

VIABILIDAD DE PROPÁGULOS MICORRIZÓGENOS-ARBUSCULARES EN PLANTACIONES DE CAFÉ (*Coffea arabica*) PERTURBADOS POR LA EROSIÓN

VIABILITY OF ARBUSCULAR-MYCORRHIZAL FUNGI PROPAGULES IN COFFEE (*Coffea arabica*) PLANTATIONS DISTURBED BY EROSION

Lara-Capistrán, L.¹; Gómez-Merino, F.C.²; Hernández-Montiel, L.G.³; Reyes-Pérez, J.J.^{4,5}; Zulueta-Rodríguez, R.^{1*}

¹Universidad Veracruzana Campus Xalapa. Facultad de Ciencias Agrícolas. Circuito Universitario Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria. Xalapa, Veracruz, México. C. P. 91090. ²Colegio de Postgraduados Campus Córdoba. Carretera Federal Córdoba-Veracruz km 348. Manuel León, Amatlán de los Reyes, Veracruz, México. C. P. 94946. ³Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Av. Instituto Politécnico Nacional No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur. La Paz, BCS, México. C. P. 23096. ⁴Universidad Técnica de Cotopaxi. Extensión La Maná. Av. Los Almendros y Pujilí, Edificio Universitario. La Maná, Ecuador. ⁵Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Av. Walter Andrade km 1.5 Vía a Santo Domingo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

*Autor para correspondencia: rzulueta36@hotmail.com

RESUMEN

En estudios agroecológicos es importante conocer la viabilidad de los hongos formadores de micorriza arbuscular (HMA), ya que estos se ven afectados por el manejo del cultivo. Esta información permite inferir su capacidad para establecer la simbiosis y el tiempo que perdura la colonización micorrizógena arbuscular. Por tal motivo, se evaluó la viabilidad de propágulos infectivos de los HMA en ocho agroecosistemas cafetaleros con diferentes grados de erosión del suelo (EroC1, EroC2, EroC3, SevEroC1, SevEroC2, SevEroC3, MinEroC y NoEroC). La colonización viable más alta se presentó en los agroecosistemas no erosionados (MinEroC y NoEroC) y los valores más bajos se encontraron en los agroecosistemas altamente erosionados (SevEroC1 21%, SevEroC2 30% y SevEroC3 30%), sin observarse colonización arbuscular. Por otro lado, el número de esporas viables fue notable en estos agroecosistemas (26 en SevEroC1, 24 en SevEroC2 y 247 en SevEroC3). El mayor porcentaje de micelio viable se encontró en los agroecosistemas no erosionados (MinEroC 19% y NoEroC 35%), en comparación con los agroecosistemas altamente erosionados (SevEroC1 2.2%, SevEroC2 4.1% y SevEroC3 6.5%). Los resultados obtenidos muestran que la erosión del suelo afecta a la viabilidad de los propágulos infectivos de HMA en los agroecosistemas cafetaleros evaluados.

Palabras clave: *Coffea arabica*, succinato deshidrogenasa, esporas, micelio extra-radical.

Agroproductividad: Vol. 11, Núm. 4, abril. 2018. pp: 42-47.

Recibido: diciembre, 2017. **Aceptado:** abril, 2018.

ABSTRACT

In agroecological research it is important to determine the viability of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), since these are affected by crop management. Thus, this information allows us to infer their ability to form symbiotic associations and the time that AMF colonization lasts. The present study was aimed at comparing the viability of AMF propagules in eight coffee agroecosystems with different degrees of soil erosion (EroC1, EroC2, EroC3, SevEroC1, SevEroC2, SevEroC3, MinEroC and NoEroC). The highest viable colonization was found in non-eroded agroecosystems (MinEroC and NoEroC) and the lowest values were seen in highly eroded agroecosystems (SevEroC1 21%, SevEroC2 30% and SevEroC3 30%), without showing arbuscular colonization. On the other hand, the number of viable spores was remarkable in these agroecosystems (26 in SevEroC1, 24 in SevEroC2 and 247 in SevEroC3). The highest percentage of viable mycelium was found in non-eroded agroecosystems (MinEroC 19% and NoEroC 35%), compared to highly eroded agroecosystems (SevEroC1 2.2%, SevEroC2 4.1% and SevEroC3 6.5%). The results of the study show that soil erosion affects the viability of AMF propagules in the coffee agroecosystems evaluated.

