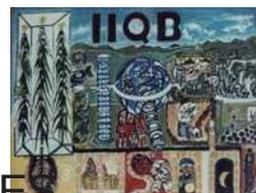




UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN

NICOLAS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

“EFECTO DE LA INTERACCIÓN *Alnus-Glomus-Pisolithus*; *Fraxinus-Glomus-Pisolithus* EN EL CRECIMIENTO DE LA PLANTA Y FORMACIÓN DE AGREGADOS DEL SUELO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

JORGE ENRIQUE AMBRIZ PARRA

TUTOR:

D.C. HECTOR JAVIER ANSELMO VILLEGAS MORENO

SEPTIEMBRE 2007

AGRADECIMIENTOS:

A LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO (UMSNH)

AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS (IIQB)

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT)

AL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES
(IIAF)

A LA CORDINACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE LA UMSNH

ÍNDICE	Página
i.- RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ii.- INTRODUCCIÓN	3
iii.- ANTECEDENTES	9
1.- Hongos micorrízicos arbusculares	9
1.1.- Clasificación	9
1.2.- Hospederos	10
1.3.- Proceso de colonización	10
1.4.- El micelio externo	12
1.5.- Adquisición de nutrimentos	13
1.6.- Metabolismo de carbono	15
2.- Hongos ectomicorrízicos	17
2.1.- Clasificación	17
2.2.- Hospederos	18
2.3.- Proceso de colonización	19
2.4.- El micelio externo	21
2.5.- Adquisición de nutrimentos	22
2.6.- Metabolismo de carbono	26
3.- El género <i>Alnus</i>	27
4.- El género <i>Fraxinus</i>	29
5.- La agregación del suelo	32
5.1.- Formación de los agregados del suelo	32
5.2.- Factores promotores de la formación de agregados de suelo	34
5.2.1.- Raíces de las plantas	34
5.2.2.- La materia orgánica	34
5.2.3.- Microorganismos del suelo	36
5.2.4.- Los agentes inorgánicos	37
5.2.5.- Variables medioambientales	37
iv.- HIPÓTESIS	39
v.- OBJETIVOS	39
vi.- RESULTADOS	

CAPÍTULO I. LA SIMBIOSIS *Fraxinus-Glomus-Pisolithus*. EFECTO EN EL

CRECIMIENTO DE LA PLANTA Y FORMACIÓN DE AGREGADOS DEL SUELO

1.- RESUMEN	40
1.1.- ABSTRACT	41
2.- INTRODUCCIÓN	42
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	44
4.- RESULTADOS	46
5.- DISCUSIÓN	48
6.- CONCLUSIONES	50
7.- LITERATURA CITADA	51

CAPÍTULO II. EFECTO DE LA INTERACCIÓN *Alnus*-Ectomicorriza- Endomicorriza SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA PLANTA Y FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE AGREGADOS DEL SUELO

1.- RESUMEN	55
1.1.- ABSTRACT	56
2.- INTRODUCCIÓN	57
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	59
4.- RESULTADOS	60
5.- DISCUSIÓN	63
6.- CONCLUSIONES	66
7.- LITERATURA CITADA	67
vii.- DISCUSIÓN	72
viii.- CONCLUSIONES	75
ix.- LITERATURA CITADA	76

RESUMEN

Existen estudios que muestran que los hongos endo y ectomicorrízicos promueven el crecimiento de su planta hospedera. Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto de estos hongos aplicados de forma individual y en interacción dual en plantas de fresno (*Fraxinus* sp.) y aile (*Alnus* sp.). El presente ensayo se estableció en cámara de crecimiento con la finalidad de observar el efecto de *Glomus intraradices* y *Pisolithus tinctorius*, inoculados de manera individual y en coinoculación, en el peso fresco y seco de la parte aérea, peso fresco y seco de la raíz y la formación de agregados del suelo tanto de aile como de fresno. El experimento contó con 8 tratamientos los cuales fueron: *Alnus* y *Fraxinus* sin la adición de hongos micorrízicos; inoculados con *G. intraradices*; inoculados con *P. tinctorius* e inoculados con *G. intraradices*-*P. tinctorius*. *P. tinctorius* inoculado de forma individual incrementó las variables de crecimiento en fresno, pero sólo fue significativo el incremento en el peso fresco y seco de la raíz en comparación al tratamiento no inoculado, mientras que cuando se inoculó *P. tinctorius* en plantas de aile se pudo observar un incremento significativo en comparación al tratamiento no inoculado en todas las variables de crecimiento evaluadas y en la formación de macroagregados de suelo. En el tratamiento donde se inoculó *G. intraradices* en las plantas de fresno se observaron incrementos significativos en comparación al tratamiento no inoculado en todas las variables de crecimiento evaluadas y en la formación de microagregados de suelo. En el caso del tratamiento con las plantas de aile inoculadas con *G. intraradices* de forma individual, se observó un incremento en las variables de crecimiento, pero sólo fue significativo el incremento en el área foliar en comparación al tratamiento no inoculado. Por otra parte la interacción dual presentó un efecto significativo en todas las variables de crecimiento evaluadas en comparación al tratamiento no inoculado en ambas especies de hospedero. El carbono total de suelo presentó un aumento significativo en el tratamiento dual con las plantas de fresno y un decremento con las plantas de aile, ambos casos en comparación al tratamiento no inoculado. Estos resultados sugieren que tanto *Fraxinus* como *Alnus* pueden establecer una simbiosis con hongos ecto y endomicorrízicos y que la interacción dual favorece en mayor medida la distribución de carbono asimilado hacia la planta y en menor medida al suelo en ambos experimentos.

ABSTRACT

Studies show that the endomycorrhizal and ectomycorrhizal fungi may influence plant growth, but the knowledge about their effect when applied individually and in dual interaction on *Fraxinus* seedlings and *Alnus* seedlings is little. In this study, the experimental units were established in growth chamber to observe the effect of *Glomus intraradices* and *Pisolithus tinctorius*, inoculated individually or in interaction, on the plant growth, water stable soil aggregates formation, and soil total carbon as much in *Fraxinus* seedlings as in *Alnus* seedlings. *P. tinctorius* individually inoculated in *Fraxinus* seedlings increased significant on roots dry weight, as compared with the non inoculated treatment, while *P. tinctorius* inoculated in *Alnus* seedlings increased significant on root and shoot dry weight, leaf area, and water stable macroaggregates, as compared with the non inoculated treatment. *G. intraradices* individually inoculated in *Fraxinus* seedlings increased significant on roots and shoot dry weight, leaf area, and water stable microaggregates, as compared with the non inoculated treatment, while the single fungi inoculated in *Alnus* seedlings increased significant leaf area, as compared with the non inoculated treatment. The dual inoculation *Glomus intraradices*-*Pisolithus tinctorius* markedly stimulated growth in *Alnus* and *Fraxinus* seedling. At the dual interaction in *Alnus* seedlings, reduction in soil total carbon was observed. Whereas with the dual interaction in *Fraxinus* seedlings, an increase in soil total carbon was observed. Our results show that dual interaction produced the most beneficial effect on plant growth, but it did not produce beneficial effect on water stable aggregates and soil total carbon.

INTRODUCCIÓN

Los recursos naturales son un factor de desarrollo económico y social de un país, por lo que su mantenimiento es verdaderamente trascendente. A pesar de ello, la tasa de deforestación en México se va incrementando continuamente, aunque en los datos oficiales se mencione que últimamente ha disminuido. La pérdida de biomasa vegetal legal o ilegal, oscila entre las 260 000 ha en un periodo de 5 años según la Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. La consecuencia inevitable por dicha acción es la pérdida paulatina de las capas superficiales de suelo y con ello la incapacidad del mismo para sustentar vida vegetal. Este tipo de actividad antropogénica es el principal factor que provoca la pérdida de suelo, pero generalmente se actúa hasta que se advierte una situación casi irreversible. En este sentido se debe adquirir conocimiento sobre especies que puedan contribuir a mantener las condiciones adecuadas para la revegetación de los sitios en aprovechamiento forestal.

Las plantas que habitan sitios perturbados se les denomina “especies de sucesión temprana”. En los bosques de pino y bosques de pino-encino que han sido talados se puede encontrar plantas de aile (*Alnus*) que ingresan como especies de sucesión temprana. Este tipo de plantas han sido estudiadas en cuanto a su participación en la asimilación de nitrógeno atmosférico y su siguiente incorporación de dicho nitrógeno al suelo mediante la descomposición del mantillo rico en nitrógeno. Se han estimado aportes de nitrógeno de aile del orden de 54 a 85 kg/ha/año en un bosque mixto de pino-aile (Binkley *et al.* 1992) y de 130 kg/ha/año en un sistema de invernadero (Binkley 1981). Sin embargo, escaso conocimiento se tiene en relación a la posible influencia del aile en la formación de agregados del suelo y carbono total.

El género *Alnus* agrupa 25 especies y algunas de estas contienen varias subespecies. Las especies de aile que se pueden encontrar en México son *Alnus acuminata*, *A. jorullensis* y *A. firmifolia*. Las especies que integran este género son consideradas de rápido crecimiento, presentan resistencia a la sequía (Percival *et al.* 1998) y pueden desarrollarse en zonas perturbadas. Los hongos ectomicorrízicos que han sido observados en raíces de plantas de aile son

diversos (Molina 1981, Ekblad *et al.* 1995, Pritsch *et al.* 1997, Massicotte *et al.* 1999, Baar *et al.* 2002, Becerra *et al.* 2002, Nouhra *et al.* 2003, Yamanaka *et al.* 2003).

El género *Pisolithus* también se ha encontrado en raíces de aile, aunque con un bajo desarrollo en la colonización (Godbout y Fotin 1983, Murphy y Miller 1994). Este hongo se puede encontrar en un amplio rango de ambientes, incluyendo bosques y zonas erosionadas con poca disponibilidad de agua y de materia orgánica (Castellano y Trappe 1991). La habilidad de *P. tinctorius* para persistir en zonas bajo condiciones adversas podría estar en función de su baja competitividad con otros hongos ectomicorrízicos (Cairney y Chambers 1997). En sitios reforestados se ha encontrado *P. tinctorius*, lo cual indica que se puede considerar a este hongo como una especie de colonización temprana (Gardner y Malajczuk 1988).

La respuesta en el crecimiento de las plantas debida a la presencia de *P. tinctorius* ha sido atribuída aun mayor contenido de fósforo (Thomson *et al.* 1994) y nitrógeno (Wullschleger y Reid 1990). Tanto en angiospermas como en gimnospermas ha sido ampliamente documentada la influencia de *P. tinctorius* en el crecimiento de las plantas, especialmente plantas de eucaliptos y de pinos. Sin embargo, hasta la fecha existen pocos trabajos que valoren el efecto de la interacción *Alnus-P. tinctorius* sobre el crecimiento de la planta. También es reducido el conocimiento sobre el posible efecto de dicha interacción en la formación de agregados de suelo. Esta interacción podría ser importante si se considera que ambos organismos tienen en común la denominación de colonizadores en la etapa temprana en sitios perturbados.

En el caso de hongos endomicorrízicos que han sido observados formando una simbiosis mutualista con plantas de *Alnus* son *Glomus fasciculatum* (Fraga-Beddiar y Le-Tacon 1990, Isopi *et al.* 1994); *Glomus mosseae* (Jha *et al.* 1993) y *Glomus intraradices* (Russo 1989, Russo *et al.* 1992, Strukova *et al.* 1996, Monzón y Azcón 2001, Oliveira *et al.* 2005). Si bien se ha demostrado *G. intraradices* logra colonizar las raíces de las plantas de *Alnus*, existen pocos

trabajos que valoran el efecto de este hongo inoculado de forma individual en el crecimiento de las plantas de aile. El género *Alnus* ha sido extensamente estudiado por su habilidad para asociarse simbióticamente con bacterias del género *Frankia*, las cuales logran fijar nitrógeno atmosférico. Por lo que mayoritariamente los hongos endomicorrízicos han sido utilizados para valorar su influencia en interacción dual con dichas bacterias en la fijación de nitrógeno atmosférico y en la nutrición mineral (Jha *et al.* 1993), desconociéndose el potencial de la interacción de hongos endomicorrízicos con plantas de aile en inoculación individual en la formación de agregados del suelo.

Las especies del género *Alnus* cuentan con la habilidad para albergar en un mismo segmento de raíz dos tipos de endófitos, hongos ecto y endomicorrízicos (Becerra *et al.* 2005). Sin embargo, sólo se ha descrito la presencia de los endófitos, desconociéndose el efecto de la interacción dual en el crecimiento de la planta hospedera y en la formación de agregados de suelo. El efecto de la interacción dual ha sido evaluado en diferentes especies (Jones *et al.* 1998, Allen *et al.* 1999, Chen *et al.* 2000, Founoune *et al.* 2002, Tian *et al.* 2003), encontrando que las plantas se ven favorecidas con la inoculación dual en comparación con la inoculación individual.

Los cambios en la población vegetal y en la de microbios en un proceso de sucesión están bien documentados a nivel mundial. En el caso de México se le ha dado poca importancia a este tipo de situaciones. Esto ha tenido como consecuencia un incremento de las zonas degradadas. La reconversión de estos sitios es muy complicada, necesitándose la implementación de estrategias en las que se incluya una buena selección de las plantas. El fresno (*Fraxinus* sp.) es una especie que ha sido ampliamente considerada para restablecer la biomasa vegetal en zonas degradadas por su habilidad para crecer bajo situaciones adversas. Sin embargo, existen pocos trabajos que muestran la forma en que el fresno logra sobrevivir en suelos deteriorados.

El éxito del fresno para poder desarrollarse en zonas degradadas podría ser su habilidad para formar asociaciones simbióticas con hongos endomicorrízicos

(Stabler *et al.* 2001). Además, el fresno micorrizado con HMA puede incrementar la acumulación de materia seca y el contenido de fósforo foliar (Douds y Chaney 1986, Lamar y Davey 1988).

La perturbación de los ecosistemas naturales, indistintamente de la fuente de perturbación, provoca la pérdida de los agregados del suelo. La clasificación de los agregados se logra con base en el diámetro de cada partícula, pero el tamaño considerado para ser evaluado varía ampliamente en relación a cada autor. Algunas clasificaciones más generales son los macro y microagregados, siendo para el primer caso considerados los agregados entre 0.25 y 2 mm de diámetro y para el segundo caso se agrupan los agregados con diámetros de 0.053 y 0.25 mm (Tisdall 1994, Six *et al.* 2000). Se ha estimado que la permanencia los macroagregados en el suelo no excede el año, mientras que los microagregados pueden permanecer por varios años (Puget *et al.* 2000). La reducida permanencia de los macroagregados se debe a la gran cantidad de fuentes de carbono y compuestos ricos en nitrógeno (Gregorich *et al.* 2003) que son la principal fuente de energía para la actividad microbiana (García-Oliva *et al.* 2003). Dentro de los principales factores involucrados en la formación de agregados de suelo están las raíces de las plantas y los microorganismos del mismo.

El efecto de las raíces sobre la formación y estabilidad de agregados de suelo se puede dar en dos sentidos, mediante un efecto físico por el crecimiento de la raíz y mediante la secreción de sustancias que podrían funcionar como agentes cementantes. Dentro de las sustancias encargadas de formar agregados resistentes están los de naturaleza fenólica (Martens 2002). La adición de sustancias secretadas por la raíz aumenta la formación de agregados (Traore *et al.* 2000) y el mecanismo podría ser por el aumento en la resistencia de la unión entre partículas y la disminución de los ciclos de humedecimiento y secado (Czarnes *et al.* 2000). Las sustancias secretadas por la raíz son importantes en la formación de agregados entre 0.25 y 2 mm (Gale *et al.* 2000). El crecimiento radicular podría ser otro factor en la formación de agregados del suelo (Bearden y Petersen 2000). En las plantas de aile y de fresno no se ha estudiado la influencia

de su rizosfera en la formación de agregados de suelo.

