
CARACTERIZACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASOCIADOS A *Cyathea* spp. EN LA SIERRA NORORIENTAL POBLANA SIGUIENDO UN GRADIENTE ALTITUDINAL EN PRIMAVERA Y VERANO

Citlalli Harris-Valle, Ezequiel Mora-Guzmán, Mayleth del Carmen Sánchez-Arias y Martín Palafox-Rodríguez

RESUMEN

El género *Cyathea* es el helecho arborescente de más amplia distribución en la Sierra Nororiental Poblana de México. No obstante, las poblaciones silvestres han sido afectadas debido a la tala excesiva y la extracción continua de rizomas. La reproducción de estas plantas en condiciones controladas es poco exitosa por la baja tasa de geminación y sobrevivencia. Aunque existe poca información sobre la micorrización en condiciones silvestres, se sabe que este grupo vegetal establece asociaciones con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) que facilitan la asimilación de nutrientes, germinación de esporas, y establecimiento y desarrollo de individuos. En este trabajo se describen las características de micorrización en poblaciones de *Cyathea* spp. ubicadas a distinta altitud sobre la cuenca del río Apulco, Puebla, México. El estudio se

realizó en tres localidades durante primavera y verano, evaluando la composición de morfoespecies, el número total de esporas, la colonización micorrízica y la cantidad de micelio extra-radicular mediante la técnica de tamizado en húmedo y microscopía. La colonización micorrízica y el número total de esporas varían según la estación climática, en relación con las diferencias en la concentración de fósforo, tipo de vegetación y altitud. Se describieron 11 morfoespecies cuya presencia depende de la época del año; solamente una se encontró en todas las localidades en ambas épocas, mientras que otras dos morfoespecies solo se observaron asociadas a *Cyathea* spp. en bosque de pino-encino. Los resultados permiten proponer algunas morfoespecies como inoculantes que faciliten los programas de reforestación.

Introducción

El género *Cyathea* es importante desde el punto de vista ecológico debido a que está presente globalmente desde el Mesozoico medio (200-150×10⁶ años) y forma parte importante de los ecosistemas tropicales y subtropicales (Lucansky, 1974). Es el grupo de helechos arborescentes más ampliamente distribuido y se localiza en respuesta a los patrones de selvas lluviosas cálidas y bosques nublados (Arens, 2001; Delgado-Vázquez y Arregui, 2006). Este género tiene importancia económica ya que las plantas son utilizadas en actividades artesanales y de construcción,

razón por la que las poblaciones silvestres de la Sierra Madre Oriental en México han mermado debido a la tala excesiva y la extracción continua de los rizomas (Flores y Gerez, 1994).

Los helechos arborescentes en México tienen una alta afinidad a condiciones ecológicas particulares. Su capacidad dispersora está seriamente limitada debido principalmente a la fragilidad de la viabilidad de las esporas, a la sobrevivencia de los prótalos y a las condiciones ambientales limitadas para la germinación y maduración de gametófitos (Wolf *et al.*, 2001, Hiendlmeyer y Randi 2007, Janssen *et al.*, 2008). Eleu-

terio y Pérez-Salicrup (2006) señalan que en la región serrana de Puebla los rizomas de diferentes especies de helechos arborescentes se utilizan continuamente en la fabricación de artesanías, y sus tallos sirven como material de construcción, por lo que las poblaciones silvestres han disminuido considerablemente, de modo que desde el año 2010 algunas especies se incluyen en la norma oficial mexicana (NOM-059, 2010) como especies sujetas a protección especial. Debido a que la tasa de crecimiento de las especies pertenecientes a este género es de 2-4cm/año y las estrategias de reproducción *in vitro* son limitadas (Rechen-

macher *et al.*, 2010; Schmitt y Windisch, 2012), las posibilidades de recuperación de sus poblaciones y/o reforestación son complicadas en términos de germinación de esporas y obtención de prótalos.

La mayoría de las plantas terrestres forman asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos arbusculares (HMA), lo cual facilita la captación de nutrientes, la adaptación de las plantas a condiciones ambientales adversas y la resistencia de éstas a microorganismos patógenos (Smith y Read, 2008). Existen pocas investigaciones respecto a la simbiosis HMA-helecho arborescente, aunque se considera que gracias a la asociación

PALABRAS CLAVE / Altitud / Estación / Helecho Arborescente / Micorrización /

Recibido: 12/07/2015. Modificado: 07/07/2016. Aceptado: 21/07/2016.

Citlalli Harris Valle. Bióloga, Universidad Autónoma de Baja California, México. Maestría y Doctorado en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., México. Profesora-Investigadora, Insti-

tuto Tecnológico Superior de Zacapoaxtla (ITSZ), México. Dirección: Carretera Acua-Zacapoaxtla Km. 8, Col. Totoltepec, C.P. 73680 Zacapoaxtla, Puebla México. e-mail: citlalliharris@yahoo.com.mx.

Ezequiel Mora Guzmán. Biólogo, Universidad Autónoma Metropolitana, México. Profesor Investigador, ITSZ, México.
Mayleth del Carmen Arias Sánchez. Bióloga, ITSZ, México. Asesora proyectos pro-

ductivos en el Istmo en Oaxaca, México.