Key words: *Coffea arabica*, succinate dehydrogenase, spores, extraradical mycelium.

da, se ha reconocido el dominio de plantas ruderales (predominantemente no micotróficas) (Villegas y Cifuentes, 2004) que estimulan la producción de propágulos en las primeras etapas sucesionales y, por lo tanto, su reemplazo progresivo es clave para cimentar los patrones de reaparición de especies micotróficas en el tiempo y en el espacio (Davey *et al.*, 2015).

Es por ello que el estudio de las capacidades metabólicas de estos simbioses y sobre todo la viabilidad de sus propágulos en terrenos degradados que estimulan el incremento en las cosechas demandadas por la humanidad sigue siendo impostergable, en virtud de que la información obtenida será de gran valor para que estos microorganismos sean utilizados en la reversión del deterioro que el hombre ha inferido a los atributos edáficos naturales e indicadores de la calidad del suelo (Asmelash *et al.*, 2016), el cual es un tema central de las actuales políticas ambientales en todo el mundo. De ahí que el objetivo del presente estudio fuera evaluar la viabilidad de propágulos infectivos de los HMA en agroecosistemas cafetaleros perturbados por la erosión del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Los sitios de estudio se ubicaron en un área de 81000 m² en Teocelo, Veracruz, México (19° 24' latitud norte, 96° 58' longitud oeste, 1160 msnm). El clima general es templado húmedo, con precipitación entre 1500 y 2000 mm año⁻¹, y temperatura promedio anual de 18-20 °C (Medina y Soto, 1991). Los suelos predominantes se clasificaron como Acrisol órticos (INEGI, 1993), caracterizados por su fertilidad va-

INTRODUCCIÓN

En México, el arreglo espacial y tipológico de los agroecosistemas cafetaleros (o pluricultivos) es muy variado (Vázquez *et al.*, 1992), y ello no solo tiene un alto valor estético-paisajístico o cultural (Ruelas-Monjardín *et al.*, 2014), sino que discrepa con los monocultivos comerciales (o agrosistemas) establecidos a pleno sol pues en estos sistemas de producción la degradación del ambiente no solo conlleva a la erosión y contaminación del suelo por residuos tóxicos que se depositan en las fincas (DaMatta y Rena, 2002), sino que el manejo puede afectar la actividad biológica y la calidad del fruto; así como la biodiversidad de la flora y fauna, la provisión de productos comestibles y el suministro de leña (Faminow y Ariza, 2001).

En cuanto a la intensificación de las prácticas culturales para elevar la productividad de un cultivo y su efecto sobre la biota edáfica se refiere, la opinión generalizada es que casi todas ellas perturban el balance ecológico y alteran la habitual interacción existente entre las plantas y los hongos micorrizógenos arbusculares, sobre todo porque el uso desmedido de agroquímicos y métodos físico-mecánicos para el control de arvenses reducen la actividad microbiana en general, y la de los HMA en particular, e influyen en la cinética de procesos que ocurren en el suelo (Carreón-Abud *et al.*, 2016), entre los cuales se restringen las opciones para establecer simbiosis con plantas hospederas herbáceas, arbustivas y arbóreas (Rodríguez-Morelos *et al.*, 2011). Aunque los ecosistemas más tolerantes a la perturbación del suelo son aquellos donde el número de propágulos micorrizógenos es alto (esporas, raíces colonizadas y redes hifales) (McGonigle y Miller, 2000), en hábitats alterados, contaminados o muy erosionados, donde la presencia de HMA es reduci-



riable y disponibilidad de nitrógeno, fósforo y potasio a menudo se reducen de acuerdo con la pendiente y profundidad (INEGI/ORSTOM, 1991).

