Pasantía de investigación en el Laboratorio de Ecología del Suelo

Universidad Nacional Autónoma de México UNAM – México

Yeison Alexander Diaz Gallo

Trabajo de Grado para Optar el Título de Ingeniero Forestal

Director

Diego Suescún Carvajal

MSc en Bosques y Conservación Ambiental

Universidad Industrial de Santander

Instituto de proyección regional y educación a distancia

Programa de Ingeniería Forestal

Bucaramanga

2021

Dedicatoria

A ***Luz Dary Gallo*** por ser la luz y el amor de mi vida, mi mejor amiga y mi educadora, y a quien debo todo lo que soy.

A mi novia ***Ingrid Carolina López*** por creer en mí y brindarme las fuerzas que necesitaba en los momentos oscuros.

A mis abuelos ***Efraín*** e ***Irene*** por ser los concejeros de vida y por su amor.

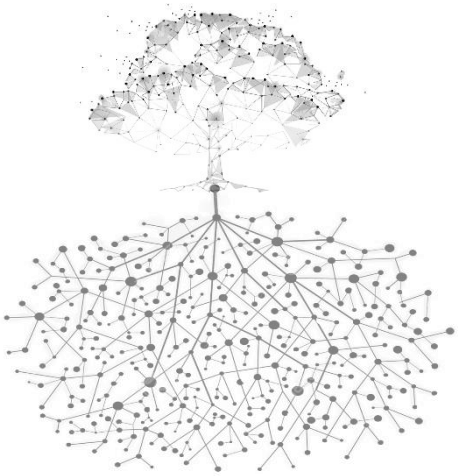
A mis tíos ***Efraín*** y ***Reynel*** por su apoyo incondicional, amor y paciencia.

A mis tías ***Nohora***, ***Evelin*** y ***Liney*** por siempre creer en mí, por su apoyo y amor.

A mis primos **Sebastián**, **Estefanía**, **Lorena**, **Brayan**, **Marlon**, **Salomé**, **Isabela** y **Santiago** por que los amo.

Dedicación especial a mis amigos ***Víctor Orjuela Márquez***, ***Hayde Yergeny Barón*** y ***Diego Suescún Carvajal*** por su apoyo incondicional, por sus concejos, por su sincera amistad y por sus locuras en cada momento personal y académico, y a quien les debo mucho.

Por último, a mis amigos ***Jhorman Hernández*** y ***Steven Herrera*** por su compañía y amistad.



"En la aritmética de la vida, uno siempre es muchos.

Muchos a menudos forman uno, y uno, cuando se examina

más de cerca, aparece compuesto de muchos"

Lynn Margulis en: Sagan D. (2012)

Agradecimientos

Expreso mi más sincera gratitud al todo poderoso por permitirme llegar hasta aquí, por cuidar de mi familia y amigos en estos tiempos de selección natural, pues han sido ellos quienes me han acompañado durante todo el proceso de crecimiento personal y profesional.

A mi madre *Luz Dary Gallo* por regalarme esta oportunidad y brindarme su invaluable tiempo y paciencia, y por estar a mi lado alentando cada etapa de mi vida.

A la Sra. *Ana Barajas* por abrirme las puertas de su hogar y acogerme como un hijo durante toda mi trayectoria académica, agradezco profundamente sus consejos y su paciencia.

A mi alma mater la Universidad Industrial de Santander Sede Málaga por esta grandiosa oportunidad, por ser mi segundo hogar y brindarme las herramientas esenciales para mi formación como ingeniero forestal.

A mi director de tesis MSc. y docente *Diego Suescún Carvajal* por su paciencia y absoluta entrega en la elaboración de este proyecto, por su admirable compromiso y sabios consejos, por creer en mi e inculcarme ese amor por el reino fungí, mi más profunda admiración por su vocación y amor por la naturaleza.

A los docentes con los que tuve la fortuna de compartir un aula de clase y depositaron en mi con mucho amor su conocimiento, en especial a la Dra. *Lizzeth Marcela Torres* por enseñarme lo que es el profesionalismo y rigor académico durante mis primeros pasos en la universidad, agradezco profundamente su loable labor como docente universitaria, al ingeniero forestal y docente *Herwin Ramiro Roa* por sus conocimientos en biología y ciencias forestales, por su gran vocación y exigencia que me acompañaron casi toda la carrera y que me ayudaron a forjar las bases del conocimiento, al ingeniero agrónomo y docente *Rubén Carvajal* por su amistad, consejos,

conocimientos y paciencia a lo largo de mi carrera, y al Dr. y docente *Julián Mauricio Botero* por inspirar y abrir mi interés en la microbiología del suelo.

Agradecimientos especiales a la Universidad Nacional Autónoma de México por hacer posible mi pasantía de investigación en sus instalaciones. Al Dr. *Francisco Javier Álvarez Sánchez* por abrirme las puertas de su laboratorio, por compartir sus conocimientos sobre la biota del suelo y por acogerme con mucho cariño y agrado junto a su equipo de investigación. A la Dra. *Irene Sánchez* por sus consejos y conocimientos brindados sobre los HMA, por recibirme con cariño y entusiasmo en su campo de estudio. A la Dra. *Guadalupe Barajas* por su agradable acogida y conocimientos en las ciencias del suelo. Al MSc. *Juan Carlos Peña* por todos sus conocimientos y buena disposición de trabajo durante toda mi estancia. A la candidata a doctorado *Yurico Pilar Cruz* por colaborarme en todo momento y aclarar mis dudas. A la estudiante de pregrado *María del Rosario Aguilar* por todo su apoyo y enseñanza en las actividades de laboratorio.

Por último, pero no menos importante agradezco con todo el corazón a todas las personas y docentes que dedicaron su tiempo a mi formación como profesional integral, mi más sincero afecto, respeto y admiración a todos, gracias.

Tabla de Contenido

Pág.

Introducción 14

1. Objetivos 17

1.1 Objetivo general 17

1.2 Objetivos específicos 17

2. Antecedentes 18

2.1 Metodologías adoptadas para el estudio de HMA en Colombia 18

2.2 Metodologías adoptadas para el estudio de HMA en México 19

2.3 Metodologías adoptadas para el estudio de HMA en otros países de Sur América 21

3. Marco referencial 22

3.1 Marco teórico 23

3.1.1 Suelo. 23

3.1.1.1 El suelo como sistema vivo 24

3.1.2 Funciones agregadas del ecosistema y su relación con la biota edáfica 25

3.1.2.1 Descomposición de materia orgánica. 25

3.1.2.2 Ciclo de nutrientes. 26

3.1.2.3 Bioturbación. 26

3.1.2.4 Enfermedades y control de plagas. 26

3.1.3 Grupos funcionales de la biota del suelo 27

3.1.4 Micorriza 29

3.1.4.1 Micorrizas formadas por hongos septados. 31

3.1.4.1.1 Ectomicorrizas 31

3.1.4.1.2 Ectendomicorrizas. 31

3.1.4.1.3 Arbutoides. 31

3.1.4.1.4 Monotropoides. 32

3.1.4.1.5 Ericoides. 32

3.1.4.1.6 Orquidioides. 32

3.1.4.1.7 Endófitos septados oscuros (DSE). 33

3.1.4.2 Micorrizas formadas por hongos aseptados. 33

3.1.4.2.1 Hongos micorrizogenos arbusculares (HMA). 33

3.2 Marco conceptual 39

4. Metodología 43

4.1 Área de estudio 43

4.1.1 Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas 43

4.1.1.1 Clima 44

4.1.1.2 Suelo. 44

4.1.1.3 Vegetación. 45

4.1.2 Laboratorio de Ecología del Suelo y Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel. 46

4.1.2.1 Clima de la REPSA. 46

4.1.2.2 Suelo de la REPSA 47

4.1.2.3 Vegetación de la REPSA 47

4.2 Trabajo de campo 48

4.2.1 Muestreo de suelo 48

4.2.2 Muestreo de suelo para extracción de micelio 50

4.3 Trabajo de laboratorio 50

4.3.1 Extracción de micelio extrarradical 50

4.3.2 Cuantificación de micelio extrarradical 52

4.3.3 Tinción de raíces y cuantificación de estructuras intrarradicales 55

5. Resultados 57

6. Discusión y Conclusiones 58

7. Recomendaciones 60

Referencias Bibliográficas 62

Apéndices 81

Lista de Tablas

Pág.

Tabla 1. Grupos funcionales de la biota del suelo 27

Tabla 2. Efectos de los HMA a nivel individual y ecológico 37

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1. Factores y procesos formadores del suelo en ecosistemas terrestres 24

Figura 2. Idealización de hábitat en menos de 1 mm de suelo 25

Figura 3. Clasificación de micorrizas por su colonización y estructuras especiales 34

Figura 4. Esquema de la colonización intercelular e intracelular y micelio extrarradical de HMA 35

Figura 5. Esquema representativo de los tipos de hifas y arquitectura de hifas asociadas con raíces HMA 36

Figura 6. Mapa de ubicación de las zonas de estudio RBLT, REPSA y Laboratorio de Ecología del Suelo 48

Figura 7. Nucleador con muestra de suelo y esquema de las parcelas de investigación 49

Figura 8. Ubicación correcta de la pipeta para la toma de alícuotas..... 52

Figura 9. Dirección de desplazamiento correcto para la cuantificación de ME sobre membrana de nitrocelulosa..... 54

Figura 10. Ubicación y secuencia correcta para el conteo de campos sobre la cuadricula de membrana de nitrocelulosa 54

Lista de Apéndices

Pág.

Apéndice 1. Estación biológica en los Tuxtlas Veracruz, México. 81

Apéndice 2. Facultad de Ciencias y Laboratorio de Ecología del Suelo. 81

Apéndice 3. Reserva Ecológia del Pedregal de San Ángel UNAM. 82

Apéndice 4. Tamizaje y pesaje de las muestras de suelo. 82

Apéndice 5. Separación de suelo y ME mediante agitación orbital. 83

Apéndice 6. Primera separación de suelo y ME mediante toma de alícuotas con agitador en movimiento. 83

Apéndice 7. Segunda separación de suelo y ME mediante pipeteo y agitación en movimiento.. 84

Apéndice 8. Tamizaje de la segunda separación mediante alícuotas y agitación en movimiento.84

Apéndice 9. Membranas de nitrocelulosa utilizadas para la captura de ME por filtración de vacío. 85

Apéndice 10. Ubicación de membranas de nitrocelulosa en el colector de vacío múltiple. 85

Apéndice 11. Transferencia de los residuos tamizados a las membranas de nitrocelulosa con ayuda de una piseta. 86

Apéndice 12. Adición de azul de tripano para la tinción del ME. 87

Apéndice 13. Reposo de membranas con azul de tripano y filtración con bomba de presión y vacío. 87

Apéndice 14.Extracción de membranas teñidas con ayuda de pinza de disección. 88

Apéndice 15. Montaje de membranas en portaobjetos y fijación con PVGL. 88

Apéndice 16. Observación y cuantificación de ME con rejilla micrométrica, microscopio de luz y contador click. 89
Apéndice 17. Observación y cuantificación microscópica de ME con objetivo de 20X. 89
Apéndice 18. Separación de raíces finas para realizar el proceso de tinción. 90
Apéndice 19. Selección y ubicación de las raíces en rejillas histológicas. 90
Apéndice 20. Adición de hidróxido de potasio (KOH) para despigmentación radicular. 91
Apéndice 21. Lavado con agua de grifo para la eliminación de restos de suelo y tierra. 91
Apéndice 22. Autoclave industrial para acelerar el proceso de eliminación de taninos radiculares. 92
Apéndice 23. Preparación de muestras para la autoclave. 92
Apéndice 24. Introducción de muestras de raíces a la autoclave. 93
Apéndice 25. Extracción y eliminación residual de taninos radiculares. 93
Apéndice 26. Aclaramiento con agua oxigenada y acidificación con ácido clorhídrico (HCl). ... 94
Apéndice 27. Preparación para tinción radicular. 94
Apéndice 28. Tinción radicular con azul de tripano al 0,05% 95
Apéndice 29. Adición de lactoglicerol para conservación de raíces teñidas y posterior montaje. 95
Apéndice 30. Montaje de raíces teñidas y fijación con PVGL. 96
Apéndice 31. Identificación y observación de colonización de HMA. 97
Apéndice 32. Estructuras funcionales de HMA observadas con objetivo de 20X. 98
Apéndice 33. Formato utilizado para el conteo de colonización de HMA. 99
Apéndice 34. Actividades realizadas a lo largo de la pasantía de investigación 100
Apéndice 35. Exámenes presentados para el taller de la ecología de la biota del suelo. 101
Apéndice 36. Nota final de la pasantía y documentos de verificación 101

Resumen

Título: Pasantía de investigación en el Laboratorio de Ecología del Suelo Universidad Nacional Autónoma de México UNAM – México.[*]

Autor: Yeison Alexander Diaz Gallo[**]

Palabras clave: Técnicas de extracción, Tinción, Hongos Micorrízicos Arbusculares, Micelio, Hifas, Vesículas, Colonización, Microscopia.

Descripción:

La internacionalización en la Universidad Industrial de Santander es el proceso que fomenta los lazos de cooperación e integración con sus pares en otros lugares del mundo, con el objetivo de alcanzar mayor presencialidad y visibilidad internacional en un mundo cada vez más globalizado. Para el programa de ingeniería forestal es una oportunidad fundamental para expandir su campo académico-científico y diversificar las ramas de investigación en las ciencias forestales. Por lo tanto, el presente proyecto busca dilucidar la experiencia de una pasantía de investigación internacional que tuvo por objetivo el apoyo y reproducción de técnicas para la extracción y análisis de estructuras de Hongos Micorrizogenos Arbusculares (HMA), de muestras procedentes de proyectos de investigación del Laboratorio de Ecología del Suelo en la zona de la selva húmeda de Veracruz, México y la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las metodologías realizadas se enfocaron en la toma de muestras del suelo, selección, decoloración y tinción de raíces, colonización, reconocimiento de estructuras, extracción y cuantificación de micelio extrarradical. Además, se abordaron aspectos teóricos y prácticos sobre los HMA. Finalmente, se manifiesta la adquisición de conocimiento y experiencia en el manejo metodológico de los HMA, orientado a la comprensión de sus estructuras funcionales y el entendimiento de las fórmulas matemáticas utilizadas para su cuantificación. De esta manera, se espera brindar las herramientas básicas para incentivar a los docentes y futuros estudiantes a interesarse por esta rama del saber, además del enriquecimiento académico y cultural que pueden llegar a ofrecer las pasantías de investigación.

[*] Trabajo de Grado

[**] Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia. IPRED. Programa de Ingeniería Forestal. Director: Suescún Carvajal, Diego. MSc en Bosques y Conservación Ambiental.

Abstract

Title: Research Internship in Soil Ecology Laboratory of Universidad Nacional Autonoma de Mexico UNAM - Mexico.[*]

Author: Yeison Alexander Diaz Gallo[**]

Key Words: Extraction techniques, Staining, Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Mycelium, Hyphae, Vesicles, Colonization, Microscopy.

Descripción:

Internationalization at the Universidad Industrial de Santander is the process that promotes co-operation and integration with its peers in other parts of the world, with the aim of achieving greater presence and international visibility in an increasingly globalized world. In the forestry engineering career, it is a fundamental opportunity to expand its academic-scientific field and diversify the research branches in forestry sciences. Therefore, this documents seeks to elucidate the experience of an international research internship that aimed to support and reproduce techniques for the extraction and analysis of structures of Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF), of samples from research projects of the Soil Ecology Laboratory in the humid jungle area of Veracruz, Mexico and the Pedregal de San Ángel Ecological Reserve of Universidad Autonoma de Mexico. The methodologies performed were focused on taking soil samples, selection, discoloration and staining of roots, colonization, recognition of structures, extraction, and quantification of extraradical mycelium. In addition, theoretical and practical aspects of AMF are included. Finally, knowledge and experience about methodological management of AMF is exposed, what aims understanding of its functional structures and mathematical formulas applied for its quantification. In this way, it is expected to provide the basic tools to encourage teachers and future students to take an interest in this branch of knowledge, besides the academic and cultural enrichment that research internships can offer.

[*] Bachelor Thesis

[**] Instituto de Proyección Regional y Educación a Distancia. IPRED. Programa de Ingeniería Forestal. Director: Suescún Carvajal, Diego. MSc en Bosques y Conservación Ambiental.

Introducción

El suelo como ecosistema, es un hábitat que alberga una amplia gama de organismos dentro de los tres dominios taxonómicos (Bacteria, Archaea y Eukarya) (Woese et al., 1990; Moreira et al., 2012; Bracamontes et al., 2016), y se estima que puede llegar a abarcar más del 25% de la biodiversidad del planeta (Moreira et al., 2012). Sin embargo, poco se sabe sobre la biodiversidad del suelo y es poco estudiada debido a su dificultad, convirtiéndose en una de las últimas fronteras en la investigación de la biodiversidad (Moreira et al., 2012; Coleman et al., 2017). Entretanto, Etter et al., (2005) y Coleman et al., (2017) afirman que el cambio climático y el cambio de uso del suelo son los mayores agentes de perturbación en la biología y ecología del suelo, desde escalas locales hasta globales, especialmente en los trópicos y subtrópicos.

En el contexto de la riqueza biológica de Colombia, la pérdida de biodiversidad para el año 2017 alcanzó el 18% (Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt, 2017), y sus núcleos principales de deforestación con un 70% fueron la praderización, la extracción de madera, la ganadería extensiva, la extracción ilícita de minerales, los cultivos ilícitos y la infraestructura de transporte (Instituto Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales [IDEAM], 2017). En consecuencia, el remplazo de los bosques naturales y la destrucción de la biota del suelo tiene efectos directos en la disponibilidad de materia orgánica necesaria para la vida vegetal (Fracetto et al., 2013; Garzón, 2015), y su disminución trae como consecuencia baja calidad del suelo, poca circulación de nutrientes y agua (Koutika et al., 1997; Barlow et al., 2007; Calviño-Cancela et al., 2012; Alegre et al., 2015; Gómez et al., 2018). Asimismo, un grupo determinante para la conservación del suelo y las comunidades vegetales son los hongos

micorrízicos arbusculares (HMA), organismos altamente amenazados por su gran sensibilidad a factores externos y pérdida significativa de las coberturas forestales (Jasso, 2010; Alegre et al., 2015; Rodríguez, 2018).

Por otra parte, la estructura y el funcionamiento de los bosques naturales tropicales están fuertemente influenciados por interacciones microbianas, en especial la de los hongos micorrízicos, los cuales presentan un papel ecológico y económico de gran trascendencia para la diversidad y las comunidades humanas (You et al., 2014; Urgiles et al., 2016). Lamprecht (1990) los describe como estabilizadores imprescindibles de los ciclos biogeoquímicos en el suelo, y asegura que debido a estas asociaciones es el bosque quien conserva al suelo y no el suelo al bosque. Además, se considera que los HMA podrían representar el segundo componente más grande en biomasa para muchos ecosistemas terrestres, los estudios demuestran que los HMA asociados con las plantas reciben entre el 60% y el 90% de carbono del dosel forestal, pudiendo ser un importante sumidero de carbono para el planeta (Montaño et al., 2007).

Dada su importancia, los profesionales y técnicos que trabajan los sistemas agrarios, la conservación del suelo y del ambiente, requieren conocer la existencia de esta simbiosis, las metodologías básicas para su estudio y manipulación, así como también las herramientas que faciliten su reconocimiento tanto en campo como en laboratorio (Sánchez de Prager et al., 2010). Por lo cual, el avance en esta rama del saber requiere la constitución de redes de investigación que conecten a las diferentes instituciones nacionales e internacionales, que faciliten e integren el conocimiento generado con el objetivo de colocarlo al servicio de los usuarios como: científicos, técnicos, estudiantes, agricultores y sociedad civil (Sánchez de Prager et al., 2007). Sin embargo, la implementación y desarrollo de las técnicas para el estudio de los HMA requieren de una infraestructura con la que no todos los laboratorios pueden contar, más aquellos localizados en

regiones como Santander, Colombia, en donde existen algunas limitaciones que desestimulan una inversión en costosos equipos (Peña-Venegas et al., 2006). Sumado a ello, la dificultad se incrementa debido a la naturaleza biológica de su estudio, la cual requiere de cierta experiencia en campo y en laboratorio (Boddington et al., 1999).

Por lo tanto, el presente proyecto buscó dilucidar la experiencia de una pasantía de investigación internacional. Las metodologías realizadas se enfocaron en la toma de muestras del suelo, selección, decoloración y tinción de raíces, colonización, reconocimiento de estructuras, extracción y cuantificación de micelio extrarradical. Además, se abordaron aspectos teóricos y prácticos sobre los HMA. De esta manera, se espera brindar las herramientas básicas para incentivar a los docentes y futuros estudiantes a interesarse por esta rama del saber, además del enriquecimiento académico y cultural que pueden llegar a ofrecer las pasantías de investigación.

Objetivos

1.1 Objetivo general

Aplicar técnicas para la extracción y análisis de estructuras de HMA, de muestras procedentes de proyectos de investigación del Laboratorio de Ecología del Suelo en la zona de la selva húmeda de Veracruz, México y la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de la UNAM.

1.2 Objetivos específicos

Aplicar los protocolos utilizados por el Laboratorio de Ecologia del Suelo para el muestreo de suelo en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.

Emplear las técnicas utilizadas por el Laboratorio de Ecología del Suelo para la extracción de micelio extrarradical y la observación de estructuras funcionales (vesículas, ovillos, arbusculos y esporas) de HMA, mediante la selección, decoloración y tinción de raíces.

Analizar el procedimiento y las herramientas utilizadas por el Laboratorio de Ecologia del Suelo para la cuantificación de micelio extrarradical y colonización de HMA.

Antecedentes

A continuación, se presenta una síntesis de las metodologías utilizadas para el estudio de estructuras de HMA en América Latina.