Martín Palafox Rodríguez. Químico Farmacobiólogo, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Profesor-Investigador, ITSZ, México.

CHARACTERIZATION OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ASSOCIATED WITH *Cyathea* Spp. IN SIERRA NORORIENTAL POBLANA FOLLOWING AN ALTITUDE GRADIENT IN SPRING AND SUMMER

Citlalli Harris-Valle, Ezequiel Mora-Guzmán, Mayleth del Carmen Sánchez-Arias and Martín Palafox-Rodríguez

SUMMARY

The genus *Cyathea* is the most widely distributed tree fern in the Sierra Nororiental Poblana of Mexico. However, wild populations have been affected due to excessive logging and continuous extraction of rhizomes. The reproduction of these plants under controlled conditions is unsuccessful due to the low germination and survival rates. While there is little information on the mycorrhization in these plants in the wild, it is known that they establish partnerships with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) that facilitate assimilation of nutrients, spore germination, establishment and development. In this paper the characteristics of mycorrhizal colonization are described in *Cyathea* spp. populations at different altitudes on the Apulco river basin, Puebla, Mexico. The study was con-

ducted in three locations during spring and summer, evaluating morphospecies composition, total number of spores, mycorrhizal colonization and the amount of extra-radicular mycelium by wet sieving technique and microscopy. It was found that changes in mycorrhizal colonization and total number of spores in the tree fern are due to differences in phosphorus concentration, vegetation and altitude. Eleven morphospecies were described whose presence in the form of spores changes depending on the season; only one morphospecies was found in all location in both seasons, while two other morphospecies were only observed associated with *Cyathea* spp. in a pine-oak forest. These results allow to propose some morphospecies as inoculants to facilitate reforestation programs.

CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ASSOCIADOS COM *Cyathea* spp. NA SIERRA NORORIENTAL POBLANA SEGUINDO UM GRADIENTE ALTITUDINAL NA PRIMAVERA E VERÃO

Citlalli Harris-Valle, Ezequiel Mora-Guzmán, Mayleth del Carmen Sánchez-Arias e Martín Palafox-Rodríguez

RESUMO

O gênero *Cyathea* é os fetos arbóreos mais amplamente distribuídos nas populações selvagens da Sierra Nororiental Poblana do México, porém foram afetados devido à exploração madeireira excessiva e extração contínua de rizomas. A reprodução dessas plantas em condições controladas é vencida com a baixa taxa de germinação e sobrevivência. Embora haja pouca informação sobre a micorrização nessas plantas em estado selvagem, é sabido que estabelece parcerias com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) que facilitar a assimilação dos nutrientes, germinação de esporos, criação e desenvolvimento. Neste trabalho é descrito as características da colonização micorrízica em populações de *Cyathea* spp. localizados em diferentes altitudes sobre a bacia do rio Apulco Puebla México. O estudo foi realizado em três locais durante a prima-

vera e no verão, avaliar a composição de morfoespécies, o número total de esporos, colonização micorrízica ea quantidade de micélio extra-radicular pela técnica de peneiramento úmido e microscopia. Verificou-se que as alterações na colonização micorrízica e o número total de esporos dos fetos arbóreos são dependentes da época do ano, e está relacionado com as diferenças na concentração de fósforo, vegetação e altitude. Onze morfoespécies foram descritos cuja presença é acordo com a estação climática, apenas uma morfoespécie encontrada em todos os locais em ambas estações, enquanto dois outros morfoespécies foram apenas observados associados com *Cyathea* spp. na floresta de pinho-carvalho. Estes resultados propor algumas morfoespécies como inoculantes para facilitar programas de reflorestamento.

entre las primeras plantas terrestres (entre las que se incluye a los helechos) y los hongos simbioses, fue posible la colonización de la tierra por parte de los vegetales, debido a que incrementaron la resistencia a la sequedad y a los patógenos (Brundrett, 2002). Turnau *et al.* (2005) mencionan que la micorrización (tanto en gametofitos como en esporofitos) estimula el crecimiento, reduce el periodo más vulnerable del ciclo de vida (gametófito), incrementa la superficie de las hojas y el desarrollo de la raíz en el esporofito, y mejora su capacidad de adaptación cuando existe

algún tipo de estrés. Por ello, una propuesta que coadyuvaría a la recuperación de poblaciones de *Cyathea* spp., es la de utilizar los HMA como inoculante en fase de vivero para incrementar las probabilidades de germinación, de sobrevivencia de plántulas germinadas e individuos traslapados, al mejorar el estado nutricional y proteger a los individuos contra diversos tipos de estrés biótico y abiótico.

Aunque la simbiosis micorrízica es poco específica, se sabe que estas asociaciones cambian en función de las especies que interactúan y de

las condiciones ambientales, pudiéndose observar asociaciones facultativas u obligadas (Kottke, 2002). En el caso de los helechos leptosporangiados (entre los que se encuentran las especies del género *Cyathea*), la asociación con HMA solo se presenta en condiciones específicas de crecimiento, de estrés o baja disponibilidad de nutrientes (Malloch *et al.*, 1980). Incluso el estadio de desarrollo de las plantas modifica la micorrización, por ejemplo *Rhizoglossum intraradices* en simbiosis con *Pteris vittata* forma vesículas y esporas únicamente con las

raíces del esporofito (Martínez *et al.*, 2012).