Si bien las plantas de aile y de fresno logran desarrollarse bajo condiciones adversas por su habilidad en ambos casos de establecer distintas relaciones simbióticas, queda por resolver la importancia de dichas asociaciones y su influencia en la formación de agregados de suelo. En otros sistemas naturales los hongos micorrízicos arbusculares juegan un papel muy importante en la formación de agregados del suelo (Tisdall 1994, Wright y Upadhyahya 1998, Augé *et al.* 2001, Rillig *et al.* 2002). Sin embargo, este tipo de hongos en asociación simbiótica con plantas de aile y de fresno han recibido poca atención en su posible influencia en la formación de agregados del suelo. Mientras que en el caso de los hongos ectomicorrízicos se conoce mucho menos su posible participación en la formación y estabilización de macro y microagregados de suelo.

Esto se debe a que el efecto de los hongos micorrízicos en la formación de agregados del suelo ha sido abordado preferentemente en sistemas agrícolas y de manera más reducida en sistemas forestales. Existen muchos trabajos donde se ha encontrado una relación directa entre la estabilidad de agregados y el contenido de una sustancia excretada por el micelio de hongos micorrízicos arbusculares llamada glomalina así como la densidad de hifas de los mismos organismos (Nobrega *et al.* 2001, Augé *et al.* 2001, Rillig *et al.* 2002, Rillig 2004, Lutgen y Rillig 2004), así como la densidad de hifas de los mismos organismos, observando que la resistencia al rompimiento por parte de los agregados a través de los poros pequeños se debe a la presencia de hifas de hongos micorrízicos (Bearden 2001). Sin embargo, otros autores han observado un efecto nulo por estos dos elementos, proponiendo que los factores principales que mantienen la estabilidad son otros (Borie *et al.* 2000, Piotrowski *et al.* 2004, Feeney *et al.* 2004). Esta disparidad de resultados podría no ser una consecuencia directa de los hongos, sino más bien de las diferentes características espacio-temporales al momento de la evaluación. Lo anterior con base a que se ha encontrado un efecto de los hongos micorrízicos en la estabilidad de agregados del suelo pero sólo en la etapa posterior a la del crecimiento vegetativo de la planta (Bearden y Petersen

2000). El papel de los agregados del suelo consiste en disminuir la velocidad de transformación del carbono, el cual se va integrando en pequeños microagregados (Denef *et al.* 2001) en forma principalmente de carbohidratos (Spaccini *et al.* 2002), mientras que los macroagregados contienen materia orgánica en sus etapas iniciales de humificación (Denef *et al.* 2001), lo cual provoca la presencia de sustancias hidrofóbicas que le dan la estabilidad a estos macroagregados (Shein y Milanovskii 2003, Mataix-Solera y Doerr 2004).

La forma de incrementar el contenido de carbono orgánico puede ser a través de la planta misma vía la raíz. En este sentido se considera que los hongos micorrízicos asociados a la raíz producen estructuras extraradiculares que a la posteridad se incorporan como carbono en el suelo (Godbold *et al.* 2006). La proporción de carbono que se destina al simbiote micorrízico arbuscular se ha estimado alrededor de un 20 % (Peng *et al.* 1993) y de este porcentaje sólo se incorpora un 0.8 % al micelio extraradicular (Jakobsen y Rosendahl 1990). Una parte del carbono como biomasa micorrízica es regresado a la atmósfera por respiración (Staddon *et al.* 2003).

Por lo que respecta a hongos ectomicorrízicos, se tiene que la cantidad de carbono destinado para la producción de micelio extraradicular varía entre 20 y 29 % (Ek 1997, Wu *et al.* 2002) y hasta un 62 % (Godbold *et al.* 2006) del total de carbono fotoasimilado por la planta huésped. Del porcentaje de carbono que llega al micelio, se puede llegar a respirar entre 43 y 64 % (Ek 1997, Phillips y Fahey 2005) y el resto del carbono representa una alternativa importante para su almacenamiento en suelo (Phillips y Fahey 2005). Por lo tanto, los hongos ectomicorrízicos y endomicorrízicos podrían representar una alternativa notable para incrementar el contenido de carbono en suelo.

Considerando que la perturbación de los ecosistemas naturales es inevitable por el hecho de representar en gran parte del territorio mexicano la forma de vida de la población y que desde hace años a dejado esta actividad antropogénica consecuencias catastróficas traducidas en un territorio cada vez más erosionado, es necesario buscar alternativas para frenar el deterioro del

suelo y para restablecer las partes que ya se encuentran degradadas. En vista de tal problemática y con la carente información al respecto, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo observar el efecto de plantas de aile y fresno inoculadas con hongos endo y ectomicorrízicos de manera individual y en coinoculación sobre el crecimiento de la planta y formación de agregados del suelo.

ANTECEDENTES

1.- Hongos micorrízicos arbusculares

Los hongos micorrízicos arbusculares forman asociaciones benéficas para ambos participantes. El origen del término micorriza es el implementado por el botánico alemán Albert Frank en 1885. Este autor pudo observar en las raíces de árboles forestales características peculiares de las mismas y les denominó micorriza, tomando los vocablos griegos “Mykes” (hongo) y “Rhiza” raíces.

1.1.- Clasificación

La clasificación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares ha tenido muchos cambios a través del tiempo y se les ha clasificado como organismos micorrízicos vesículo-arbusculares. Esta clasificación se basó en aspectos relacionados con el desarrollo, morfología y estructura de la pared celular de las esporas. Los miembros del género *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Glomus* y *Sclerocystis* forman parte de este tipo de organismos formadores de micorriza. Recientemente se ha tomado la perspectiva filogenética y a partir de este aspecto se separó otro orden, Glomales dentro de los Endogonales. Por último, a partir de los métodos moleculares (Smith y Read, 1997) fue que se establecieron dos subórdenes del orden Glomales, el *Glomineae* y *Gigasporineae*. El suborden *Glomineae* agrupa a la familia Glomaceae con los géneros *Glomus* (77 especies) y *Sclerocystis* (10 especies) y la familia Acaulosporaceae con los géneros *Acaulospora* (32 especies) y *Entrophospora* (3 especies). Por otra parte el suborden *Gigasporineae* sólo tiene a la familia Gigasporaceae con los géneros *Gigaspora* (7 especies) y *Scutellospora* (23 especies). Sin embargo, todos estos organismos comparten la característica de que su micelio vegetativo es septado y

multinucleado, mientras que sus esporas contienen 1000 o más núcleos y germinan y producen muy poco micelio en ausencia de planta hospedera.

1.2.- Hospederos

Los hongos micorrízicos arbusculares cuentan con un espectro muy amplio en cuanto a plantas hospedero. En la mayoría de las familias de Angiospermas y Gimnospermas existe presencia de este tipo de asociaciones simbióticas, así como en helechos, líquenes y musgos, abarcando el 95 % de todas las especies de plantas examinadas hasta la actualidad. Las familias que se consideran no colonizadas o escasamente colonizadas por estos hongos son la *Polygonaceae*, *Juncaceae*, *Cruciferae* y *Caryophyllaceae*. También existe la asociación endomicorrízica en árboles que se consideran típicamente ectomicorrízicos.

En ecosistemas forestales este tipo de asociación no ha sido casi tomada en cuenta, sin embargo, se ha detectado su presencia en miembros de las gimnospermas. Las especies de donde se ha observado este tipo de colonización que pertenecen a las gimnospermas son el género *Juniperus* (Roncadori y Pokorny 1982, Reinsvold y Reeves 1986), *Tetraclinis* (Díaz y Honrubia 1993, Abbas *et al.* 2006), *Sequoiadendron* y *Sequoia* (Kough *et al.* 1985), *Araucaria* (Breuning *et al.* 2000, Andrade *et al.* 2000, Moreira-Souza *et al.* 2003), *Pseudotsuga*, *Abies* (Cázares y Trappe 1993, Cázares y Smith 1995) y *Pinus* (Horton y Bruns 1998).

1.3.- Proceso de colonización

Existen tres formas de inóculo con las cuales se puede iniciar el proceso de colonización de las raíces por los hongos micorrízicos: las esporas, micelio externo y segmentos de raíz colonizada. En este último caso, se ha observado que solamente permanecen infectivas cuando presentan vesículas en el interior de la raíz con *Glomus fasciculatum*, *Glomus mosseae* y *Acaulospora spinosa* (Biermann y Linderman 1983). Sin embargo, el estudio de los procesos de colonización se ha logrado a partir de esporas. La germinación de las esporas se inicia cuando entran en contacto con los exudados de la raíz (Graham 1982), los cuales han sido determinados como flavonoides (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1989,

Siqueira *et al.* 1991, Chabot *et al.* 1992). Esta primera etapa del proceso de colonización se caracteriza por la producción de una hifa principal, que al estar en la proximidad de la raíz se divide en ramificaciones irregulares y septadas (Chabot *et al.* 1992, Giovannetti *et al.* 1993). La germinación de la espora se logra utilizando las fuentes de carbono almacenadas (lípidos), las cuales se integran al metabolismo inicial de germinación (Bago *et al.* 1999). Es importante mencionar que el metabolismo de las fuentes almacenadas cesa sí la espora germinada llega a ser separada de la proximidad de la raíz, como una posible estrategia para conservar las reservas e intentar una nueva colonización (Bago *et al.* 2000).

La primera estructura que se forma con el contacto hongo-planta es el denominado apresorio y generalmente está alineado de forma paralela al eje de la célula epidérmica de la raíz. Al mismo tiempo, esta célula sufre un ensanchamiento en la pared celular en el punto de contacto del apresorio y se forma un punto donde la lignina está en bajas proporciones (Smith y Read 1997). Seguido de la formación del apresorio y la penetración del hongo, la hifa se ramifica en las células corticales, creciendo en forma longitudinal y en algunos casos de forma radial. Las hifas ramificadas y crecidas longitudinalmente dan lugar a una de las estructuras internas características de este tipo de asociación simbiótica, el arbusculo. Tanto la magnitud del crecimiento como la velocidad han sido evaluadas y están en el orden de 5-10 mm en cada dirección a partir del punto de entrada, a un ritmo de 0.13 a 1.22 mm/ día.

El desarrollo del hongo dentro de la raíz se logra de dos formas, vía los espacios intercelulares e intracelulares. Para el primer caso se denomina colonización tipo Arum y la formación de los arbusculos se logra mediante la penetración de pequeñas ramificaciones del micelio intercelular. La colonización que penetra la célula se denomina tipo Paris y se caracteriza por dispersarse en el córtex de célula a célula, formándose el arbusculo a partir de la hifa que ingresa en la misma. Los arbusculos se localizan en una región cerca del meristemo apical de la raíz, donde la elongación de las células ha cesado (Blee y Anderson 1998). Estas estructuras son usualmente de corta vida y se forman del segmento de hifa que penetra la célula en ambos tipos de colonización. Una vez que la hifa

se encuentra en el interior de la célula se ramifica con la finalidad de incrementar el área superficial de contacto con el hospedero y se rodea de una membrana periarbuscular. Esta membrana sirve como zona de intercambio de metabolitos entre el hospedero y el hongo (Blee y Anderson 1998). La aparición de los arbusculos es rápida y parece que está estrechamente relacionada con un intenso crecimiento de micelio externo (Hepper 1981, Bécard y Piche 1992).

La colonización de los HMA ocurre rápidamente en las raíces más jóvenes. El tiempo estimado de penetración dura alrededor de 2 días, mientras que la formación de arbusculos de 4 días y las vesículas entre 3 y 6 días (Brundrett *et al.* 1985). La ubicación de los puntos de infección se ha observado a 11 mm del ápice de la raíz, aunque la variación hace pensar que no existe un lugar estratégico en donde se lleve a cabo dicha entrada. Sin embargo, la mayoría de los puntos de entrada siempre se encontrarán en la proximidad del ápice. El número de puntos de infección incrementa con una baja densidad de esporas (Louis y Lim 1987).

1.4.- El micelio externo

Otra parte muy importante en el desarrollo de la micorriza arbuscular es la formación del micelio externo. Esta estructura del hongo crece a partir de los puntos de infección en la raíz después de que la hifa se introduce en las células del córtex y se dispersa grandemente en el suelo. El momento en el que inicia el crecimiento del micelio es a partir de que se forma el apresorio (Hepper 1981) y tiene un periodo de vida de pocas días (Staddon *et al.* 2003). El micelio externo participa activamente en la toma de minerales y agua (Smith y Read 1997). La eficiencia en la toma de dichos elementos es muy alta considerando que su diámetro es de 2 μm (Leake *et al.* 2004).

La longitud del micelio externo de HMA normalmente se expresa en unidad de masa por volumen de suelo o por unidad de longitud de raíz colonizada. En términos generales la longitud del micelio podría ser de entre 3 y 30 m de hifas / g de suelo (Leake *et al.* 2004), aunque puede variar de acuerdo al sistema utilizado. En un sistema de maceta el rango en la longitud es de 2 a 29 m de hifas / g de

suelo y en un sistema experimental de compartimentos es de 2 a 36 m de hifas / g de suelo (Leake *et al.* 2004), mientras que en campo se ha estimado para ser de 68 a 101 m de hifas / g de suelo en zonas de pradera y de 45 a 74 m de hifas / g de suelo en zonas de pasto (Miller *et al.* 1995). En sistemas agrícolas los valores de longitud decrecen drásticamente, quedando del orden de 2 a 8 m de hifas / g de suelo (Leake *et al.* 2004).

Los velocidad de crecimiento del micelio externo es de menos de 2 m de hifas / g de suelo al final de 9 días y después de 32 días se incrementa a 10 m de hifas / g de suelo (Thingstrup *et al.* 2000). Otros datos muestran que el crecimiento del micelio puede variar en relación al tiempo. En este sentido se ha observado una longitud de 10 m de hifas / g de suelo en 4 semanas, 20 m de hifas / g de suelo en 5 semanas y sólo 25 m de hifas / g de suelo en 7 semanas (Abbott y Robson 1985).

1.5.- Adquisición de nutrimentos

Es bien conocido el papel que tienen los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la nutrición mineral de su planta hospedera. Entre los minerales que puede tomar más eficientemente en comparación a la raíz sin la presencia del hongo se encuentran el fósforo (P), el nitrógeno (N), zinc (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni), azufre (S), manganeso (Mn), boro (B), hierro (Fe), calcio (Ca) y potasio (K) (Clark y Zeto 2000). La eficiencia en la toma de estos elementos depende en gran medida de la mayor exploración el suelo por parte del micelio (Allen *et al.* 2003). Una vez que el HMA toma y transporta los nutrimentos de la solución del suelo hacia su hospedero, se requiere de una zona de transferencia. Esta zona de transferencia está representada por la hifa que crece longitudinalmente dentro de la raíz y se presenta en la mayoría de las asociaciones con HMA (Smith y Smith 1990).