1.3 Metodologías adoptadas para el estudio de HMA en Colombia

Pérez et al., (2016) en su estudio colonización de micorrizas arbusculares en tres especies de pasturas del departamento de Sucre, utilizaron un tubo de plástico de PVC de 3,8 cm de diámetro y 25 cm de longitud para colectar las muestras de suelo y raíces; la profundidad definida fue de 0 a 20 cm. Asimismo, para la determinación de colonización de HMA tomaron raíces de 1 cm de longitud, basados en Phillips & Hayman (1970) las sometieron a procesos de aclareo en KOH al 10% durante 24 horas, blanqueo con agua estéril, acidificación en HCL al 1% durante 30 minutos y tinción con azul de tripán a 0,1% en lactofenol; las raíces se observaron con objetivo de 40 X y el porcentaje de colonización lo calcularon como: número de campos positivos x 100 / número total de campos observados (positivos y/o negativos).

Hernández & Monroy (2017) en su trabajo caracterización de hongos micorrícicos arbusculares asociados a tres clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el Yopal (Casanare), Colombia, obtuvieron muestras a una profundidad de 10 a 30 cm, donde colectaron 1 kg entre suelo y raíces en cada punto de muestreo, posterior a ello las almacenaron a 4ºC. Para la cuantificación de colonización de HMA tomaron 20 fragmentos de raíces de 1 cm de largo, el proceso para la tinción de raíces siguió lo propuesto por Phillips & Hayman (1970) la tinción se

realizó con azul de tripano al 0,05%, para la cuantificación del porcentaje de colonización utilizaron el método de intersección de grilla propuesto por Tennant (1975).

Restrepo et al., (2019) en su estudio caracterización de hongos micorrízicos arbusculares de suelos ganaderos del trópico alto y trópico bajo en Antioquia, Colombia, obtuvieron muestras compuestas en cada uno de sus sitios de muestreo, la extracción del suelo la realizaron a una profundidad de 20 cm. Para la determinación del porcentaje de colonización las raíces se sometieron a procesos de decoloración, acidificación y tinción con azul de tripano al 0,05%; para el cálculo del porcentaje siguieron lo propuesto por Phillips & Hayman (1970) el grado de colonización lo obtuvieron según los criterios de Nicolson & Schenck (1979).

Por último, Sandoval (2019) en su trabajo Efecto de las comunidades locales de hongos formadores de micorrizas arbusculares y patrones de injertación en la fisiología de plántulas de cacao sometidas a estrés por cadmio y zinc utilizó raíces de 2 mm para evaluar la presencia y porcentaje de colonización, las raíces se tiñeron siguiendo la metodología propuesta por Vierheilig et al. (1998) se sometieron a procesos de decoloración, acidificación, tinción con tinta negra (Sheaffer SKRIP®) y vinagre, y eliminación de exceso de colorante. Las raíces teñidas se sumergieron en lacto-glicerol y se almacenaron en refrigeración de 2-8ºC para evitar deterioro hasta la cuantificación. El porcentaje de colonización lo evaluó mediante estereoscopio por medio del método de intersección de la grilla de Giovannetti & Mosse (1980).

1.4 Metodologías adoptadas para el estudio de HMA en México

Casariego (2017), en su trabajo análisis de la producción de micelio extrarradical y colonización intrarradical de los hongos micorrizógenos arbusculares en potreros y cultivos

derivados de una selva húmeda en Los Tuxtlas, Veracruz, utilizó un nucleador de 15 cm de diámetro y 20 cm de largo para realizar el muestreo de suelo y raíces, obtuvo una muestra compuesta de 1 kg por cada sitio de muestreo. Para la cuantificación de micelio extrarradical y colonización de HMA el autor separo 10 g de raíces y 30 g de suelo que luego fueron almacenados a una temperatura de 3°C; utilizó 5 g de suelo para realizar la extracción de micelio extrarradical mediante la técnica de Miller & Jasrow (2000) con las modificaciones de Jasso (2010) y Sánchez de Prager et al. (2010), la tinción la realizó con azul de tripano para micelio y raíces. Para la cuantificación de micelio extrarradical utilizo la técnica de Boddington et al. (1999) y para la evaluación de colonización el método de Phillips & Hayman (1970), las observaciones microscópicas fueron con un objetivo de 20X.

Fabián et al., (2018) en su estudio arbuscular mycorrhizal fungi in a coastal wetland in Yucatan, Mexico, tomaron raíces menores a 2 mm de diámetro para evaluar la colonización por HMA, las raíces muestreadas las sometieron a procesos de blanqueo y tinción con azul de tripano bajo la metodología de Brundrett et al. (1996) y Phillips & Hayman (1970) con las modificaciones propuestas por Hernández-Cuevas et al. (2008). Utilizaron portaobjetos con 10 a 12 raíces teñidas para observar colonización y estructuras de HMA, la cuantificación de colonización total y de cada estructura la efectuaron bajo los lineamientos de McGonigle et al. (1990), examinaron 100 campos con un objetivo de 100X.

Hernández-Zamudio et al., (2018) en su estudio dinámica de la diversidad temporal de los hongos micorrícicos arbusculares de *Larrea tridentata* (Sesse & Mocino ex DC) Coville en un ecosistema semiárido, recolectaron suelo y raíces entre 2 cm y 15 cm de profundidad, el suelo se tamizo con una malla de 2 mm que luego se almaceno a una temperatura de 4ºC. Las raíces se sometieron a procesos de limpieza con agua corriente, aclareo y tinción con azul de tripano; para

evaluar la colonización los autores examinaron 10 segmentos de raíces de 1 cm de largo utilizando un objetivo de 40 X basados en Phillips & Hayman (1970).

Finalmente, Vázquez-Santos et al., (2019) en su estudio the reproductive phenology of *Acaena elongata* and its relation with arbuscular mycorrhizal fungi" utilizaron raíces finas para evaluar la presencia de HMA, procesaron las raíces bajo los métodos de Koske & Gemma (1989) la tinción se realizó con azul de tripano al 0,05%; para evaluar la colonización utilizaron 25 fragmentos raíces de 2 cm de largo y las fijaron en portaobjetos con PVGL, las observaciones las realizaron con objetivos de 20 X y 40 X, cada fragmento se examinó en cuatro puntos utilizando el método de intersección en cruz de McGonigle et al. (1990) y se observaron 80 campos en total.

1.5 Metodologías adoptadas para el estudio de HMA en otros países de Sur América

En un estudio publicado en Argentina por Castillo et al., (2016) titulado colonización temprana de hongos micorrícicos arbusculares en trigo con aplicación de productos naturales en un Andisol de La Araucanía, los autores utilizaron el método de Phillips & Hayman (1970) para someter las raíces a lavado y tinción con azul de tripán al 0,05%, la cuantificación de colonización la realizaron con 10 raíces que colocaron sobre un portaobjetos. Cuantificaron los puntos de entrada de hifas, intensidad y frecuencia de micorrización bajo la metodología propuesta por Trouvelot et al. (1986).

Otro estudio realizado en Ecuador por Meza et al., (2017) titulado Identificación de Hongos Micorrízicos en Plantaciones de Melina (*Gmelina arborea* Roxb) en el Trópico Húmedo Ecuatoriano, los autores definieron el muestreo a 20 cm de profundidad, utilizaron un barreno y bolsas plásticas rotuladas para extraer las muestras, obtuvieron una muestra compuesta de suelo

de 2 kg y 80 g de raíces que luego fueron almacenadas a una temperatura de 4 a 10°C. Para la determinación de colonización sometieron las raíces a procesos de despigmentación y tinción con azul de tripano al 0,05% basados en la metodología de Phillips & Hayman (1970) y Giovannetti & Mosse (1980), las observaciones se realizaron con objetivo de 40 X en 50 segmentos de raíz.

Un estudio realizado en Venezuela por Parra-Rivero et al., (2018) titulado anatomical description of the arbuscular mycorrhizal fungi colonization in two tree legumes, analizó raíces secundarias menores a 1 mm de anchas para determinar la colonización de HMA, las raíces se segmentaron a 1 cm de longitud, y se cortaron longitudinalmente a mano alzada para la observación . Se sometieron a procesos de aclareo y tinción con azul de tripano y fucsina ácida mediante los protocolos propuestos por Phillips & Hayman (1970). El porcentaje de colonización lo determinaron siguiendo la metodología de McGonigle et al. (1990), y las observaciones microscópicas las realizaron con aumentos de 40 X y 100 X.

Por último, Santillana & Toro (2018) en su estudio asociación micorrízica arbuscular en pastizales de la Comunidad Alto Andina de Ccarhuaccpampa-Ayacucho Perú, tomaron la totalidad del sistema radical y suelo rizosférico a una profundidad de 20 cm, las raíces muestreadas las sometieron a procesos aclareo, acidificación, tinción con azul de tripano al 0,05% y eliminación de excesos de colorante siguiendo la metodología de Phillips & Hayman (1970). La cuantificación de la colonización la realizaron mediante el método de intersección de cuadrantes y campos colonizados propuesto por Giovannetti & Mosse (1980), las observaciones se realizaron con objetivo de 40 X.

Marco referencial

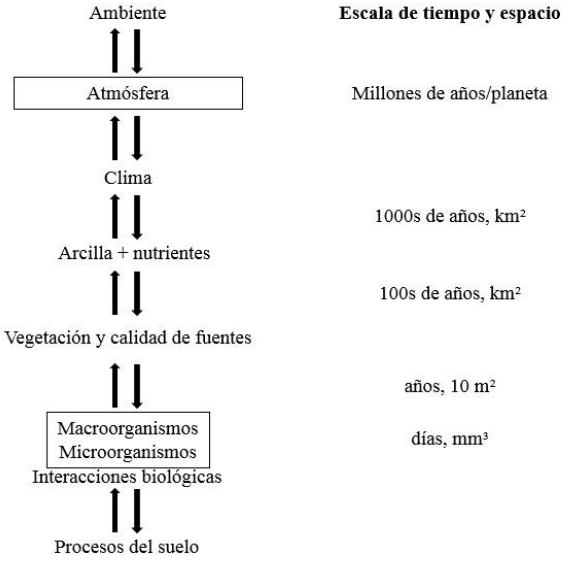
1.6 Marco teórico

1.6.1 Suelo.

El suelo es un cuerpo natural resultado de la interacción de factores geológicos, climáticos, biológicos y sociales (Bracamontes et al., 2016), Tarbuck & Lutgens (2005) lo definen como una matriz heterogénea que reúne elementos bióticos y abióticos en donde interactúan cuatro diferentes partes: la litosfera, la atmosfera, la hidrosfera y la biosfera. Es un sistema constituido por dos fases principales, una fase sólida compuesta de minerales y materia orgánica, y una fase porosa que se puede llenar de líquidos y gases (Jaramillo, 2002), y que solo se consolidan como sistema suelo cuando conforman un todo que se expresa en propiedades físicas, químicas y biológicas, dando lugar a diferentes niveles de organización tanto espaciales como temporales (Figura 1) solo posibles en los sistemas vivientes (Sánchez de Prager et al., 2010; Bracamontes et al., 2016).

Figura 1

Factores y procesos formadores del suelo en ecosistemas terrestres

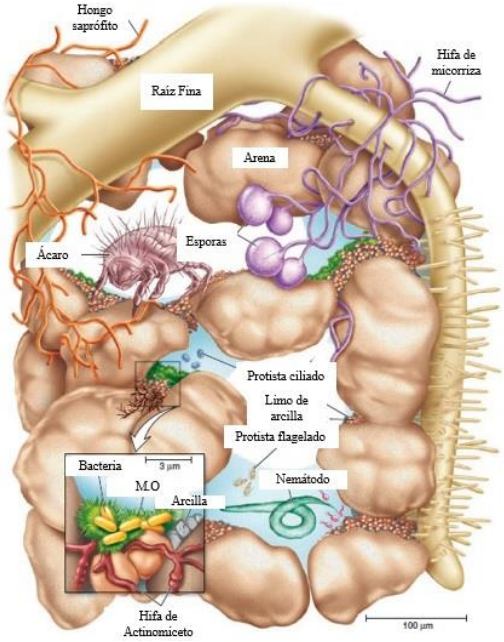


Nota: Adaptado de *Modelo jerárquico de los factores que determinan los procesos formadores del suelo en ecosistemas terrestres* (p. 34), por Sánchez de Prager et al., 2007, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias.

3.1.1.1 El suelo como sistema vivo. Es el hogar de vertebrados, insectos, arácnidos, lombrices, nemátodos, protozoarios, hongos y bacterias (Figura 2) (Bracamontes et al., 2016), y según Moreira et al. (2012) se estiman aproximadamente más de 1,5 millones de especies de eucariontes y más de 10.000 especies de procariontes en el suelo. Es por ello, que se reconoce como uno de los mayores hábitats en el planeta, y gracias a las interacciones reciprocas entre sus organismos y los servicios esenciales que aportan a los ciclos globales, hacen posible la vida en el planeta tierra (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2021).

Figura 2

Idealización de hábitat en menos de 1 mm de suelo



Nota: Idealización grafica donde se observa la gran cantidad de organismos vivos presentes en menos de un gramo de suelo. Adaptado de *The Soil Habitat* (p. 688), por Willey et al., 2008, McGraw Hill Higher Education.

1.6.2 Funciones agregadas del ecosistema y su relación con la biota edáfica

3.1.2.1 Descomposición de materia orgánica. Ocurre principalmente por la actividad enzimática de bacterias y hongos, realizada en gran parte por animales del suelo como ácaros, milpiés, lombrices de tierra y termitas, los cuales trituran los residuos de las plantas y animales (Willey et al., 2008). Se les da el nombre de "transformadores de hojarasca" sin incluir a los ingenieros del ecosistema, como resultado el carbono orgánico es liberado en la atmósfera,

principalmente como CO_2 o CH_4, pero también es incorporado en forma de materia orgánica en el suelo (Chapin lll et al., 2011).

3.1.2.2 Ciclo de nutrientes. Estrechamente asociado con la descomposición orgánica donde los microorganismos también juegan un papel importante, pero el cambio que determina la operación se le atribuye a los micropredadores como protistas, nematodos, colémbolos y ácaros (Swift et al., 2012). Animales más grandes mejoran los procesos ya que proporcionan nichos para un crecimiento microbiano dentro de sus intestinos o excremento; los ciclos de nutrientes por la biota del suelo son indispensables para todo tipo de agricultura y silvicultura (Moreira et al., 2012).

3.1.2.3 Bioturbación. Juega un papel importante en la regulación del equilibrio del agua en el suelo y tiene una fuerte influencia en la erosión del suelo, las raíces de plantas, lombrices de tierra, hormigas y otros integrantes de la fauna del suelo se mantienen físicamente activos, lo que da como resultado modificaciones físicas como canales, poros, agregados, montículos y movimiento de partículas de un horizonte a otro (Carmona et al., 2015). Estos procesos de bioturbación determinan la estructura física del suelo y la distribución de materia orgánica e influyen directamente en las propiedades del suelo como aireación, drenaje, estabilidad de agregados y capacidad de retención de agua; es por esta razón que a este conjunto de organismos se les llaman “ingenieros del ecosistema” (Anderson, 1995; Lavelle, 1996, 1997).

3.1.2.4 Enfermedades y control de plagas. La biota del suelo incluye un amplio rango de virus, bacterias, hongos y animales invertebrados capaces de invadir plantas, animales y humanos, con la posibilidad de producir enfermedades e incluso la muerte (Agrios, 2005; Alegre et al., 2015).

En ecosistemas naturales los brotes de enfermedades y plagas son raros, pero si se evidencian y son comunes en la agricultura, en suelos saludables estas actividades son reguladas por interacciones con otros miembros de la biota del suelo, que incluyen microhervivoros y microdepredadores que se alimentan de plagas microbianas y de animales. En agroecosistemas estas interacciones se ven reducidas debido a la baja disponibilidad de materia orgánica del suelo (Nicholls & Altieri, 2004).

1.6.3 Grupos funcionales de la biota del suelo

A pesar de que no existe una definición precisa de grupos funcionales en la biota del suelo ni de cuantos grupos deberán definirse dentro del suelo, estos se clasifican basándose en la función particular que desempeñan o en el proceso específico del suelo del que son mediadores (Tabla 1) (Swift et al., 2012).

Tabla 1

Grupos funcionales de la biota del suelo

Grupo	Organismo	Función
Productores Primarios	Plantas superiores e inferiores	Fotosintéticos, asimilan bióxido de carbono del aire y penetran el suelo mediante sistema de raíces.
Herbívoros	Minadores de hojas y tallos, chupadores de sabia	Consumen y digieren tejidos vivientes de plantas.

Grupo	Organismo	Función
Ingenieros del ecosistema	Macrofauna como termitas y hormigas	Causan un impacto mayor en el suelo mediante su transporte, construcción de estructuras agregadas y formación de poros, incluyendo ciclaje de nutrientes
Transformadores de hojarasca	Macrofauna, mesofauna y microfauna	Se alimentan de desechos orgánicos originados por microbios y por trituradores de este material, favoreciendo a los descomponedores y el crecimiento microbiano, esta actividad puede ocurrir a escalas espaciales.
Descomponedores	Hongos y bacterias degradadores de celulosa	Poseen las enzimas polímero-degradadoras, son los responsables del mayor flujo de energía en la red alimenticia de los descomponedores.
Predadores	Macrofauna y mesofauna	Regulan a los herbívoros, ingenieros del ecosistema, transformadores de hojarasca, descomponedores y microrreguladores por depredación.
Microrreguladores	Microfauna como nemátodos	Regulan los ciclos de nutrientes mediante forrajeo y otras interacciones con los microorganismos descomponedores.
Microsimbiontes	Hongos micorrízicos y rízobia	Asociados con raíces que facilitan la absorción de nutrientes.
Plagas y enfermedades del suelo	Hongos patógenos, invertebrados, plagas	Especies de control biológico.
Transformadores procariontes	Archea y bacterias	Transforman de manera específica el carbono elementos nutricionales como N, S o P.

Nota: Adaptado de *Principales grupos funcionales de la biota del suelo* (p. 37-38) por Moreira et al., 2012, Instituto Nacional de Ecología.

1.6.4 Micorriza

La colonización de las plantas en la superficie terrestre se remonta al inicio de la era Paleozoica, hace unos 370 a 500 millones de años, y corresponden al orden Rhyniales, estos ancestros de los vegetales carecían de raíces, pero en sus rizomas prototalicos se encontraron vestigios de colonización por hongos, similares a los que forman las endomicorrizas en la actualidad (Sánchez de Prager, 1999; Hynson et al., 2013).

El suelo disponible para las plantas primitivas carecía de elementos y nutrientes esenciales, y se cree que la intervención del simbionte fungoso en la absorción nutricional, fue fundamental para el salto evolutivo de las plantas primitivas a la vida terrestre. Así, las Pteridofitas alcanzaron su máximo esplendor en el periodo carbonífero, y las gimnospermas la supremacía arbórea, tiempo después las angiospermas presentaron el éxito en las especies herbáceas (Simon et al., 1993; Remy et al., 1994; Sánchez de Prager, 1999; Redecker et al., 2000; Bidartondo et al., 2011).

Varios autores, científicos y filósofos del siglo XVII hicieron grandes aportaciones en el entendimiento de estas relaciones simbióticas, pero el investigador alemán Albert Bernard Frank, descubrió la asociación regular de tejidos fungosos (manto), con el tejido radical de algunos árboles, en su artículo "Über die Wurzelsymbiose auf beruhende Ernährung gewisser Bäume durch Unterirdische Pilze" publicado en 1885, propone el término micorriza y reconoce que la colonización estaba ampliamente dispersa entre especies arbóreas*: Fagus, Corylus, Quercus sp,*

Carpinus, Castania, Betulia, Salix, Tilia, Abies, Picea entre otras (Sánchez de Prager, 1999; Urgiles et al., 2016).

Además, en 1887, reconoció que muchas plantas especialmente orquídeas ericáceas y también árboles como *Fraxinus, Acer, Platanus* y *Taxus* eran colonizados por vías diferentes, distinguiendo dos clases de micorrizas: endotrófica y ectotrófica (Sánchez, 1999; Urgiles et al., 2016). Registros fósiles muestran que el origen de la simbiosis endomicorrícica ocurrió más de 400 millones de años durante el Ordovícico (Simon et al., 1993; Remy et al., 1994; Kottke & Nebel, 2005; Parniske, 2008), a diferencia de las ectomicorrizas que son más recientes, con un periodo de 130 a 180 millones de años (Hibbett et al., 2000; Alexander, 2004; Moyersoen, 2006). Se cree que los bosques dominados por roble lograron migrar a latitudes más tropicales gracias a su relación mutualista altamente especializada con micorrizas, las cuales también migraron junto con sus socios tróficos (Mueller et al., 2006).

Por otra parte, las raíces de muchas especies de plantas son colonizadas con hongos micorrízicos, se estima que el 95% de las plantas pertenecen a géneros que característicamente forman micorrizas, por lo que la micotrofía (capacidad de una planta de ser infectada por micorrizas) parece ser la regla y no la excepción en el mundo vegetal (Sánchez, 1999). Las micorrizas son un sistema de raíces modificadas resultante de la asociación entre las raíces de las plantas superiores y ciertos hongos microscópicos del suelo. Esta unión es una simbiosis mutualista que se encuentra en casi todos los ecosistemas (Báez et al., 2015); pueden ser clasificadas en varios grupos de acuerdo a su capacidad de formar esporas dentro de la planta y a las estructuras microscópicas que forman para el intercambio de nutrientes con su hospedero, es necesario dejar claro que nunca el hongo atraviesa la membrana plasmática (Cuenca, 2015).