En diferentes ambientes, como pastizales y bosques de montaña, las comunidades de HMA varían en composición, frecuencia, densidad y riqueza a lo largo de gradientes altitudinales, asociado directamente con cambios en las características del suelo (Lugo *et al.*, 2008; Gai *et al.*, 2012; Coutinho *et al.*, 2015). Por otro lado, en ecosistemas desérticos y praderas la colonización micorrízica se modifica en función de la humedad del sustrato y la temperatura (Apple *et al.*, 2005; Owens *et al.*, 2012). Moreira

et al. (2006) describieron el efecto del clima en algunas variables de micorrización, encontrando que la colonización es mayor y el número de esporas menor en épocas frías y secas, comparado con periodos cálidos y húmedos.

Cyathea spp. se encuentra distribuido a lo largo de la cuenca del río Apulco, desde la región de Zacapoaxtla hasta el municipio de Cuetzalan del Progreso en la Sierra Nororiental Poblana en México (Rovirosa y Rovirosa, 2013) y consideramos que las diferencias en las características de micorrización y composición de morfoespecies que se presentan son debidas a que en un intervalo de 600m de altitud cambian el suelo, el clima y la vegetación: San Carlos, localizado al sur del municipio de Zacapoaxtla, tiene un clima templado húmedo con lluvias todo el año, suelo tipo andosol y bosque de pino-encino; San Francisco, al norte del municipio de Cuetzalan del Progreso, tiene clima semitemplado húmedo con lluvias todo el año, suelo tipo leptosol y bosque de pino-encino; mientras que Acachiloco, al sur de municipio de Cuetzalan del Progreso, posee vegetación selvática, suelo tipo regosol y clima cálido húmedo con lluvias todo el año (INEGI, 2009).

Los estudios de distribución de cualquier especie vegetal deben incluir información acerca de las interacciones con los microorganismos asociados a las raíces. En cualquier ecosistema, las comunidades son afectadas por los beneficios relativos conferidos por las diferentes especies de HMA nativos, de manera que hay una retroalimentación entre el crecimiento fúngico y el desarrollo de la planta, lo cual promueve la diversidad de la comunidad (Quilambo, 2003; Ehrenfeld *et al.*, 2006). De manera que consideramos importante estudiar las poblaciones de HMA de la rizósfera en condiciones ambientales específicas asociadas a un gradiente altitudinal, para entender mejor los procesos reproductivos, de desarrollo y de adaptación de estas plantas.

Conocer aspectos de la micorrización en los helechos arborescentes *Cyathea* spp. (porcentaje de colonización micorrízica, número de esporas, micelio extra-radicular y diversidad de morfoespecies presentes) a lo largo de un gradiente altitudinal sobre la cuenca del río Apulco, donde se observan cambios en clima, vegetación y tipo de suelo, permitirá identificar si se presentan diferencias en el establecimiento de la simbiosis. Cabe mencionar que hasta el momento solamente se ha encontrado la especie *Cyathea arborea* en la región (Rovirosa y Rovirosa, 2013) pero no se descarta la presencia de alguna otra especie.

La información obtenida permitirá comprender mejor la importancia de la micorrización en los helechos arborescentes y al mismo tiempo sentar las bases para seleccionar especies de HMA que puedan ser utilizados como inoculantes micorrízico que incrementen la sobrevivencia de *Cyathea* spp. en las estrategias de repoblamiento.

Metodología

De acuerdo con estudios exploratorios previos de presencia de individuos del género *Cyathea*, se seleccionaron tres localidades que difieren en altitud: San Carlos a 1500msnm (L1), San Francisco a 1200msnm (L2) y Acachiloco a 900msnm (L3), todas ubicadas a lo largo de la cuenca del río Apulco, en la carretera Zacapoaxtla-Cuetzalan, Puebla, México.

En los sitios seleccionados se realizó un estudio preliminar de presencia/ausencia de HMA. Se tomaron muestras en cuadrantes de 25×25m extrayendo suelo de todos los organismos del género *Cyathea* dentro del área marcada, mezclando para obtener una muestra compuesta. Se hicieron cuatro cuadrantes por localidad en cada época, dando un total de 24 muestras de suelo (cuatro repeticiones por localidad por temporada); las épocas fueron primavera (estación con menor precipitación) y verano (estación con mayor precipitación). Parte de las

muestras fueron enviadas al Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA) del Instituto Politécnico Nacional para el análisis de textura y nutrientes del suelo de acuerdo con la norma oficial mexicana (NOM-021, 2002).