Características de los sitios de muestreo

En total se tomaron muestras de ocho plantaciones de café con diferentes grados de erosión y en ese momento a 16 años de haberse establecido. Las plantaciones de café de los sitios EroC1, EroC2 y EroC3 presentaban erosión moderada, un estrato vegetativo formado por hierbas en laderas empinadas ($\geq 85\%$) y un programa de rejuvenecimiento de las plantas. Con regularidad se efectúan tres aplicaciones de herbicida (glifosato, N-fosfonometilglicina, $C_3H_8NO_5P$, CAS 1071-83-6) y fertilizante (triple 17, 17N-17P-17K) al año. Los sitios SevEroC1, SevEroC2 y SevEroC3 estaban altamente erosionados, sin estrato herbáceo o incluso suelo desnudo; pendientes elevadas ($\geq 85\%$) y también se concretan programas para el rejuvenecimiento de la finca. Se realizan tres aplicaciones de herbicida (glifosato) y fertilizante (por lo general $CaCO_3$ y triple 17) al año. En el sitio MinEroC el grado de erosión era mínimo, con pendiente muy suave (2-4%), sin aplicación de plaguicidas, pero contaba con deshierbe manual y fertilización (con triple 17) tres veces por año. Finalmente, el sitio NoEroC exhibía una cobertura densa y continua de vegetación herbácea, con pendiente muy suave (2-4%) y sin erosión evidente. Tampoco se aplican plaguicidas, y la fertilización básica se efectúa a mano con triple 17, $CaCO_3$ y 20N-10P-10K tres veces al año.

Muestreo

El muestreo se realizó en la época de lluvias, durante los meses de septiembre-octubre de 2015. Se tomó 1 L de suelo.planta⁻¹ a 1 m de distancia de la orilla de las parcelas para evitar el efecto del borde, y raíces de 20 plantas (distanciadas ca. 5 m entre sí) que se fijaron en el campo en FAA (formol, ácido acético y alcohol) para su procesamiento en el laboratorio.

Colonización micorrizógena viable

Con el fin de prevenir errores en la determinación de la viabilidad de los propágulos micorrizógenos-arbusculares, las raíces fueron procesadas el mismo día de su colecta. Se utilizó la técnica de Kough *et al.* (1987), modificada por Schaffer y Peterson (1993) y Brundrett *et al.* (1994), y se observaron al microscopio compuesto para detectar estructuras intra-radicales fúngicas viables y no viables. El porcentaje de longitud de raíz colonizada por HMA se cuantificó por el método de McGonigle *et al.*

(1990). A la proporción de estructuras fúngicas metabólicamente activas por la estimación visual de depósitos de formazán azul púrpura, que denotan viabilidad, se le aplicaron los mismos criterios de clasificación.

Cuantificación de esporas viables

Las esporas fueron separadas de las sub-muestras de suelo (50 g) obtenidas en cada uno de los agroecosistemas por el método de tamizado húmedo y decantación (Gerdemann y Nicolson, 1963), complementado con la flotación en sacarosa (Walker, 1997) y, para comprobar la viabilidad de las esporas, se recurrió a la técnica de Walley y Germida (1995).

Extracción, tinción y cuantificación de micelio externo viable

La extracción, tinción y cuantificación de micelio externo viable se realizó de acuerdo con la técnica de Melloni y Cardoso (1999a, b), en combinación con las de Kough *et al.* (1987) y Saito *et al.* (1993) citadas por Tawarayama *et al.* (1994). La longitud de micelio viable se cuantificó mediante la fórmula $H=11/14 \times N \times \text{Unidad de gradiente de Tennant}$ (1975).