3.1.4.1 Micorrizas formadas por hongos septados.

3.1.4.1.1 Ectomicorrizas. Desarrollan cuerpos fructíferos que pueden ser hipogeos o epigeos los cuales constituyen su estructura reproductiva más importante, es el tipo de micorriza presente en especies maderables de gran importancia económica y muy abundante en zonas templadas, estos hongos desarrollan un manto que cubre una parte considerable de la raíz (Harley & Smith, 1983). La red de hartig es la estructura diagnóstica para este tipo de micorrizas y se encuentra entre las células de la raíz, se ha evidenciado en angiospermas donde la red esta confinada a la epidermis y en las gimnospermas donde se encuentra en la epidermis y la corteza (Figura 3 d), pueden desarrollar un micelio externo y en ocasiones rizomorfos (Brundrett et al., 1996). Pertenecen al fylum Basidiomycota y Ascomycota, y se considera entre la comunidad científica que estas micorrizas demandan muchos más carbohidratos que los HMA y es por ello que son más abundantes en grandes árboles que puedan cubrir esa demanda de carbono (Cepero de García et al., 2012).

3.1.4.1.2 Ectendomicorrizas. Se caracteriza por tener un manto reducido o ausente, el cual esta empapado por un mucigel que produce la raíz y que sirve de diagnóstico para esta micorriza (Figura 3 e) (Peterson et al., 2004; Cuenca, 2015). Presentan red de hartig y se considera que pueden degradar carbohidratos complejos además de proteger a las plantas por toxicidad de hierro (Smith & Smith, 2011).

3.1.4.1.3 Arbutoides. Estas micorrizas al igual que las Ectomicorrizas y Ectendomicorrizas también desarrollan manto, hifas externas y red de hartig, sin embargo, constituyen estructuras

enrolladas en el interior de la células de la raíz (Willey et al., 2008). Colonizan árboles, arbustos y algunas hierbas sin clorofila, solo dos géneros del Orden Ericales (*Arbutus* y *Arctostaphylos*) son capaces de formar este tipo de micorriza (Peterson et al., 2004; Cuenca, 2015).

3.1.4.1.4 Monotropoides. Presentan un manto grueso, red de hartig confinada a la epidermis y unas estructuras especiales conocidas como clavijas fúngicas, las cuales son hifas cortas que invaden la epidermis de la raíz (Figura 3 f); estas micorrizas se desarrollan únicamente en plantas sin clorofila, que pertenecen al Orden Ericales y todos los géneros *Monotropa* de la familia Ericaceae (Urgiles et al., 2016).

3.1.4.1.5 Ericoides. Presentan colonización por hifas fúngicas en la epidermis radicular seguido de un complejo sistema de hifas ramificadas en cada célula (Figura 3 c), se desarrolla en miembros autótrofos de Ericáceas ya que las plantas pertenecientes a este phylum poseen raíces laterales especializadas (Read, 1996). Se consideran endomicorrizas ya que las hifas no pasan de una célula a otra, las plantas involucradas con estos organismos viven en ambientes donde los nutrientes están en forma principalmente orgánica, integran un nicho ecológico que no están disponibles ni para plantas que no forman micorrizas ni para las que poseen micorrizas arbusculares (Perotto et al., 2012). Pueden adquirir N orgánico como inorgánico mediante la degradación de pectinas y ligninas, además utilizan fosfatos orgánicos (Perotto et al., 2012; Cuenca, 2015).

3.1.4.1.6 Orquidioides. Forman complejos enrollados hifales dentro de la célula (Figura 3 b) por lo que son consideradas endomicorrizas, estas estructuras son digeridas una vez finaliza su

función, este grupo de micorrizas solo forman asociaciones con plantas de la familia de las orquídeas, las cuales carecen de clorofila durante toda o una sola etapa de su vida y su asociación con estos hongos son esenciales para la germinación de la semilla como para su establecimiento (Arditti et al., 1990; McCormick et al., 2004). No hay evidencia de que la asociación sea mutualista, por lo que las orquídeas se consideran plantas micoheterotrofas y las especies de orquídeas sin clorofila se asocian con hongos que forman ectomicorrizas con plantas autótrofas (Peterson et al., 2004; Cuenca, 2015).

3.1.4.1.7 Endófitos septados oscuros (DSE). Son hongos ascomicetos con hifas septadas y pared celular melanizada llamados por la comunidad científica (Dark Septate Endophyte), se han encontrado en más de 600 especies de plantas, que representan aproximadamente 320 géneros y 100 familias pero solo 59 géneros pertenecen a zonas tropicales, se consideran asociaciones de amplio rango ya que abarcan desde el mutualismo hasta parasitismo (Jumpponen & Trappe, 1998; Cuenca, 2015).

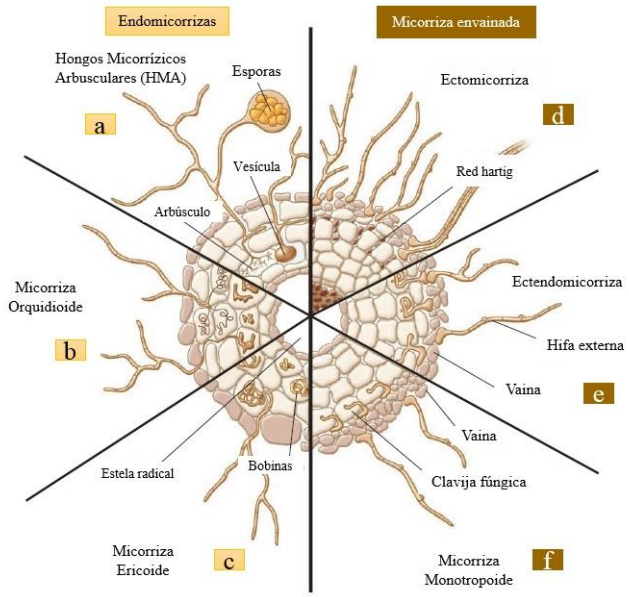
3.1.4.2 Micorrizas formadas por hongos aseptados.

3.1.4.2.1 Hongos micorrizogenos arbusculares (HMA). Son el tipo ancestral de micorriza y tienen una relación mutualista con el 80 % de las plantas pertenecientes a las briofitas, pteridofitas, gimnospermas y angiospermas (Smith & Read, 2008), se han registrado en desiertos, dunas de arena, selvas tropicales, salinas y sistemas manejados como praderas, huertos y cultivos agrícolas, se considera la asociación de mayor frecuencia en los ecosistemas tropicales (Sánchez de Prager et al., 2010). Estos hongos pertenecen al phylum Glomeromycota los cuales se clasifican

en tres órdenes (Diversisporales, Gigasporales y Glomerales) (Schüβler et al., 2001; International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi [INVAM], 2020), esa clasificación toma en cuenta la formación de arbusculos y vesículas intrarradicales (Figura 3 a) como el carácter taxonómico que los unifica, además de los caracteres morfológicos de las esporas, que son las más grandes dentro del reino de los hongos, y que llegan a medir hasta 500 micras con 800 a 35000 núcleos (Cuenca, 2015).

Figura 3

Clasificación de micorrizas por su colonización y estructuras especiales



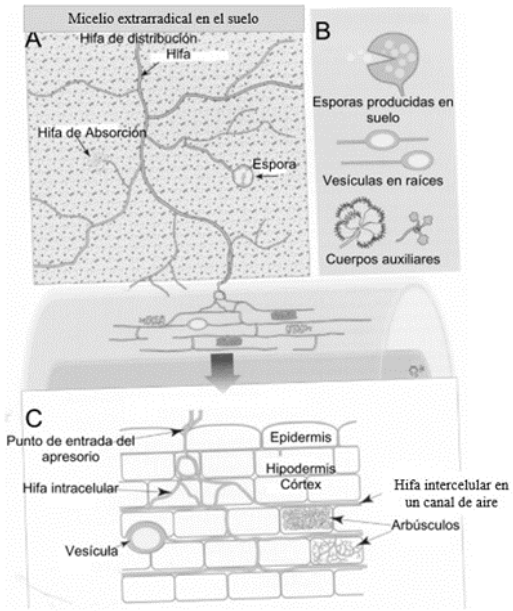
Nota: Sección transversal de una raíz donde se observan los diferentes tipos de colonización y estructuras especiales característicos de las micorrizas. Adaptado de *Mycorrhizae* (p. 699), por Willey et al., 2008, McGraw-Hill.

La característica más significativa de este grupo es que no son cultivables, son biótrofos obligados totalmente dependientes de su planta hospedera para obtener sus carbohidratos (Sánchez

de Prager et al., 2007). Los HMA operan a través de dos fases en las cuales existe el intercambio nutricional, la primera se desarrolla fuera de la raíz del hospedador y se encarga de la búsqueda y absorción de nutrientes presentes en el medio natural, se realiza a través de la producción de un micelio extrarradical (Figura 4) (Smith & Read, 2008). La segunda fase se lleva a cabo dentro de la raíz, e involucra el desarrollo de estructuras especializadas que permiten en intercambio de nutrientes con la planta y el almacenamiento de carbohidratos, esta fase se conoce como colonización intraradical (Figura 4) (Brundrett et al., 1996; Smith & Read, 2008).

Figura 4

Esquema de la colonización intercelular e intracelular y micelio extrarradical de HMA

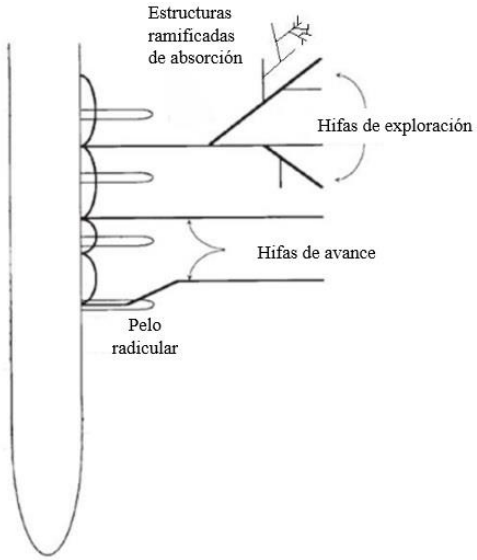


Nota: Imagen donde se representa la colonización y penetración de un HMA perteneciente a la familia Glomaceae donde: A. Son las estructuras que desarrollan los HMA en el suelo; B. Estructuras que se forman en el suelo y/o raíces y C. estructuras que se forman en la raíz. Adaptado de *Glomalean mycorrhizal associations-principal components of VAM associatios*, (p. 22), por Brundrett et al., 1996, Australian Centre for International Agricultural Research.

En la primera fase, los HMA desarrollan una red a partir de dos tipos de hifas distintas, las hifas de avance y las hifas de exploración (Figura 5); las hifas de avance se caracterizan por ser de gran tamaño con paredes gruesas y proyecciones angulares definidas, las hifas de exploración son mucho más finas, y forman ramificaciones continuamente para formar la red del micelio extrarradical, unas vez establecida y formada la red micelial se forman las estructuras ramificadas de absorción (Figura 5) (Harley & Smith, 1983; Smith & Read, 2008).

Figura 5

Esquema representativo de los tipos de hifas y arquitectura de hifas asociadas con raíces HMA



Nota: Adaptado de *Diagrammatic representation of the types of hyphae and hyphal architecture associated with AM roots* (p. 44), por Smith & Read, 2008, Academic Press.

La segunda fase es un proceso dinámico que desarrolla tanto el hongo como la planta, esta ocurre de diversas formas dependiendo de la cantidad y el tipo de propágulo que se encuentre en el suelo, ya sean esporas, raíces ya colonizadas o por hifas en el suelo, pero la colonización por fragmentos de raíz colonizada y micelio son las más efectivas ya que las esporas requieren de

condiciones muy específicas (Guadarrama et al., 2008; Smith & Read, 2008). Cuando la hifa penetra la raíz se extiende de forma radial por la epidermis y la exodermis, desarrollando hifas y micelio inter e intra celular, son etapas gobernadas por procesos de señalización y reconocimiento químico entre la raíz y el hongo (Bonfante & Perotto, 1995; Giovannetti & Sbrana, 1998; Smith & Read, 2008).

Asimismo, se conocen actualmente dos tipos de colonización intraradical, el tipo *Arum* y el tipo *Paris*, el tipo *Arum* se presenta frecuentemente en especies vegetales con ciclos de vida rápidos que se pueden considerar pioneras; la tipo *Paris* es más lenta, con tasas de desarrollo intercelular más bajas (Becerril, 2017). El mismo autor indica la existencia de dos tipos distintos de colonización intrarradical, cuyo desarrollo está relacionado con el ciclo de vida del huésped, indica que los HMA están adaptados a diferentes estados sucesionales del bosque.

Por otro lado, la comunidad científica le atribuye a los HMA muchos efectos a las plantas y el suelo a nivel individual y ecológico, y que se resumen a continuación (Tabla 2):

Tabla 2

Efectos de los HMA a nivel individual y ecológico

Individual	Comunidades y ecosistemas
Aumento de la superficie de absorción del sistema radicular (Agrios, 2005; Alegre et al., 2015).	Unen la parte biótica con la parte geoquímica del ecosistema (O'Neill et al., 1991).
Incremento de la longevidad de las raíces de absorción (Agrios, 2005).	Recuperación de especies después de una perturbación, lo que es importante cuando el disturbio es impredecible (Simard et al., 2003).

Individual	Comunidades y ecosistemas
Mejoran la absorción de nutrientes como C, P, y N (Moreno & Read, 2004; Agrios, 2005; Báez et al., 2015).	Reducen la intensidad de la competencia y promueven la diversidad de especies por transferencia de C o nutrimentos entre plantas conectadas a la red micelial (Simard et al., 2003).
Mayor resistencia al déficit hídrico y aumento del transporte de agua (Espeleta et al., 1999; Osonubi et al., 1991; Ruiz-Lozano & Azcón, 1995).	Reducen las pérdidas de nutrientes de los ecosistemas a través del almacenamiento de nutrimentos en la biomasa viva (Simard et al., 2003).
Facilitan la absorción de iones de inmóviles como el fosfato, cobre y zinc (Munyanziza et al., 1997; Agrios, 2005; Cuenca et al., 2007; Alegre et al., 2015).	Aumentan la productividad, estabilidad, y el mantenimiento de los ecosistemas (Simard et al., 2003).
Actúan sinérgicamente con bacterias fijadoras de nitrógeno y microorganismos solubilizadores (Alegre et al., 2015).	La red micelial ayuda a que las plántulas se establezcan cerca de las plantas maduras, lo que permite una colonización más rápida al entrar en contacto con la red micelial (Simard et al., 2003).
Mejoran la tolerancia a la salinidad (Sannazzaro et al., 2006).	Aumentan las tasas de supervivencia de las especies huésped y permiten el establecimiento de especies dependientes de los HMA, las cuales pueden desplazar a las especies colonizadoras no dependientes (Van Der Heijden et al., 1998; Klironomos et al., 2000).
Mejoran y protegen contra la acción de patógenos presentes en el suelo (Agrios, 2005; Alegre et al., 2015).	Promueven la fitorremediación de suelos contaminados (Pawlowska et al., 2000).
Mejoran la tolerancia a la toxicidad por metales pesados y contaminantes orgánicos (Borie & Rubio, 1999; Pawlowska & Charvat, 2004)	Mejoran la estructura de los suelos disminuyendo la erosión y estabilizan los agregados (Cavagnaro et al., 2006; Guerra, 2008; Alegre et al., 2015).
	Incremento de la mineralización del humus (Lamprecht, 1990; Cavagnaro et al., 2006)

Por último, la observación macroscópica de las raíces es insuficiente para detectar la presencia de HMA, es por ello que se debe recurrir a las técnicas de tinción las cuales hacen visible

las estructuras internas y externas de los HMA (Sánchez de Prager et al., 2010). Las técnicas de tinción se consideran avances tecnológicos muy esenciales en la investigación de estas asociaciones, ya que permiten evaluar, identificar y cuantificar las estructuras del micosimbionte dentro y fuera de la raíz (Sánchez de Prager et al., 2010).

1.7 Marco conceptual

Ecología: rama de la biología que estudia las relaciones de los diferentes seres vivos entre sí y con su entorno (Chapin lll et al., 2011).

Mutualismo simbiótico: relación entre dos especies que beneficia a ambos compañeros (Chapin lll et al., 2011).

Biótrofo: organismo parásito que obtiene nutrientes de tejidos vivos y cuya subsistencia depende del hospedero parasitado, por lo cual lo mantiene vivo (Cepero de García et al., 2012).

Hifas: elemento uni o pluricelular. tubular o filamentoso cuyo conjunto constituye el micelio de los hongos. Pueden ser septadas o aseptadas. En el caso de los HMA, cotidianamente son aseptadas (Sánchez de Prager et al., 2007).

Hifas "runner" o colonizadoras: hifas gruesas con más de 27 micras de diámetro que, aunque absorben nutrimentos, en especial, sirven de soporte y base temporal al tejido micelial de los HMA en el suelo (Sánchez de Prager et al., 2007).

Hospedero: organismo vivo que aloja un parásito (Cepero de García et al., 2012)

Septo: pared transversal. En los hongos se representa en las hifas. Los septos hifales pueden ser simples como en el micelio del filo Ascomycota y doliporo como en muchos hongos del filo Basidiomycota (Cepero de García et al., 2012).

Aseptado: se refiere a una estructura sin septos o escasamente septada, por ejemplo: micelio cenocítico o escasamente septado (Cepero de García et al., 2012).

Apresorio: Modificación de una hifa que fija el hongo parásito al hospedero. Se forma en el tubo de germinación de una espora o conidio o en una hifa vegetativa y permite que se adhiera al hospedero para facilitar la penetración (Cepero de García et al., 2012).

Septado: con paredes transversales o longitudinales. Es un término utilizado para hifas, esporas y basidios, divididos en compartimentos (Cepero de García et al., 2012).

Manto: hifas fúngicas que rodean la raíz en ectomicorrizas; también llamado vaina (Chapin lll et al., 2011).

Micelio: conjunto de hifas que constituyen el cuerpo (talo) de un hongo (Cepero de García et al., 2012).

Micelio extrarradical: es la estructura del hongo que se encuentra en contacto con el suelo, tienen un diámetro de entre 2 y 27 µ, y su longitud varía entre 1-5 mg^{-1} , llegan a su máxima longitud ocho semanas después de la colonización (Smith & Read, 2008; Cuenca, 2015). Su principal función es la absorción de agua y nutrientes, los cuales posteriormente movilizan a la planta, el ME al entrar en contacto con la raíz forma un Apresorio a partir del cual empieza la colonización intrarradical (Blanke et al., 2012).

Esporas: son las estructuras de resistencia y propagación dispersadas mediante diversos mecanismos, se forman asexualmente y son la principal unidad de supervivencia de los HMA, pueden formarse dentro o fuera de la raíz y de ellas pueden germinar el micelio intraradical como extrarradical (Brundrett et al., 1996; Smith & Read, 2008; Cuenca, 2015)**.**

Arbúsculo: Son estructuras que invaginan las células de la planta, son características de este grupo de hongos de ahí su nombre de hongos micorrizógenos arbusculares, su función es llevar a cabo el intercambio nutricional y metabólico entre la planta y hongo (Cuenca, 2015).

Vesículas: estructuras que ayudan principalmente en el almacenamiento de lípidos, además tienen una función auxiliar como propágulos del hongo al intervenir en la formación de esporas y ayudar en el metabolismo de cierto nutrientes como el fosforo, ya que almacenan gránulos de polifosfato los cuales son indispensables para el transporte de fosforo a través de la hifa y la planta (Smith & Read, 2008; Cuenca, 2015).

Ovillos: Estas estructuras son enrollamientos de las hifas y se cree que también cumplen la función de intercambio nutricional con el hospedador, sin embargo se presentan con menor frecuencia a diferencia de los arbúsculos (Smith & Read, 2008)

HMA tipo Arum*:* presenta extenso desarrollo de hifas intercelulares en las células corticales, arbúsculos y frecuentemente vesículas (Sánchez de Prager et al., 2007).

HMA tipo Paris*:* Su desarrollo ocurre intracelular con enrollamientos de hifas, vesículas y con descripciones de arbúsculos menos frecuentes que en el tipo Arum (Sánchez de Prager et al., 2007).

Endotrófico: organismo que obtiene su nutrición desde dentro del hospedador (por ejemplo, los HMA) (Cepero de García et al., 2012).

Micorhizosfera: zona del suelo que está directamente influenciada por las hifas micorrizales (Chapin lll et al., 2011).

Rizosfera: zona de suelo directamente influenciada de raíces.(Chapin lll et al., 2011).

Endorrizosfera: zona de la rizosfera establecida dentro de las células corticales o alrededor de ellas, a la cual acceden los hongos que forman micorriza arbuscular, las bacterias como rizobios y también organismos patogénicos (Sánchez de Prager et al., 2007).

Córtex: es la región comprendida entre la rizodermis y el cilindro vascular, su función principal es la de almacenar sustancias de reserva como almidones (Sánchez de Prager, 1999).

Epidermis: superficie externa de la raíz, estas células absorben agua del medio ambiente circundante y producen unos vellos o pelos radiculares que incrementan en área de absorción de agua de la célula epidermal (Sánchez de Prager et al., 2007).

Tinción: técnica auxiliar utilizada en microscopia para mejorar el contraste en la imagen vista al microscopio (Willey et al., 2008).

Objetivo: es un elemento del microscopio que tiene la función de concentrar la luz procedente del objeto observado y la enfoca para producir una imagen real.

Metodología

1.8 Área de estudio

1.8.1 Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas.

La primera zona de estudio es la Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas (RBLT), un área natural protegida ubicada en la parte central sur del estado de Veracruz (Figura 6), de donde

procedieron las muestras utilizadas para los análisis en laboratorio (Apéndice 1). La RBLT se encuentra entre los 18º34’ y los 18º36’ latitud Norte y los 95º04’ y 95º09’ longitud Oeste, enclavada en las estribaciones del volcán San Martín Tuxtla (Flores et al., 1999). Posee un área aproximada de 155,122 ha (Von Bertrab, 2010).

1.8.1.1 Clima. El clima de los Tuxtlas está influenciado por su relieve con altitudes desde el nivel medio del mar hasta los 1700 m s. n. m. (Guevara et al., 1999). Según la clasificación de Köppen, en la región predomina el clima cálido húmedo, la temperatura media anual varía entre 24ºC y 26°C, la temperatura máxima promedio oscila entre 34ºC y 36ºC en el mes de mayo, mientras la temperatura mínima promedio oscila entre los 10ºC y 14ºC en el mes de enero. Presenta lluvias todo el año y es considerada una de las cinco regiones más lluviosas de México (Guevara, 2010), presenta una precipitación media superior a los 4000 mm anuales donde el mes más seco es de 60 mm; la época lluviosa se comprende entre los meses de junio a febrero y una época seca entre marzo y mayo (Soto, 2004).