Las muestras fueron secadas a 45°C y guardadas a 4°C hasta su utilización en el análisis. Se procesó 100ml de sustrato obtenido en campo, desfloculando con H₂O₂ al 10% durante 30min; se disgregó físicamente utilizando una licuadora comercial y se eliminaron las partículas más pesadas por decantación. Las muestras se procesaron mediante tamizado en húmedo utilizando mallas de 60 y 120µm, se filtraron con papel Whatman # 4 y se secaron en estufa hasta peso constante. Las muestras fueron guardadas en un lugar seco, de acuerdo con lo propuesto por Gerdemann y Nicolson (1963) y modificada por Herrera-Peraza *et al.* (2004). El número total de esporas y la determinación de morfoespecies se evaluó con el método de flotación en sacarosa 2M y visualización con un microscopio óptico, utilizando el 20 y 10% de las fracciones de 60 y 120µm, respectivamente.

De las dos fracciones resultantes (60 y 120µm) se obtuvieron las esporas, clasificando las morfoespecies de acuerdo con la morfología. Fueron identificadas con las letras del alfabeto conforme fueron halladas utilizando un microscopio estereoscópico. Las esporas fueron montadas en PVLG y Melzer para observación mediante microscopía óptica. La clasificación se hizo de acuerdo con Schenck y Pérez (1990), Morton *et al.* (1993) y el sitio <http://in-vam.caf.wvu.edu>.

Para estimar la cantidad de micelio extra-radicular se pesaron alicuotas por duplicado (0,03-0,06g) y se dispersaron de manera homogénea en una gota de glicerina sobre un portaobjetos. La preparación se revisó al microscopio compuesto a 40× y se contabilizaron las hifas en cuatro líneas imaginarias. El valor promedio obtenido para los cuatro conteos en líneas se

multiplicó por la constante 0,000745 (Herrera-Peraza *et al.*, 2004), lo que permitió estimar el peso (mg) del micelio por gramos de dicha alicuota. Lo anterior se realizó por duplicado en las dos fracciones (60 y 120µm) obtenidas mediante el tamizado en húmedo. Los promedios de cada fracción fueron sumados para obtener un valor final de micelio extra-radical expresado en mg·dm⁻¹. La colonización en raíces se evaluó tiñendo 100-150mg de raíces secas (45°C) con azul de tripano después de aclarar los tejidos con KOH 10% (Phillips y Hayman, 1970). El porcentaje de colonización se cuantificó considerando el número de segmentos de raíz que contenían micelio intercelular respecto al número total de raíces evaluadas, según Biermann y Linderman (1981).

Se aplicó un análisis de varianza para variables con distribución normal y cuando se encontraron diferencias significativas se realizó la comparación de medias por el método de Tukey-Kramer. Para las variables que no se ajustan a una distribución normal se aplicó un análisis de Kruskal-Wallis y en la comparación de medias se aplicó la prueba de Mann-Whitney con un valor crítico p=0,05. Las variables de respuesta fueron el porcentaje de colonización en raíces, los mg de micelio extra-radicular/dm³ de suelo y el número de esporas/g de suelo. Las variables predictoras fueron la localidad, la temporada y las características edafológicas (nutrientes y textura). La comparación de morfoespecies por localidad y temporada se hizo cualitativamente.

Resultados

En todas las zonas de estudio se identificó la presencia de HMA en el rizoma de los helechos arborescentes. Los datos edafológicos se muestran en la Tabla I. En Acachiloco (L3) se cuantificó la mayor concentración de N y menor de P, mientras que en San Francisco y San Carlos la concentración de estos dos nutrientes fue similar.

TABLA I
CARACTERÍSTICAS EDAFOLÓGICAS DE LOS SUELOS
EN LAS TRES LOCALIDADES MUESTREADAS

| Localidad | N (mg·kg ⁻¹) | P (mg·kg ⁻¹) | K (mg·kg ⁻¹) | MO (%) | Arena (%) | Arcilla (%) | Limo (%) |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|--------------|----------------|-------------|
| L1 | 10-20 | 15-30 | <0,2 | >6 | 76,4 | 15,6 | 8 |
| L2 | 10-20 | 15-30 | <0,2 | 1,6-3,5 | 86,4 | 9,6 | 4 |
| L3 | 20-40 | <15 | <0,2 | 3,6-6 | 80,4 | 7,6 | 12 |

L1: San Carlos, L2: San Francisco, L3: Acachiloco.

En cuanto al potasio, no hubo diferencias entre localidades (<0,2mg·kg⁻¹). En la textura del sustrato se encontró poca variación entre los sitios; en San Francisco tuvo ligeramente mayor porcentaje de arena (86%), Acachiloco presentó la proporción más elevada de arcilla (15%) y en San Carlos el limo fue 4% más alto que en las otras dos localidades. El menor valor de materia orgánica se encontró en L2 (1,6-3,5%) mientras que fue mayor al 6% en Acachiloco (L3).

La colonización micorrízica fue menor en Acachiloco (L3) respecto a las otras dos localidades en ambas épocas del año, mientras que entre San Carlos y San Francisco no se observaron diferencias signi-

ficativas (Tabla II). El micelio extra-radicular no mostró diferencias estadísticas comparando las localidades y las dos épocas del año; en las localidades L1 y L2 esta variable fue algo mayor en verano, mientras que en Acachiloco (L3) se encontraron valores más cercanos comparando las dos temporadas (Tabla II).