Análisis estadístico

Se tuvieron ocho tratamientos con cuatro repeticiones en un diseño de bloques al azar, y los resultados obtenidos se analizaron con el software SAS (versión 6.12) para Windows, y la diferencia entre las medias se comparó mediante la prueba HSD de Tukey con un nivel de significación del 5% ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre la colonización micorrizógena viable cuantificada en los agroecosistemas cafetaleros que presentaban cobertura vegetal y sin erosión (NoEroC), así como los más altos porcentajes de viabilidad en las estructuras intra-radicales del hongo (hifas 10.2%, arbusculos 1% y vesículas 1%) (Cuadro 1). En cambio, en los sitios más perturbados (SevEroC1, SevEroC2 y SevEroC3) los porcentajes de viabilidad fueron prácticamente nulos. Sin embargo, en los sitios donde la cobertura vegetal y la erosión eran evidentes (EroC1, EroC2 y EroC3) la viabilidad de las vesículas e hifas intra-radicales era baja (1% y 1 a 1.5%, respectivamente). En relación al agroecosistema que presentaba mínima erosión, sin pendiente y sin cobertura vegetal (MinEroC) los porcentajes fueron de 9.8% para hifas intra-radicales, 2% para vesículas y 0% para arbusculos. Con base en lo

denotado, las diferentes fuentes de propágulos evaluados evidenciaron una baja viabilidad debido tal vez a que las especies vegetales predominantes son perennes (los cafetos) y no anuales (arvenses).

Al respecto, Abdel y Fattah (2001) refieren que los niveles de colonización más altos ocurren en plantas jóvenes, o bien en cierta etapa fenológica y edad de la hospedera. Además, mencionan que los arbuscúlos jóvenes e intercelulares son viables, mientras no se forme un septo en la hifa (Camarena-Gutiérrez, 2012), en contraste con los arbuscúlos colapsados y metabólicamente inactivos, con una vida efímera en la madurez de dos a cuatro días (Kobae y Hata, 2010).

En este caso se recurrió a la visualización histoquímica de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) para detectar la presencia y absorción de P en las estructuras fúngicas metabólicamente activas mediante tinción con Azul nitro-tetrazolio cloruro (NBT) (MacDonald y Lewis, 1978) (Figura 1). Para la viabilidad de esporas de hongos MA el análisis estadístico mostró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre los agroecosistemas muestreados (Cuadro 1).

De acuerdo a los datos en el Cuadro 1, la mayor viabilidad la presentan las esporas en los agroecosistemas más perturbados (SevEroC1, SevEroC2 y SevEroC3). Además, se aprecia que en estos se registraron los porcentajes más altos de viabilidad de las esporas fúngicas, en comparación a los valores apreciados en los sitios menos perturbados por la erosión (MinEroC, 2.33% y NoEroC, 3.0%).

En cuanto a los agroecosistemas EroC1, EroC2 y EroC3 se obtuvieron porcentajes de 11, 8.3 y 16.3%, respectivamente, de tal manera que al parecer la erosión del suelo no afecta la viabilidad de los propágulos de *Gigaspora gigantea*, los cuales presentaron una mayor viabilidad en comparación con las esporas presentes en los sitios no erosionados.

An y Hendrix (1988) establecen que la viabilidad de esporas en la superficie del suelo oscila entre 35 y 60% de-

pendiendo del tratamiento, la estación climática o la especie micorrizógena. En dicho contexto, Meier y Charvat (1993) constataron ese rango porcentual para *Glomus* spp., y reportan un 50% en la viabilidad del cultivo fresco y almacenado de *Glomus mosseae*. Por su parte, Cuenca y Lovera (1992) comprobaron que este tipo de estructuras de resistencia presentes en sitios perturbados de La Gran Sabana, en Venezuela, pueden presentar hasta un 60% de aptitud colonizadora. Si bien las comunidades de HMA difieren en cuanto a las estrategias de propagación y los principales propágulos que forman (Varela-Cervero et al., 2015), en algunos miembros de Glomeraceae se ha constatado que el micelio intra y extra-radical tiene ventaja sobre especies de Acauloporaceae y Gigasporaceae (Schalamuk y Cabello, 2010).

La presencia y alcances provenientes de las esporas pudiere ser trascendental en la colonización radicular de sus hospederas. Aunque en ocasiones las estructuras de resistencia consiguen germinar, no logran establecer una simbiosis mutualista (Walley y Gemida, 1995), o al estar parasitadas no ser viables (Trinidad-Cruz et al., 2017). Esta pudiera ser la razón del por qué los bajos porcentajes de viabilidad se presentaron en los sitios no erosionados.