1.8.1.2 Suelo. Dentro de la RBLT se reconocen nueve grandes grupos de suelo producto de la actividad volcánica, conformados por: Andosoles, Feozem, Luvisoles, Acrisoles, Vertisoles, Cambisoles, Nitosoles, Regosoles y Litosoles (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas [CONANP] & Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2006). Entre los más representativos por extensión están los Luvisoles y Acrisoles con 34,2%, Andosoles con 21%, Feozems con 18% y Vertisoles con 13% (Campos, 2004). Generalmente, estos suelos tienen textura arcillosa (con más del 75% de arcillas), franco arcilloso arenosa, franco arcillosa y franca.

1.8.1.3 Vegetación. Se reconocen nueve tipos de vegetación: selva alta y mediana perennifolia, selva baja perennifolia inundada, bosque mesófilo de montaña, bosque de pino, bosque de encino, sabana, manglar y duna costeras y algunas variantes como acahuales (bosque secundario en sucesión) y pastizales (Castillo-Campos & Laborde, 2004; Guevara, 2010). La selva alta y mediana perennifolia denominada también selva húmeda representa el 35% de la RBLT. El dosel está compuesto principalmente por árboles con fuste recto y grueso, con más de 1 m de DAP y en algunos casos hasta 2 m, con alturas de 30 y 35 m (Castillo-Campos & Laborde, 2004). Las especies más representativas son: *Siparuna andina, Vochysia guatemalensis, Lonchocarpus cruentus, L. guatemalensis var. mexicanus, Dussia mexicana, Nectandra ambigens, N. lundellii, Ocotea uxpanapana, Pouteria sapota, Ceiba pentandra, Bernoullia flammea, Bursera simaruba, Cordia megalantha, Virola guatemalensis, Omphalea oleifera, Ampelocera hottlei, Terminalia amazonia* y *Calophyllum brasiliense, Ficus yoponensis* y *F. tecolutensis* entre otras (Bongers et al., 1988; Castillo-Campos & Laborde, 2004; Arroyo-Rodríguez & Mandujano, 2006).

El estrato medio lo conforman individuos que miden entre 15 y 2 m de altura (CONANP & SEMARNAT, 2006), algunas de las especies que destacan son: *Pseudolmedia oxyphyllaria*, *Dendropanax arboreus*, *Cymbopetalum baillonii*, Cupania *glabra*, *Pimenta dioica, Annona muricata, Calycophyllum candidissimum, Citharexylum affine, Croton schiedeanus, Alchornea latifolia, Albizia purpusii, Lonchocarpus santarosanus, Cojoba arborea, Ocotea dendrodaphne, Nectandra salicifolia* (Castillo-Campos & Laborde, 2004).

Por último, en el sotobosque destaca la presencia de palmas como *Astrocaryum mexicanum Chamaedorea tepejilote, Chamaedorea ernesti-augustii, Bactris baculifera, Desmoncus ferox* y *Reinhardtia gracilis var. Gracilior* (Castillo-Campos & Laborde, 2004) y especies herbáceas como *Dieffenbachia seguine, Spathiphyllum cochlearispathum, Aphelandra aurantiaca* (Bongers *et al*.,

1988). Otras plantas muy características de este tipo de vegetación son las lianas, los bejucos y las epífitas.

1.8.2 Laboratorio de Ecología del Suelo y Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel.

La segunda zona de estudio está conformada por el Laboratorio de Ecología del Suelo, edificio B de Biología, Facultad de Ciencias, en los 19°19’ latitud Norte y 99°10’longitud Oeste, donde se llevó a cabo el trabajo de laboratorio (Figura 6) (Apéndice 2). Así mismo la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) (Apéndice 3), es un área ubicada dentro del campus de Ciudad Universitaria de la UNAM (Figura 6), y en donde se apoyaron algunas actividades de campo y toma de muestras. Actualmente la REPSA posee una extensión de 273,33 ha, las cuales se dividen en tres zonas núcleo que constituyen 171,14 ha y 13 zonas de amortiguamiento que en total suman 66,91 ha (Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica Pedregal de San Ángel [SEREPSA], 2013).

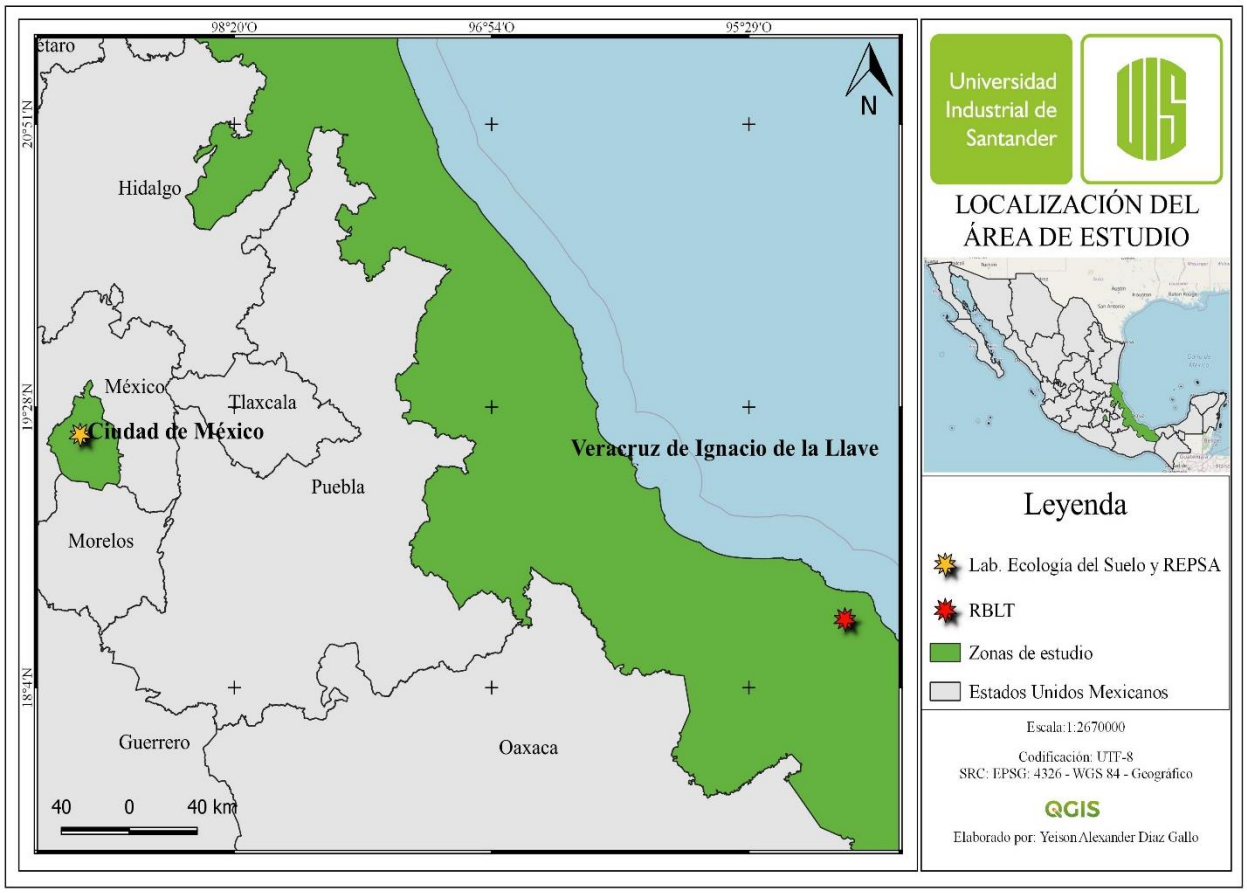
1.8.2.1 Clima de la REPSA. Según García (2004), el clima de la REPSA es templado subhúmedo con un régimen de lluvias en verano. La precipitación pluvial es de 870 mm anuales y la temperatura media anual es de 15,5ºC, con variaciones extremas que oscilan entre -6ºC y 34,6ºC (Valiente-Banuet & Luna-García, 1990). Posee dos estaciones bien marcadas que cambian notoriamente su paisaje: una estación de lluvias que va de mayo a octubre, y otra de secas que comprende los meses de noviembre a abril (Rzedowski, 1954).

1.8.2.2 Suelo de la REPSA. El suelo corresponde a un litosol que derivó de las rocas ígneas que se formaron en la erupción del Xitle, se cree que el origen de sus componentes ha sido principalmente por acción eólica y aporte orgánico y, en menor medida, por aporte aluvial y humano (Rzedowski, 1954; Hernández, 1984). La textura del suelo es arenosa-limosa, su pH es moderadamente ácido probablemente por su contenido de materia orgánica. Químicamente es un suelo rico en potasio y calcio, y pobre en nitrógeno y fósforo (Rzedowski, 1954).

1.8.2.3 Vegetación de la REPSA. El tipo de vegetación que cubre esta área se clasifica como un matorral xerófilo donde una de las especies dominantes es *Pittocaulon praecox*. Dentro de la reserva se han registrado 337 especies vegetales comprendidas en 193 géneros y 74 familias. Entre las familias de angiospermas más representativas destacan Asteraceae, Poaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Convolvulaceae, Solanaceae y Orchidaceae (Castillo-Argüero et al., 2007).

Figura 6

Mapa de ubicación de las zonas de estudio RBLT, REPSA y Laboratorio de Ecología del Suelo



1.9 Trabajo de campo

A continuación, se describe la metodología empleada para el apoyo en los muestreos en campo.

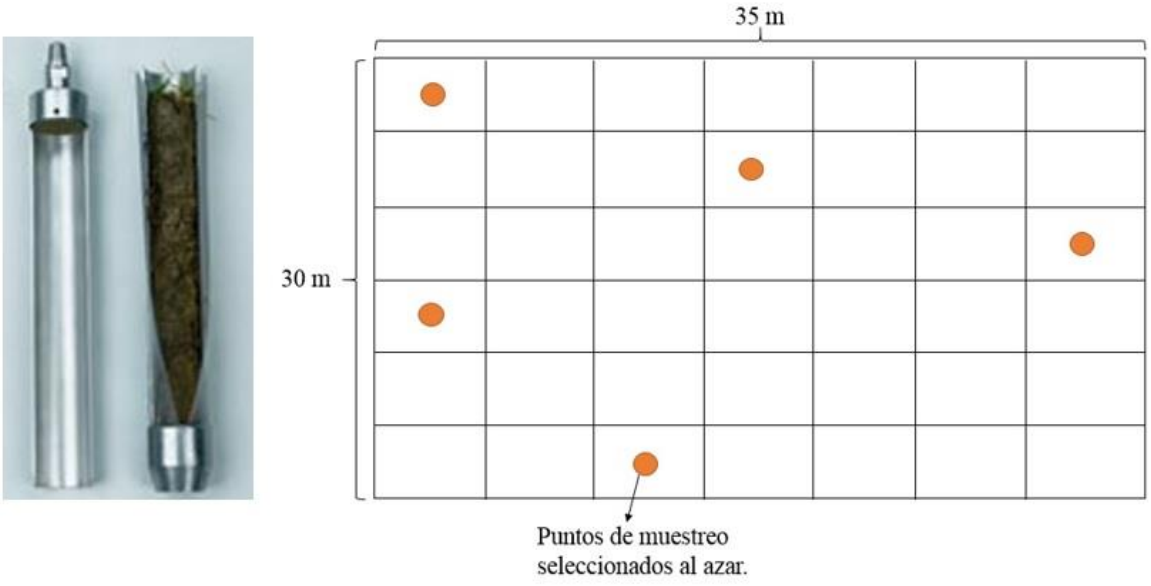
1.9.1 Muestreo de suelo

La colecta de muestras se llevó a cabo en parcelas de investigación ubicadas en la REPSA (Apéndice 3) que adelantan estudiantes de licenciatura, maestría y doctorado, los estudios comprendían temporadas hidrológicas (húmedas y secas). Se realizo la colecta de suelo en la temporada seca.

Se colaboro en el montaje de parcelas de 30 x 35m (1 ha) (Figura 7), las muestras de suelo se tomaron al azar de los primeros 10 cm de profundidad, para la colecta se utilizó un nucleador manual de 20 cm de largo y 15 cm de diámetro (Figura 7) y pala convencional, las colectas se depositaron en bolsas plásticas rotuladas y se refrigeraron en campo con un termo portátil de poliestireno expandido, posteriormente las muestras fueron almacenadas en el Laboratorio de Ecología del Suelo a una temperatura de 3ºC en una nevera convencional.

Figura 7

Nucleador con muestra de suelo y esquema de las parcelas de investigación



1.9.2 Muestreo de suelo para extracción de micelio

En cada uno de los cinco puntos se tomaron muestras compuestas de 1 kg retirando la hojarasca de la superficie y siguiendo los protocolos anteriormente descritos.

1.10 Trabajo de laboratorio

1.10.1 Extracción de micelio extrarradical

De cada muestra compuesta se tomaron aproximadamente 30 g de suelo que luego se tamizaron con una malla de 2 mm de abertura (Apéndice 4), una vez tamizado se tomaron 5 g para realizar el proceso de extracción mediante la técnica propuesta por Miller & Jastrow (1998) con las modificaciones hechas por Jasso (2010) y Sánchez de Prager et al. (2010).

Los 5 g de suelo se colocaron en matraces Erlenmayer de vidrio con capacidad de 500 ml, se agregaron 250 ml de agua y 35 ml de hexametafosfato de sodio, este último con el fin de separar los agregados del suelo y micelio. Una vez completada la solución en el recipiente se mezcló con una barra agitadora para disgregar grumos del suelo y se tapó la boca con papel aluminio, posteriormente se colocó el matraz en un agitador orbital E-15 SOL BAT a 180 r.p.m durante 90 min (Apéndice 5).

Transcurridos los 90 min, al mismo tiempo que los matraces continuaron agitándose se tomó una alícuota de 12 ml de la solución con una pipeta de vidrio de 10 ml (Apéndice 6), la punta de la pipeta se introdujo casi a la mitad del matraz, se siguió la recomendación de no tomar el sobrenadante superficial (Figura 8). Los 12 ml se depositaron en otro matraz de 500 ml con 250

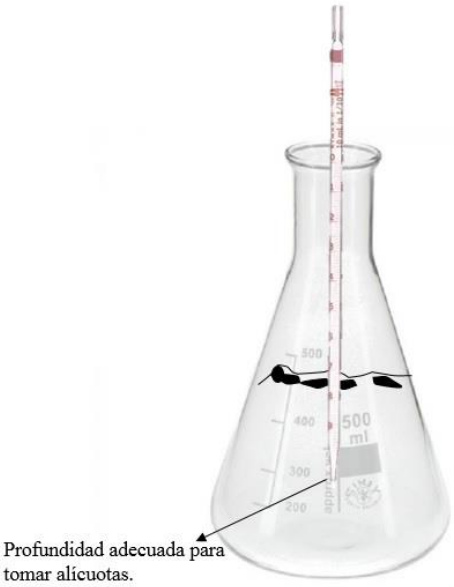
ml de agua y 35 ml de hexametafosfato de sodio, nuevamente se colocó sobre el agitador orbital con 180 r.p.m y durante 20 min (Apéndice 7).

Una vez transcurrido el tiempo de la segunda separación y con el agitador aun en movimiento, con una pipeta de vidrio de 5 ml se tomaron cuatro alícuotas de 5 ml con las recomendaciones anteriormente descritas, cada alícuota se pasó a través de un tamiz con abertura de 0,037 mm (Apéndice 8). Se utilizaron membranas de nitrocelulosa MF-Millipore cuadriculadas de 45µ de apertura (Apéndice 9) que fueron colocadas en un colector de vacío para filtración múltiple (Apéndice 10), los residuos filtrados que quedaron adheridos a la malla del tamiz se pasaron a las membranas con ayuda de una piseta (Apéndice 11). Posteriormente se dejaron filtrar en reposo durante 10 min hasta que no quedaron residuos de agua en la superficie de la membrana. Una vez transcurrido el tiempo se adicionaron 5 ml de azul de tripano al 0,05% para realizar la tinción del micelio (Apéndice 12) y se dejó reposar durante 10 min, transcurrido este tiempo se colocaron los tapones de goma en cada membrana y se inició el proceso de filtrado rápido con una bomba de presión y vacío para productos químicos marca Merk Millipore, durante un lapso de 10 min (Apéndice 13).

Pasada la etapa de filtrado rápido, se procedió a retirar con mucho cuidado y con pinzas de disección las membranas del colector de vacío (Apéndice 14), las membranas se fijaron con PVLG en portaobjetos esmerilados y se dejaron secar durante 24 horas protegiéndolas con platos de pasta (Apéndice 15). Una vez trascurrido el tiempo, se fijó un cubreobjetos de 24 x 50 mm con PVGL para su posterior observación y cuantificación.

Figura 8

Ubicación correcta de la pipeta para la toma de alícuotas



1.10.2 Cuantificación de micelio extrarradical

Para la cuantificación de micelio extrarradical se utilizó la técnica sugerida por Jakobsen (1998), la modificación realizada para esta técnica fue que los campos de observación pasaron de 25 a 70; la dirección de observación sobre la membrana de nitrocelulosa se realizó en forma de zic zac en función de las filas y columnas (Figura 9), por cada cuadro de la membrana se observaron cuatro puntos los cuales correspondieron a los vértices del cuadrado (Figura 10); usando una rejilla micrométrica de 10 x 10 en el ocular del microscopio óptico y un contador manual de click de tres puestos (Apéndice 16) se contabilizaron por cada campo el número de intersecciones líneas-hifas (Apéndice 17), posteriormente se aplicaron los datos en la siguiente fórmula y así se logró obtener la longitud del micelio.

$$TL = \frac{\left(HL \times \left[\frac{12 + 250 + 31}{20}\right]\right) \times \left[\frac{250 + 31}{12}\right]}{p}$$

Donde:

HL (longitud total de la hifa observada sobre el área de filtrado (FA) cubierta por 70 campos de observación) (mm) = (11/14) · N x a

11/14= constante

N= número total de interceptos en 70 campos de observación

a (longitud total de la unidad de la rejilla en el ocular de 10×10 sobre el filtro usando un objetivo micrométrico) = 0,05 mm

p = peso seco en g de la muestra de 5g de suelo húmeda utilizada

250 ml = volumen de agua donde la muestra fue suspendida

31 ml = volumen utilizado de hexametafosfato de sodio en las dos disoluciones

12 y 20 ml son las alícuotas de las disoluciones pipeteadas del suelo

Área filtrable sobre la membrana de nitrocelulosa (FA):

FA= π x r^2 (mm^2)

r= radio del área de captación/filtrado = 9,5 mm

Área total examinada o área contable (CA)

CA= (10 · a) ^{2} x C (mm^2)

C= número total de campos observados (en este caso es C= 70)

Longitud total de la hifa sobre el área filtrable (HL g*m-1)

HL= (H/CA) ·FA o HL = H·FA/CA

Figura 9

Dirección de desplazamiento correcto para la cuantificación de ME sobre membrana de nitrocelulosa

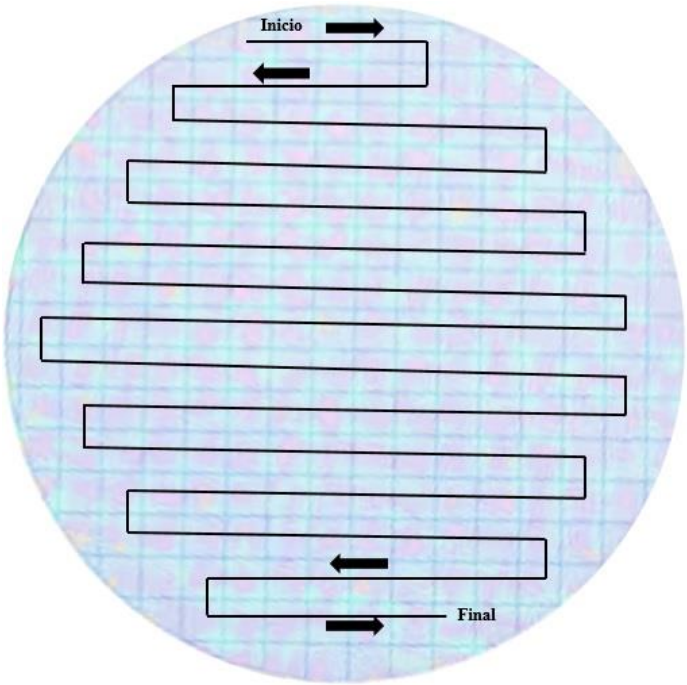
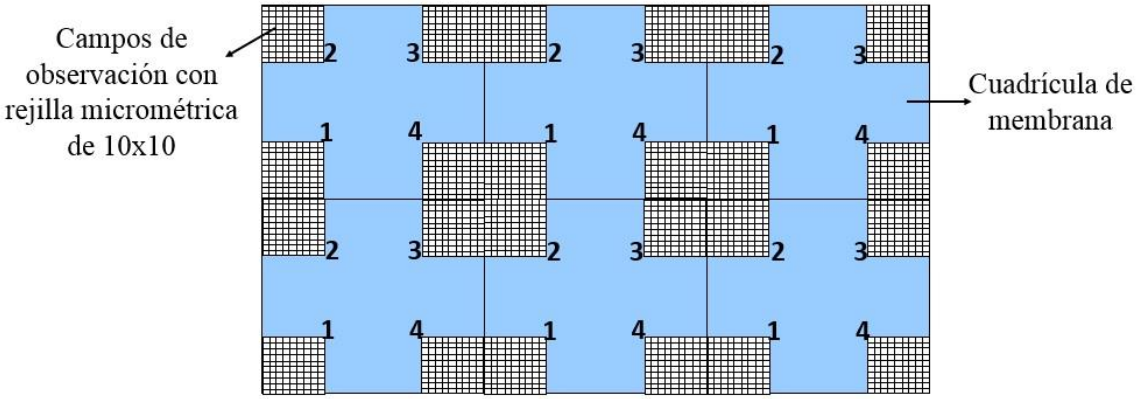


Figura 10

Ubicación y secuencia correcta para el conteo de campos sobre la cuadricula de membrana de nitrocelulosa



1.10.3 Tinción de raíces y cuantificación de estructuras intrarradicales

De cada muestra compuesta se separaron 10 g de raíces finas menores a 2 mm, se depositaron en bolsas plásticas de cierre hermético (Anexo 18) y se refrigeraron a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento. Se sometieron a procesos de aclaramiento, blanqueo, acidificación, tinción y eliminación de excesos de colorantes siguiendo la metodología propuesta por Phillips & Hayman (1970) con algunas modificaciones, el proceso se describe continuación:

Se colocaron las raíces en rejillas histológicas (Apéndice 19) y se lavaron con abundante agua de llave para eliminar restos de suelo y piedras (Apéndice 21). Las rejillas histológicas se colocaron en un vaso de precipitado de 1000 ml y se adicionó KOH al 10% hasta taparlas completamente con el objetivo de ablandarlas y eliminar los taninos de las raíces (Apéndice 20), el procedimiento normal es dejarlas sumergidas durante 24 horas, pero para acelerar el proceso y ahorrar tiempo se utilizó un autoclave industrial (Apéndice 22). Las muestras se sellaron con papel aluminio y se introdujeron en su interior (Apéndice23 y 24), el autoclave se mantuvo con una temperatura de 90°C y 15 psi durante 15 min.