El número total de esporas fue una variable cuyos datos mostraron normalidad, por lo que se realizó un ANOVA y se encontró que existen diferencias significativas entre épocas del año (Figura 1). En verano los valores fueron iguales entre localidades, no obstante en primavera se observaron valores mayores en San Carlos (L1) y San Francisco (L2) (>25000

TABLA II
MICELIO EXTERNO (ME) Y COLONIZACIÓN
MICORRÍZICA (CM) CUANTIFICADAS EN LAS TRES
LOCALIDADES, LAS DOS ÉPOCAS DEL AÑO

| Localidad | CM (%) | | ME (mg·dm ⁻³) | |
|-----------|-----------|--------|---------------------------|--------|
| | Primavera | Verano | Primavera | Verano |
| L1 | 90 a | 99 a | 576 | 1012 |
| L2 | 90 a | 96 a | 449 | 579 |
| L3 | 80 b | 70 b | 399 | 336 |

L1: San Carlos, L2: San Francisco, L3: Acachiloco.

Los valores son el promedio de 4 repeticiones. Diferente literal indica diferencias significativas entre valores de una misma variable de respuesta aplicando las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis y Mann-Whitney ($\alpha=0,05$).

esporas/g de suelo) con respecto a lo observado en verano (11000-15000 esporas/g de suelo) y vs <1900 esporas/g de suelo cuantificado en Acachiloco (L3). Contrario a lo descrito para L1 y L2, en la localidad L3 se cuantificaron más esporas en verano que en primavera (difieren por más de 10000 esporas/g de suelo).

En la Tabla III se muestran las características microscópicas de las esporas que fueron consideradas para diferenciar las morfoespecies de HMA. Se asignaron las letras (A-H) conforme fueron encontradas y descritas. Las descripciones se basaron en el tamaño de las esporas, la forma, la superficie, capas de las paredes, reacción al reactivo de Melzer y separación de paredes (interna y externa) de la espora (Figura 2).

Se determinó la presencia de las morfoespecies de HMA en su forma esporulada en las distintas localidades y épocas del año evaluadas, lo cual no

implica que otras especies no estén presentes aun cuando no se detectaron sus estructuras reproductivas. Lo anterior se muestra en la Tabla IV. Se encontró que solo la morfoespecie E está presente en su forma esporulada en las tres localidades durante las dos épocas del año, mientras que las morfoespecies A y B únicamente están presentes en San Carlos y San Francisco tanto en primavera como en verano. Las morfoespecies C y H solo se observaron en Acachiloco, la primera únicamente en primavera y la segunda en las dos estaciones. La morfoespecie D está presente solamente durante primavera. La morfoespecie G no fue detectada en San Carlos en ninguna de las dos estaciones.

Discusión

Se observa mayor similitud entre las localidades San Carlos (L1) y San Francisco (L2) en cuanto a características edafológicas y presentan un mayor porcentaje de colonización micorrízica y de número total de esporas al comparar las tres localidades. Los sitios identificados como L1 y L2 se localizan a mayor elevación que Acachiloco y la vegetación de ambos es característica de un bosque de pino-encino.

Dos variables edafológicas influyen significativamente en las características de micorrización: la proporción de arena y la cantidad de P en el suelo. Según Ruiz-Lozano (2003) la colonización micorrízica se incrementa en condiciones de limitación de P. Contrario a esto, en este trabajo los sitios

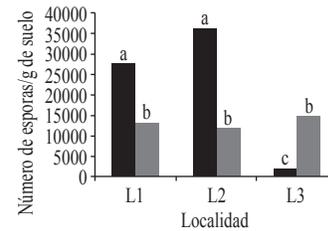


Figura 1. Número total de esporas cuantificadas en las tres localidades de la Sierra Nororiental Poblana en primavera (barras negras) y verano (barras grises). L1: San Carlos, L2: San Francisco, L3: Acachiloco. Los valores son el promedio de cuatro repeticiones; diferente literal indica diferencias significativas evaluadas por análisis de varianza y prueba de Tukey-Kramer ($\alpha=0,05$)

TABLA III
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS QUE PERMITEN DIFERENCIAR LAS MORFOESPECIES
ENCONTRADAS EN LOS TRES SITIOS

| Morfoespecie | Tamaño (μ m) | Forma | Superficie | Capas de paredes | Color (RGB) | Reacción al Melzer's | Separación de paredes |
|--------------|----------------------|---------|---------------------|---------------------|----------------|---------------------------------|--------------------------|
| A | 85 | globosa | Ondulada/pubescente | 2 | 000-000-000 | Sin cambio | No (capa dehiscente) |
| B | 110 | globosa | Verrugosa | 4 | 100-036-036 | Sin cambio | Si |
| C | 100 | globosa | Lisa | 2 | 000-000-000 | Sin cambio | Si |
| D | 135 | globosa | Lisa | 3 | 161-035-018 | Sin cambio | No |
| E | 70 | globosa | Pubescente | 2 | 000-000-000 | Sin cambio | No |
| F | 75 | globosa | Ondulada | 2 | 000-000-000 | Sin cambio | No |
| G | 80 | globosa | Lisa | 4 | 194-176-120 | Sin cambio | No |
| H | 80 | globosa | Escamosa | 2 | 000-000-000 | Interior se torna marrón oscuro | No (capa dehiscente) |