La toma de nitrógeno por parte del micelio externo es aún controversial en relación a sí el hongo logra tomarlo en forma de nitrato (NO_3), amonio (NH_4) o ambas (Figura 1). En este sentido se ha observado en un sistema *in vitro* que el micelio externo toma el nitrógeno en forma de NH_4 pero no en forma de NO_3

(Villegas *et al.* 1996, Toussaint *et al.* 2004), mientras que en un sistema similar se logró observar que el micelio de HMA puede tomar el nitrógeno en forma de NO_3^- (Bago *et al.* 1996, Govindarajulu *et al.* 2005). Otro sistema utilizado para evaluar la toma de nutrimentos por el micelio externo de HMA es el sistema de compartimentos utilizando diversas especies de plantas. En este tipo de sistema se ha observado que el micelio logra tomar ambas fuentes (Johansen *et al.* 1992, Frey y Schüepp 1993, Johansen *et al.* 1993a, Johansen *et al.* 1993b, Tobar *et al.* 1994), sin embargo, cuando se aplica NH_4NO_3 , el nitrógeno que se logra observar en el hongo y en la planta hospedera, es el de la molécula de NH_4^+ (Hawkins *et al.* 2000). En el caso del nitrógeno orgánico se ha observado que el micelio logra tomarlo de manera eficiente (Hodge *et al.* 2001, Hodge 2003).

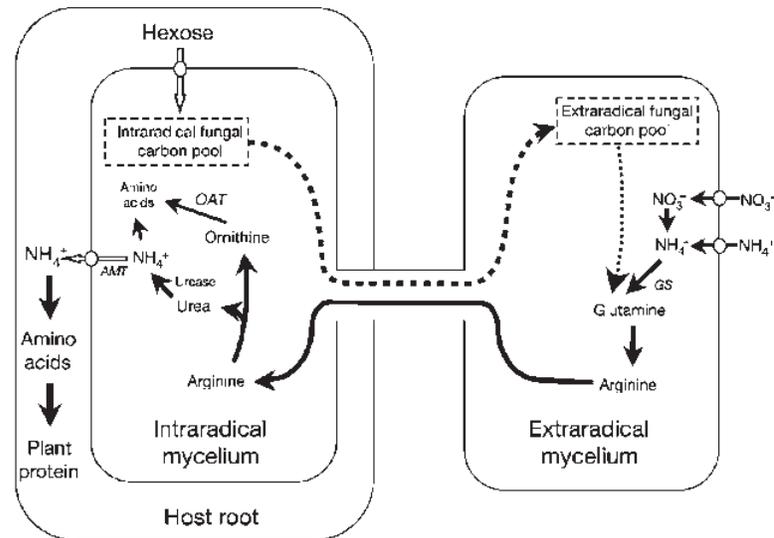


Figura 1.- Movimiento de nitrógeno en la simbiosis micorrízica (Fuente: Govindarajulu *et al.* 2005).

Después que el nitrógeno se incorpora en el micelio se ha detectado actividad de nitrato reductasa en presencia de NO_3^- , mientras que cuando se aplica NH_4^+ , se observa un incremento en la actividad de glutamina sintasa, lo cual hace suponer que el nitrógeno se incorpora en aminoácidos para su transporte, independiente de la fuente (Toussaint *et al.* 2004). El aminoácido que sirve como vehículo de transporte de nitrógeno del micelio externo al interno es la arginina (Bago *et al.* 2002). Con la finalidad de obtener conocimiento sobre la

transferencia de nitrógeno al hospedero se estableció un experimento in vitro, concluyendo que el nitrógeno se transfiere a la planta en forma inorgánica (Govindarajulu *et al.* 2005).

El fósforo es otro elemento mineral importante en la nutrición de los organismos vivos y proviene del material parental formando compuestos en el suelo con calcio, hierro, aluminio y manganeso y unidos a las superficies de las arcillas (Bolan *et al.* 1991) y otra parte importante se presenta en la materia orgánica. Los hongos micorrízicos arbusculares cuentan con la habilidad de tomarlo en forma inorgánica y orgánica (Koide y Kabir 2000, Joner *et al.* 2000). El mecanismo que implementa el micelio para acceder al fósforo podría ser a través de la secreción de enzimas. En este sentido Olsson y colaboradores (2005) detectaron la existencia de fosfatasa ácida y alcalina aplicando una fuente inorgánica de fósforo. La eficiencia de la toma de fósforo por el micelio varía en relación a la forma, siendo la inorgánica la que más rápidamente se absorbe (Maldonado-Mendoza *et al.* 2001), hasta una diferencia de 8 veces en relación a la forma orgánica (Nielsen *et al.* 2002, Koide y Kabir 2000).

La forma en que el fósforo logra ingresar en el micelio externo es a través de transportadores de fosfato (Harrison y van Buuren 1995, Rosewarne *et al.* 1999, Maldonado-Mendoza *et al.* 2001) y por medio de potencial electroquímico (Ayling *et al.* 2000). Una vez que el fósforo se encuentra en el interior del micelio se transforma y se transporta hacia el micelio interno en polifosfato (Cox *et al.* 1980, Solaiman *et al.* 1999, Rasmussen *et al.* 2000). Este polifosfato en el micelio interno se hidroliza a través de fosfatasas, liberando fósforo inorgánico (Ezawa *et al.* 2001). Después que el fósforo esta en forma inorgánica, se ha propuesto que la transferencia podría llevarse a cabo con transportadores, debido a que se han encontrado estos elementos en las células con arbusculos (Rausch *et al.* 2001) en la membrana periarbuscular (Harrison *et al.* 2002).

1.6.- Metabolismo de carbono

La distribución del carbono en los HMA derivado de su planta huésped puede ser medida de manera indirecta y directa. En el primer caso, se logra a

través de la determinación de la biomasa fungal a través de la determinación de fosfolípidos (Olsson *et al.* 1999, Olsson y Wilhelmsson 2000) y quitina (Pacovsky y Bethlenfalvay 1982), mientras que la directa se logra mediante la utilización de carbono marcado.

Las zonas de transferencia del carbono de la planta al hongo aún no han sido esclarecidas. Sin embargo, existen datos en donde documentan que los arbusculos y la hifa intracelular pueden ser los puntos de toma de carbono fotoasimilado. En el caso de la hifa interna se ha podido observar que en las asociaciones del tipo *Arum*, la hifa sigue activa y teniendo contacto con el micelio externo aún cuando la cantidad de arbusculos disminuye por la edad de la planta y de la misma colonización (Smith y Dickson 1991, Tisserant *et al.* 1993). Otro dato en este mismo sentido es el que muestra la presencia de una bomba de protones en la membrana de la hifa intraradicular, lo cual podría dar lugar a una fuerza suficiente para soportar un transportador de azúcares (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1991). En el caso de las asociaciones que forman un tipo *Paris* aún es más desconocido el posible sitio de transferencia de carbono en virtud de que no presenta hifa intercelular o es muy escasa. El otro sitio probable de transferencia de carbono son los arbusculos y en este caso se ha observado una acumulación de carbono y de lípidos en las células que contienen los arbusculos (van Aarle y Olsson 2003). Además se presume que puede darse un flujo pasivo a través de la membrana periplásmica, seguido de un flujo activo (Ferrol *et al.* 2002).

Por otra parte, la sacarosa es la fuente de carbono que se transfiere hacia las células corticales de la raíz y de ahí esta sacarosa es hidrolizada mediante la invertasa (Smith y Read 1997). Esta enzima se ha observado unida a la pared celular del hospedero y aumenta su actividad de forma significativa en las raíces micorrizadas en relación a las no micorrizadas (Schubert *et al.* 2004). Del producto de la actividad de la invertasa aparece en mayor medida la glucosa (Shachar-Hill *et al.* 1995, Solaiman y Saito 1997), aunque aplicando las dos formas (glucosa y fructuosa) de manera exógena, son absorbidas rápidamente y transformadas en trealosa, glicógeno y lípidos (Pfeffer *et al.* 1999). Los mecanismos involucrados en la toma de carbono por el hongo, no están bien

establecidos, a pesar de que se ha observado la presencia de transportadores de hexosa (Harrison 1996, Harrison 1999).

La técnica del carbono marcado ha permitido detectar en que productos se incorpora el carbono fotoasimilado del hospedero en los HMA. La trealosa, el glicerol, el manitol, el glicógeno (Bago *et al.* 2003), los esteroides (Fontaine *et al.* 2004) y los lípidos han sido encontrados en raíces micorrizadas, siendo los lípidos los principales compuestos sintetizados en los hongos. La trealosa y el glicógeno han sido descritos como los primeros productos sintetizados por el hongo en el micelio intraradical (Shachar-Hill *et al.* 1995, Lammers *et al.* 2001), mientras que la síntesis de mono, di y triglicéridos, fosfolípidos y esteroides ocurre en las esporas y en el micelio externo (Fortin *et al.* 2002). Después de que el carbono cedido al simbiote se transforma en carbohidratos y lípidos en el micelio intraradical, se ha observado la presencia de dichos compuestos en el micelio extraradical (Pfeffer *et al.* 1999, Bago *et al.* 2003). La función de los lípidos en el micelio externo podría ser como sustrato para la síntesis de nuevos carbohidratos, aunque sólo de forma parcial los lípidos de almacenamiento participan en ese proceso (Bago *et al.* 2003).

Los HMA se han caracterizado como organismos obligados debido a que sólo crecen en presencia de planta hospedera. Sin embargo, se ha observado que el micelio externo puede tomar glicerol y acetato del medio e incorporarlos en trealosa (Pfeffer *et al.* 2004, Bago *et al.* 2003, Douds *et al.* 2000). Entonces la razón de la obligatoriedad no radica propiamente en la fuente de carbono, sino en la ruta que sigue cada una de las fuentes. En este contexto, se ha observado que la ruta metabólica de los compuestos carbonados tomados del medio, no se logra incorporar en los ácidos grasos en el micelio externo tal como sucede con el carbono fotoasimilado (Douds *et al.* 2000, Pfeffer *et al.* 2004).

2.- Hongos ectomicorrízicos

2.1.- Clasificación

Las ectomicorrizas son hongos de raíz que pertenecen al grupo de los

basidiomicetes. Estos hongos difieren de los ascomicetes por la producción de esporas en el exterior del suelo en un órgano llamado basidio o cuerpo fructífero y se piensa que forman parte de la evolución de los ascomicetes por la similitud que existe en la forma y tamaño de la espora. Los cuerpos fructíferos pueden ser gelatinosos, cartilagosos, carnosos, esponjosos y estar abiertos desde el inicio de su formación, abrirse posteriormente o permanecer cerrados. Existen algunos datos donde se estima que el número de hongos ectomicorrízicos asciende a 6000 especies, con una variación muy amplia en estructura y función dentro de la misma especie (Smith y Read 1997).

Las familias de plantas en donde se ha encontrado a las ectomicorrizas como relación simbiótica están la *Pinaceae*, *Fagaceae* y *Betulaceae*. Generalmente la clasificación de los hongos ectomicorrízicos se hace con base en la distribución geográfica y a la cantidad de hospederos con los que pueden asociarse (Smith y Read 1997). En el primer caso, existen especies que se pueden encontrar en un gran número de zonas geográficas como el caso de *Laccaria laccata* y *Pisolithus tinctorius*, mientras que *Hebeloma cylindrosporum* sólo se encuentra en algunas zonas a nivel mundial. Por otra parte existen un gran número de especies que tienen hospederos muy determinados como el caso de *Suillus grevillei*, que se localiza únicamente en *Larix decidua*. También se han clasificado a los hongos ectomicorrízicos con base en el tipo de exploración del micelio externo, contando con hongos de tipo de exploración de contacto, corta, mediana y de gran exploración (Agerer 2001).

2.2.- Hospederos

La proporción de plantas que establecen una relación simbiótica con hongos ectomicorrízicos oscila en un 3 % de total de las fanerógamas, pero su importancia radica en que estas plantas ocupan una extensión muy grande de tierra. Dentro de este grupo de familias que forman ectomicorrizas sobresale la familia *Pinaceae*, la cual tiene un impacto comercial de gran relevancia a nivel mundial. Aparte de la *Pinaceae*, existen otras familias con especies importantes a nivel comercial y son la *Fagaceae* con el género *Quercus*; la *Betulaceae* con el género *Alnus* y la *Ericaceae* con el género *Arbutus* (Smith y Read 1997).

2.3.- Proceso de colonización

La formación de las ectomicorrizas inicia cuando la espora hace contacto con los exudados de la raíz, existiendo compuestos que orientan la hifa del hongo compatible hacia la punta de la raíz del hospedero (Lagrange *et al.* 2001) y algunos compuestos aceleran el contacto entre los organismos (Regvar *et al.* 1997). Una vez que se lleva a cabo el contacto entre la planta y el hongo, se observa la secreción de polipéptidos y proteínas de alto peso molecular en unas cuantas horas después del contacto, las cuales pueden ser las responsables de la adhesión del hongo a la raíz (Hilbert *et al.* 1991, Beguiristain y Lapeyrie 1997). La adhesión del hongo en la raíz inicia el proceso de rompimiento de la capa más externa de la pared celular del hospedero (Bonfante *et al.* 1998) y altera su morfología con la finalidad de formar sus estructuras representativas, la red de Hartig y el manto hifal. Todos estos sucesos aparecen con la compatibilidad del hongo y la planta, ya que de lo contrario, se observa la presencia de compuestos fenólicos, limitando la formación de la red de Hartig en la capa exterior del córtex de la raíz (Feugey *et al.* 1999).

La formación de la ectomicorriza puede tardar de 2 a 4 días, contados a partir del inicio del contacto del inóculo con los exudados de la raíz. En el caso de la simbiosis entre *Betula pendula* y *Paxillus involutus*, la hifa hace contacto con la raíz en la parte proximal del ápice, apareciendo un sistema envolvente en este punto después de 24 a 48 horas que rodea la raíz con excepción del meristemo apical (Jordy *et al.* 1998). Después de que se forma parcialmente este manto, las hifas del interior comienzan a penetrar entre las células epidérmicas inmediatamente atrás del ápice (Jordy *et al.* 1998), formando posteriormente la red de Hartig al ramificarse las hifas no septadas en el interior de la raíz (Duddridge y Read 1984a). Generalmente las hifas del hongo no penetran más allá de la primera capa de células corticales. Las células epidérmicas atrapadas en el manto sufren una elongación radial sólo cuando las hifas no logran superar esta capa, lo cual es común en las ectomicorrizas de angiospermas.

Cuando ya se forma el manto y la red de Hartig, se dispara la producción de raíces laterales, formándose un pequeño manto fungal muy delgado que rodea

al meristemo apical y es la base para la formación de la red de Hartig en una zona más madura de la raíz lateral (Smith y Read 1997). La forma en que la red de Hartig se interna en la parte radial de la célula es como en forma de abanico, formando una especie de laberinto (Duddridge y Read 1984b). El crecimiento de la red es transversal al eje longitudinal de la raíz. La zona en que el hongo logra ingresar en las células de su hospedero es muy específica y ésta es cerca del ápice. Se ha observado que la forma de penetrar puede ser mecánica (Duddridge y Read 1984a), considerando que la proporción de pectina-celulosa es más alta que en células más alejadas del ápice. También la presencia de enzimas fungales ha sido observada mediante la lisis de la lámina media de las células epidérmicas, así como enzimas que degradan celulosa, pectina y glucanos.