Una vez transcurrido el tiempo en la autoclave, se procedió a retirar las rejillas histológicas de su interior y a lavarlas con agua corriente unas tres veces seguidas para eliminar la pigmentación oscura residual (Apéndice 25), se tuvo especial cuidado en recoger el KOH residual para desecharlo de forma correcta. Se agregó agua oxigenada al 3% por 10 min para aclarar aún más las raíces (Apéndice 26), y se lavaron nuevamente (Apéndice 27), se agregó una solución de HCl al 10% durante 10 min (Apéndice 26). Posteriormente, se separó la solución de HCl de las rejillas y sin enjuagarlas se adicionó una solución de tripano al 0,05% disuelto en una mezcla de ácido

láctico, glicerina y agua en una proporción de 1:2:1 hasta cubrir completamente las rejillas (Apéndice 28), esto se dejó en reposo por un lapso de 24 horas.

Transcurridas las 24 horas se retiró con cuidado el azul de tripano desechándolo adecuadamente en bidones de plástico, las rejillas se colocaron en una solución de lactoglicerol (Apéndice 29) para su conservación y posterior montaje en portaobjetos. Para el montaje de raíces en portaobjetos esmerilados se seleccionaron raíces de 1,2 a 2 cm de longitud, por cada portaobjeto se montaron de 20 a 25 fragmentos, estas se colocaron paralelamente con relación al ancho del portaobjeto y se colocó un cubreobjeto que se fijó con PVGL (Apéndice 30).

Una vez montadas las raíces se procedió a realizar la identificación de estructuras funcionales y colonización (Apéndice 31 y 32), para realizar la cuantificación de la colonización se utilizó un objetivo de 20X y se contaron 70 campos de observación a lo largo de las raíces, se anotó la presencia o ausencia de estructuras funcionales como hifas, vesículas, esporas, ovillos y arbusculos en un formato impreso (Anexo 33) el cual ayudo a obtener los porcentajes de colonización total y por estructura. Para la colonización total al observar cada campo se anotó un signo (+) cuando se observó una estructura presente, y para estimar el porcentaje por estructura se colocó el signo (+) en la casilla correspondiente a la estructura observada. Ya obtenidos los datos se aplicaron las siguientes formulas:

$$\% \, C.T = \frac{N° \, Total \, de \, campos \, observados \, con \, cualquier \, estructura}{70} \times 100$$

$$\%\ C.T\ estructura\ "x" = \frac{N°\ Total\ de\ campos\ observados\ con\ estructura\ "x"}{70} \times 100$$

Resultados

Se estableció una parcela de 35 x 30 m en la REPSA en una temporada hidrológica seca, donde se ubicaron los puntos de muestreo de suelo y se colectaron las muestras a una profundidad de 10 cm con nucleador manual y pala. Se colectaron cinco muestras compuestas que posteriormente se utilizaron para las etapas de laboratorio. Se conoció a detalle la manera como el Laboratorio de Ecologia del Suelo implementa sus métodos de muestreo en campo para estudiar los HMA y los factores para tener en cuenta a la hora de hacer estudios enfocados en los HMA.

Asimismo, se desarrolló la técnica de Miller & Jastrow (1998) para separar el micelio extrarradical de muestras de suelo, cumpliendo todas las etapas protocolarias propuestas por el laboratorio. Se identificaron las modificaciones realizadas por el laboratorio que consistieron en prolongar el tiempo de la muestra en la agitadora orbital y el uso de membranas de nitrocelulosa cuadriculada para la captura y conteo del micelio, así como también el uso de una rejilla en el ocular del microscopio lo que permitió identificar 14 puntos de intersección del micelio. La tinción del micelio se efectuó con azul de tripano al 0,05% y se logró visualizar el micelio extrarradical con cinco esporas utilizando un objetivo de 20X.

Por último, la observación de estructuras funcionales se logró empleando un objetivo de 20 X y aplicando la técnica de selección, decoloración, tinción con azul de tripano al 0,05 % y eliminación de excesos de Phillips & Hayman (1970), lo que permitió visualizar 13 vesículas, y

colonizaciones intercelulares e intracelulares en las raíces estudiadas. Además, se logró comprender y aprender la forma de como los integrantes del laboratorio aplican las fórmulas matemáticas para obtener los distintos parámetros de colonización y longitud de micelio.

Discusión y Conclusiones

Durante el desarrollo de las actividades de campo se logró comprender los diferentes métodos para delimitar y tomar muestras de suelo; la Dra. Guadalupe Barajas enfatizó en la importancia que representa muestrear suelo en un área mínimo de 1 ha, esto con el objetivo de tomar una muestra representativa y que tenga un valor estadístico más significativo. De igual manera, la Dra. Irene Sánchez afirma que la mayor proporción de la biota edáfica se encuentra en los primeros 10 cm de profundidad, y que los trabajos de investigación encaminados al estudio de la ecología del suelo deberían realizarse máximo a esta profundidad, con el objetivo de evitar subestimaciones y sesgos estadísticos en el momento de su evaluación. También, hay que dejar en claro que estos métodos siempre están susceptibles a sufrir modificaciones, y de acuerdo con Sánchez de Prager et al. (2010) se adecuan y están en función de los objetivos que persiga la investigación.

La tinción con azul de tripano al 0,05% para ME suele ser la mas utilizada y la que genera mejores resultados frente a otras técnicas de tinción, y según la Dra. Irene Sánchez es la tinción que mas dura frente a otras que suelen degradarse con mucha velocidad. Además, sugirió la observación de ME con el aumento de 20X para realizar la cuantificación y de 40X para confirmar la naturaleza del micelio. Por otro lado, es importante que al momento de realizar la cuantificación del micelio el

portaobjetos tenga cubreobjetos, el orden del conteo debe ser cuidadoso y ordenado acompañado de una excelente concentración para no perderse ni sobreestimar los valores.

Igualmente, se debe tener muy claro los conceptos básicos al momento de discriminar estructuras que no se asemejen al micelio, pues en algunas ocasiones se suelen confundir con estructuras que presentan una morfología similar, para ello la Dra. Irene Sánchez sugiere que las estructuras que sean incoloras, hialinas y que no tengan una tinción considerable no deben tomarse en cuenta para la cuantificación. Al mismo tiempo, sugiere para la discriminación de estructuras tener claridad de las dimensiones de la cuadricula que se utiliza en el microscopio, ya que esto ayuda a considerar que tamaños hacen parte del ME. Por otro lado, otra consideración para tener en cuenta es que en algunos casos las hifas de los HMA pueden presentar divisiones similares a septos, estas divisiones no son consecutivas ni tampoco uniformes y de acuerdo con la Dra. Irene Sánchez en muchos casos es complejo determinar si se trata o no de micelio de HMA, pues afirma que las hifas de HMA presentan un tipo de cicatrización que muchas veces suele confundirse con hifas septadas producto de la edad del hongo.

Por otra parte, la técnica de tinción de raíces de Phillips & Hayman (1970) es la mas utilizada para el estudio de colonización de los HMA, y a pesar de que con lleva más costos económicos que otras técnicas de tinción como la de tinta vinagre de Vierheilig et al. (1998), es la utilizada por excelencia por los investigadores de los HMA. Con respecto al uso de autoclave para acelerar el proceso de despigmentación radicular y eliminación de taninos, la Dra. Irene Sánchez sugiere tener cuidado con esta técnica ya que degrada las raíces y puede llegar a cocinarlas, recomienda únicamente utilizarla cuando se desee procesar rápidamente las raíces, de lo contrario el proceso normal es dejarlas 24 horas en KOH al 10%.

Durante las observaciones microscópicas de colonización radicular las estructuras funcionales como arbusculos y ovillos no se observaron con mucha frecuencia y en algunas ocasiones no hubo

presencia alguna de estas en las raíces, la Dra. Irene Sánchez afirma que estas estructuras son mucho más frecuentes en gramíneas ya que son especies con alto grado de micotrofia y que estas estructuras de intercambio son mas escazas cuando se trabajan especies vegetales en bosques naturales, también aclara que la temporada climática y la disponibilidad nutricional tienen una fuerte influencia en la producción de estas estructuras de intercambio. Por otro lado, es importante resaltar el papel de HMA en los procesos de sucesión vegetal y regeneración del bosque, pues la mayoría de las investigaciones realizadas y por realizar en el Laboratorio de Ecología del Suelo de la UNAM están encaminadas en dilucidar estos procesos tan importantes e indispensables para las comunidades animales y vegetales.

Por otro lado, la publicación, presentación de datos y resultados de los proyectos de investigación, desarrollados en el laboratorio de Ecologia del Suelo, durante el periodo de la pasantía de investigación, se encuentran protegidos bajo un acuerdo de confidencialidad académica de datos, pues la mayoría de los proyectos de investigación y tesis se encuentran en la etapa de desarrollo y hacen parte de un material confidencial por parte del autor hasta su publicación. Es por esta razón que la divulgación de datos específicos tales como: porcentajes de colonización, longitud de micelio, análisis de suelos y resultados de laboratorios no se encuentran expuestos en el presente trabajo.

Por último, La comprensión de la ecología del suelo es esencial para valorar la importancia que esta representa para la vida en la tierra, sus grupos funcionales y su relación con los ciclos vitales en el planeta deben ser considerados como de alta prioridad en los intereses investigativos de los gobiernos mundiales. La cooperación internacional entre instituciones de educación superior puede ser la herramienta fundamental que permita el desarrollo científico y tecnológico de manera eficaz y oportuna para el crecimiento del conocimiento de la biota del suelo.

Recomendaciones

El proceso de la pasantía de investigación debe considerarse como una etapa esencial en la formación integral del estudiante de ingeniería forestal, por lo que se recomienda seguir impulsando estas iniciativas con más constancia, pues gracias a ello se presenta la oportunidad de ofrecer al estudiante una visión más globalizada de sus líneas de interés, lo que permite agudizar su capacidad de crítica, investigación y generación de nuevo conocimiento.

La Universidad Industrial de Santander Sede Málaga esta en la capacidad para implementar las metodologías para el estudio de HMA descritas en este documento, por lo que se invita a los docentes investigadores y a la comunidad estudiantil en especial a los estudiantes de las carreras de ingeniería forestal y zootecnia a familiarizarse e interesarse por esta importante rama científica que requiere con urgencia la mirada de todos los profesionales de las ciencias forestales y afines.

Es indispensable iniciar estudios de investigación en la ecología del suelo en el territorio colombiano, pues son escasos y de poca demanda investigativa. Colombia cuenta con 11 de los 12 ordenes de suelos existentes en el mundo lo que es un dato fehaciente de la gran biodiversidad que se puede llegar a encontrarse debajo de nuestros pies.

Referencias Bibliográficas

Agrios, G. (2005). *Introducción a la fitopatología* (2º Edicion). Limusa. http://biblioteca.utsem-morelos.edu.mx/files/asp/biologia/FITOPATOLOGIA - George N-Agrios.pdf

Alegre, J. C., Vega, R., & Garcia, S. (2015). Manual reciclaje de nutrientes en sistemas agroforestales. In *Technical Report*. Universidad Nacional Agraria La Molina oficina proyecto VLIR-UNALM. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17646.72003

Alexander, I. J. (2004). Ectomycorrhizas – out of Africa ? *New Phytologist*, *172*(4), 589–591. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01930.x

Anderson, J. M. (1995). Soil organisms as engineers: microsite modulation of macroscale processes. In J. H. Lawton & C. G. Jones (Eds.), *Linking Species & Ecosystems* (pp. 94–106). Chapman & Hall. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1773-3_10

Arditti, J., Ernst, R., Yam, T., & Glabe, C. (1990). The contribution of orchid mycorrhizal fungi to seed germination: a speculative review. *Lindleyana*, *5*(4), 249–255. https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19922318457

Arroyo-Rodríguez, V., & Mandujano, S. (2006). The importance of tropical rain forest fragments to the conservation of plant species diversity in Los Tuxtlas, Mexico. *Biodiversity & Conservation*, *15*(13), 4159–4179. https://doi.org/10.1007/s10531-005-3374-8

Báez, A. L., Gómez, M., Villegas, J., De La Barrera, E., Carreto, L., & Lindig, R. (2015). Inoculación con hongos micorrízicos y fertilización con urea de plantas de fraxinus uhdei en acrisoles provenientes de sitios degradados. *Botanical Sciences*, *93*(3), 501–508. https://doi.org/10.17129/botsci.207

Barlow, J., Gardner, T. ., Araujo, I. ., Avila, T. ., Bonaldo, A. ., Costa, J. ., Esposito, M. ., Ferreira, L. ., Hawes, J., Hernandez, M. ., Hoogmoed, M. ., Leite, R. ., Lo-Man-Hung, N. ., Malcolm, J. ., Martins, M. ., Mestre, L. A. M., Miranda-Santos, R., Nunes-Gutjahr, A. L., Overal, W. L., … Peres, C. A. (2007). Quantifying the biodiversity value of tropical primary , secondary , and plantation forests. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(47), 18555–18560. https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.0703333104

Becerril, A. (2017). *Análisis de la producción de micelio extrarradical de hongos micorrizógenos arbusculares durante la sucesión en una selva de Los Tuxtlas, Veracruz, México* (tesis de pregrado) [Universidad Nacional Autónoma de México]. http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/NNDMTVLUTIFJ9MA6T5SX4VY1PDTAJHYE89C9BM1QS118Y6MDNK-45602?func=find-acc&acc_sequence=002430847

Bidartondo, M. I., Read, D. J., Trappe, J. M., Merckx, V., Ligrone, R., Duckett, G., Supplement, D., Bidartondo, M. I., Read, D. J., Trappe, J. M., Merckx, V., Ligrone, R., & Duckett, J. G. (2011). The dawn of symbiosis between plants and fungi. *Biology Letters*, *7*(4), 574–577. https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.1203

Blanke, V., Bassin, S., Volk, M., & Fuhrer, J. (2012). Nitrogen deposition effects on subalpine grassland: The role of nutrient limitations and changes in mycorrhizal abundance. *Acta Oecologica*, *45*, 57–65. https://doi.org/10.1016/j.actao.2012.09.002

Boddington, C. L., Bassett, E. E., Jakobsen, I., & Dodd, J. C. (1999). Comparison of techniques for the extraction and quantification of extra-radical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *31*(3), 479–482. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00145-X

Bonfante, P., & Perotto, S. (1995). Tansley Review No. 82. Strategies of arbuscular mycorrhizal

fungi when infecting host plants. *New Phytologist*, *130*(1), 3–21. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1995.tb01810.x

Bongers, F., Popma, J., Del Castillo, J. M., & Carabias, J. (1988). Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio*, *74*(1), 55–80. https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Meave/publication/226353881_Structure_and_floristic_composition_of_the_lowland_rain_forest_of_Los_Tuxtlas_Mexico/links/53e261880cf275a5fdd6e29f.pdf

Borie, F., & Rubio, R. (1999). Effects of arbuscular mycorrhizae and liming on growth and mineral acquisition of aluminum - tolerant and aluminum - sensitive barley cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, *22*(1), 121–137. https://doi.org/10.1080/01904169909365612

Bracamontes, L., Fuentes, M., Rodríguez, L. M., & Macedas, J. (2016). *Manual de indicadores biológicos de la salud del suelo* (Primera ed). Casa abierta al tiempo Universidad Autonoma Metropolitana. https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/Manual_suelo.pdf

Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajczuk, N. (1996). *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture* (Canberra:). Australian Centre for International Agricultural Research. https://www.researchgate.net/profile/B_Dell/publication/227365112_Working_with_Mycorrhizas_in_Forestry_and_Agriculture/links/53eb31430cf28f342f451ac4/Working-with-Mycorrhizas-in-Forestry-and-Agriculture.pdf

Calviño-Cancela, M., Rubido-Bará, M., & van Etten, E. J. (2012). Forest Ecology and Management Do eucalypt plantations provide habitat for native forest biodiversity ? *Forest*

Ecology and Management, *270*, 153–162. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2012.01.019

Campos, C. A. (2004). El suelo. In S. S. Guevara, D. J. Laborde, & G. R. Sanchez (Eds.), *Los Tuxtlas: El paisaje de la sierra* (pp. 181–192). Instituto de Ecología A.C y Union Europea.

Carmona, N. B., Ponce, J. J., Canale, N., & Montagna, A. O. (2015). Estructuras sedimentarias orgánicas-Bioturbación. In J. J. Ponce, A. O. Montagna, & N. B. Carmona (Eds.), *Geología de la cuenca Neuquina y sus sistemas petroleros: una mirada integradora desde los afloramientos al subsuelo* (pp. 72–93). Fundación YPF; Viedma: Universidad Nacional de Río Negro. https://fundacionypf.org/Documents/Publicaciones/GEOLOGIA-CUENCA-NEUQUINA.pdf

Casariego, M. M. . (2017). *Análisis de la producción de micelio extrarradical y colonización intrarradical de los hongos micorrizógenos arbusculares en potreros y cultivos derivados de una selva húmeda en Los Tuxtlas, Veracruz* (tesis de pregrado) [Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de Mexico, México]. http://132.248.9.195/ptd2017/octubre/0766761/Index.html

Castillo-Argüero, S., Martínez-Orea, Y., Romero-Romero, M. A., Guadarrama-Chávez, P., Núñez-Castillo, O., Sánchez-Gallén, I., & Meave, J. A. (2007). *La reserva ecológica del Pedregal de San Ángel: Aspectos florísticos y ecológicos*. Coordinación de la Investigación Científica. Universidad Nacional Autónoma de México. https://www.researchgate.net/publication/281348086_La_reserva_ecologica_del_Pedregal_de_San_Angel_aspectos_floristicos_y_ecologicos

Castillo-Campos, G., & Laborde, J. (2004). La vegetacion. In S. S. Guevara, D. J. Laborde, & G. R. Sanchez (Eds.), *Los Tuxtlas: El paisaje de la sierra* (pp. 231–265). Instituto de Ecología A.C y Union Europea.

Castillo, C., Morales, D., Fuentealba, F., & San Martin, V. (2016). Colonización temprana de hongos micorrícicos arbusculares en trigo con aplicación de productos naturales en un Andisol de La Araucanía. *Idesia (Arica)*, *34*(2), 63–68. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292016005000009

Cavagnaro, T. R., Jackson, L. E., Six, J., Ferris, H., Goyal, S., Asami, D., & Scow, K. M. (2006). Arbuscular mycorrhizas , microbial communities , nutrient availability , and soil aggregates in organic tomato production. *Plant and Soil*, *282*(1–2), 209–225. https://doi.org/10.1007/s11104-005-5847-7

Cepero de García, M. C., Restrepo Restrepo, S., Franco-Molano, A. E., Cárdenas Toquica, M., & Vargas Estupiñán, N. (2012). *Biología de Hongos* (Primera ed). Ediciones Uniandes.

Chapin lll, F. P., Matson, P. A., & Vitousek, P. M. (2011). *Principles of terrestrial ecosystem ecology* (Second Edi). Springer Science & Business Media. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9504-9

Coleman, D. C., Callaham, M. A., & Crossley, D. A. (2017). Introduction to Soil: Historical Overview, Soil Science Basics, and the Fitness of the Soil Environment. In *Fundamentals of Soil Ecology* (Third edit, pp. 1–20). Academic press. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805251-8.00001-6

CONANP, & SEMARNAT. (2006). *Programa de conservación y manejo: Reserva de la biosfera de los Tuxtlas, México*. https://simec.conanp.gob.mx/pdf_libro_pm/138_libro_pm.pdf

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

Cuenca, Gisela, Caceres, A., Oirdobro, G., Hasmy, Z., & Urdaneta, C. (2007). Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales.