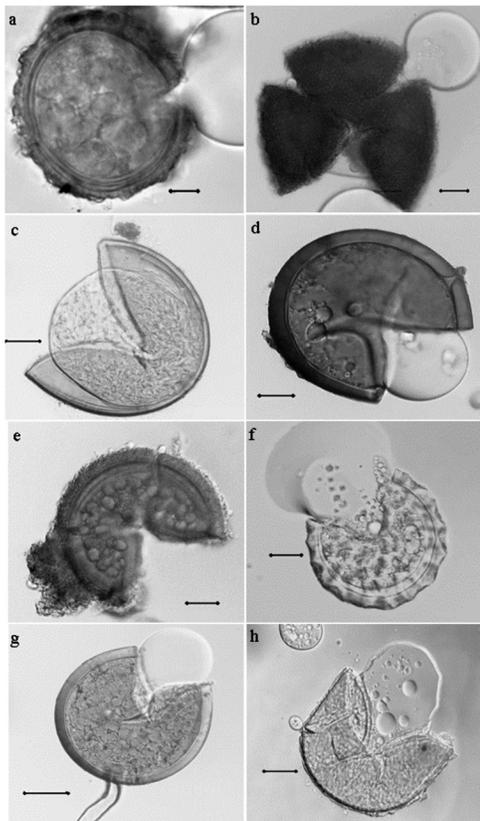


Figura 2. Esporas de morfoespecies de HMA asociados a *Cyathea* spp. en las tres localidades de la Sierra Nororiental Poblana. a) Morfoespecie A, b) Morfoespecie B, c) Morfoespecie C, d) Morfoespecie D, e) Morfoespecie E, f) Morfoespecie F, g) Morfoespecie G, h) Morfoespecie H. La barra negra equivale a 20µm.

con concentración de P >15mg·kg⁻¹ (L1 y L2) presentaron valores más altos de colonización fúngica en raíces. Por otro lado, algunos autores señalan que a mayor proporción de arena se observan valores altos de micelio externo (ME) en suelo (Morte *et al.*, 2000; Al Karaki, 2004) y al comparar los tres sitios evaluados en este estudio las diferencias en el porcentaje de arena no son mayores al 10% y el micelio externo es estadísticamente igual, por lo tanto consideramos que la proporción de arena puede estar relacionada directamente con la igualdad observada en cuanto a ME.

Se ha visto que la esporulación de hongos micorrízicos es dinámica con relación a la estacionalidad (Moreira *et al.*, 2006; Lovera y Cuenca, 2007). En este estudio se encontraron diferencias significativas entre primavera y verano en todas la

localidades. En un estudio en pastizales de montaña los valores más altos en el número total de esporas fueron en la época seca y los autores señalan los incrementos coinciden con la ausencia de floración y fructificación, así como con el final de la época de crecimiento (Lugo y Cabello, 2002). De manera similar, en San Carlos y San Francisco la esporulación más alta se observó en la época de menor precipitación pluvial. Cabe señalar que en el caso de los helechos arborescentes *Cyathea*, durante los periodos de sequía se presenta una disminución en la liberación de esporas, la cual

aumenta en los periodos de lluvia (Arens, 2001; Schmitt y Windisch, 2012).

En los helechos se observan porcentajes de colonización menores a los de las plantas superiores (68 vs 85%) siendo los helechos terrestres los que presentan mayores porcentajes (Kessler *et al.*, 2010). En general la colonización puede ser desde 0 hasta más del 75% (Zhao, 2000; Lehnert *et al.*, 2009). En este trabajo se encontraron porcentajes >80% en todas las localidades, lo cual significa que estos organismos vegetales son susceptibles a la colonización y probablemente con elevada dependencia de la planta hacia el hongo. Son escasos los estudios de micorrización en pteridofitas, pero en un trabajo reciente en helechos arborescentes (*Alsophila*) se encontró que los altos porcentajes de colonización micorrízica indican una fuerte dependencia

TABLA IV
PRESENCIA (+) Y
AUSENCIA (-) DE ESPORAS
DE CADA UNA DE
LAS MORFOESPECIES
ENCONTRADAS EN
LAS TRES LOCALIDADES
MUESTREADAS EN
PRIMAVERA (P)
Y VERANO (V)

| Morfoespecie | L1 | | L2 | | L3 | |
|--------------|----|---|----|---|----|---|
| | P | V | P | V | P | V |
| A | + | + | + | + | - | - |
| B | + | + | + | + | - | - |
| C | - | - | - | - | + | - |
| D | + | - | + | - | - | - |
| E | + | + | + | + | + | + |
| F | - | + | + | + | - | - |
| G | - | - | + | + | + | + |
| H | - | - | - | - | + | + |

L1: San Carlos, L2: San Francisco, L3: Acachiloco.

del helecho en la simbiosis (Lara-Pérez *et al.*, 2014).

En un estudio de diversidad de HMA en *Alsophyla firma* en un bosque subtropical de montaña en Veracruz Lara-Pérez *et al.* (2014) encontraron un total de 17 especies de HMA, cantidad mayor a la determinada en el presente estudio; no obstante, la mayoría de las morfoespecies asociadas a *A. firma* fueron identificadas hasta el nivel de especie, por lo que resultados más precisos requerirían análisis taxonómicos moleculares, mientras que en este estudio únicamente fueron clasificadas en función de la morfología.