Todos estos procesos van acompañados de cambios morfológicos finales en la raíz colonizada. Entre los más importantes destaca la formación de raíces laterales por la producción de hormonas como el ácido indol acético (Rudawska y Kieliszewska-Rokicka 1997, Karabaghli-Degron *et al.* 1998) y ácido jasmónico (Regvar *et al.* 1997), la formación de estructuras coralinas (Kaska *et al.* 1999), elongación de las células y supresión de la elongación de los pelos radiculares (Ditengou *et al.* 2000). Tanto la formación dicotómica de las raíces laterales como la estructura coralina son inducidas químicamente por la presencia del hongo (Kaska *et al.* 1999).

El manto hifal es el elemento donde se inicia el crecimiento hacia el interior de las células para formar la red de Hartig y hacia el exterior se inicia el crecimiento de micelio extraradicular (Tagu *et al.* 2002). Esta estructura puede representar hasta un 40 % del peso total de la raíz colonizada; puede emplearse en la identificación a nivel de especie; tiene la función de tomar, transportar y transferir nutrimentos del suelo hacia el manto hifal (Smith y Read 1997) y al unirse dos micelios monocarióticos en uno dicariótico se da lugar a la producción de nuevas esporas en un basidio (Barker *et al.* 1998). Este último aspecto cierra el ciclo de vida de los hongos ectomicorrízicos al dar lugar a nuevas esporas e iniciar la colonización de otras plantas.

2.4.- El micelio externo

El micelio externo se llama a una hifa simple o un grupo de hifas unidas directamente al manto hifal. La función de este tejido es la de incrementar el área de contacto con el suelo para incrementar la toma de nutrimentos y de agua para el tejido simbiótico (Barker *et al.* 1998). La distribución del micelio en el suelo y la formación de rizomorfos son características que ha sido empleadas para la clasificación de estos hongos micorrízicos (Agerer 2001). Existen especies con estructuras muy simples, clasificadas como del tipo exploratorio de contacto como el caso de *Tuber* spp.. En este tipo de hongos el micelio permanece como una hifa individual a través del suelo con una pequeña longitud. Después se tienen hongos con micelio del tipo de exploración a corta distancia, como el caso de *Cenococum geophilum*, en el cual la cantidad de micelio es muy abundante pero no se forma rizomorfos.

Otro grupo de hongos ectomicorrízicos se distinguen por la producción de una gran cantidad de micelio con formación de rizomorfos no tan diferenciados llamado del tipo de exploración media, encontrando en este grupo a especies de *Laccaria*, *Cortinarius* y *Thelephora*. Por último se encuentran los hongos que producen pocos pero bien definidos rizomorfos y se les denomina del tipo exploratorio de larga distancia. En este grupo se puede ubicar a *Pisolithus*, *Scleroderma* y *Paxillus*. Estos rizomorfos crecen normalmente en forma paralela al manto hifal y el ápice del rizomorfo se extiende en forma de abanico con la finalidad de explorar de mejor manera el medio circundante. La conformación de dichas estructuras varía en relación a las especies, pero en algunos casos el rizomorfo presenta una hifa sin citoplasma en el centro que bien podría parecerse a los vasos de las angiospermas. La unión entre el rizomorfo y el manto hifal se logra con una unión tipo delta, en donde la hifa central hueca desaparece al igual que en ápice.

La función por excelencia del micelio es la exploración de una mayor cantidad de suelo con la finalidad de acceder a fuentes de nutrimentos y de agua inaccesibles para la raíz de la planta hospedera (Tagu *et al.* 2002). En este sentido se ha observado que los hongos que forman rizomorfos con una hifa

central hueca tienen mayor capacidad para transportar líquidos y fosfato que los que carecen de esta estructura (Brownlee *et al.* 1983). Además el micelio puede contribuir en el aporte de nitrógeno y carbono orgánicos al suelo, puesto llega a representar hasta un 32 % (Högberg y Högberg 2002) y esto se debe a que cerca de 24 % del carbono asimilado se destina a esta estructura (Wu *et al.* 2002).

2.5.-Adquisición de nutrimentos

Los hongos ectomicorrízicos (HEM) presentan una gran distribución a nivel mundial, pero existen nichos en los cuales son dominantes. Desde hace décadas, bajo sustento del trabajo de investigación de este tipo de organismos, se han ubicado a estos hongos como organismos que dominan los sistemas donde predominan las fuentes de nutrimentos orgánicas y donde la disponibilidad de nitrógeno es limitada (Vogt *et al.* 1991).

Las formas de nitrógeno (N) que son disponibles para los HEM van desde formas orgánicas e inorgánicas. Las fuentes orgánicas de N que puede tomar el micelio externo son muy variables (Turnbull *et al.* 1995, Keller 1996, Wallander 2002, Sawyer *et al.* 2003) y lo hacen por su habilidad para producir enzimas extracelulares como las proteinasas (Leake y Read 1990, Zhu *et al.* 1990, Bending y Read 1995, Sundari y Adholeya 2000a), ureasas (Sundari y Adholeya 2000b), proteinasas (Nehls *et al.* 2001a) y otras enzimas que participan en la mineralización de N (Colpaert y van Laere 1996, Chen *et al.* 2003) a partir de proteínas, aminoácidos (Abuzinadah y Read 1986, Abuzinadah y Read 1988, Chalot *et al.* 1994, Dickie *et al.* 1998, Kytöviita y Arnebrant 2000), quitina (Kerley y Read 1995) o mediante la toma de polipéptidos cuando el N es limitante (Benjdia *et al.* 2006). La habilidad de los HEM para utilizar fuentes de N orgánico radica en las características particulares de la especie e incluso se puede tener una diferencia a nivel intraespecífica (Sawyer *et al.* 2003, Guidot *et al.* 2004). En este sentido se ha visto que hongos que generalmente colonizan horizontes ricos en materia orgánica producen una mayor cantidad de proteasas en comparación con los que colonizan horizontes minerales como *Cenococcum geophilum* (Chalot y Brun 1998).

La toma de nitrógeno en forma de nitrato por parte del micelio externo ha sido estudiada por varios autores y se ha observado que la eficiencia varía en relación a la especie. Existen datos sobre especies que logran eficientemente reducirlo (France y Reid 1984, Scheromm *et al.* 1990a), entre ellas se encuentra *Rhizopogon roseolus* (Gobert y Plassard 2002), *Hebeloma cylindrosporum* (Plassard *et al.* 1994, Scheromm *et al.* 1990a, Scheromm *et al.* 1990b, Plassard *et al.* 2000) y *Suillus granulatus* (France y Reid 1984), mientras que otras lo reducen de manera poco eficiente (Eltrop y Marschner 1996, Wallander *et al.* 1997a, Högberg *et al.* 1999, Rangel-Castro *et al.* 2002). Si bien la toma de nitrato puede ser poco o muy eficiente por los HEM, se debe señalar que la raíz micorrizada proporciona una mayor habilidad para tomarlo a bajas concentraciones (Gobert y Plassard 2002).

Con respecto al amonio, se ha mostrado que el micelio de HEM tiene una mayor capacidad para tomarlo que las raíces (Chalot *et al.* 2002) y la eficiencia en la toma de este ión es muy grande en la mayoría de las especies (Ahmad *et al.* 1990, Jongbloed y Borstpauwels 1991, France y Reid 1984, Eltrop y Marschner 1996, Sarjala 1999, Högberg *et al.* 1999, Rangel-Castro *et al.* 2002). La toma del amonio va de un 2 a 3 % en un sistema de cajas Petri (Finlay *et al.* 1988) hasta un 73 % en un sistema in vivo (Brandes *et al.* 1998). La diferencia en la toma de las dos fuentes inorgánicas oscila entre un 60 % de nitrato en relación a la absorción total de amonio (Finlay *et al.* 1989) y normalmente cuando están los dos iones se denota una preferencia del hongo por el amonio (Colpaert *et al.* 1999).

La toma de N en el micelio externo se lleva a cabo por la acción de transportadores de membrana (Jongbloed *et al.* 1991, Marini *et al.* 1997, Javelle *et al.* 2001, Javelle *et al.* 2003) de aminoácidos (Nehls *et al.* 1999) y de otras fuentes inorgánicas y orgánicas (Kytöviita y Arnebrant 2000, Javelle *et al.* 2003). Aunque sólo el transportador para amonio y aminoácidos ha sido demostrado (Chalot *et al.* 2002). La cantidad de N asimilado puede variar en relación a la fuente, puesto que con nitrato el micelio logra tomar un 29 % del total administrado, mientras que con amonio, la toma se logra incrementar hasta un 47 % (Finlay *et al.* 1989).

El N tanto en forma de nitrato como amonio ingresa en el micelio externo y es incorporado en aminoácidos (Finlay *et al.* 1989) como se muestra en la figura 3 (Javelle *et al.* 2003). El amonio (NH_4^+) una vez que ingresa al micelio externo se integra como un grupo amino o amida en un esqueleto carbonado (Smith y Read 1997) y éste se transporta hacia el manto hifal. La incorporación del grupo amino se logra por la presencia de la glutamina sintasa, dando como producto la glutamina (Kershaw y Stewart 1992, Martin *et al.* 1994, Rudawska *et al.* 1994, Botton *et al.* 1994). Cuando la glutamina sintasa se inhibe, la glutamato deshidrogenada incrementa su actividad, dando como producto el glutamato (Turnbull, *et al.* 1996).

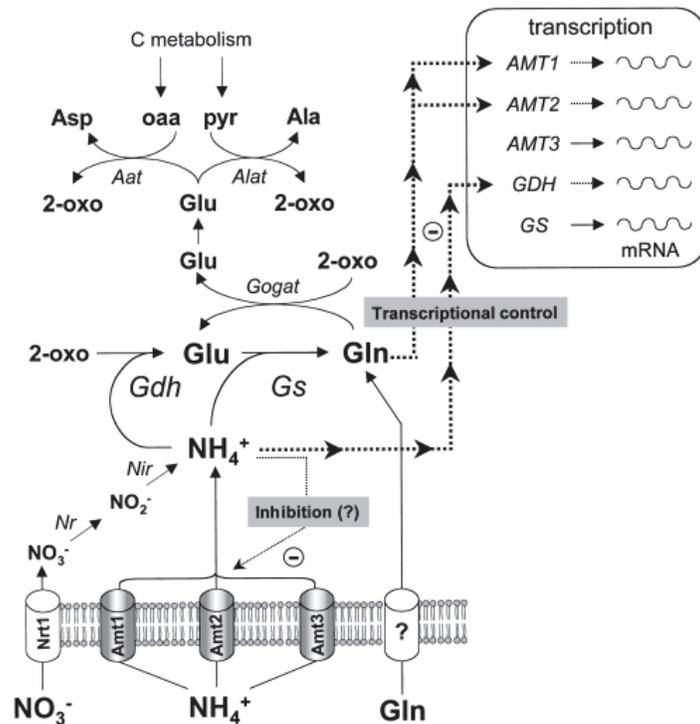


Figura 3.- Modelo de integración del nitrógeno en aminoácidos en el micelio externo de *Hebeloma cylindrosporium* (Fuente: Javelle *et al.* 2003).

El nitrato por su parte es reducido por la nitrato reductasa/nitrito reductasa (Ho 1989, Jargeat *et al.* 2000, Guescini *et al.*, 2003) e incorporado en glutamato, glutamina y asparagina (Guescini *et al.* 2003). En otros casos y utilizando amonio como fuente de N, el glutamato, glutamina, aspartato, asparagina y alanina fueron encontrados en mayor proporción en el micelio de *Rhizopogon roseolus*, *Suillus bovinus*, *Pisolithus tinctorius* y *Paxillus involutus* y en menor proporción serina,

trionina, tirosina, lisina y arginina (Finlay *et al.* 1988). En *Paxillus involutus*, expuesto a malato y glutamato, el principal aminoácido encontrado en micelio fue la alanina (Blaudez *et al.* 2001). El transporte de los compuestos nitrogenados tanto a corta, como a larga distancia, podría ser mediante un sistema de vacuolas móviles (Ashford y Allaway 2002). Mientras que la proporción de N transferido a la planta hospedera puede variar respecto a la fuente, siendo de entre 1.1 a 5 % con una fuente orgánica (Pérez-Moreno y Read 2000) y de 13 A 17 % con N en forma de amonio (Wallander *et al.* 1999). La zona que se ha determinado como de intercambio del N tomado por el micelio es el apoplasto en la red de Hartig (Barker *et al.* 1998) y el mecanismo por el cual el nutrimento entra a la célula del hospedero parece ser a través de transportadores de amonio (Selle *et al.* 2005).

Por otro lado, la toma de fósforo por parte del micelio externo puede ser de fuentes orgánicas e inorgánicas. La forma en como se logra la adquisición de P puede ser mediante la secreción de enzimas (Pérez-Moreno y Read 2000) como la fosfatasa (Ho 1987, Ho 1989, MacFall *et al.* 1991), fitasas (Ho 1989, Hilger y Krause 1989) y la fosfomonoestereasa (Colpaert y van Laere 1996, Antibus *et al.* 1997). Estas enzimas se localizan en la pared celular externa del micelio extraradicular (Álvarez *et al.* 2005) y las fuentes que puede hidrolizar son el fitato (Heinrich *et al.* 1988, Antibus *et al.* 1997); el fosfato de inositol (Antibus *et al.* 1992); el mantillo (Chuyoung *et al.* 2002); el fosfato de calcio (Lapeyrie *et al.* 1991) y la apatita (Wallander *et al.* 1997b). En el caso de la apatita, el mecanismo utilizado para obtener el P por parte de los hongos es la secreción de ácido oxálico (Wallander 2000), logrando absorber hasta un 23 % del total de P adicionado (Wallander *et al.* 2005). A pesar de que los HEM obtienen P de diversas fuentes, existen especies que no pueden degradar fosfato de aluminio, inositol hexafosfato (Cumming 1993) o fitato (Colpaert *et al.* 1997).

Las micorrizas más jóvenes tienen una mejor habilidad para la toma de P, debido a que cuentan con sistemas de alta y baja afinidad para su absorción (Cairney y Alexander 1992). La velocidad de la toma de P ha sido calculada en 25 μg de P/ día, a razón de 3.2×10^{-12} mol de P / m de raíz x s (Jones *et al.* 1991) y 1.8 a 11.7×10^{-10} mol P / cm^2 x s (Finlay y Read 1986). En cuanto a la cantidad de

P absorbido en valores porcentuales se ha estimado que el micelio del hongo puede tomar hasta un 76 % de P (Brandes *et al.* 1998) y puede duplicar la cantidad absorbida de este elemento por la raíz en comparación a la no micorrizada (Chuyong *et al.* 2000).

El transporte de fósforo vía el micelio extraradicular se ha pensado que se logra mediante un sistema de vacuolas tubulares móviles, las cuales llevan en su interior el P en forma polifosfato (Marschner y Dell 1994, Ashford *et al.* 1994, Bucking y Heyser 2000, Ashford y Allaway 2002) y de ortofosfato (Martins *et al.* 1999). El transporte de P es gobernado por la baja disponibilidad de carbono fotoasimilado (Bücking y Heyser 2003).

Cuando el P se encuentra en el micelio intraradical en forma de polifosfato, la transferencia se lleva a cabo en la interfase conformada entre la célula del hospedero y el micelio intraradical y esta transferencia parece que está gobernada por la concentración de polifosfato en el citoplasma del hongo y no por la concentración del mismo en la solución del suelo (Bücking y Heyser 2000). La proporción de fósforo transferido incrementa en la primera fase del desarrollo de la simbiosis y disminuye conforme se va estableciendo la misma (Jones *et al.* 1991). Otro factor involucrado en la transferencia de P es la especie de hongo, teniendo un mayor aporte del mismo cuando se inocula *Pisolithus tinctorius* en comparación con *Cenococcum geophilum* (Rousseau *et al.* 1994) o con *Thelephora terrestris* (Dixon y Hiohliol 1992). La fuente de P, la disponibilidad de fotoasimilados y la disponibilidad de P en la solución del suelo también son factores que intervienen en la transferencia de P al hospedero (Colpaert *et al.* 1999, Pérez-Moreno y Read 2000, Bücking y Heyser 2003).