Interciencia, *32*(1), 23–29. http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33932104

Espeleta, J. F., Eissenstat, D. M., & Graham, J. H. (1999). Citrus root responses to localized drying soil : a new approach to studying mycorrhizal effects on the roots of mature trees. *Plant and Soil*, *206*(1), 1–10. https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1004325300583

Etter, A., McAlpine, C., Pullar, D., & Possingham, H. (2005). Modelling the conversion of Colombian lowland ecosystems since 1940: Drivers, patterns and rates. *Journal of Environmental Management*, *79*(1), 74–87. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.05.017

Fabián, D., Guadarrama, P., Hernadez-Cuevas, L., & Ramos-Zapata, J. A. (2018). Arbuscular mycorrhizal fungi in a coastal wetland in Yucatan, Mexico. *Botanical Sciences*, *96*(1), 24–34. https://doi.org/10.17129/botsci.1216

FAO. (2021). *Datos y cifras | Portal de Suelos de la FAO | Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Portal de Suelos de La FAO. Datos y Cifras. http://www.fao.org/soils-portal/soil-biodiversity/datosycifras/es/

Flores, L., Sommer, I., Alcalá, J., & Álvarez, J. (1999). Estudio morfogenético de algunos suelos de la region de Los Tuxtlas, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geologicas*, *16*(1), 81–88. http://rmcg.geociencias.unam.mx/index.php/rmcg/article/view/1064

Fracetto, G. G. M., Azevedo, L. C. B., Fracetto, F. J. C., Andreote, F. D., Lambais, M. R., & Pfenning, L. H. (2013). Impact of Amazon land use on the community of soil fungi. *Scientia Agricola*, *70*(2), 59–67. https://doi.org/10.1590/s0103-90162013000200001

García, E. (2004). *Modificaciones al sistema de Clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)* (5ta ed.). Instituto de Geografia. Universidad Nacional Autonoma de México. http://www.publicaciones.igg.unam.mx/index.php/ig/catalog/view/83/82/251-1

Garzón, L. P. (2015). Importancia De Las Micorrizas Arbusculares (Ma) Para Un Uso Sostenible Del Suelo En La Amazonia Colombiana. *Luna Azul*, *42*, 217–234. https://doi.org/10.17151/luaz.2016.42.14

Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*, *84*(3), 489–500. https://www.jstor.org/stable/2432123?seq=1

Giovannetti, M., & Sbrana, C. (1998). Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. *Mycorrhiza*, *8*(3), 123–130. https://doi.org/10.1007/s005720050224

Gómez, F. A. M., Pérez, E. H., & Sarmiento, L. G. (2018). Agricultura migratoria conductor del cambio de uso del suelo de ecosistemas alto-andinos de colombia. *Biotecnologia En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *16*(1), 15–25. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18684/bsaa.v16n1.630

Guadarrama, P., Castillo-Argüero, S., Ramos-Zapata, J. A., Camargo-Ricalde, S. L., & Álvarez-Sánchez, J. (2008). Propagules of arbuscular mycorrhizal fungi in a secondary dry forest of Oaxaca, Mexico. *Revista de Biologia Tropical*, *56*(1), 269–277. https://doi.org/10.15517/rbt.v56i1.5523

Guerra, B. E. (2008). Micorriza arbuscular. Recurso microbiológico en la agricultura sostenible. *Tecnología En Marcha*, *21*(1), 191–201. https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4835698

Guevara, Sada, S. (2010). *Los Tuxtlas. Tierra mítica*. Comisión Organizadora del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave para la Conmemoración del Bicent.

Guevara, S. S., Laborde, D. J., & Sánchez, R. G. (1999). La Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas, México. *Documento de Trabajo No*, *29*.

Harley, J. L., & Smith, S. E. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic press. https://doi.org/10.1017/S0014479700014113

Hernández-Cuevas, L., Guadarrama-Chávez, P., Sánchez-Gallen, I., & Ramos-Zapata, J. (2008). Micorriza arbuscular. Colonización intrarradical y extracción de esporas del suelo. In J. Álvarez-Sánchez & A. Monroy-Ata (Eds.), *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración* (pp. 1–16). Las Prensas de Ciencias-UNAM.

Hernández-Zamudio, G., Sáenz-Mata, J., Moreno-Reséndez, A., Castañeda-Gaytán, G., Ogaz, A., Carballar-Hernández, S., & Hernández-Cuevas, L. (2018). Dinámica de la diversidad temporal de los hongos micorrícicos arbusculares de Larrea tridentata (Sesse & Mocino ex DC) Coville en un ecosistema semiárido. *Revista Argentina de Microbiología*, *50*(3), 301–310. https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.07.007

Hernández, Á. D., & Monroy, M. (2017). *Caracterización de hongos micorrícicos arbúsculares asociados a tres clones de cacao (Theobroma cacao L.) en el Yopal (Casanare), Colombia (tesis de pregrado)* [Universidad de Cundinamarca, Facatativá, Colombia]. http://repositorio.ucundinamarca.edu.co/handle/20.500.12558/2474

Hernández, J. (1984). *Variacion estacional del contenido de semillas del suelo, en tres habitats de la comunidad de Senecio praecox, (Pedregal de San Angel, Mexico, D.F.)* [Universidad Nacional Autónoma de México]. http://132.248.9.195/pmig2018/0004640/0004640.pdf

Hibbett, D. S., Gilbert, L. B., & Donoghue, M. J. (2000). Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature*, *407*(6803), 506–508. https://doi.org/10.1038/35035065

Hynson, N. A., Madsen, T. P., Selosse, M. A., & Merckx, V. S. F. T. (2013). *Mycoheterotrophy:*

the biology of plants living on fungi. (V. S. F. T. Merckx (Ed.)). Springer Science Business Media New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5209-6

IDEAM. (2017). *Resultados Monitoreo de la Deforestación 2017*. http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/023835/Resultados_Monitoreo_Deforestacion_2017.pdf

Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. (2017, September 11). *Biodiversidad colombiana: números para tener en cuenta*. http://www.humboldt.org.co/es/boletines-y-comunicados/item/1087-biodiversidad-colombiana-numero-tener-en-cuenta

INVAM. (2020). *Home | INVAM International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi | West Virginia University*. https://invam.wvu.edu/home

Jakobsen, I. (1998). Extraction and quantification of soil hyphae. (Working well for soils with up to 20% clay content). *Development and Funtion of the Mycelium of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Workshop*, 7–9.

Jaramillo, D. (2002). *Introducción a la ciencia del suelo*. Facultad de ciencias. Universidad Nacional de Colombia. https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Jasso, R. (2010). *Determinación de la colonización intrarradical y extrarradical de hongos micorrizógenos arbusculares en una selva alta perennifolia* (tesis de pregrado) [Universidad Nacional Autónoma de México]. http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/RHLDUHEEBGSH5355M8SU52HLFY2ASYG3RJFMBJBNPXTUN2LATX-54767?func=find-acc&acc_sequence=002039090

Jumpponen, A. R. I., & Trappe, J. M. (1998). Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist*, *140*(2), 295–310.

https://doi.org/doi.org/10.1046/j.1469-8137.1998.00265.x

Klironomos, J. N., McCune, J., Hart, M., & Neville, J. (2000). The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters*, *3*(2), 137–141. https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00131.x

Koske, R. E., & Gemma, J. N. (1989). A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycological Research*, *92*(4), 486–488.

Kottke, I., & Nebel, M. (2005). The evolution of mycorrhiza- like associations in liverworts : an update. *New Phytologist*, *167*(2), 330–334. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01471.x

Koutika, L. S., Bartoli, F., Andreux, F., Cerri, C. C., Burtin, G., Chone, T., & Philippy, R. (1997). Organic matter dynamics and aggregation in soils under rain forest and pastures of increasing age in the eastern Amazon Basin. *Geoderma*, *76*(1–2), 87–122. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0016-7061(96)00105-X

Lamprecht, H. (1990). *ilvicultura en los trópicos: los ecosistemas forestales en los bosques tropicales y sus especies arbóreas, posibilidades y métodos para un aprovechamiento sostenido (No. 634.95 L239s esp.)*. GTZ.

Lavelle, P. (1996). Diversity of soil fauna and ecosystem function. *Biology International*, *33*, 3–16. https://core.ac.uk/download/pdf/39853397.pdf

Lavelle, P. (1997). Faunal Activities and Soil Processes: Adaptive Strategies That Determine Ecosystem Function. *Advances in Ecological Research*, *27*, 93–132. https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60007-0

McCormick, M. K., Whigham, D. F., & O'Neill, J. (2004). Mycorrhizal diversity in photosynthetic terrestrial orchids. *New Phytologist*, *163*(2), 425–438. https://doi.org/10.1111/j.1469-

8137.2004.01114.x

McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, *115*(3), 495–501. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x

Meza, F., Díaz, E., Escobar, H., Belezaca Pinargote, C., Cachipuendo, J., Meza, G., F.M, L., Meza, C. B., Meza, J. B., Cachipuendo, J. C., & Cabrera, R. V. (2017). Identificación de Hongos Micorrízicos en Plantaciones de Melina (Gmelina arborea Roxb) en el Trópico Húmedo Ecuatoriano. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *28*(4), 969–975. http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n4/a22v28n4.pdf

Miller, R. M., & Jasrow, J. D. (2000). Mycorrhizal fungi influence soil structure. In Y. Kapulnik & D. . Douds (Eds.), *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function* (pp. 3–18). Springer. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-017-0776-3_1

Miller, R. M., & Jastrow, J. D. (1998). Extraction and quantification of external mycorrhizal hyphae. In M. Kling (Ed.), *Development and function of the mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi. Second international conference on mycorrhizae. Preconference workshop method manual*. Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences.

Montaño, N. M., Camargo-Ricalde, S. L., García-Sánchez, R., & Monroy, A. (Eds.). (2007). *Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos (Arbuscular mycorrhizae in arid and semiarid ecosystems).* Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, Mundi-Prensa SA de CV, UAM- Iztapalapa, FES Zaragoza, UNAM. https://www.researchgate.net/profile/Arcadio_Monroy_Ata/publication/242595379_MIC

ORRIZAS_ARBUSCULARES_EN_ECOSISTEMAS_ARIDOS_Y_SEMIARIDOS/links/57a4ca4708aefe6167aff40a.pdf

Moreira, F., Huising, E. J., & Bignell, D. E. (2012). *Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo* (Primera ed). Instituto Nacional de Ecología. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=m-QMZaBiP0YC&oi=fnd&pg=PA10&dq=manual+de+biologia+de+suelos&ots=Lg6pSgqpn1&sig=T61Pzd_jCLoyEY_idC8aiemt7cU#v=onepage&q=manual de biologia de suelos&f=false

Moreno, J. P., & Read, D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, *29*(5), 239–247. file:///C:/Users/GalloTap12/Downloads/artículo_redalyc_33909203.pdf

Moyersoen, B. (2006). Pakaraimaea dipterocarpacea is ectomycorrhizal, indicating an ancient Gondwanaland origin for the ectomycorrhizal habit in Dipterocarpaceae. *New Phytologist*, *172*(4), 753–762. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01860.x

Mueller, G. M., Halling, R. E., Carranza, J., Mata, M., & Schmit, J. P. (2006). Saprotrophic and ectomycorrhizal macrofungi of Costa Rican oak forests. In L. M.M. Caldwell, M. G.Heldmaier, D. R.B. Jackson, W. O.L. Lange, S. H.A.Mooney, J. E.-D. Schulze, & K. U. Sommer (Eds.), *Ecology and Conservation of Neotropical Montane Oak Forests* (Vol. 185, pp. 55–68). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-28909-7

Munyanziza, E., Kehri, H. K., & Bagyaraj, D. J. (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and agro-ecosystem function in the tropics: the role of mycorrhiza in crops and trees. *Applied Soil Ecology*, *6*(1), 77–85. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0929-1393(96)00152-7

Nicholls, C. I., & Altieri, M. (2004). Manejo de la fertilidad de suelos e insectos plaga: armonizando la salud del suelo y la salud de las plantas en los agroecosistemas. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, *77*(8), 1–9. http://agroecologia.pbworks.com/f/Catie-suelos-plagas.pdf

Nicolson, T. H., & Schenck, N. C. (1979). Endogonaceous mycorrhizal endophytes in Florida. *Mycologia*, *71*(1), 178–198. https://doi.org/10.1080/00275514.1979.12020997

O'Neill, E. G., O'Neill, R. V., & Norby, R. J. (1991). Hierarchy theory as a guide to mycorrhizal research on large-scale problems. *Environmental Pollution*, *73*(3–4), 271–284. https://doi.org/10.1016/0269-7491(91)90054-Z

Osonubi, O., Mulongoy, K., Awotoye, O. O., Atayese, M. O., & Okali, D. U. U. (1991). Effects of ectomycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on drought tolerance of four leguminous woody seedlings. *Plant and Soil*, *136*(1), 131–143. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02465228

Parniske, M. (2008). Arbuscular mycorrhiza : the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(10), 763–775. https://doi.org/10.1038/nrmicro1987

Parra-Rivero, S. M., Sousa, M. D., Norberto, M., Sanabria-Chopite, M. E., & Pineda, J. (2018). Anatomical description of the arbuscular mycorrhizal fungi colonization in two tree legumes. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, *24*(2), 183–196. https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.02.014

Pawlowska, T. E., Chaney, R. L., Chin, M., & Charvat, I. (2000). Effects of metal phytoextraction practices on the indigenous community of arbuscular mycorrhizal fungi at a metal-contaminated landfill. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(6), 2526–2530. https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2526-2530.2000

Pawlowska, T. E., & Charvat, I. (2004). Heavy-Metal Stress and Developmental Patterns of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Heavy-Metal Stress and Developmental Patterns of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, *70*(11), 6643–6649. https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6643

Peña-Venegas, C. P., Cardona, G. I., Mazorra, A., Arguellez, J. H., & Arcos, A. L. (2006). *Micorrizas arbusculares de la Amazonia colombiana Catálogo ilustrado* (Primera ed). Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/18983/44082_56213.pdf?sequence=1

Pérez, A., Cury, K., & Oviedo, L. (2016). Colonización de micorrizas arbusculares en tres especies de pasturas del departamento de Sucre. *Temas Agrarios*, *21*(2), 65–75. https://doi.org/10.21897/rta.v21i2.902

Perotto, S., Martino, E., Abbà, S., & Vallino, M. (2012). Genetic diversity and functional aspects of ericoid mycorrhizal fungi. In *Fungal Associations* (2 Edition, pp. 255–285). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30826-0

Peterson, R. L., Massicotte, H. B., & Melville, L. H. (2004). *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC Research Press.

Phillips, J. M., & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, *55*(1), 158–161.

Read, D. J. (1996). The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Annals of Botany*, *77*(4), 365–374. https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0044

Redecker, D., Kodner, R., & Graham, L. E. (2000). Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*,

289(5486), 1920–1921. https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/redecker2000d.pdf

Remy, W., Taylor, T., Hass, H., & Kerp, H. (1994). Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(25), 11841–11843. https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.11841

Restrepo, K. J., Montoya, M. I., Henao, P., Gutiérrez, L. A., & Molina, L. P. (2019). Caracterización de hongos micorrízicos arbusculares de suelos ganaderos del trópico alto y trópico bajo en Antioquia , Colombia. *Idesia (Arica)*, *37*(1), 35–44. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-34292019005000301&script=sci_arttext

Rodríguez, V. (2018). *Análisis de la comunidad de Hongos Micorrizógenos Arbusculares en diferentes estados sucesionales de la selva húmeda de Los Tuxtlas, Veracruz* (tesis de pregrado) [Universidad Nacional Autónoma de México, México]. http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F/NNDMTVLUTIFJ9MA6T5SX4VY1PDTAJHYE89C9BM1QS118Y6MDNK-51122?func=find-acc&acc_sequence=002472722.

Ruiz-Lozano, J. M., & Azcón, R. (1995). Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiologia Plantarum*, *95*(3), 472–478. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1995.tb00865.x

Rzedowski, J. (1954). Vegetation of Pedregal de san angel. *Anales de La Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Mexico*, *8*, 59–129.

Sánchez de Prager, M. (1999). *Endomicorrizas en agroecosistemas colombianos* (p. 34). (No. Doc. 19297)* CO-BAC, Santafé de Bogotá).

Sánchez de Prager, M., Gómez López, E. D., Muñoz Florez, J. E., Barrios, E., Prager Mosquera, M., Bravo Otero, N., El-Sharkawi., M., Pérez Sarmentero, J., Asakawa, N., Marmolejo de la Torre, F., Cadavid, L. F., Quintero Durán, R., Miranda V, J. C., Mier, C. E., Torres, R.,

Reyes, J. T., Zapata, C. F., Tofiño, R., Benjumea, C., … Vargas, N. (2007). *Las Endomicorrizas: Expresión bioedáfica de importancia en el trópico*. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. http://www.bdigital.unal.edu.co/56779/1/2007-MarinaSanchezdePraguer.pdf

Sánchez de Prager, M., Posada, R., Velásquez, D., & Narvaez, M. (2010). Metodologías básicas para el trabajo con micorriza arbuscular y hongos formadores de micorriza arbuscular. In *Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira* (Primera Ed). Divulgación Académica y Cultural Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. https://www.researchgate.net/profile/Raul_Hernando_Posada/publication/271507112_Metodologias_basicas_para_el_trabajo_con_Micorriza_Arbuscular_y_Hongos_Formadores_de_Micorriza_Arbuscular/links/555c169c08ae6aea08173167/Metodologias-basicas-para-el-trabajo-c

Sandoval, P. J. F. (2019). *Efecto de las comunidades locales de hongos formadores de micorrizas arbusculares y patrones de injertación en la fisiología de plántulas de cacao sometidas a estrés por cadmio y zinc* (tesis de maestria). Universidad Nacional de Colombia, Bogota D.C., Colombia.

Sannazzaro, A. I., Ruiz, O. A., Alberto, E. O., & Menéndez, A. B. (2006). Alleviation of salt stress in Lotus glaber by Glomus intraradices. *Plant and Soil*, *285*(1–2), 279–287. https://doi.org/10.1007/s11104-006-9015-5

Santillana, N., & Toro, M. (2018). Asociación micorrízica arbuscular en pastizales de la Comunidad Alto Andina de Ccarhuaccpampa-Ayacucho. *Ecología Aplicada*, *17*(2), 165–169. http://dx.doi.org/10.21704/rea.v17i2.1236

Schüβler, A., Schwarzott, D., & Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota:

phylogeny and evolution. *Mycological Research*, *105*(12), 1413–1421. https://doi.org/10.1017/S0953756201005196

SEREPSA. (2013). *Portal oficial de la Reserva Ecológica Pedregal de San Ángel. Coodinación de la Investigación Científica. UNAM. Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Fecha de creación: 4-sep-2013*. http://www.repsa.unam.mx/

Simard, S. W., Jones, M. D., & Durall, D. M. (2003). Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. In *Mycorrhizal ecology* (pp. 33–74). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-38364-2_2

Simon, L., Bousquet, J., Lévesque, R. C., & Lalonde, M. (1993). Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, *363*(6424), 67–69. https://doi.org/10.1038/363067a0

Smith, S. E., & Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (Third Edit). Academic press. https://bibliotecavirtual.uis.edu.co:2191/book/9780123705266/mycorrhizal-symbiosis

Smith, Sally E., & Smith, F. A. (2011). Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. *Annual Review of Plant Biology*, *62*(1), 227–250. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846

Soto, M. (2004). El clima. In S. S. Guevara, D. J. Laborde, & G. R. Sanchez (Eds.), *Los Tuxtlas: El paisaje de la sierra* (pp. 195–198). Instituto de Ecología A.C y Union Europea.

Swift, M. J., Bignell, D. E., Moreira, F. M., & Huising, E. J. (2012). El inventario de la biodiversidad biológica del suelo: conceptos y guía general. In *Manual de biología de suelos tropicales. Muestreo y caracterización de la biodiversidad bajo suelo* (pp. 29–52). Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Nacional de Ecología (INE). http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/667/cap1.pdf

Tarbuck, E. J., & Lutgens, F. K. (2005). *Ciencias de la tierra una introduccion a la geologia fisica* (M. Martin-Romo & M. Caicoya (Eds.); Octava edi, Vol. 1). Pearson Prentice Hall. http://www.xeologosdelmundu.org/wp-content/uploads/2016/03/TARBUCK-y-LUTGENS-Ciencias-de-la-Tierra-8va-ed.-1.pdf

Tennant, D. (1975). A Test of a Modified Line Intersect Method of Estimating Root Length. *The Journal of Ecology*, *63*(3), 995–1001. https://doi.org/https://doi.org/10.2307/2258617

Trouvelot, A., Knough, J. L., & Gianinazzi-Pearson, V. (1986). Mesure du taux de mycorhization VA d'un système radiculaire. Recherche de méthode d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi (Eds.), *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae* (pp. 217–221). INRA Press.

Urgiles, N., Haug, I., Serato, S., & Aguirre, N. (2016). *Introduction to Mycorrhizas in the Tropics with emphasis on the Montane Forest in Southern Ecuador*. Universidad Nacional de Loja. https://www.researchgate.net/profile/Narcisa_Urgiles_Gomez/publication/306082812_Introduction_to_Mycorrhizas_in_the_Tropics_with_Emphasis_on_the_Montane_Forest_in_Southern_Ecuador/links/57af01ce08aeb2cf17c23695/Introduction-to-Mycorrhizas-in-the-Tropics-w

Valiente-Banuet, A., & Luna-García, E. (1990). Una lista florística actualizada para la Reserva del Pedregal de San Ángel, México DF. *Acta Botanica Mexicana*, *9*, 13–30. https://www.redalyc.org/pdf/574/57400902.pdf

Van Der Heijden, M. G., Klironomos, J. N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., & Sanders, I. R. (1998). Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, *396*(6706), 69–72. https://serval.unil.ch/resource/serval:BIB_2B45C4CA31A8.P001/REF.pdf

Vázquez-Santos, Y., Castillo-Argüero, S., Martínez-Orea, Y., Sánchez-Gallen, I., Vega-Frutis, R., Camargo-Ricalde, S. L., & Hernández-Cuevas, L. V. (2019). The reproductive phenology of Acaena elongata and its relation with arbuscular mycorrhizal fungi. *Symbiosis*, *79*(2), 129–140. https://doi.org/10.1007/s13199-019-00629-z

Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U., & Piché, Y. (1998). Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(12), 5004–5007. https://doi.org/10.1128/aem.64.12.5004-5007.1998

Von Bertrab Tamm, A. I. (2010). Conflicto social alrededor de la conservación en la Reserva de la Biosfera de los Tuxtlas: un análisis de intereses, posturas y consecuencias. *Nueva Antropología*, *23*(72), 55–80. http://www.scielo.org.mx/pdf/na/v23n72/v23n72a4.pdf

Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Christopher, J. W. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's microbiology* (Sevent edi). McGraw-Hill.

Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(12), 4576–4579. https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576

You, Y., Wang, J., Huang, X., Tang, Z., Liu, S., & Sun, O. J. (2014). Relating microbial community structure to functioning in forest soil organic carbon transformation and turnover. *Ecology and Evolution*, *4*(5), 633–647. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ece3.969

Apéndices

Apéndice 1. Estación biológica en los Tuxtlas Veracruz, México.

Nota: Lugar de donde procedieron algunas muestras para los análisis de laboratorio. Fotografía tomada de https://www.fundacionunam.org.mx/donde-paso/estacion-de-biologia-tropical-los-tuxtlas-ultima extension-de-selva-en-tierras-bajas-de-mexico/

Apéndice 2. Facultad de Ciencias y Laboratorio de Ecología del Suelo.

Nota: A la izquierda la facultada de ciencias en donde se realizaron actividades académicas como asistencia a clases, a la derecha el laboratorio de ecología del suelo donde se realizaron las actividades de laboratorio.

Apéndice 3. Reserva Ecológia del Pedregal de San Ángel UNAM.

Nota: Lugar donde se apoyaron las actividades de campo y de donde procedieron muestras para los análisis de laboratorio.

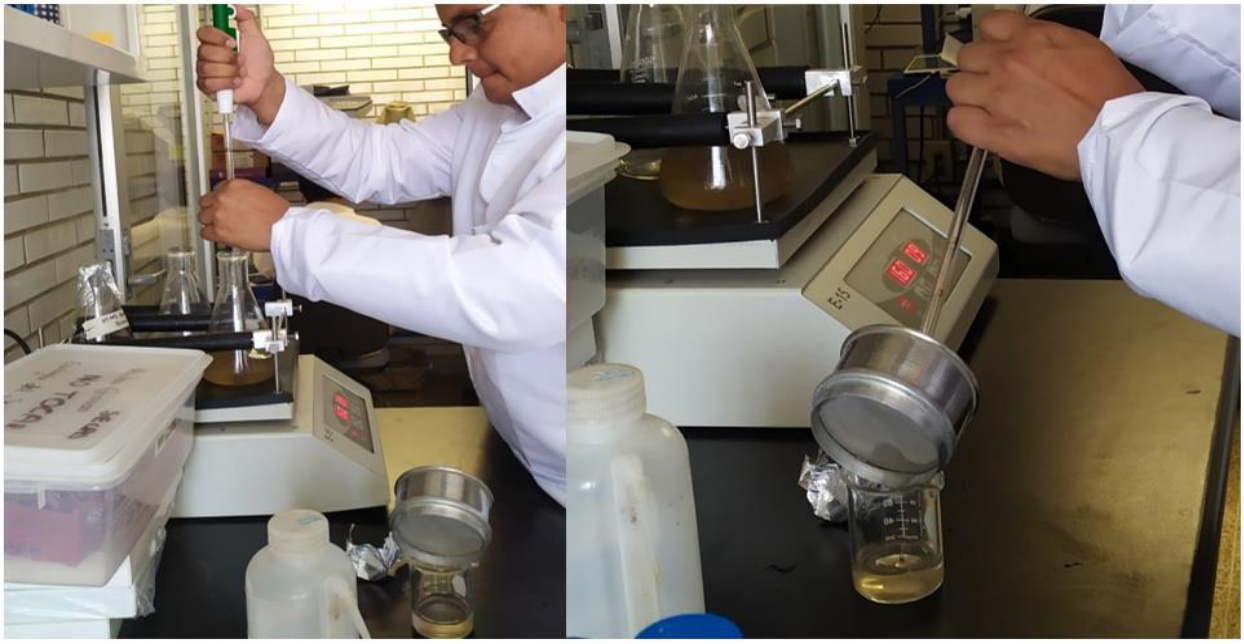
Apéndice 4. Tamizaje y pesaje de las muestras de suelo.

Apéndice 5. Separación de suelo y ME mediante agitación orbital.

Apéndice 6. Primera separación de suelo y ME mediante toma de alícuotas con agitador en movimiento.

Apéndice 7. Segunda separación de suelo y ME mediante pipeteo y agitación en movimiento.

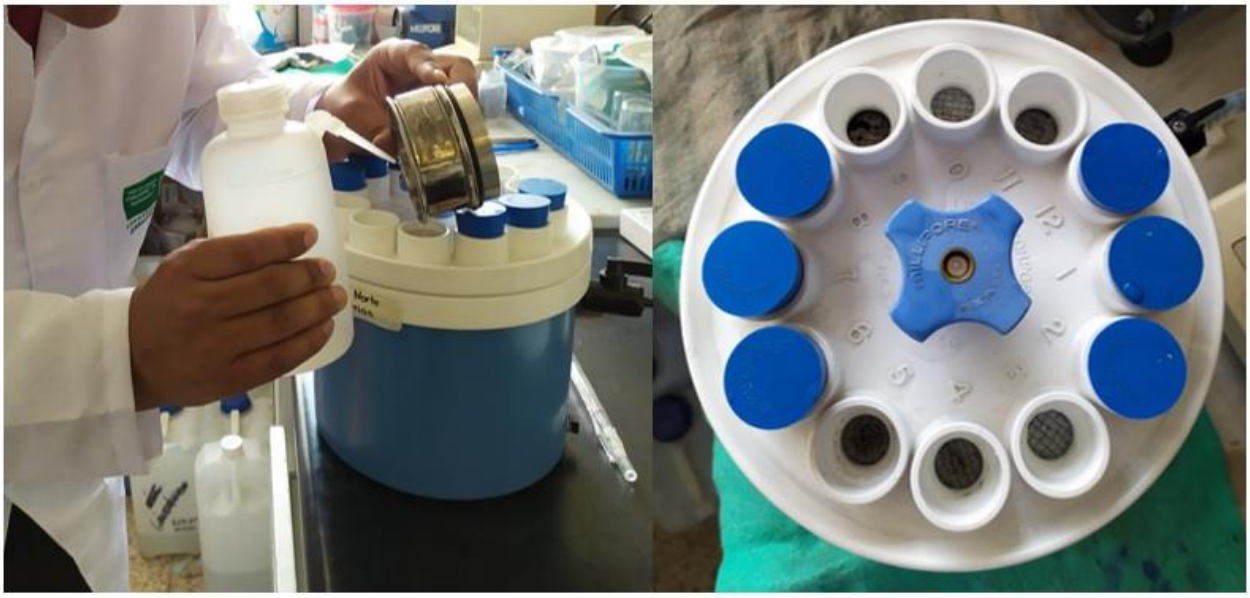
Apéndice 8. Tamizaje de la segunda separación mediante alícuotas y agitación en movimiento.



Apéndice 9. Membranas de nitrocelulosa utilizadas para la captura de ME por filtración de vacío.

Apéndice 10. Ubicación de membranas de nitrocelulosa en el colector de vacío múltiple.

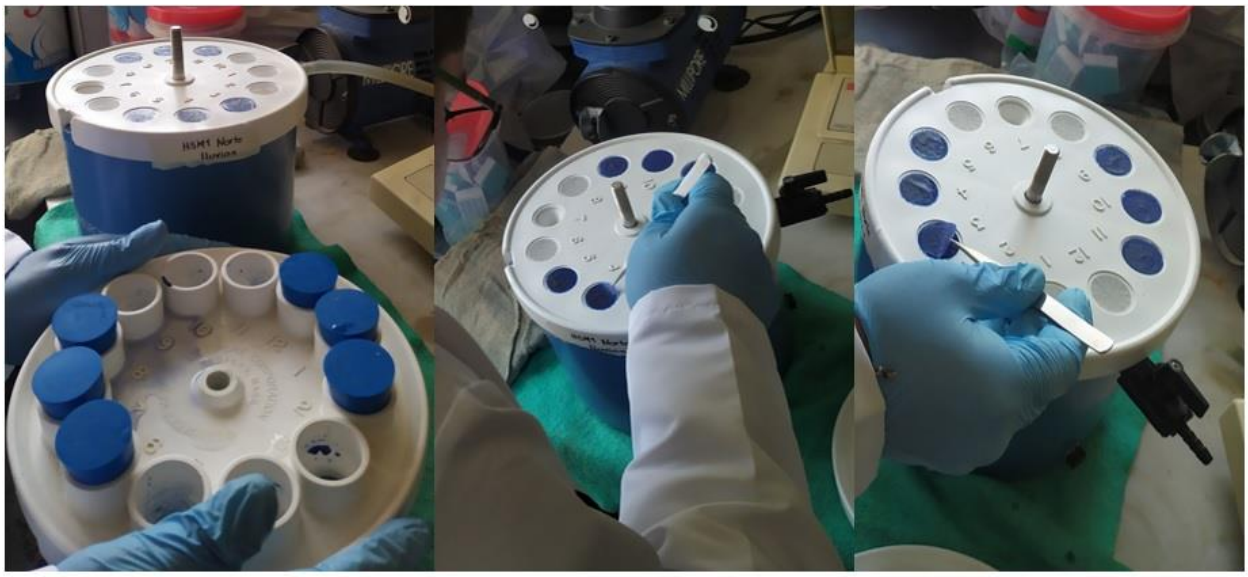
Apéndice 11. Transferencia de los residuos tamizados a las membranas de nitrocelulosa con ayuda de una piseta.



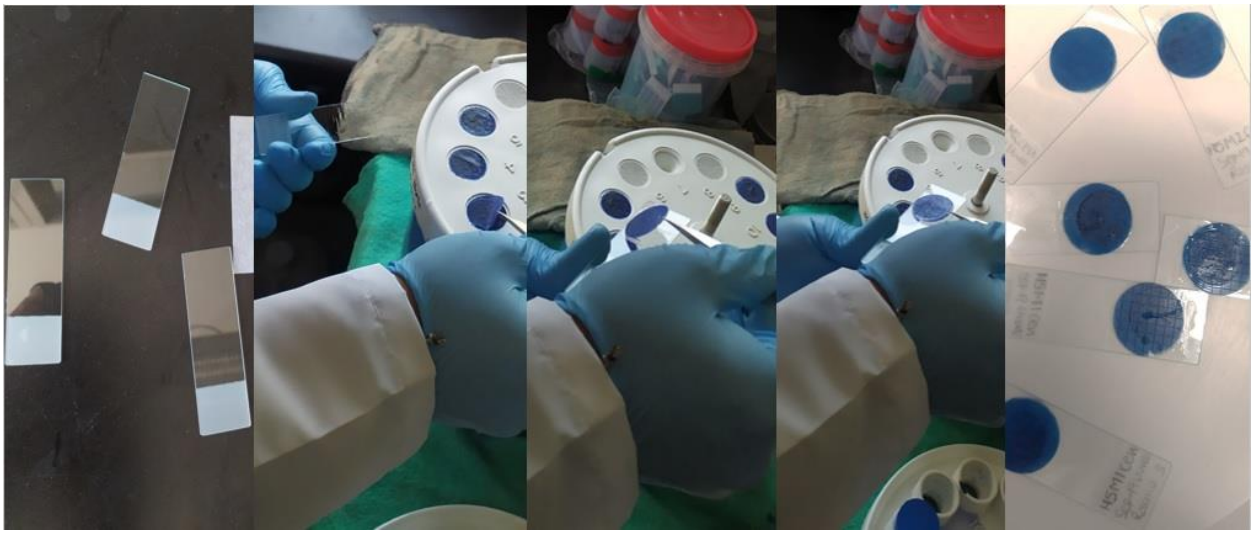
Apéndice 12. Adición de azul de tripano para la tinción del ME.

Apéndice 13. Reposo de membranas con azul de tripano y filtración con bomba de presión y vacío.

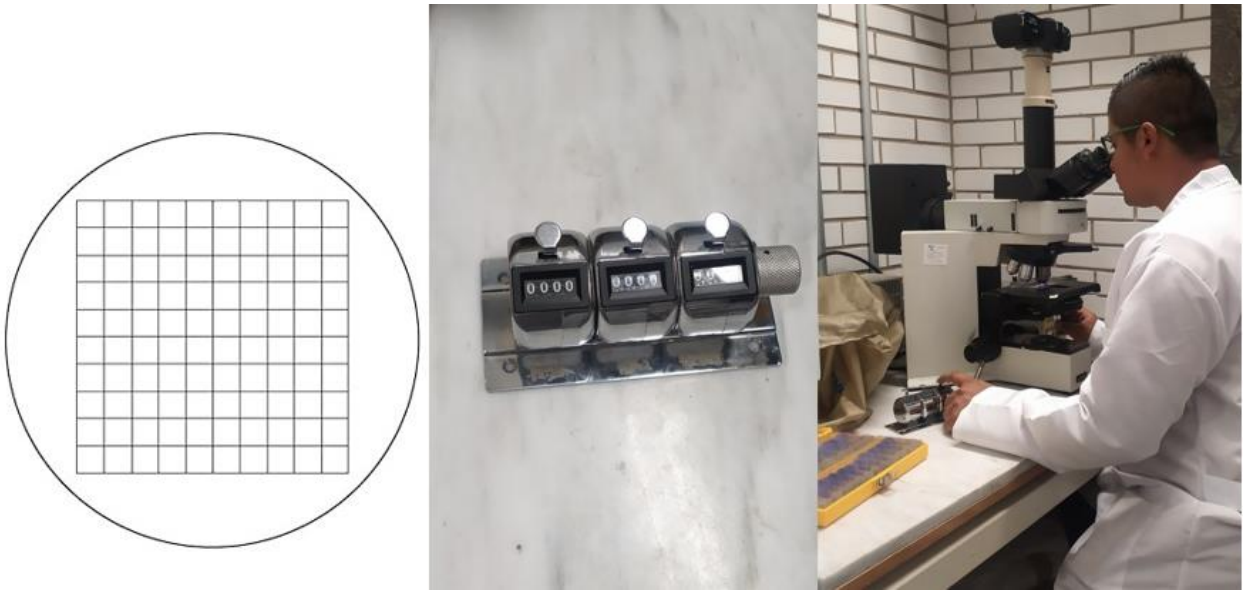
Apéndice 14.Extracción de membranas teñidas con ayuda de pinza de disección.



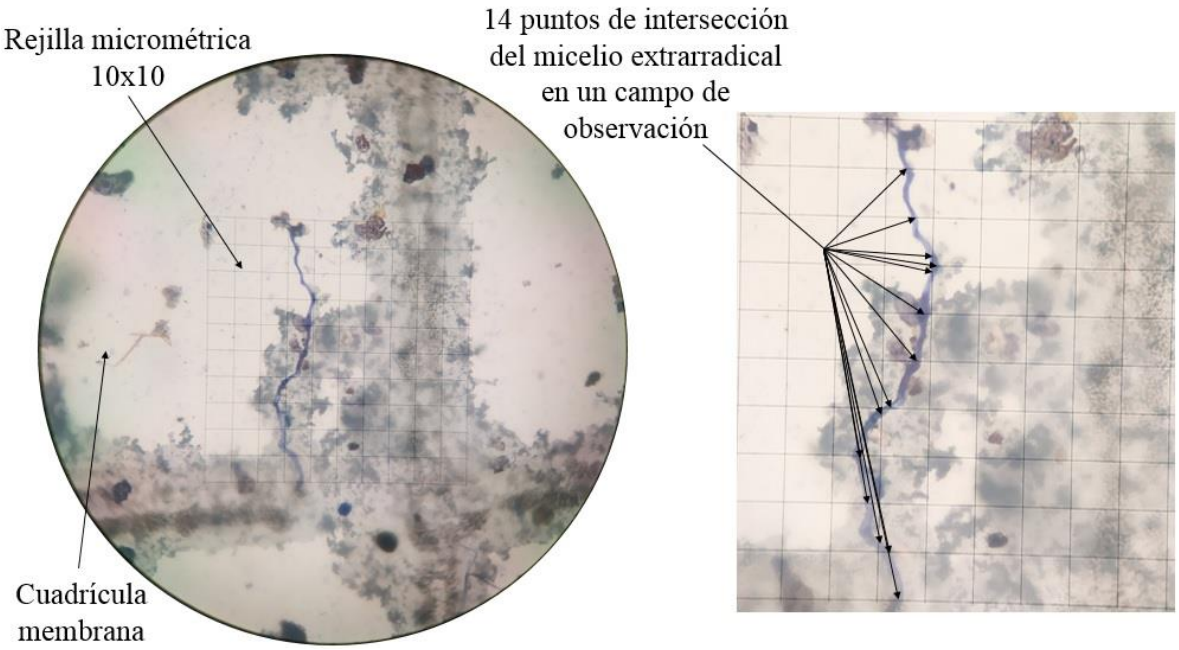
Apéndice 15. Montaje de membranas en portaobjetos y fijación con PVGL.



Apéndice 16. Observación y cuantificación de ME con rejilla micrométrica, microscopio de luz y contador click.



Apéndice 17. Observación y cuantificación microscópica de ME con objetivo de 20X.



Apéndice 18. Separación de raíces finas para realizar el proceso de tinción.

Apéndice 19. Selección y ubicación de las raíces en rejillas histológicas.

Apéndice 21. Lavado con agua de grifo para la eliminación de restos de suelo y tierra.

Apéndice 20. Adición de hidróxido de potasio (KOH) para despigmentación radicular.

Apéndice 22. Autoclave industrial para acelerar el proceso de eliminación de taninos radiculares.

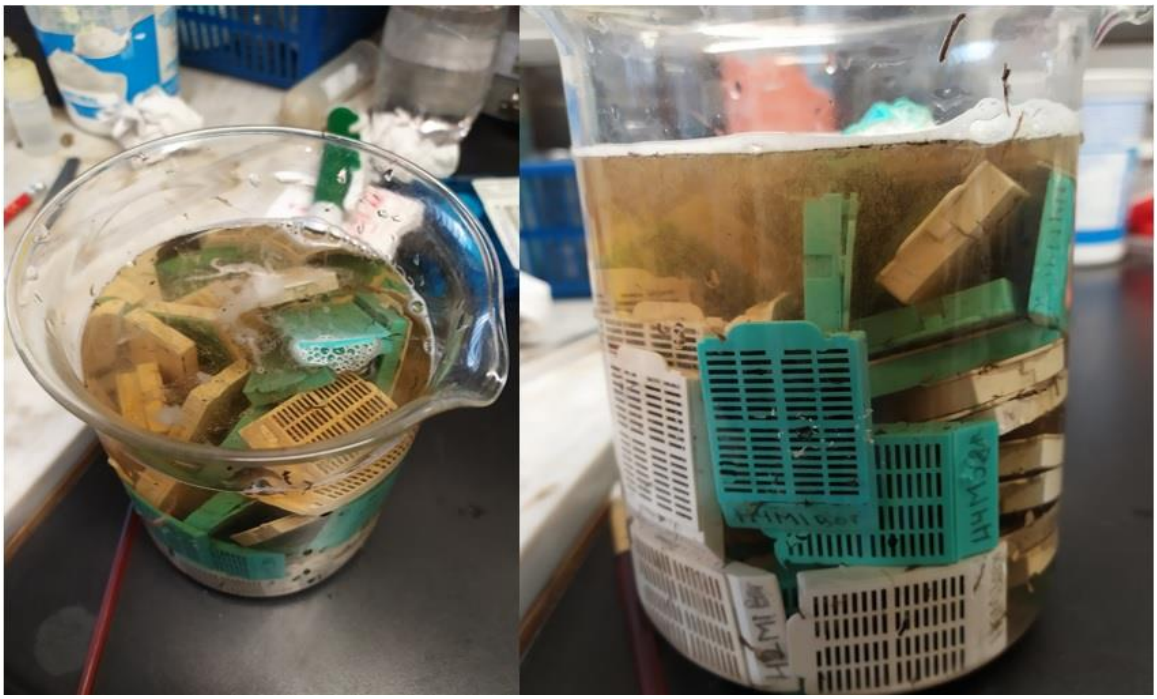
-

Apéndice 23. Preparación de muestras para la autoclave.

Apéndice 24. Introducción de muestras de raíces a la autoclave.

Apéndice 25. Extracción y eliminación residual de taninos radiculares.

Apéndice 26. Aclaramiento con agua oxigenada y acidificación con ácido clorhídrico (HCl).