Se han descrito diferencias estacionales en cuanto a la diversidad de esporas de hongos micorrízicos presentes, debido a que algunos hongos esporulan preferentemente en época de lluvias, mientras que otros lo hacen en épocas secas (Pringler y Baver, 2002), razón por la que se considera que la presencia de esporas de ciertas morfoespecies en una determinada localidad o época no implica necesariamente que los HMA no estén presentes en los otros sitios o temporadas del año. Con base en la información mostrada en la Tabla IV consideramos que la morfoespecie E es la mejor candidata para ser reproducida y evaluada como inoculante con fines de pro-

pagación de *Cyathea* spp., ya que se encuentra en todas las localidades estudiadas en ambas épocas del año, mientras que las morfoespecies A y B pudieran ser efectivas si se utilizan en bosques de pino-encino.

Algunas características de la micorrización, tales como la colonización micorrízica y el número total de esporas, cambian cuando se modifica la concentración de P en el suelo y la altitud a la que son encontradas las plantas, probablemente en función de la temperatura ambiental y/o vegetación circundante, siendo contrastante lo encontrado a menos de 900msnm y por encima de 1200msnm. La esporulación cambia entre localidades solamente en primavera, mientras que el micelio externo es igual en todas las épocas y localidades.

Existen pocos estudios de evaluación de la micorrización en helechos arborescentes y este trabajo contribuye a ampliar la información de la simbiosis de HMA en el género *Cyathea* para esta región considerada relictual de esta antigua especie vegetal. Al mismo tiempo el trabajo sienta las bases para la selección de especies de HMA que sean utilizados como inoculantes con la finalidad de facilitar los procesos de germinación y el establecimiento de individuos con fines de reforestación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Sadot Mora Ortigoza y Kevin Pérez por su apoyo y colaboración durante todo el desarrollo del trabajo experimental, y al jardín botánico Xoxoctic A.C. por permitirnos realizar los muestreos en las dos ocasiones.

REFERENCIAS

- Apple ME, Thee CI, Smith-Longozo VL, Cogar CR, Wells CE, Nowak RS (2005) Arbuscular mycorrhizal colonization of *Larrea tridentata* and *Ambrosia dumosa* roots varies with precipitation and season in the Mojave Desert. *Symbiosis* 39: 131-135.
- Arens NC (2001) Variation in performance of the tree fern *Cyathea caracasana* (Cyatheaceae) across