2.6.- Metabolismo de carbono

La transferencia de carbono fotoasimilado del hospedero al hongo ectomicorrízico se lleva a cabo tan pronto como se da inicio a la colonización. Dentro de los 6 primeros días, cuando el manto y la red de Hartig están bien desarrollados, aparecen grandes cantidades de glicogen en las células de ambas estructuras y una reducción significativa de almidón en las células del hospedero

(Jordy *et al.* 1998). Considerando que este almidón sea aportado al simbiote en forma de hexosas, preferentemente glucosa (Chen y Hampp 1993), el catabolismo de estos polisacáridos dentro del hongo es importante para la generación de energía (Ceccaroli *et al.* 1999). La forma en que la hifa intraradicular toma los monosacáridos (glucosa) es a través de transportadores (Nehls *et al.* 2000, Wright *et al.* 2000, Nehls *et al.* 2001, Grunze *et al.* 2004) los cuales actúan a muy bajas concentraciones de monosacáridos. La disponibilidad de estos monosacáridos en el apoplasto de interacción entre los simbioses está regulada por la presencia de invertasa en la raíz micorrizada (Salzer y Hager 1993, Wright *et al.* 2000) que controla la cantidad de glucosa.

Los fotoasimilados obtenidos por los HEM se destinan para la producción de aminoácidos, polioles de cadena corta (Martin *et al.* 1998) y más específicamente la glucosa obtenida se destina para la producción de trealosa (Wisser *et al.* 2000), mientras que la fructuosa es la base para la producción de manitol (Smith y Read 1997). Las enzimas involucradas en la catálisis de la trealosa son la trealosa ácida y la neutra, siendo sintetizada la primera de ellas en el manto hifal y no en la red de Hartig (Wisser *et al.* 2000). Los productos sintetizados por el hongo a partir de la fuente orgánica varían en relación a diversos factores. En algunas especies se ha encontrado un aumento de arabitol con un decremento de la temperatura, mientras que con otras especies se ha detectado un incremento en la síntesis de manitol y trealosa (Tibbett *et al.* 2002). Con respecto al estrés hídrico se ha encontrado un aumento de arabitol y manitol en el caso de *Lactarius subdulcis* (Shi *et al.* 2002).

3. El género *Alnus*.

Clasificación del género *Alnus*

División: Angiospermas

Clase: *Dicotiledóneas*

Orden: *Fagales*

Familia: *Betulacea*

Géneros de la familia: *Betulaceae*

Alnus

Betula

Carpinus

Corylus

El género *Alnus* agrupa 25 especies y algunas de estas contienen varias subespecies. La mayoría de dichas especies son árboles y arbustos caducifolios de hojas alternas, dentadas, con flores unisexuales; las masculinas en amentos cilíndricos colgantes; las femeninas en racimos terminales con numerosas escamas leñosas y sus frutos en forma de núcula. Las especies de aile que se pueden encontrar en México son *Alnus acuminata*, *A. jorullensis* y *A. firmifolia*. Las especies que integran este género son consideradas de rápido crecimiento y cuentan con la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico mediante la asociación con bacterias del género *Frankia* y han sido encontrados hongos tanto endo como ectomicorrízicos en sus raíces.

Alnus glutinosa es originario de Europa, Asia y noroeste de África. Crece en suelos no compactados, fértiles, muy húmedos y se caracteriza por ser especie pionera en sitios degradados. Presenta glándulas resinosas en sus ramillas y se utiliza en la fabricación de muebles y como combustible. La corteza es muy astringente y de ella pueden obtenerse taninos para curtir pieles, así como propiedades medicinales en el tratamiento de quemaduras y reumatismo. En Europa crece rápido en suelos con pH ácido (Lowry *et al.*, 1962) mientras que en suelos alcalinos o neutros, su crecimiento se ve reducido; además destaca el hecho que fija una gran cantidad de nitrógeno atmosférico. Una diferencia importante de esta especie de aile es la gran cantidad de nitrógeno foliar que logra retener en sus hojas poco antes de que éstas caigan (Côte *et al.*, 1989), aportando cerca de 101 kg/ha/año de nitrógeno al suelo a través del hojarasca.

Alnus acuminata se puede localizar desde México hasta Bolivia y en las montañas de los Andes en Sudamérica. Las zonas de distribución se localizan a altitudes de los 600 a 3000 m.s.n.m. en los estados de del centro y noreste de México. En el municipio de Morelia se le puede encontrar en los bosques de pino, cohabitando con especies de madroño y fresno. Esta especie de aile se desarrolla en suelos profundos a semiprofundos con pH de 4 a 6; en las laderas de

montañas muy inclinadas y secas; en suelos bien drenados y húmedos; en las riveras de los ríos y en sitios con media o plena luz. Esta especie de aile es importante en etapas de sucesión temprana en los bosques de pino, encino y bosque mesófilo de montaña. La madera de esta especie se utiliza para la elaboración de artesanías por su baja densidad, para la producción de mangos para herramienta, para la producción de pulpa para papel y muebles en general, mientras que la corteza puede ser una fuente importante de taninos. Como todas las especies de este género es importante en la incorporación de nitrógeno al suelo a través de la hojarasca (50 kg/ha/año). En la rama medicinal se han encontrado sustancias antifúngicas y antibacteriales en su corteza, sustancias para el tratamiento de padecimientos en la piel, en enfermedades venéreas, en heridas de la piel y para la inflamación de la garganta.

Alnus jorullensis (aile mexicano) se puede encontrar en la zona centro-sur de México y Guatemala. Las zonas en que habita son generalmente en las montañas a una altitud elevada. En el municipio de Morelia, Michoacán, México, se le ha encontrado formando parte del bosque de encino y cohabitando en este mismo bosque con fresno. La planta de aile se desarrolla sobre suelos arcillosos, poco fértiles, suelos de origen volcánico, suelos con capas arenosas y cenizas volcánicas y con pH desde ácido, neutro y alcalino. Cuenta con la característica de que tolera suelos más secos que otros miembros de este género. Los usos más importantes de la madera de este aile, son la fabricación de muebles en general por la buena trabajabilidad y acabado de su madera, además tradicionalmente ha sido empleada como leña, en la producción de carbono vegetal y en la industria del tablero contrachapado. Otro uso potencial del aile mexicano es en la producción de tintes de las hojas y de su corteza, teniendo la corteza porcentajes importantes de taninos empleados en la curtiduría.

4.- El género *Fraxinus*

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Oleaceae

Géneros de la familia: Oleaceae

Familia *Oleaceae* constituida por árboles y arbustos caducifolios o perennifolios, comprende alrededor de 29 géneros y cerca de 600 especies en regiones templadas o tropicales. El género *Fraxinus* es importante por su madera y por su valor ornamental. Este género abarca árboles caducifolios con hojas opuestas, pinnadas, rara vez unifoliadas y fruto en sámara. Comprende unas 65 especies nativas de zonas templadas de Europa, Asia y Norteamérica. En el norte de México, se pueden encontrar las especies de *Fraxinus americana*, *F. berlandieriana*, *F. cuspidata*, *F. greggii* y *F. velutina*, mientras que en el centro y sur se localiza *F. uhdei*.

Fraxinus americana (Fresno blanco) es uno de los árboles más grandes y más frondosos pertenecientes al género *Fraxinus* en el norte de América. Se caracteriza por ser un árbol pionero de sitios abandonados pero con una gran fertilidad. La corteza de este árbol cuando maduro es café oscuro y presenta fisuras profundas, siendo un patrón característico de esta especie dichas fisuras, así como el color blanquecino bajo las hojas. El sistema radicular de este fresno crece generalmente en forma de raíz principal con pocas raíces laterales creciendo en forma descendente. Las condiciones donde se desarrolla este árbol son en suelos bien drenados, fértiles, húmedos (a lo largo de los ríos), con pH neutro y alcalino, en pendientes no tan pronunciadas, ricos en nitrógeno y en moderado a alto contenido de calcio.

La forma en que se desarrolla el fresno normalmente es en bosques mixtos y nunca ocurre en forma simple, sino más bien en pequeños rodales o por individual junto a otras especies como *Pinus strobus* y *Quercus rubra*. A diferencia de la mayoría de los fresnos, esta especie tiene un crecimiento lento y no tolera las condiciones de baja disponibilidad de agua. La madera del fresno blanco es de ligera a dura y esta característica la hace valuable en la fabricación de artículos deportivos por su resistencia a la compresión. El jugo de las hojas del fresno blanco se puede emplear contra los piquetes de mosquito, reduciendo la

inflamación y el ardor. La corteza es astringente y amarga, usada en infusión para promover la menstruación, problemas de la piel, comezón y organismos en el cuero cabelludo. La corteza interna se utiliza como diurética, laxante, vomitiva, en te para remover la bilis del intestino, como tónico después de dar a luz, para reducir la fiebre y los calambres estomacales. El conocimiento de las asociaciones simbióticas con esta especie es limitado, pero se sabe que hongos micorrízicos arbusculares han logrado colonizar sus raíces.

Fraxinus uhdei (Wenzig) Lingelsh es una especie nativa de México, fácilmente adaptable, de rápido y vigoroso crecimiento y vive de 80 a 100 años. La altura de este árbol mide entre 15 a 20 m pero puede llegar hasta los 25 m. Cuenta con una corteza rugosa y estriada; sus hojas están formadas de 5 a 9 folíolos y crece generalmente en climas templados. También se ha encontrado a este árbol a altitudes entre los 2,250 a 2,800 m.s.n.m., siendo la única especie del género que se puede encontrar de forma natural en bosque de galería, bosque mixto de pino encino y bosque mesófilo de montaña. Las raíces en esta especie son profundas por su distribución sobre suelos profundos, fértiles, frescos y húmedos. La zona de distribución abarca desde el área central occidental de México hasta Guatemala. En el caso de México se puede encontrar en los estados de Sinaloa y Durango hasta Veracruz y Chiapas, creciendo esporádicamente a orillas de corrientes de agua. El tipo de suelo en donde se desarrolla el fresno es arcilloso, arenoso, lava basáltica, ácido o alcalino, con la única condición de que sean profundos, fértiles, frescos y húmedos.

El fresno se ha recomendado para la restauración de sitios degradados, preferentemente donde se realizó una explotación minera. Un aspecto que no se tenía contemplado es la aportación de nitrógeno al suelo por parte de esta especie de fresno. En este sentido se observó que en un bosque dominado por fresno aportó una mayor cantidad de nitrógeno al suelo mediante la producción de hojarasca y este suministro condujo al incremento en la actividad enzimática (Rothstein y Vitousek 2001). Este mayor aporte de nutrientes se debe al incremento en el contenido de nitrógeno y fósforo en las hojas de fresno, aunque esta situación inmoviliza grandemente estos nutrientes, lo cual rompe el proceso

de recirculación (Rothstein *et al.* 2004). Por último se tiene conocimiento de que esta especie forma asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos arbusculares (Stabler *et al.* 2001).

5.- La agregación del suelo

5.1.- Formación de los agregados del suelo

Los agregados del suelo son partículas minerales unidas con material orgánico, formando así estructuras de diferentes tamaños. Las etapas de formación inician cuando una cierta cantidad de material orgánico forma una especie de recubrimiento en la superficie mineral, iniciándose posteriormente con éste material de exceso, la unión entre partículas (Tarchitzky *et al.* 2000). La clasificación de los agregados se logra con base en el diámetro de cada partícula, pero el tamaño considerado para ser evaluado varía ampliamente en relación a cada autor. Algunas clasificaciones más generales consisten en agruparlos en macro y microagregados, siendo para el primer caso considerados los agregados entre 0.25 y 2 mm de diámetro y para el segundo caso se agrupan los agregados con diámetros de 0.053 y 0.25 mm (Tisdall 1994, Six *et al.* 2000). El tiempo de permanencia de los agregados varía en relación a su tamaño, teniendo que los macroagregados sólo se mantienen por periodos de tiempo que no exceden el año, mientras que los microagregados pueden permanecer por varios años (Puget *et al.* 2000). La reducida permanencia de los macroagregados es por la gran cantidad de fuentes de carbono altamente degradable, generalmente compuestos ricos en nitrógeno (Gregorich *et al.* 2003) que son la principal fuente de energía para la actividad microbiana (García-Oliva *et al.* 2003).

En los macroagregados la materia orgánica transformada se va integrando en pequeños microagregados (Denef *et al.* 2001), que se forman dentro de los mismos (Gale *et al.* 2000). La baja transformación de la materia orgánica en los macroagregados se pudo constatar en suelo forestal en donde los agregados estables carecieron de carbono marcado introducido poco antes de la evaluación (Rodionov *et al.* 2000). Además la naturaleza del material orgánico en relación al tamaño de los agregados cambia. En este sentido, se ha observado que los agregados más pequeños contienen un mayor contenido de carbohidratos

(Spaccini *et al.* 2002), mientras que los macroagregados contienen materia orgánica en sus etapas iniciales de humificación (Denef *et al.* 2001), lo cual provoca la presencia de sustancias hidrofóbicas que le dan la estabilidad a estos macroagregados (Shein y Milanovskii 2003, Mataix-Solera y Doerr 2004).

La protección de la materia orgánica por parte de los agregados del suelo se ha propuesto en tres diferentes formas. La primera de ellas es la protección física que corresponde a incluir carbono orgánico en los agregados más pequeños o microagregados. La segunda consiste en integrar la materia orgánica en las partículas minerales del suelo como limos y arcillas, mientras que la tercera forma consiste en incorporar compuestos recalcitrantes en los agregados, aunque es importante considerar que cada suelo cuenta con características que definen la capacidad de incrementar o disminuir la entrada de residuos orgánicos (Six *et al.* 2002). A parte de los anteriores mecanismos de protección de la materia orgánica, se tiene referencia que la velocidad de desintegración de los agregados grandes, también participa en dicha protección. La velocidad media de transformación se ha visto como la más satisfactoria (Plante y McGill 2002), considerando que una velocidad media de rompimiento de los macroagregados permite integrar materia orgánica para su protección (Six *et al.* 2004), aunque con ello se pierda una porción de la ya existente (Plante y McGill 2002). El carbono más persistente en el suelo y por tanto, el que se conserva más dada su protección, es el situado dentro de los microagregados (Six *et al.* 2004, Shrestha *et al.* 2004) en forma de polisacáridos (Carter *et al.* 2002).

Las ventajas de tener un suelo con mejor estructura (entendiéndose como mejor la presencia de macroagregados) son variadas. En primer lugar se cuenta con una mayor disponibilidad de nutrientes (Wright y Hons 2005). En este sentido se pudo observar que el tamaño de los agregados tiene gran influencia sobre la toma de fósforo. Wang y colaboradores (2001) encontraron un mayor contenido de fósforo foliar en plantas crecidas en suelos con agregados con diámetro de 4 a 6 mm en comparación con de las plantas crecidas en los suelos con agregados menores a 0.5 mm. Lo anterior hace suponer que en los pequeños agregados se da una mayor fijación de fósforo.

5.2.- Factores que promueven la formación de los agregados del suelo.