Las esporas pueden persistir en el suelo por varios años sin disminuir su viabilidad, mas durante la primavera y el verano la incidencia de luz, temperatura y agua no son factores

limitantes de la actividad fisiológica y fotosintética en las plantas hospederas (Zangaro et al., 2013) y, en consecuencia, el dinamismo simbiótico mutualista tiende a sincronizarse con sus proveedores de carbohidratos, como fuente de energía (Schmidt et al., 2011).

En la viabilidad del micelio micorrizógeno, el análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre los agroecosistemas muestreados (Cuadro 1), siendo en el sitio NoEroC donde se confirmaron los porcentajes más altos (35%), en comparación a lo ponderado en los parajes más erosionados (EroC1, EroC3, SevEroC1, SevEroC2 y SevEroC3) con valores fluctuantes entre 2.5 y 6.5%. Dichas evidencias

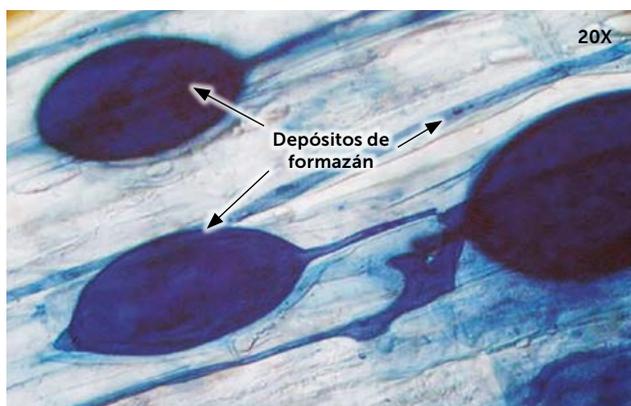


Figura 1. Viabilidad de vesículas en raíces de café de un agroecosistema no erosionado (NoEroC).

Cuadro 1. Viabilidad de propágulos micorrizógenos provenientes de agroecosistemas cafetaleros de Teocelo, Veracruz, México.

Sitios de muestreo	Porcentajes de colonización				Viabilidad de esporas ^Y	Porcentaje de viabilidad del micelio extra-radical
	Colonización total	Hifas	Vesículas	Arbúsculos		
EroC1	41.885b	41.885ab	7.705cb	2.283b	6.50 b	5.3c
EroC2	27.472cb	27.472bc	12.288b	0.0b	10.50 b	9.2 bc
EroC3	35.475cb	35.475bc	12.893b	0.525b	11.50 b	7.1c
SevEroC1	21.250c	21.250c	0.0d	0.0b	26 b	2.5c
SevEroC2	30.095cb	30.095bc	1.487cd	0.0b	24 b	4.1c
SevEroC3	30.675cb	30.675bc	0.625cd	0.0b	247.25 a	6.5 c
MinEroC	33.843cb	33.843bc	11.303b	0.05b	11.00 b	19.5b
NoEroC	64.912a	59.188a	25.817a	11.60a	11.25 b	35a

^YLetras iguales en la misma columna indican igualdad estadística (Tukey $P \leq 0.05$).

permiten inferir que en los agroecosistemas más conservados se carece de manejo agronómico tecnificado y por consiguiente no se presenta arrastre de partículas estructurales o texturales (o ambas) por escorrentía, a diferencia de los sistemas agroproductivos donde la degradación de las propiedades físicas, químicas y biológica del suelo es considerable (Onipchenko y Zobel, 2000).

Los resultados obtenidos concuerdan con los de Kabir *et al.* (1997) quienes manifiestan que el total de la densidad hifal metabólicamente activa está en función del disturbio del suelo y, cuando éste incrementa, la viabilidad de la hifa disminuye.

El cuanto al porcentaje de viabilidad se refiere, la mayor proporción se presentó en los sitios no erosionados, lo cual pudiera deberse a que la cantidad de micelio intra y extra-matrical se incrementa durante la estación lluviosa, y ello concuerda con Palma *et al.* (2000) al demostrar que las lluvias favorecen su incremento en sitios no erosionados. Lo denotado no ocurrió en los agroecosistemas altamente erosionados, ya que éstos se encontraban desprovistos de vegetación y además con una pendiente tan pronunciada que, al no tener protección, la pérdida del micelio seguramente es alta.

