.
- Cuervo A., J. y G. Rivas P. 2007. Cuantificación de hongos micorrízicos en muestras de suelo en plantaciones de *Tabebuia rosea* y *Cordia alliodora*. *Nova - Publicación científica* 5(7): 38-41.
- De Sousa-Lima, F. y C. Da Silva-Sousa. 2014. Crescimento e nutrição de mudas de clones de eucalipto inoculadas com fungos micorrízicos. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 44(2): 110-118.
- García-Gallegos, E., G. Gómez, O.G. Vázquez y E.M. Zamora. 2009. Respuesta de *Cassia tomentosa* desarrollada en tepetate con inoculación micorrízica bajo condiciones de invernadero. *Revista UDO Agrícola* 9(4): 816-825.
- García-Sánchez, R., A. Monroy-Ata y E. Chimal. 2008. Hongos micorrízicos arbusculares asociados a diferentes plantas y matorrales del Valle del Mezquital, Hidalgo, México. In: Montaña-Arias, N.M., S.L. Camargo-Ricalde, R. García-Sánchez y A. Monroy-Ata (Eds.): Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos. Mundi-Prensa S.A. de C.V., Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, UAM-Iztapalapa. FES-Zaragoza-UNAM, México, D. F. México. pp. 123-136.
- Gerdemann J. W. y T.H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244.
- Hernández-Cuevas, L., G. Santiago-Martínez y P. Cuatlal-Cuahutencos. 2011. Propagación y micorrización de plantas nativas con potencial para restauración de suelos. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 2(7): 87-96.
- Huante, P., E. Ceccon, A. Orozco-Segovia, M.E. Sánchez-Coronado, I. Acosta y E. Rincón. 2012. The role of arbuscular mycorrhizal fungi on the early-stage restoration of seasonally dry tropical forest in Chamela, Mexico. *Revista Árvore* 36(2): 279-289.
- Jiménez, I.J., M. Ramírez, B. Petit, C. Colmenares e I. Parra. 2017. Efecto de hongos Micorrízicos arbusculares y estiércol de bovino en el crecimiento inicial y

- pigmentación en *Capsicum frutescens* L. *Bioagro* 29(2): 137-144.
- Khanam, D., M. Miridha, A. Solaiman y T. Hossain. 2006. Effect of edaphic factor on root colonization and spore population of arbuscular mycorrhizal fungi. *Bull. Ins. Trop. Agr., Kyushu Univ.* 29: 97-104.
- LeTacon, F., J. Garbaye y G. Carr. 1998. The use of micorrizas in temperate and tropical forest. *Simbiosis* 3: 179-206.
- Monroy-Ata, A., J. Estevez, R. García-Sánchez y R. Ríos. 2007. Establecimiento de plantas mediante el uso de micorrizas y de islas de recursos en un matorral xerófilo deteriorado. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 80 (Supl.): 49-57.
- 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. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Pírela-Almarza, A.Y., O.E. Aguirre-Serpa, M.D.C. Ramírez-Villalobos, B. Petit, B. Bracho e I. Parra. 2018. Efecto de hongos micorrízicos arbusculares y del estiércol de ovino en el desarrollo inicial de la lechosa (*Carica papaya* L.) var. maradol roja. *Bioagro* 30(1): 79-86.
- Ramos Zapata, J. y P. Guadarrama. 2004. Los hongos micorrizógenos arbusculares en la restauración de comunidades tropicales. *Universidad y Ciencia*, Num. Esp. 1: 59-65.
- Salas, E., 2004. Las Micorrizas y su Importancia para el Manejo y Conservación de los Árboles del Trópico. Memoria del I Congreso Sobre Suelos Forestales y de Ordenación Territorial ¿Son los Suelos Forestales Diferentes? Universidad Nacional - INISEFOR. Heredia, Costa Rica.
- Salgado-García, S., M. Castelán-Estrada, R. Jiménez-Jerónimo, J.F. Gómez-Leyva y M. Osorio-Miranda. 2014. Diversidad de Hongos micorrízicos arbusculares en suelos cultivados con caña de azúcar en la región de la Chontalpa, Tabasco. *Revista Mexicana de Micología* 40: 7-16.
- SEMARNAT. 2013a. Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México. 360 pp.
- SEMARNAT. 2013b. Inventario estatal forestal y de suelos - Morelos 2013. SEMARNAT-CONAFOR. México. 120 pp.
- Torres-Arias, Y., R.O. Fors, C. Nobre, E.F. Gómez y R.L.L. Barbara. 2017. Production of native arbuscular mycorrhizal fungi inoculum under different environmental conditions. *Brazilian Journal of Microbiology* 48(1): 87-94.
- Viera, W., D. Campaña, A. Lastra, W. Vázquez, P. Viteri y A. Sotomayor. 2017. Micorrizas nativas y su efecto en dos portainjertos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). *Bioagro* 29(2): 105-114.