- a successional mosaic in an andean cloud forest. *Am. J. Bot.* 88: 545-551.
- Biermann B, Linderman RG (1981) Quantifying vesicular-arbuscular mycorrhizae: A proposed method towards standardization. *New Phytol.* 87: 63-67.
- Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* 154: 275-304.
- Coutinho ES, Fernandes GW, Berbara RLL, Valério HM, Goto BT (2015) Variation of arbuscular mycorrhizal fungal communities along an altitudinal gradient in rupestrian grasslands in Brazil. *Mycorrhiza* 25: 627-638.
- Delgado-Vázquez AJ, Arregui LP (2006) *Helechos Amenazados de Andalucía*. Consejo de Medio Ambiente. Andalucía, España, 128 pp.
- Ehrenfeld JG, Ravit B, Elgersma K (2005) Feedback in the plant-soil system. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 30: 75-115.
- Eleuterio AA, Perez-Saliciup D (2006) Management of tree fern (*Cyathea* spp.) for handicraft production in Cuetzalan, México. *Econ. Bot.* 60: 182-191.
- Flores-Villela O, Gerez P (1994) *Biodiversidad y Conservación en México: Vertebrados, Vegetación y Uso de Suelo*. 2ª ed. Técnico científicas-UNAM. México. 439 pp.
- Gai JP, Tian H, Yang FY, Christie P, Li XL, Klironomos JN (2012) Arbuscular mycorrhizal fungal diversity along a Tibetan elevation gradient. *Pedobiologia* 55: 145-151.
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46: 235-244.
- Herrera-Peraza RA, Furrázola E, Fernández-Valle R, Torres Y (2004) Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. *Rev. CENIC Cs. Biol.* 35: 113-123.
- Hiendlmeyer R, Randi AM (2007) Responses of spores and young gametophytes of *Cyathea delgadoi* Sternb. (Cyatheaceae) and *Blechnum brasiliense* Desv. (Blechnaceae) to different light levels. *Acta Bot. Bras.* 21: 909-915.
- INEGI (2009) Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Zacapoaxtla, clave geoestadística: 21207. Cuetzalan del Progreso, clave geoestadística: 21043. Instituto Nacional de Geografía e Informática. México.
- Janssen T, Bystríková N, Raketondrainibe F, Coomes D, Labat JN, Schneider H (2008) Neotendism in Madagascan scaly tree ferns results from recent, coincident diversification bursts. *Evolution* 62: 1876-1889.
- Kessler M, Jonas R, Strasberg D, Lehnert M (2010) Mycorrhizal colonizations of ferns and lycophytes on the island of La Réunion in relation to nutrient availability. *Bas. Appl. Ecol.* 11: 329-336.
- Kottke I (2002) Mycorrhizae-rhizosphere determinants of plant communities. En Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (Eds.) *Plant Roots: The Hidden Half*. 3a ed. Dekker. Nueva York, EEUU. pp. 919-932.
- Lara-Pérez LA, Noa-Carranza JC, Landa-López AJ, Hernández-González S, Oros-Ortega I, Torres AA (2014) Colonización y estructura de la comunidad de hongos micorrízicos arbusculares en *Alsophila firma* (Cyatheaceae) en bosque mesófilo de montaña en Veracruz, México. *Rev. Biol. Trop.* 62: 1609-1623.
- Lehnert, M, Kottke I, Setaro S, PazminoLF, SuarezJP, Kessler M (2009) Mycorrhizal associations in ferns from Southern Ecuador. *Am. Fern J.* 99: 292-306.
- Lovera M, Cuenca G (2007) Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y potencial micorrízico del suelo de una sabana natural y una sabana perturbada en la Gran Sabana Venezuela. *Interiencia* 32: 108-114.
- Lucansky W (1974) Comparative studies of the nodal and vascular anatomy in the Neotropical Cyatheaceae. II. Squamate genera. *Am. J. Bot.* 61: 472-480.
- Lugo MA, Cabello MN (2002) Native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from mountain grassland (Córdoba, Argentina) I. Seasonal variation of fungal spore diversity. *Mycologia* 94: 579-586.
- Lugo MA, Ferrero M, Menoyo E, Estévez MC, Siferiz F, Anton A (2008) Arbuscular mycorrhizal fungi and rhizospheric bacteria diversity along an altitudinal gradient in South American Puna grassland. *Microb. Ecol.* 55: 705-713.
- Martínez AE, Chiochio V, Em LT, Rodríguez MA, Godeas AM (2012) Mycorrhizal association in gametophytes and sporophytes of the fern *Pteris vittata* (Pteridaceae) with *Glomus intraradices*. *Rev. Biol. Trop.* 60: 857-865.
- Malloch DW, Pirozynski KA, Raven PH (1980) Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2113-2118.
- Moreira M, Barreta D, Tsai SM, Cardoso EJB (2006) Spore density and root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in preserved or disturbed *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. ecosystems. *Sci. Agric.* 63: 380-385
- Morte A, LovisoloC, Schubert A (2000) Effect of drought on growth and water relations of the mycorrhizal association *Helianthemum almeriense-Terfeziaclaveryi*. *Mycorrhiza* 10: 115-119.
- Morton JB, Bentivenga SP, Wheeler WW (1993) Germ plasm in the international collection of arbuscular and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48: 491-528.
- NOM-021 (2002) *Norma Oficial Mexicana SEMARNAT-2000. Que Establece las Especificaciones de Fertilidad, Salinidad y Clasificación de Suelos, Estudio, Muestreo y Análisis*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación (31/12/2002). México. <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2280n.pdf>
- NOM-059 (2010) *Norma Oficial Mexicana SEMARNAT-2010. Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres - Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión, Cambio - Lista de Especies en Riesgo*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación (30/12/2010). México. www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT_2010.pdf
- Owens H, LaFantasie J, Adler PB (2012) Mycorrhization rates of two grasses following alterations in moisture inputs in a southern mixed grass prairie. *Appl. Soil Ecol.* 60: 56-60.
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55: 158-161.
- Pringle A, Bever, JD (2002) Divergent phenologies may facilitate the coexistence of arbuscular mycorrhizal fungi in North Carolina grassland. *Am. J. Bot.* 89: 1439-1446.
- Quilambo OA (2003) The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Afr. J. Biotechnol.* 2: 539-546.
- Rovirosa, M., Cuatlahuac, A., & Rovirosa, F. (2013). Prospección dasométrica de la familia Cyatheaceae en restauración en Cuetzalan, Puebla. *Rev. Mex. Cs. Forest.* 4(20): 32-49.
- Schenck NC, Pérez Y (1990) *Manual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi*. 3ª ed. Synergistic. Gainesville, FL, EEUU. 286 pp.
- Schmitt JL, Windisch PG (2012) Caudex growth and phenology of *Cyathea atrovirens* (Langsd. & Fisch.) Domin (Cyatheaceae) in secondary forest, southern Brazil. *Braz. J. Biol.*, 72: 397-405.
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. 3ª ed. Academic Press. Londres, RU. pp. 11-145
- Turnau K, Anielska T, Jurkiewicz A (2005) Mycohallic/mycorrhizal symbiosis of chlorophyllous gametophytes and sporophytes of a fern, *Pellaea viridis* (Forsk.) Prantl (Pellaeaceae, Pteridales). *Mycorrhiza* 15: 121-128
- Wolf PG, Schneider H, Ranker TA (2001) Geographic distributions of homosporous ferns: does dispersal obscure evidence of vicariance? *J. Biogeogr.* 28: 263-270.
- Zhao ZW (2000) Study on the relationships between vesicular arbuscular mycorrhiza and the systematic evolution of Pteridophyte. *Acta Bot. Yunnan.* 22: 401-404.