Los factores involucrados en la formación de agregados de suelo son la raíz de las plantas, la materia orgánica, los microorganismos del suelo, los agentes inorgánicos y las variables medioambientales.

5.2.1.- Raíces de las plantas

El efecto de las raíces sobre la formación y estabilidad de agregados de suelo se puede dar en dos sentidos, a través de un efecto físico por el crecimiento de la raíz y mediante la secreción de sustancias que podrían funcionar como agentes cementantes. Dentro de las sustancias encargadas de formar agregados resistentes están los de naturaleza fenólica (Martens 2002). La adición de sustancias secretadas por la raíz incrementan la estabilidad de agregados después de 30 días de incubación en alrededor de 3.8 veces en relación al tratamiento sin la adición mucigel (Traore *et al.* 2000). El ácido poligacturónico es un exudado de raíz que incrementa la estabilidad de agregados al incrementar la resistencia de la unión entre partículas y al disminución de los ciclos de humedecimiento y secado (Czarnes *et al.* 2000). Las sustancias secretadas por la raíz son importantes en la formación de agregados de suelo, sin embargo, todo indica que su importancia en este proceso es mayor en la formación de agregados entre 0.25 y 2 mm (Gale *et al.* 2000).

El crecimiento radicular en diferentes direcciones es otro factor que podría afectar la formación y estabilidad de agregados del suelo. Sin embargo, existen datos donde se observa que la distribución de las raíces no afecta de manera significativa la estabilidad de agregados (Rasse *et al.* 2000) mientras que en otros casos se refleja una clara participación de este factor en la agregación (Bearden y Petersen 2000).

5.2.2.- La materia orgánica

Existe una gran cantidad de materiales orgánicos que han sido utilizados para incrementar la estabilidad de agregados del suelo, encontrando que los

productos de origen orgánico como carbohidratos y la misma materia orgánica de los diferentes materiales, son los parámetros más relacionados con la estabilidad (Albiach *et al.* 2001, Pagliai *et al.* 2004). El posible mecanismo implicado en la estabilidad podría ser por la disminución en el humedecimiento e incrementando la fuerza en la adhesión entre las partículas por el aumento en el contenido de carbono orgánico (Chenu *et al.* 2000), lo cual hace suponer que el factor clave en la estabilidad es la materia orgánica (Cerdeira 2000). Además, se ha logrado observar una lámina de compuestos repelentes al agua cubriendo los agregados, lo que provoca una mayor estabilidad (Shepherd *et al.* 2001, Ellies *et al.* 2005). Este recubrimiento derivado de la materia orgánica afectaría directamente la proporción de carbono orgánico del suelo, lo cual ha sido observado mediante la relación directa entre el contenido de carbono y la estabilidad (Mrabet *et al.* 2001, Goulet *et al.* 2004), siendo dinámica esta relación a través del uso de suelo (Molina *et al.* 2001). La adición de sustancias húmicas, que es uno de los productos de la desintegración materia orgánica, participa en la agregación de manera eficaz (Yamaguchi *et al.* 2004).

Dentro de los materiales orgánicos que han mostrado una contribución positiva en la formación y estabilidad de agregados del suelo está la composta (Bresson *et al.* 2001, Caravaca *et al.* 2003, Whalen *et al.* 2003, Yuksel *et al.* 2004), teniendo variación después de 3 meses en los agregados entre 2 y 4 mm, mientras que en los de 0.2 a 2 mm el efecto puede no ser tan marcado (Guerrero *et al.* 2000). Aunque la adición de este material puede en ocasiones contribuir en la formación de agregados pero no así, en su estabilidad (de León-González *et al.* 2000).

El tipo de materia orgánica que ha sido empleada para mejorar la estructura del suelo es diversa. Los residuos de cultivos y otras plantas como el pasto son de interés en este sentido. En el caso de este último material se ha observado un incremento en la estabilidad (Watts *et al.* 2001). Por lo que respecta a los residuos de cultivos, éstos han sido empleados como material orgánico para el aumento de algunos parámetros físicos del suelo como la estabilidad de los

agregados (Graham *et al.* 2002, Dorado *et al.* 2003). Entre otros materiales que han sido considerados como residuos se encuentra la fibra o también denominada pulpa, la cual incrementa la materia orgánica y por ende los macroagregados se ven incrementados (Gagnon *et al.* 2001). Los subproductos generados en la industria del azúcar como la melasa, pueden ser de utilidad para aumentar la calidad del suelo a través de una mayor formación y estabilidad de agregados, lo cual pudo observarse en suelos con alto contenido de sodio (Suriadi *et al.* 2002).

El estiércol de ganado es otro material orgánico que ha sido ampliamente aplicado bajo diferentes condiciones con la finalidad de determinar su efecto en las propiedades físicas del suelo. La adición del estiércol incrementa el contenido de materia orgánica y éste parámetro en su mayoría está directamente relacionado con la estabilidad de agregados (Spaccini *et al.* 2002, Villar *et al.* 2004, Tripathy y Singh 2004, Mikha y Rice 2004). Por último cabe hacer mención que posiblemente la única vía de estabilizar carbono orgánico derivado de materia orgánica y de otras fuentes en el suelo es la agregación (Lehmann *et al.* 2001), aunque no siempre con el aumento en el contenido de carbono orgánico se tiene un aumento en la estabilidad (Cruz *et al.* 2003, Spaccini *et al.* 2004).

5.2.3.- Microorganismos del suelo

El efecto de los hongos micorrízicos en la estabilidad de agregados del suelo ha sido abordado preferentemente en sistemas agrícolas y de manera más reducida en sistemas forestales. Existen muchos trabajos donde se ha encontrado una relación directa entre la estabilidad de agregados del suelo y el contenido de una sustancia excretada por el micelio de hongos micorrízicos arbusculares llamada glomalina y del mismo modo, se da esta relación con la densidad de hifas de los mismos organismos (Nobrega *et al.* 2001, Augé *et al.* 2001, Rillig *et al.* 2002), observando que la resistencia al rompimiento por parte de los agregados a través de los poros pequeños se debe a la presencia de hifas de hongos micorrízicos (Bearden 2001). Sin embargo, otros autores no han encontrado esta influencia, proponiendo que otros son los factores principales (Borie *et al.* 2000, Piotrowski *et al.* 2004, Feeney *et al.* 2004). Esta disparidad de resultados podría no ser una consecuencia directa de los hongos, sino más bien

de las diferentes características espacio-temporales al momento de la evaluación. Lo anterior con base a que se ha encontrado un efecto de los hongos micorrízicos en la estabilidad de agregados del suelo pero sólo en la etapa posterior a la del crecimiento vegetativo de la planta (Bearden y Petersen 2000).

Otros microorganismos del suelo en los que se ha encontrado que tienen una influencia en la estabilidad de agregados son las bacterias. La actividad de estos organismos podría ser el motor que dispare la promoción del incremento en la estabilidad de agregados del suelo (Eviner y Chapin 2002). En forma más específica, las bacterias del género *Rhizobium*, al igual que otros organismos del suelo, secretan sustancias que pueden participar en la adhesión entre partículas tal como se observó por la presencia de un polisacárido encontrado cerca de la raíz de girasol inoculado con *Rhizobium* (Alami *et al.* 2000).

5.2.4.- Los agentes inorgánicos

La estabilización de los agregados también puede llevarse a cabo mediante la unión de las partículas de arcilla por medio de uniones con metales polivalentes cuando la proporción de materia orgánica es baja (Denef *et al.* 2002), aunque sólo se haya descrito su influencia a nivel de microagregados (Igwe y Stahr 2004). Dentro de los metales que podrían participar en la agregación se encuentran los óxidos de calcio, aluminio y hierro. En el caso del calcio, no se ha observado un efecto en la estabilidad de agregados en un suelo pobremente estructurado a razón de 6.5 Mg de Ca/ha (Stenberg *et al.* 2000). Por otra parte los óxidos de hierro y aluminio parecen participar activamente en la agregación en suelos con diferente minerología (Six *et al.* 2000) y bajo la influencia del contenido de materia orgánica (Duiker *et al.* 2003). La aplicación de fertilizante provocó una disminución de la estabilidad de agregados de suelo por el hecho de incrementar la concentración de cationes monovalentes (Graham *et al.* 2002).

5.2.5.- Variables ambientales

La temperatura es un factor que ha sido poco estudiado en relación a su posible efecto en la estabilidad de agregados del suelo. Si bien puede ser un factor que no está estrechamente relacionado con esta propiedad del suelo, la

temperatura determina algunas circunstancias indirectas como la actividad microbiana que pueden ser claves en la estabilidad de agregados. Los carbohidratos son sustancias importantes para la estabilidad porque se unen a las partículas de arcilla, funcionando como agentes cementantes y dando lugar a nuevos agregados. El tiempo de permanencia de estas sustancias en la matriz del suelo favorece la agregación, por lo que en sitios con bajas temperaturas los carbohidratos están menos expuestos a la degradación microbiana (Spaccini *et al.* 2000).

La estabilidad de los agregados del suelo así como el porcentaje de éstos puede variar temporalmente, encontrándose una mayor estabilidad (Izquierdo *et al.* 2003) y un mayor porcentaje de macroagregados en la estación lluviosa (García-Oliva *et al.* 2003). Tales resultados podrían ser por la presencia de ciclos de humectación y secado ya que se considera a este mecanismo como promotor de formación y estabilidad de agregados (Taboada *et al.* 2004).

HIPÓTESIS

Las interacciones *Alnus-Pisolithus tinctorius-Glomus intraradices* y *Fraxinus-P. tinctorius-G. intraradices* influyen en el crecimiento de planta y la formación y estabilidad de los agregados del suelo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la interacción *Alnus-Pisolithus tinctorius-Glomus intraradices* y *Fraxinus-P. tinctorius-G. intraradices* sobre el crecimiento de planta y la formación y estabilidad de los agregados del suelo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la contribución de *Pisolithus tinctorius* y *Glomus intraradices* en asociación con *Alnus* sp. de forma individual y en interacción en el área foliar, peso fresco y seco de la raíz y de la parte aérea.

Determinar la contribución de *P. tinctorius* y *G. intraradices* en asociación con *Alnus* sp. en la formación y estabilidad de agregados del suelo de forma individual y en interacción.

Determinar la contribución de *P. tinctorius* y *G. intraradices* en asociación con *Alnus* sp. en el contenido de carbono del suelo de forma individual y en interacción.

Determinar la contribución de *P. tinctorius* y *G. intraradices* en asociación con *Fraxinus* sp. de forma individual y en interacción en el área foliar, peso fresco y seco de la raíz y de la parte aérea.

Determinar la contribución de *P. tinctorius* y *G. intraradices* en asociación con *Fraxinus* sp. sobre la formación y estabilidad de agregados del suelo de forma individual y en interacción.

Determinar la contribución de *P. tinctorius* y *G. intraradices* en asociación con *Fraxinus* sp. en el carbono del suelo de forma individual y en interacción.

RESULTADOS

CAPÍTULO I

LA SIMBIOSIS *Fraxinus-Glomus-Pisolithus*. EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE LA PLANTA Y FORMACIÓN DE AGREGADOS DEL SUELO.

RESUMEN

Existen estudios que muestran que los hongos endo y ectomicorrízicos influyen en el crecimiento de su planta hospedera, pero poco se conoce sobre el efecto de estos hongos aplicados de forma individual y en interacción dual en plantas de fresno (*Fraxinus* sp.). En el presente ensayo se estableció un experimento en cámara de crecimiento con la finalidad de observar el efecto de *Glomus intraradices* y *Pisolithus tinctorius*, inoculados de manera individual y en coinoculación, en el crecimiento de la planta y formación de agregados del suelo. *P. tinctorius* inoculado de forma individual incrementó las variables de crecimiento, pero sólo fue significativo el incremento en el peso fresco y seco de la raíz en comparación al tratamiento no inoculado, mientras que el tratamiento donde se inoculó *G. intraradices* se observaron incrementos significativos en comparación al tratamiento no inoculado en el área foliar, peso fresco y seco de la parte aérea, peso fresco y seco de la raíz y en la formación de microagregados de suelo. Por otra parte la interacción dual presentó un efecto significativo en las variables de crecimiento y en el carbono total de suelo en comparación al tratamiento no inoculado. Estos resultados sugieren que la especie de *Fraxinus* puede establecer una simbiosis con hongos ectomicorrízicos y endomicorrízicos y que la interacción dual favorece en mayor medida la distribución de carbono asimilado hacia la planta y en menor medida al suelo. Además, con este estudio se puede observar que el incremento en el carbono del suelo no favorece a corto plazo la formación de macroagregados.

ABSTRACT

Whether studies show that endomycorrhizal and ectomycorrhizal fungi may influence of plant growth, little is known about their effect when applied individually and in dual interaction on ash trees (*Fraxinus* sp.). In this study, the experimental units were established in growth chamber to observe the effect of *Glomus intraradices* and *Pisolithus tinctorius*, inoculated individually or in interaction, on the plant growth, water stable soil aggregates formation, and soil total carbon. *P. tinctorius* individually inoculated increased significant on roots fresh and dry weight, as compared with the non inoculated treatment while for the *G. intraradices* inoculated treatment, significant increases were observed on all growing variables evaluated and in the water stable microaggregates, as compared with the non inoculated treatment. On the other side, the dual interaction *Glomus intraradices*-*Pisolithus tinctorius* showed significant effect on plant growing variables as well as on the soil total carbon, as compared with the non-inoculated treatment.

These results suggest that the *Fraxinus* species can establish symbiosis with ectomycorrhizal and endomycorrhizal fungi and that the dual interaction contributes to increase plant biomass as well as in a minor way to assimilated carbon to the soil.

INTRODUCCIÓN

Los hongos tanto endo (HMA) como ectomicorrízicos (HEM) suelen presentarse en la mayoría de los ecosistemas naturales (Smith y Read 1997) y establecen un beneficio mutuo con las plantas denominada micorriza (Kendrick 1985). Existen muchos trabajos sobre HMA y HEM que muestran sus efectos hacia el hospedero de forma individual, pero muy pocos abordan las interacciones simbióticas con distintos endófitos en un mismo huésped. En este último caso se ha observado que la presencia de HMA y HEM colonizando una misma planta presentan tanto efectos sinérgicos (Chen *et al.* 2000, Founoune *et al.* 2002, Tian *et al.* 2003, Ramanankierana *et al.* 2007) como efectos negativos (Egerton-Warburton y Allen 2001, Duponnois *et al.* 2003) y en otros casos sólo se ha observado la presencia de estructuras de ambos endófitos (Allen *et al.* 1999, Frioni *et al.* 1999). En estos trabajos se observa que una adecuada interacción favorece el establecimiento de la planta huésped bajo condiciones adversas, sin embargo, actualmente no existe hasta donde sabemos, estudios que documenten el efecto de la doble inoculación de hongos ecto y endomicorrízicos en el aporte de carbono en el suelo, así como en la agregación y conservación de suelo.