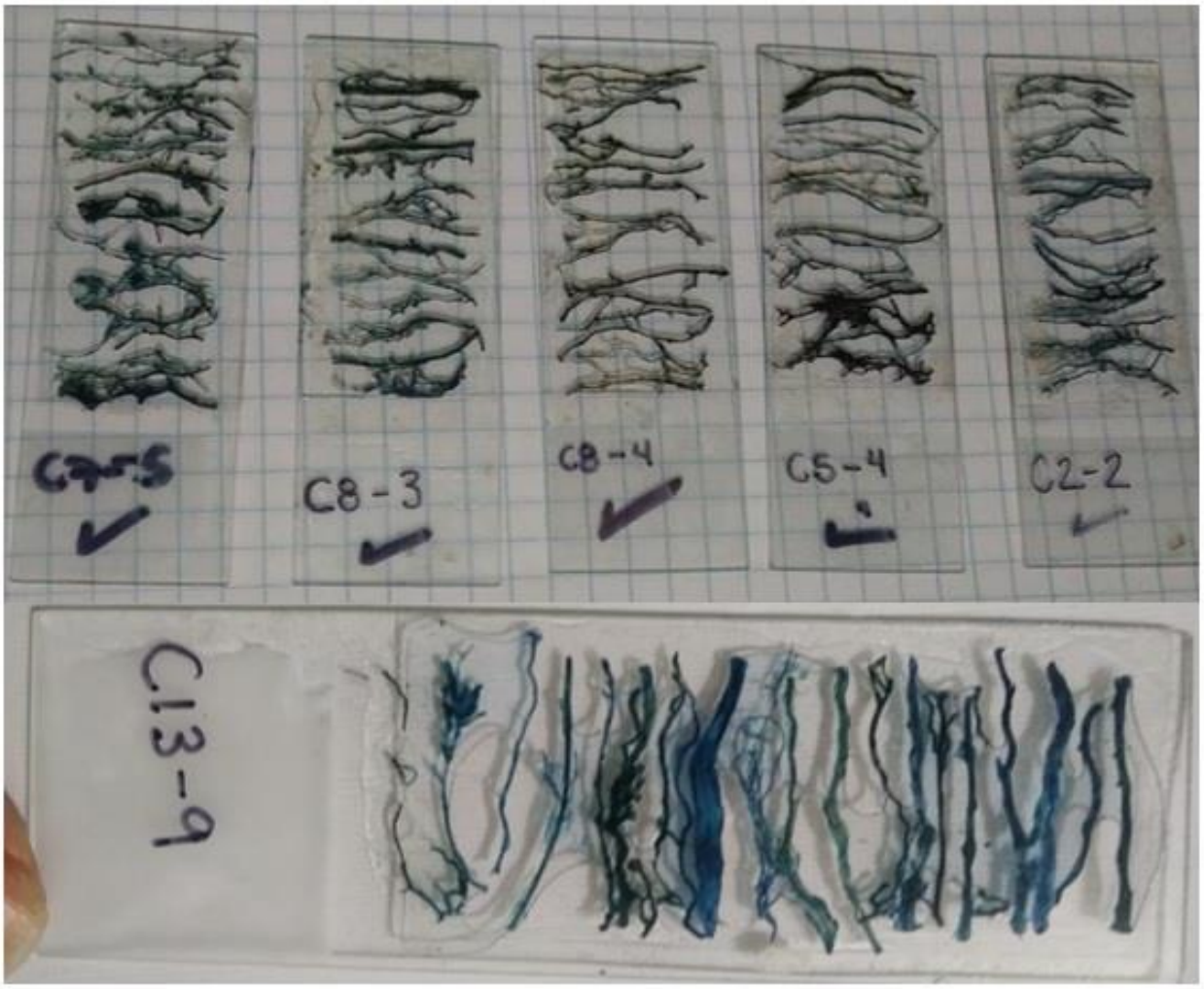


Apéndice 27. Preparación para tinción radicular.

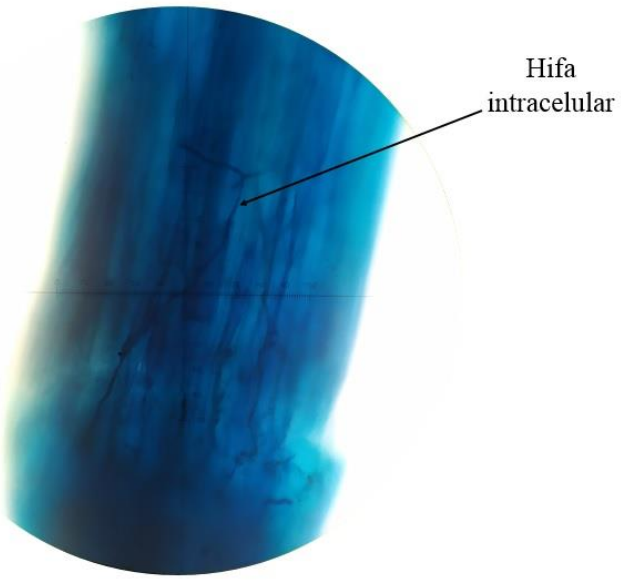
Apéndice 28. Tinción radicular con azul de tripano al 0,05%

Apéndice 29. Adición de lactoglicerol para conservación de raíces teñidas y posterior montaje.

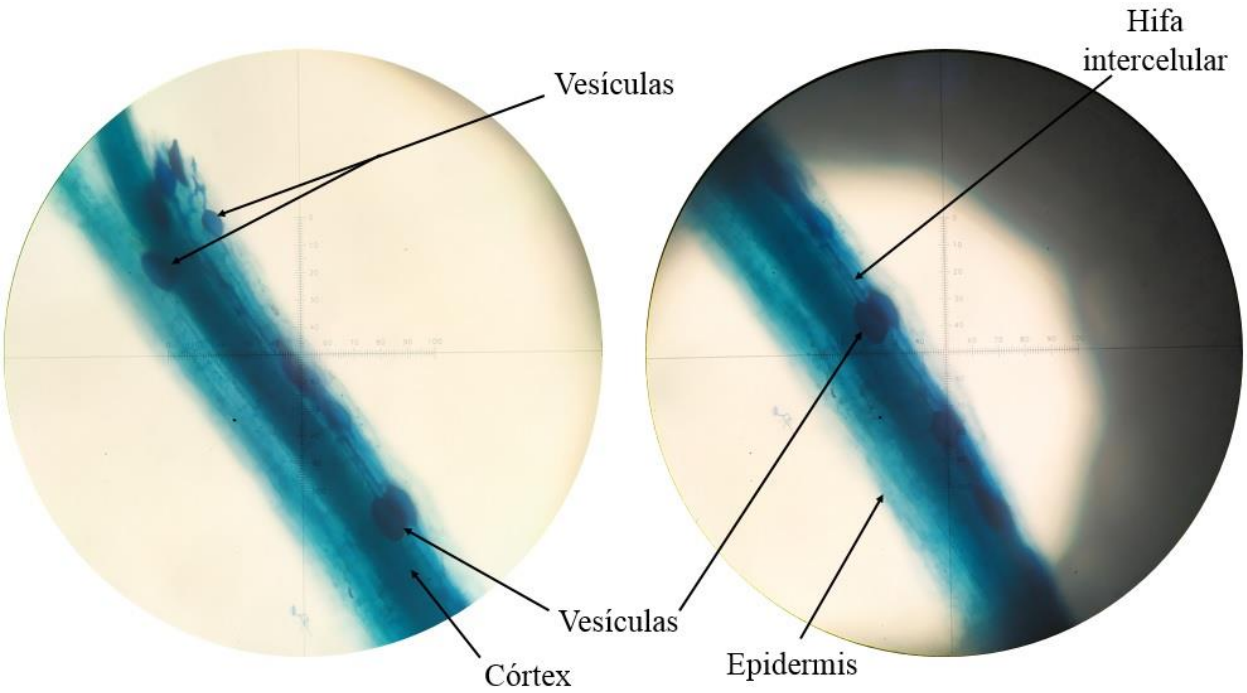
Apéndice 30. Montaje de raíces teñidas y fijación con PVGL.

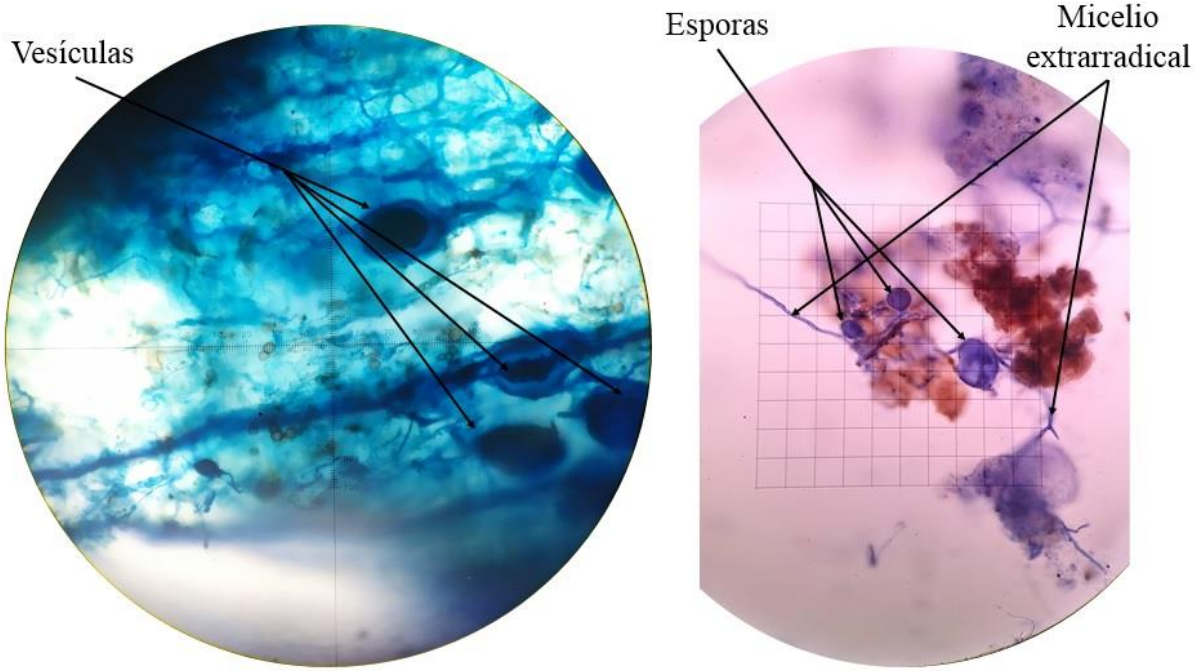


Apéndice 31. Identificación y observación de colonización de HMA.



Apéndice 32. Estructuras funcionales de HMA observadas con objetivo de 20X.





Apéndice 33. Formato utilizado para el conteo de colonización de HMA.

Campo visual	Micelio	Vesículas	Esporas	Ovillos	Arbusculos	Total estructuras
1		(+)				7
2	(+)					5
3	(+)					4
....						...
70						...

Apéndice 34. Actividades realizadas a lo largo de la pasantía de investigación

Fecha	Actividades
24 al 28 de febrero	Asistencia presencial a clases de Ecología **I** a cargo del profesor Jonathan Hernández Cumplido **temática**: microclima y ecofisiología de organismos, dos veces en la semana. Asistencia presencial al primer taller de Ecología de la Biota del Suelo nivel I a cargo de la doctora Guadalupe Barajas Guzmán, **temática**: atributos y características de los ecosistemas, productividad en ecosistemas, tipos de productividad, procesos energéticos, formación y clasificación de suelos.
02 al 06 de marzo	Proceso para la cuantificación de micelio extrarradical y porcentaje de colonización de estructuras funcionales de HMA con María del Rosario Aguilar. Asistencia presencial al taller de Ecología del Suelo a cargo de la Dra. Guadalupe Barajas, **temática**: características físicas del suelo, captura y secuestro de carbono, presencia de carbono global; actividades de consulta en casa. Asistencia presencial al taller de Ecología del Suelo a cargo del Dr. Javier Álvarez, **temática**: Ciclos biogeoquímicos y descomposición.
09 al 13 de marzo	Asistencia presencial a clases de Ecología I a cargo del profesor Jonathan Hernández Cumplido y la Dra. Guadalupe Barajas, **temática:** nicho y teoría general del muestreo. Asistencia presencial al taller de Ecología del Suelo a cargo del maestro Juan Carlos Peña, **temática:** clasificación de grupos funcionales y biodiversidad edáfica.
16 al 20 de marzo	Proceso de tinción de raíces con María del Rosario Aguilar.
23 al 27 de marzo	Taller virtual de Ecología del Suelo a cargo de la Dra. Irene Sánchez, **temática**: técnica de muestreo de raíces y hongos. Taller virtual de Ecología del Suelo a cargo del Dr. Javier Álvarez, **temática**: micorrizas, estudio a distintas escalas (introducción).
30 de marzo al 03 de abril	Taller virtual de Ecología del Suelo a cargo del Dr. Javier Álvarez, **temática**: Función de los HMA en varios niveles de organización. Taller virtual de Ecología del Suelo a cargo del maestro Juan Carlos Peña, **temática**: Protocolos de muestro para meso y macrofauna. Primer examen del taller.

Fecha	Actividades
06 al 10 de abril	Desarrollo del primer examen con nota final de **8.25**
13 al 17 de abril	Talleres virtuales de Ecología del Suelo a cargo del Dr. Javier Álvarez, **temática**: disturbio y perturbación, sucesión y regeneración vegetal.
20 al 24 de abril	Taller virtual de Ecología del Suelo a cargo del maestro Juan Carlos Peña, **temática**: procesos generales de intervención (reforestación, rehabilitación, restauración).
27 de abril al 01 de mayo	Taller virtual de Ecología del Suelo a cargo del Dr. Javier Álvarez, **temática**: diseño de experimentos. Taller virtual de Ecología del Suelo a cargo de la Dra. Guadalupe Barajas, **temática**: estadística paramétrica y no paramétrica.
04 al 08 de mayo	Taller virtual de Ecología del Suelo a cargo del maestro Juan Carlos Peña, **temática**: Pruebas de t, U, correlación y regresión. Taller virtual de Ecología del Suelo a cargo de la Dra. Irene Sánchez, **temática**: ANOVA y Kruskall-Wallis. Segundo examen del taller con nota final de **8.75**.
11 al 15 de mayo	Taller virtual de Ecología del Suelo a cargo de la Dra. Irene Sánchez, **temática**: análisis multivariados. Actividad de consulta en casa y ejercicio.
25 al 29 de mayo	Tercer examen del taller con nota final de **8.4**.
22 al 04 de julio	Entrega de exámenes y tareas finales (Apéndice 35)
07 de agosto	Finalización de la pasantía con nota final de **10** (Apéndice 36).

Apéndice 35. Exámenes presentados para el taller de la ecología de la biota del suelo.

1er. Examen Parcial de Taller:
Ecología de la biota del suelo
Grupo: 5450 y 5602 **Semestre: 2020-2**

Nombre: Yeison Alexander Diaz Gallo

Instrucciones: Contesta lo que se te pide. La suma total de las preguntas es de 10 puntos.

TOTAL 8.25

Preguntas Guadalupe Barajas

1.0

1. ¿Por qué el suelo se vuelve relevante a nivel de ecosistema y no lo fue históricamente a nivel de la comunidad? **(1 punto)**.

Gracias a su naturaleza multifacética, son el soporte físico de la vegetación terrestre y el hogar de organismos descomponedores y muchos animales. Son el trasfondo esencial para el funcionamiento de ecosistemas y ciclos biogeoquímicos (Chapin III *et al.*, 2011).

Históricamente algunos ecólogos como clements (1916), se enfocaron fuertemente en estudiar los organismos o unidades biológicas, que no reconocieron la importancia del intercambio de materiales entre los organismos y su entorno. Tansley (1935) acuño el termino ecosistema y su importancia de la interacción biótica y abiótica.

2. ¿Qué relación hay entre la productividad primaria neta y la estructura del suelo? **(1 punto)**.

1.0

La estructura del suelo afecta directamente el crecimiento de la planta; su porosidad influye en la penetración y distribución de las raíces, determina el comportamiento de los gases y la capacidad de absorber agua y nutrientes, lo que afecta el rendimiento de PPN. Además, el tamaño y diámetro de los agregados estables del agua se correlacionan con la composición bioquímica de los residuos vegetales. El retorno de los residuos de las plantas al suelo mejora su estructura (Bronick & Lal, 2005; Chapin III *et al.*,2002)

2do. Examen Parcial de Taller:
Ecología de la biota del suelo
Grupo: 5450 y 5602 **Semestre: 2020-2**

Nombre: Yeison Alexander Diaz Gallo

Instrucciones: Contesta lo que se te pide. La suma total de las preguntas es de 10 puntos.

Calificaciones exámenes taller Recibidos x

Francisco Javier Alvarez Sánchez <javier.alvarez@ciencias.unam.mx>
para Yeison

Hola:
Estas son tus calificaciones de los exámenes 2 y 3 del Taller; adjunto documentos con observaciones.
Saludos.

		P2					
	P1	a	b	c	P3	P4	Total
Ex2	4	1	1	0.95	0.8	1	8.75

Preguntas Javier Álvarez

1. Un Mapa Mental, es una representación en una diapositiva de Power point, en la que, usando fotos, esquemas y/o diagramas, y poco texto, explicas un concepto y sus partes más importantes, ya sea factores que lo regulan, sus componentes, etc. (ver dispositiva anexa con ejemplo).

De esta forma, elabora un (**solamente uno**) mapa mental **para cada uno** de los siguientes temas:

a) Regeneración (valor 1 pto.)
b) Sucesión (valor 1 pto.)
c) Estudio de los hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) desde alguna (solo una) de las tres escalas de aproximación para su estudio (individual, comunidad o ecosistema) (valor 2 pts.).

Preguntas Juan C. Peña

2. En un ambiente templado se estableció una milpa que mide 50 x 20 metros. En dicho espacio se está cultiva maíz, calabaza y frijol.
   a) Se desea conocer la composición de meso y macro fauna. Indica el diseño de muestro que realizarías (1 punto). 1.0 pts.

Tercer Examen Parcial de Taller
Ecología de la Biota del Suelo
Grupo: 5450 y 5602 **Semestre: 2020-2**

Nombre: Yeison Alexander Diaz Gallo

	P1	P2	P3	P4	P5	Total
Ex3	2	1	1.8	1.8	1.8	8.4

1.- Los siguientes datos representan la altura (cm) y los pesos (kg) de 13 niños. Contesta los que se te pide **(2 puntos)**: 2 puntos

	Altura (m) (x)	Peso (kg) (y)
1	72	9
2	76	10
3	59	6
4	68	8
5	58	5
6	70	8
7	65	7
8	54	4
9	83	11
10	64	7
11	66	7
12	61	6
13	66	8

a. Escribe la ecuación que describe a la recta de la gráfica:
Rta: **y=0.2442x-8.8084**

b. La prueba de Shapiro-Wilks para el dato de altura fue de: W = 0.974; *P* = 0.945, y para el peso de: W = 0.978.; *P* = 0.973 ¿Se cumplen con el supuesto de normalidad? Si/no ¿por qué?

Apéndice 36. Nota final de la pasantía y documentos de verificación

	PROCESO RELACIONES EXTERIORES	Código: FRE.19
	FORMATO CUMPLIMIENTO DE COMPROMISOS ACADÉMICOS	

Nombre Universidad Anfitriona: Universidad Nacional Autónoma de México

Nombre Estudiante: Yeison Alexander Diaz Gallo

Programa académico UIS: Ingeniería Forestal

Semestre UIS: 2020-01

Nombre asignatura: Pasantía de Investigación

Calificación a la fecha: 10

Nombre del profesor: Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez

Firma del profesor: _____

Firma del Estudiante:

Yeison Alexander Diaz Gallo
Ingeniería Forestal
C.C 1030644817 Cod:2145218

Yeison Alexander Díaz Gallo
Universidad Industrial de Santander, Málaga
PRESENTE

Por medio de la presente, me permito agradecer a usted su disposición, colaboración y compromiso durante su estancia en mi Laboratorio de Ecología del Suelo, realizada desde el 11 de febrero del presente año, hasta la fecha, para trabajar y aprender sobre técnicas de extracción y ecología de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA).

Durante dicha pasantía, hago constar que sus actividades fueron cumplidas satisfactoriamente de acuerdo a cronograma correspondiente, las cuales incluyeron desde el aprendizaje de técnicas de extracción de estructuras de los HMA, hasta el cumplimiento de las actividades teóricas llevadas a cabo en torno al Taller de Investigación Ecología de la Biota del suelo, en el cual se abordaron aspectos teóricos y prácticos sobre los HMA, y algunos aspectos generales del tratamiento estadístico de datos en ecología de microorganismos.

Deseo que su estancia con nosotros haya sido provechosa, y le deseo el mejor de los éxitos en sus actividades y proyectos futuros.

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente.
Ciudad Universitaria, a 27 de julio de 2020.

Dr. Fco. Javier Álvarez Sánchez
Profesor Titular C T.C.
Departamento de Ecología y Recursos Naturales
Facultad de Ciencias

	PROCESO RELACIONES EXTERIORES	Código: FRE.16
	FORMATO DE CERTIFICADO DE ESTANCIA (MOVILIDAD ACADÉMICA)	Versión: 01
		Página 1 de 2

PROGRAMAS DE MOVILIDAD
(Semestre 01 de 2020)
CERTIFICADO DE ESTANCIA/CERTIFICATE OF MOBILITY

La Universidad Industrial de Santander (UIS) y el Responsable de Movilidad académica de pregrado hacen constar que: / The Universidad Industrial de Santander (UIS) and the International Mobility Coordinator certify that:

De acuerdo con el rol de coordinador de movilidad de estudiantes, que obran en esta Unidad, el alumno que se menciona abajo se ha inscrito como beneficiario del programa de movilidad de la UIS, en el cual recibe beneficios/ According to the duties of the student mobility coordinator, the student mentioned below is a benefactor under the mobility program at UIS in which he is receiving profit

El estudiante debe certificar su llegada a la institución de destino, así como reportar la finalización y el cumplimiento del programa de movilidad al que se inscribió / the student must notify his/her arrival to the host institution, as well as the fulfillment and ending of the program he/she is enrolled.

Nombre/Apellidos del estudiante –Student's First Name and Last Name

Yeison Alexander Diaz Gallo

CERTIFICADO DE LLEGADA –ARRIVAL CERTIFICATE[1]

Fecha de llegada/Arrival Date: 11 de febrero de 2020.

Nombre y cargo/Name and Title: Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez
(Responsable de Movilidad Universidad de Destino/ Responsible for Mobility in the Host University)

Firma, Sello / Signature, Stamp:

CERTIFICADO DE SALIDA – DEPARTURE CERTIFICATE[2]

Fecha de salida/ Departure Date: 7 de agosto de 2020.

Nombre y cargo/Name and Title: Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez
(Responsable de Movilidad Universidad de Destino/ Responsible for Mobility in the host University)

Firma, Sello / Signature, Stamp:

	PROCESO RELACIONES EXTERIORES	Código: FRE.16
	FORMATO DE CERTIFICADO DE ESTANCIA (MOVILIDAD ACADÉMICA)	Versión: 01
		Página 2 de 2

FIRMA DEL ESTUDIANTE / STUDENT SIGNATURE

Yelson Alexander Diaz Gallo
Ingeniería Forestal
C.C 1030644817 Cod:2145218

La comunicación de la fecha de llegada es requisito previo para el reporte como estudiante en intercambio en el sistema de información de la UIS; si no lo hace, el sistema le asignará la calidad de estudiante con retiro voluntario / Reporting the arrival date is a requirement so the exchange student can be successfully registered in the UIS student system; if not registered, the system will automatically assign a voluntary withdrawal status to the student.