CONCLUSIONES

La viabilidad de los propágulos micorrizógenos en los agroecosistemas altamente erosionados fue alta en las esporas, mas no concordó con el porcentaje de colonización y viabilidad de micelio, pues éstos si se vieron afectados por la erosión del suelo. Por tal motivo, en estudios agroecológicos se considera de suma importancia tomar en cuenta la viabilidad

de los HMA para estimar la proporción de estructuras fúngicas metabólicamente activas dentro y fuera del sistema radical de su planta hospedera.

LITERATURA CITADA

- Abdel-Fattah G.M. 2001. Measurement of the viability of arbuscular-mycorrhizal fungi using three different strains; relation to growth and metabolic activities of soybean plants. *Microbiol. Res.* 156, 359-367.
- An Z.Q., Hendrix J.W. 1988. Determining viability of endogonaceous spores with a vital stain. *Mycologia* 80: 259-261.
- Brundrett M., Melville L., Peterson, L. (eds.). 1994. Practical methods in mycorrhiza research. Mycologue Publications, Canada. 161 p.
- Camarena-Gutiérrez G. 2012. Interacción planta-hongos micorrizicos arbusculares. *Rev. Chapingo Ser. Cien. Forest. Amb.* 18: 409-421.
- Carreón-Abud Y., Gómez-Dorantes N., Beltrán-Nambo M.A., Alvarado-Herrejón M. y Varela-Fregoso L. 2016. Diversidad de hongos micorrizicos arbusculares provenientes de la rizósfera de aguacate (*Persea americana* Mill.) y selección de plantas trampa para su propagación. *Biológicas* 18: 1-9.
- Cuenca G., Lovera M. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in disturbed and revegetated sites from La Gran Sabana, Venezuela. *Can. J. Bot.* 70: 73-79.
- DaMatta F.M., Rena A.B. 2002. Ecofisiología de cafezais sombreados e a pleno sol. En: Zambolim L. (ed). O estado da arte de tecnologias na produção de café (pp. 93-135). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Davey M., Blaalis R., Vik U., Carlsen T. Kauserud H., Eidesen P.B. 2015. Primary succession of *Bistorta vivipara* (L.) Delabre (Polygonaceae) root-associated fungi mirrors plant succession in two glacial chronosequences. *Environ. Microbiol.* 17: 2777-2790.
- Faminow M.D., Ariza R.E. 2001. Biodiversity of flora and fauna in shaded coffee systems. International Centre for Research in Agroforestry. Report prepared for the Commission for Environmental Cooperation. 36 p.
- Gerdemann J.W., Nicolson T.H. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transac. Brit. Mycol. Soc.* 46: 235-244.

- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 1993. Carta edafológica Veracruz E14-3, escala 1:250,000. INEGI, México.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) / ORSTOM (Instituto Francés de Investigación Científica para el Desarrollo en Cooperación). 1991. Cuaderno de información básica región Cofre de Perote. INEGI, México.
- Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi, S. 1987. Depressed metabolic activity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide applications. *New Phytol.* 106: 707-715.
- Medina A.M.E., Soto E. M. 1991. Atlas climático de los municipios de Teocelo y Cosautlán de Carvajal (Estado de Veracruz). Instituto de Ecología, México. 51 p.
- Kabir Z., O'Halloran I.P., Hamel C. 1997. Overwinter survival of arbuscular mycorrhizal hyphae is favored by attachment to roots but diminished by disturbance. *Mycorrhiza* 7: 197-200.
- Kobae Y., Hata S. 2010. Dynamics of periarbuscular membranes visualized with a fluorescent phosphate transporter in arbuscular mycorrhizal roots of rice. *Plant Cell Physiol.* 51: 341-353.
- MacDonald R.M., Lewis M. 1978. The occurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytol.* 80: 135-141.
- 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 Phytol.* 115: 495-501.
- McGonigle T.P., Miller M.H. 2000. The inconsistent effect of soil disturbance on colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi: A test of the inoculum density hypothesis. *Appl. Soil Ecol.* 14: 147-155.
- Meier R, Charvat I. 1993. Reassessment of tetrazolium bromide as a viability stain for spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Am. J. Bot.* 80: 1007-1015.
- Melloni R., Cardoso E.J.B.N. 1999a. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas e endófitos. I. Método empregado. *Rev. Bras. Ciên. Solo* 23: 53-58.
- Melloni R., Cardoso E.J.B.N. 1999b. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. II. Comparação entre diferentes espécies cítricas e endófitos. *Rev. Bras. Ciên. Solo* 23: 59-67.
- Onipchenko V.G., Zobel, M. 2000. Mycorrhiza, vegetative mobility and response to disturbance of alpine plants in the Northwestern Caucasus. *Folia Geobot.* 35:1-11.
- Palma R.M., Arrigo N.M., Saubidet M.I., Conti M.E. 2000. Chemical and biochemical properties as potential indicators of disturbances. *Biol. Fert. Soils* 32: 381-384.
- Rodríguez-Morelos V.H., Soto-Estrada A., Pérez-Moreno J., Negreros-Castillo P. 2011. Los hongos micorrízicos arbusculares y su implicación en la producción y manejo de especies neotropicales forestales, con énfasis en meliáceas. *Interciencia* 36: 564-569.
- Ruelas-Monjardín L.C., Nava-Tablada M.E., Cervantes J., Barradas V.L. 2014. Importancia ambiental de los agroecosistemas bajo sombra en la zona central montañosa del estado de Veracruz, México. *Madera y Bosques* 20: 27-40.
- Schaffer G.F., Peterson, L.R. 1993. Modifications to clearing methods used in combination with vital staining of roots colonized with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 4: 29-35.
- Schalamuk S., Cabello M. 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal propagules from tillage and no-tillage systems: Possible effects on Glomeromycota diversity. *Mycologia* 102: 261-268.
- Schmidt B., Gaşpar S., Carmen D., Ciobanu I., Sumălan R. 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi in terms of symbiosis-parasitism continuum. *Com. Agr. Appl. Biol. Sci.* 76: 653-659.
- Tawaraya K., Saito M., Morioka M., Wagatsuma T. 1994. Effect of phosphate application to arbuscular mycorrhizal onion on the development and succinate dehydrogenase activity of internal hyphae. *Soil Sci. Plant Nutr.* 40: 667-674.
- Trinidad-Cruz J.R., Quiñones-Aguilar E.E., Hernández-Cuevas L.V., López-Pérez L., Rincón-Enríquez G. 2017. Hongos micorrízicos arbusculares asociados a la rizosfera de *Agave cupreata* en regiones mezcaleras del estado de Michoacán, México. *Sci. Fung.* 45: 13-25.
- Vázquez T. V., Zulueta R. R., Báez T. C. 1992. Descripción tipológica del cultivo del café en el centro de Veracruz. *La Ciencia y el Hombre* 10: 139-161.
- Varela-Cervero S., Vasar M., Davison J., Barea J.M., Öpik M., Azcón-Aguilar C. 2015. The composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities differs among the roots, spores and extraradical mycelia associated with five Mediterranean plant species. *Environ. Microbiol.* 17: 2882-2895.
- Villegas R. M., Cifuentes J. 2004. Las micorrizas en la evolución de las plantas. *Ciencias* 73: 30-36.
- Walker, C. 1997. Spore extraction by centrifugation-sugar flotation. Internal Document, Biological Research and Imaging Laboratory, Hampshire, UK.
- Walley F.L., Germida J.J. 1995. Estimating the viability of vesicular-arbuscular mycorrhizae fungal spores using tetrazolium salts as vital stains. *Mycologia* 87: 273-279.
- Zangaro W., Rostirola L.V., de Souza P.B., Alves R.A., Lescano L.E.A.M., Rondina A.B.L., Nogueira M.A., Carrenho R. 2013. Root colonization and spore abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in distinct successional stages from an Atlantic rainforest biome in southern Brazil. *Mycorrhiza* 23: 221-233.