La degradación del suelo es un grave problema a nivel global y cada día se va intensificando a medida que incrementa el aclareo de los bosques y selvas (Sivakumar 2007), trayendo como consecuencia la improductividad del suelo por la pérdida de los agregados (Six *et al.* 2000, Simard *et al.* 2003). Desde hace más de dos décadas la UNCED (United Nations Conference on Environment and Develop) ha señalado las consecuencias de la degradación del suelo en la población mundial, por lo que en la actualidad se vuelve impostergable desarrollar estrategias de revegetalización que permitan solucionar este problema. *Fraxinus* es un género perteneciente a la familia *Oleaceae* con una amplia distribución a través de todo el territorio mexicano, es una planta de rápido crecimiento, crece en suelos pobres y contribuye a disminuir los efectos de la erosión, por lo que este género puede ser susceptible de ser usado en programas de restauración de suelo. Existen trabajos que manifiestan que las especies del género *Fraxinus* son esencialmente plantas endomicorrízicas y que la asociación de fresno con HMA puede incrementar la acumulación de materia seca y el contenido de fósforo

foliar de esta planta (Douds y Chaney 1986, Lamar y Davey 1988). Sin embargo, se desconoce el efecto de esta planta en la dinámica de agregación de suelos.

El proceso de agregación de suelo ha sido ampliamente documentado y se han detectado varios eventos relacionados a este proceso. Una parte importante de estos eventos se puede explicar por la teoría jerárquica (Tisdall y Oades 1982). Este modelo funciona principalmente en suelos donde la materia orgánica dirige la formación y estabilización de agregados (Oades y Waters 1991). Tomando la teoría jerárquica como modelo, se ha logrado identificar que la presencia de macroagregados incrementa el aporte de carbono en el suelo y que el carbono recientemente adicionado al suelo se incorpora en mayor medida en macroagregados en comparación a los microagregados (Elliott 1986).

La contribución de los hongos y bacterias del suelo en la formación de agregados ha sido estudiada desde hace más de 50 años (Thornton *et al.* 1956). Entre los microorganismos del suelo involucrados en los procesos de agregación se encuentran los HMA. La contribución de estos hongos ha sido ampliamente estudiada, debido principalmente a la producción de micelio externo (Jastrow *et al.* 1998) y a la capacidad de éste de juntar las partículas orgánicas e inorgánicas de suelo, formando macroagregados (Tisdall y Oades 1982). En fechas recientes se ha podido determinar que además del efecto del micelio en la agregación, se tiene otro mecanismo. La producción de una sustancia llamada glomalina por parte del micelio, la cual tiene una relación muy estrecha en el proceso de agregación en campo de partículas del suelo (Wright y Upadhyahya 1996, Wright y Upadhyahya 1998). Sin embargo, en la actualidad aún no se tienen datos claros sobre la participación de los hongos ectomicorrízicos en la agregación ya sea solos o en interacción con hongos micorrízicos arbusculares, debido a que la mayoría de los trabajos en este campo han incluido exclusivamente la micorriza arbuscular.

La presencia de carbono en suelos ha mostrado tener diversos orígenes. Una de las diferentes formas de este carbono es el derivado de los microorganismos, especialmente los HM. En el caso de los HMA, la cantidad de

carbono vía fotosíntesis destinada para el simbionte puede variar grandemente, observándose en el caso de hongos micorrízicos arbusculares que se destina alrededor de un 20 % (Peng *et al.* 1993). Por lo que respecta a los hongos ectomicorrízicos, el micelio externo de éstos hongos puede llegar a representar entre 125 a 200 kg micelio/ha (Wallander *et al.* 2001). Mientras que la cantidad de carbono fotoasimilado al micelio externo varía del 20 al 29 % (Ek 1997), 24 % (Wu *et al.* 2002) y hasta un 62 % (Godbold *et al.* 2006). El carbono llega al suelo vía los hongos a través del micelio vivo y una vez que este micelio muere, algunos de sus componentes pueden quedar dentro de los macro y microagregados del suelo (Treseder y Allen 2000, Zhu y Miller 2003).

En atención a la cada vez más creciente demanda de frenar los efectos de la degradación del suelo por las actividades antropogénicas y debido al conocimiento aún no claro sobre la interacción planta-hongo sobre factores claves en la disminución del deterioro del suelo y posterior rehabilitación, en el presente trabajo se pretende evaluar en cámara de crecimiento el efecto sinérgico de la interacción *Fraxinus-P. tinctorius-G. intraradices* sobre el crecimiento de la planta, la estabilidad de agregados del suelo y el contenido de carbono total en el suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la producción de plántulas de *Fraxinus* sp. se utilizó semilla recolectada en el municipio de Morelia en el mes de octubre de 2005, sometiéndolas a un proceso de esterilización superficial con peróxido de hidrógeno al 10 % (v:v) en agitación constante durante 30 min. Las semillas se pusieron a germinar en charolas conteniendo como sustrato vermiculita pasteurizada y después de 15 días se alcanzó la totalidad de semillas germinadas.

Las plántulas de las charolas de germinación se pasaron a bolsas de plástico, las cuales fueron llenadas con 450 g de suelo mineral procedente de la microcuenca de la Joya dentro del municipio de Morelia, Michoacán. El suelo se tamizó en el sitio de colecta con una malla de 5 mm de abertura y posteriormente

se sometió a un proceso de pasteurización bajo las siguientes condiciones: 121 °C, 1.05 kg/cm² de presión, por un periodo de 15 minutos durante 3 días consecutivos. Las plantas fueron colocadas en cámara de crecimiento bajo condiciones de 25 °C, 75 % de humedad relativa y 14 horas de foto-periodo.

La inoculación de las plántulas se llevó a cabo al momento del transplante. El hongo endomicorrízico *Glomus intraradices* fue aplicado en una suspensión de fitagel al 0.2 %, recibiendo cada plántula un promedio de 80 propágulos, mientras que para el hongo ectotrófico *Pisolithus tinctorius*, las esporas fueron aplicadas en una solución de agua destilada estéril, recibiendo en promedio 1×10^8 esporas por planta. El experimento contó con 4 tratamientos los cuales fueron *Fraxinus* sp. como control, *Fraxinus* sp.-*P. tinctorius*, *Fraxinus* sp.-*G. intraradices* y *Fraxinus* sp.-*G. intraradices*-*P. tinctorius*. Después de 12 semanas de que las plántulas de fresno se colocaron en macetas bajo las condiciones antes mencionadas, se procedió a evaluar los tratamientos, tomando 5 plántulas por tratamiento. Las variables que se consideraron para su evaluación fueron el peso seco de la parte aérea (PSPA), peso fresco de la parte aérea (PFPA), peso fresco de la raíz (PFR), peso seco de la raíz (PSR), área foliar (AF), estabilidad de agregados del suelo y carbono total de suelo.

El área foliar (AF) se determinó mediante las fotos tomadas de cada planta con una cámara digital FinePix de 3.2 mega píxeles, con el uso de un software (Image J versión 4.1). La estabilidad de agregados se realizó bajo la técnica de Kemper y Rosenau (1986), determinándose la fracción de macroagregados (mayor a 1 mm) y microagregados (menor a 1 mm y mayor a 0.125 mm). Para el porcentaje de carbono total de suelo se tomó una muestra de cada maceta y se secó al aire libre. Una vez que la muestra estaba seca se pasó por un molino (Restsch MM200) con una frecuencia de 30/s durante 2 min. y el suelo molido se colocó en un horno a 60 °C durante 24 hr para eliminar la humedad restante y hacer la determinación de carbono en un Carlo Erva (Flash EA 1112 series). El análisis estadístico fue un diseño completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento y con ayuda del programa de estadística Assistat (2005).

RESULTADOS

La presencia de *P. tinctorius* y *G. intraradices* fue observada en las raíces de fresno (*Fraxinus* sp.) en los tratamientos en donde se inocularon de forma individual, sin embargo, en el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius*-*G. intraradices* en combinación, la presencia del hongo ectomicorrízico impidió la observación del endomicorrízico (datos no mostrados). Los valores promedio obtenidos para las diferentes variables de crecimiento se presentan en el cuadro 1. Una vez concluido el periodo de crecimiento, se pudo observar un incremento en los tratamientos inoculados con *G. intraradices* y *P. tinctorius* tanto en forma individual como en coinoculación, aunque estadísticamente no resultaron significativos en todos los casos.

Cuadro 1. Valores promedio en las variables de crecimiento de las plantas de fresno (*Fraxinus* sp.).

Tratamiento	AF (cm ²)	PFPA (g)	PFR (g)	PSPA (g)	PSR (g)
No inoculado	6.9 ^c	0.19 ^c	0.13 ^b	0.073 ^c	0.05 ^b
<i>Pisolithus tinctorius</i>	25.8 ^c	0.51 ^{bc}	0.42 ^a	0.158 ^c	0.11 ^a
<i>Glomus intraradices</i>	66.3 ^b	0.95 ^b	0.56 ^a	0.289 ^b	0.13 ^a
<i>P. tinctorius</i> - <i>G. intraradices</i>	169.6 ^a	1.98 ^a	0.52 ^a	0.400 ^a	0.15 ^a

AF = Área foliar; PFPA y PSPA = Peso fresco y seco de la parte aérea; PFR y PSR = Peso fresco y seco de la raíz. Los tratamientos seguidos de la misma letra no son significativos con $\alpha = 0.05$. \pm = Desviación estándar.

En el caso particular del tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* se pudo observar un incremento en el AF, PFPA y en el PSPA, pero no fue estadísticamente significativo en ningún caso en comparación con el tratamiento no inoculado. Mientras que para los tratamientos donde se inoculó *G. intraradices* y *P. tinctorius*-*G. intraradices* se logró observar un incremento estadísticamente significativo en todas las variables de crecimiento en comparación con el tratamiento no inoculado. En el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* los incrementos fueron del orden de 3.7, 2.6 y 2.1 veces en el AF, PFPA y PSPA respectivamente en comparación con el tratamiento no inoculado. En el caso del tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius*-*G. intraradices*, se pudo observar un incremento del 24.5, 10.4 y 5.4 veces en el AF, PFPA y PSPA respectivamente, en comparación con el tratamiento no inoculado. Además se observó un efecto

sinérgico en las variables de la parte aérea de la planta, pudiéndose observar un incremento estadísticamente significativo en comparación con los tratamientos en donde se inocularon los hongos en forma individual.

Por otra parte en las variables relacionadas con la raíz, se pudo observar que los tratamientos en donde se inocularon los hongos, tanto en forma individual como en inoculación dual, se logró observar un incremento estadísticamente significativo en relación al tratamiento no inoculado. No obstante, estos incrementos fueron de menor magnitud que los detectados en la parte aérea. El tratamiento en donde se inoculó *P. tinctorius* incrementó de 3.2 y 2.2 veces en el PFR y PSR respectivamente en comparación al tratamiento no inoculado. Con respecto al tratamiento inoculado con *G. intraradices* los incrementos observados en el PFR y PSR fueron de 4.3 y 2.6 veces respectivamente en comparación a los incrementos en el tratamiento no inoculado. Por último en la interacción dual se observaron incrementos en el PFR y PSR de 4.0 y 3.0 veces respectivamente en comparación con el tratamiento no inoculado.

Los resultados obtenidos en el porcentaje de macro y microagregados estables en agua y carbono total de suelo se presentan en la cuadro 2. Los valores promedio en la formación de macroagregados estables en húmedo fueron similares en todos los tratamientos y no se detectaron diferencias estadísticas significativas. Mientras que en el caso de los microagregados se pudo observar un incremento por parte del tratamiento donde se inoculó *G. intraradices* y en donde *P. tinctorius-G. intraradices* fueron inoculados en combinación, aunque en este caso sólo en el primer tratamiento resultó tener un efecto estadístico significativo en comparación al no inoculado. Los incrementos en la formación de microagregados estables en agua en los tratamientos donde se inoculó *G. intraradices* y donde se inocularon *P. tinctorius-G. intraradices* en combinación, van del orden del 38 y 21 % respectivamente en comparación al tratamiento no inoculado. En el caso del carbono total del suelo se observaron incrementos del 13 % para el tratamiento con *P. tinctorius*, 14 % para el tratamiento con *G. intraradices* y de 31 % para el tratamiento con *P. tinctorius-G. intraradices* en combinación, en comparación con el tratamiento no inoculado. Sin embargo, sólo

el incremento en el tratamiento donde se inocularon *P. tinctorius*-*G. intraradices* en combinación, resultó estadísticamente significativo en comparación al tratamiento no inoculado.

Cuadro 2. Valores promedio en macro y microagregados del suelo y carbono total del suelo en los tratamientos individuales y en interacción dual.

Tratamiento	MacroH (%)	MicroH (%)	C suelo (%)
No inoculado	29.8 ^a	18.1 ^b	0.743 ^b
<i>Pisolithus tinctorius</i>	30.3 ^a	18.8 ^b	0.840 ^{ab}
<i>Glomus intraradices</i>	29.0 ^a	25.1 ^a	0.852 ^{ab}
<i>P. tinctorius</i> - <i>G. intraradices</i>	31.0 ^a	22.0 ^{ab}	0.975 ^a

MacroH = Macroagregados en húmedo; MicroH = Microagregados en húmedo; C suelo = Carbono total del suelo. Los tratamientos seguidos de la misma letra no son significativos con $\alpha = 0.05$. \pm = Desviación estándar.

DISCUSIÓN

Las especies del género *Fraxinus* se han reportado como plantas que logran establecer asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos arbusculares (Douds y Chaney 1986, Lamar y Davey 1988). Sin embargo, este es el primer reporte que muestra la habilidad de *Fraxinus* sp. para establecer una relación simbiótica con hongos ectomicorrízicos. *G. intraradices* inoculado de forma individual produjo incrementos en la mayoría de las variables determinadas en comparación al tratamiento no inoculado. Tales incrementos coinciden con los trabajos donde se observa un aumento en las variables de crecimiento por la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares en fresno (Douds y Chaney 1982, Lamar y Davey 1988). Hasta la fecha no se ha documentado el efecto de la interacción de *P. tinctorius* y *G. intraradices* en plantas de fresno, sin embargo nuestros resultados coinciden con los trabajos que han valorado el efecto de la interacción dual en otras especies (Jones *et al.* 1998, Chen *et al.* 2000, Egerton-Warburton y Allen 2001, Founoune *et al.*, 2002, Ramanankierana *et al.* 2007). El incremento en el PFFA y PSPA podría ser el resultado del aporte de nutrimentos, tal como se ha establecido ampliamente en hongos micorrízicos arbusculares y ectomicorrízicos. Nuestros resultados sugieren que la interacción repercute en mayor medida en la acumulación de materia seca en la parte aérea de la planta

en comparación a la acumulación de materia seca en la raíz. Lo anterior sugiere que el carbono fotoasimilado se destina en mayor proporción para la planta huésped y que la proporción destinada al suelo es en apariencia menor.

La estructura del suelo es crucial para el desarrollo de las plantas y la calidad en la estructura de suelo puede determinarse mediante el porcentaje de agregados estables en húmedo. El porcentaje de macroagregados estables en húmedo no presentó incremento en ningún tratamiento. En el caso de los HMA, se ha reportado que el efecto de diferentes especies de HMA en diferentes especies de plantas en la formación de macroagregados estables en agua no es significativo (Piotrowski *et al.* 2004), lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente experimento. En el caso del tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* y donde se inocularon *P. tinctorius*-*G. intraradices* en combinación, no existen antecedentes que documenten el efecto de dichos organismos en la formación y estabilidad de macroagregados. Si bien en la literatura existen investigaciones que han propuesto que tanto los microorganismos como la planta misma (Andrade *et al.* 1998, Bearden y Petersen 2000) participan activamente en la formación y estabilidad de macroagregados, los resultados del presente experimento muestran que en este caso, en particular ni los endófitos ni la planta huésped participan activamente en la formación de macroagregados en húmedo.

En el caso de los microagregados, el tratamiento donde se inoculó *G. intraradices* y donde se inocularon *P. tinctorius*-*G. intraradices* en combinación, fueron los únicos que incrementaron el porcentaje de estos agregados, siendo significativo el incremento sólo en el FG en comparación al tratamiento no inoculado. Andrade y colaboradores (1998) han sugerido que el peso seco de la raíz es una variable que influye en el porcentaje de agregados estables en húmedo. Sin embargo, en el caso de la presente investigación, las diferencias entre tratamientos en la formación de microagregados en húmedo no estuvieron asociadas a incrementos importantes en el peso seco de la raíz.

En el caso del carbono total en el suelo se encontró un incremento del mismo en los tratamientos en donde se inocularon los hongos micorrízicos tanto

en forma individual como coinoculados, pero sólo el tratamiento donde se inocularon *P. tinctorius*-*G. intraradices* en combinación, fue significativo en comparación al no inoculado. El carbono del suelo ha sido ampliamente vinculado con la estructura de suelo y más específicamente con los macroagregados (Puget *et al.* 2000, Bossuyt *et al.* 2002, Chevallier *et al.* 2004). Estos resultados muestran que si bien la interacción de *G. intraradices* y *P. tinctorius* contribuye de manera significativa en el aporte de carbono hacia el suelo, éste aumento no fue suficiente en el tiempo experimental para notar un efecto significativo en la formación y estabilización de macro o microagregados.

Por último sería importante señalar con base en los resultados obtenidos, que en los programas de revegetación en suelos deteriorados se puede utilizar la interacción *Fraxinus*-*P. tinctorius*-*G. intraradices* que podría proporcionar una mayor rentabilidad en términos de acumulación de biomasa.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados aquí muestran que el fresno (*Fraxinus* sp.) puede establecer asociación simbiótica con hongos ectomicorrízicos y endomicorrízicos y que estos organismos en interacción dual promueven en mayor medida el crecimiento de las plantas comparadas con los organismos inoculados de forma individual. El tratamiento donde se inoculó *G. intraradices* incrementó de forma significativa la formación de microagregados estables en agua. La interacción dual incrementó de forma significativa el carbono total de suelo en comparación con los organismos inoculados de forma individual. Los resultados hacen suponer que la inoculación de hongos endomicorrízicos y ectomicorrízicos solos y en interacción dual en plantas de fresno no mejoran la estructura de suelo de manera inmediata a pesar de incorporar carbono fotoasimilado al suelo en sus primeras etapas de crecimiento. Esta misma interacción aumenta el contenido de carbono mayoritariamente en la biomasa de la planta huésped. Sin embargo, se necesitan mayores estudios para conocer si la adición de otro tipo de organismos de la rizosfera puede contribuir a que la simbiosis estudiada tenga un efecto significativo en la agregación de suelos.

LITERATURA CITADA

- Allen, M.F.; Egerton-Warburton, L.M.; Allen, E.F.; Karen, O. 1999. Mycorrhizae in *Adenostoma fasciculatum* Hook. & Arn.: a combination of unusual ecto- and endo-forms. *Mycorrhiza*. 8(4):225-228.
- Andrade, G.; Mihara, K.L.; Linderman, R.G. y Bethlenfalvay, G.J. 1998. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant and Soil*. 202:89-96.
- Bearden, B.N.; Petersen, L. 2000. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of a vertisol. *Plant and Soil*. 218(1):173-183.
- Bossuyt, H.; Six, J.; Hendrix, P.F. 2002. Aggregated-protected carbon in no-tillage and conventional tillage agroecosystems using carbon-14 labeled plant residue. *Soil Science Society of American Journal*. 66:1965-1973.
- Chen, Y.L.; Brundrett, M.C.; Dell, B. 2000. Effects of ectomycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizas, alone or in competition, on root colonization and growth of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla*. *New Phytologist*. 146(3):545-555.
- Chevallier, T.; Blanchart, E.; Albrecht, A.; Feller, C. 2004. The physical protection of soil organic carbon in aggregates: a mechanism of carbon storage in a vertisol under pasture and market gardening (Martinique, West Indies). *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 103:375-387.
- Douds, D.D. y Chaney, W.R. 1982. Correlation of fungal morphology and development to host growth in a green ash mycorrhiza. *New Phytologist*. 92:519-526.
- Douds, D.D. y Chaney, W.R. 1986. The effect of high nutrients addition upon seasonal patterns of mycorrhizal development, host growth, and root phosphorus and carbohydrate content in *Fraxinus pennsylvanica* Marsh. *New Phytologist*. 103(1):91-106.
- Duponnois, R.; Diédhiou, S.; Chotte, J.L.; Ourey Sy, M. 2003. Relative importance of the endomycorrhizal and (or) ectomycorrhizal associations in *Allocasuarina* and *Casuarina* genera. *Can. J. Microbiol./Rev. Can. Microbiol.* 49(4): 281-287 (2003).
- Egerton-Warburton, L.; Allen, M.F. 2001. Endo and ectomycorrhizae in *Quercus*

- agrifolia* Nee. (Fagaceae): patterns of root colonization and effect on seedlings growth. *Mycorrhiza*. 11(6):283-290.
- Ek, H. 1997. The influence of nitrogen fertilization on the carbon economy of *Paxillus involutus* in ectomycorrhizal associations with *Betula pendula*. *New Phytologist*. 135:133-142.
- Elliott, E.T. 1986. Aggregate structure and carbon, nitrogen, and phosphorus in native and cultivated soils. *Soil Science Society of American Journal*. 50:627-633.
- Froni, L.; Minasian, H.; Volfovicz, R. 1999. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. *For. Ecol. Manage.* 115(1):41-47.
- Founoune, H.; Duponnois, R.; Ba, A.M. y Bouami, F. 2002. Influence of dual arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal symbiosis on the growth of *Acacia holosericea* (A. Cunn. Ex G. Don) in glasshouse conditions. *Ann. For. Sci.* 59:93-98.
- Jastrow, J.D.; Mieller, R.M.; Lussenhop, J. 1998. Contributions of interacting biological mechanisms to soil aggregate stabilization in restored prairie. *Soil Biology and Biochemistry*. 30:905-916.
- Jones, M.D.; Durall, D.M.; Tinker, P.B. 1998. A comparison of arbuscular and ectomycorrhizal *Eucalyptus coccifera*: growth response, phosphorus uptake efficiency and external hyphal production. *New Phytologist*. 140(1):125-134.
- Kendrick, B. 1985. *The fifth kingdom*. Mycologue Publications. Ontario, Canada. 364 p.
- Kemper, W.A. y Rosenau, R.C. 1986. Aggregate stability and size distribution. *Methods of soil analysis: Part 1- Physical and mineralogical methods*. 2a edición. Madison WI. 423-442.
- Lamar, R.T. y Davey, C.B. 1988. Comparative effectivity of Three *Fraxinus pennsylvanica* Marsh. Vesicular-Arbuscular mycorrhizal fungi in a high-phosphorus nursery soil. *New Phytologist*. 109(2):171-181.
- Oades, J.M. y Waters, A.G. 1991. Aggregated hierarchy in soils. *Australian Journal of Soil Research*. 29:815-828.
- Peng, S.; Eissenstat, D.M.; Graham, J.H.; Williams, K.; Hodge, N.C. 1993. Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply (Analysis of

- carbon costs). *Plant Physiology*. 101:1063-1071.
- Piotrowski, J.S.; Denich, T.; Klironomos, J.N.; Graham, J.M. y Rillig, M.C. 2004. The effects of arbuscular mycorrhizas on soil aggregation depend on the interaction between plant and fungal species. *New Phytol.* 164:365-373.
- Puget, P.; Chenu, C.; Balesdent, J. 2000. Dynamics of soil organic matter associated with particle-size fractions of water-stable aggregates. *European Journal of Soil Science*. 51:595-605.
- Ramanankierana, N.; Ducouso, M.; Rakotoarimanga, N.; Prin, Y.; Thioulouse, J.; Randrianjohany, E.; Ramaroson, L.; Kisa, M.; Galiana, A.; Duponnois, R. 2007. Arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas of *Uapaca bojeri* L. (*Euphorbiaceae*): sporophore diversity, patterns of root colonization, and effect of seedlings growth and soil microbial catabolic diversity. *Mycorrhiza*. 17:195-208.
- Simard, S.W.; Jones, M.D.; Durall, D.M.; Hope, G.D.; Stathers, R.J.; Sorensen, N.S.; Zimonick, B.J. 2003. Chemical and mechanical site preparation: effects on *Pinus contorta* growth, physiology and microsite quality on grassy, steps forest sites in British Columbia. *Canadian Journal of Forest Research*. 33:1495-1515.
- Sivakumar, M.V.K. 2007. Interactions between climate and desertification. *Agricultural and Forest Meteorology*. 142:143-155.
- Six, J.; Paustian, K.; Elliott, E.T. y Combrink, C. 2000. Soil structure and organic matter: I. Distribution of aggregate-size classes and aggregate-associated carbon. *Soil science society of american journal*. 64:681-689.
- Smith, S.F.; Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2ª Edición. Academic Press London. 605 p.
- Thornton, R.H.; Cowie, J.D.; McDonald, D.C. 1956. Mycelial aggregation on sand soil under *Pinus radiata*. *Nature*. 177:231-232.
- Tian, C.; He, X.; Zhong, Y.; Chen, J. 2003. Effect of inoculation with ecto- and arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* on the growth and nitrogen fixation by black locust, *Robinia pseudoacacia*. *New Forest*. 25:125-131.
- Tisdall, J.M. y Oades, J.M. 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *Canadian Journal of Soil Science*. 62:141-163.
- Treseder, K.K.; Allen, M.F. 2000. Mycorrhizal fungi have a potential role in soil

- carbon storage under elevated CO₂ and nitrogen deposition. *New Phytologist*. 147:189-200.
- Wallander, H.; Nilsson, L.O.; Hagerberg, D. ; Bååth, E. 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytologist*. 151:753-760.
- Wright, S.F. y Upadhyaya, A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Science*. 161:575-586.
- Wright, S.F. y Upadhyaya, A. 1998. A survey of soil for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. 198:97-107.
- Zhu, Y.G. y Miller, R.M. 2003. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi un soil-plant systems. *TRENDS in Plant Science*. 8:407-409.
- Wu, B.; Nara, K.; Hogetsu, T. 2002. Spatiotemporal transfer of carbon-14-labelled photosynthate from ectomycorrhizal *Pinus densiflora* seedlings to extraradical mycelia. *Mycorrhiza*. 12:83-88.

CAPÍTULO II

EFFECTO DE LA INTERACCIÓN *Alnus*-Ectomicorriza-Endomicorriza SOBRE EL CRECIMIENTO DE LA PLANTA Y FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE AGREGADOS DEL SUELO.

RESUMEN

Las especies del género *Alnus* cuentan con una gran distribución en el territorio mexicano y han sido ampliamente estudiadas en su habilidad para fijar nitrógeno atmosférico, pero poco se ha estudiado sobre el efecto de hongos micorrízicos arbusculares y ectomicorrízicos aplicados de forma individual y en interacción dual en plantas de aile (*Alnus* sp.). En el presente ensayo se estableció un experimento en cámara de crecimiento con la finalidad de observar el efecto de *Glomus intraradices* y *Pisolithus tinctorius*, inoculados de manera individual y en coinoculación, en el crecimiento de la planta y formación de agregados del suelo. *G. intraradices* inoculado de forma individual incrementó de forma significativa el área foliar y decreció significativamente el carbono total de suelo. Mientras que en el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* se observaron incrementos significativos en comparación al tratamiento no inoculado en todas las variables de crecimiento evaluadas y en la formación de macroagregados de suelo. Por otra parte, la interacción dual presentó un efecto significativo en todas las variables de crecimiento en comparación al tratamiento no inoculado. Estos resultados sugieren que la interacción dual favorece en mayor medida la distribución de carbono asimilado hacia la planta. Además con este estudio se puede observar que el incremento en el carbono del suelo se favorece a corto plazo la formación de macroagregados sólo en presencia de *P. tinctorius*.

ABSTRACT

The species of *Alnus* have presence in all the Mexican territory and have been studied in their ability to fix nitrogen, but little have been studied about the effect the endo and ectomycorrhizal fungi when are applied individually and in dual interaction on alder seedlings (*Alnus* sp.). In this study, the experimental units were established in growth chamber to observe the effect of *Glomus intraradices* and *Pisolithus tinctorius*, inoculated individually or in interaction, on the plant growth, water stable soil aggregates formation, and soil total carbon. *G. intraradices* individually inoculated increased significant on leaf area as well as a reduction on soil total carbon, as compared with the non inoculated treatment, while for the *P. tinctorius* individually inoculated, significant increases were observed on all growing variables evaluated and in the water stable macroaggregates, as compared with the non inoculated treatment. The soil total carbon in the treatment with *P. tinctorius* was higher than non-inoculated treatment. The dual interaction *G. intraradices*-*P. tinctorius* showed significant effect on plant growing variables, as compared with the non-inoculated treatment. In addition with this study it is possible to be observed that the increase in the soil total carbon favors short term the macroaggregates formation in presence of *P. tinctorius*.

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento forestal es una actividad que puede cambiar la estructura de la población vegetal, la estructura de los hongos micorrízicos, las propiedades físicas del suelo y la entrada de carbono orgánico al suelo (Jones *et al.* 2003). Los aspectos relevantes en el cambio de la estructura de la vegetación, son que puede variar la edad de las plantas presentes en el sitio y que pueden aparecer hierbas, arbustos y especies que son potencialmente de vegetación secundaria. Las especies del género *Alnus* se han considerado como plantas de vegetación secundaria y se ha observado que cuentan con la habilidad de fijar nitrógeno atmosférico, lo cual ha sido ampliamente documentado. El *Alnus* se puede encontrar ampliamente distribuido en México, es de rápido crecimiento, puede ayudar a controlar la erosión (Grau 1985) y cuenta con la capacidad de formar simbiosis con hongos endotróficos y ectotróficos (Molina 1981, Nourra *et al.* 2003, Pritsch *et al.* 1997, Becerra *et al.* 2002). Por lo tanto, puede ser una planta que podría mitigar los efectos adversos que trae consigo la pérdida de biomasa forestal.

Por otro lado, los hongos tanto endo como ectomicorrízicos han sido caracterizados como organismos que pueden presentarse en la mayoría de los ecosistemas naturales (Smith y Read 1997) y primordialmente en sitios donde la estructura micorrízica sufre cambios por el cambio de uso de suelo. El conocimiento del efecto de estos hongos bajo dichas condiciones es de vital importancia para emprender prácticas de revegetación-reforestación más eficaces. Existen muchos trabajos que han observado el efecto de los hongos micorrízicos arbusculares y ectomicorrízicos sobre su planta hospedera inoculados de forma individual, pero la participación de la interacción dual en especies características de vegetación secundaria es escasa. En este sentido, sólo se han limitado a identificar su presencia en las raíces de algunas plantas (Allen *et al.* 1999, Frioni *et al.* 1999).

El estudio de los hongos endo y ectomicorrízicos en asociación con plantas de aile ha sido enfocado a evaluar su efecto en la fijación biológica de nitrógeno (Miller *et al.* 1992, Jha *et al.* 1993). Sin embargo, su contribución en la agregación

del suelo y en el contenido de carbono orgánico en asociación con plantas de aile se desconoce por completo.

La estructura del suelo (estabilidad de agregados) es un aspecto trascendental cuando se habla de fertilidad del suelo. La toma de conciencia sobre la importancia de esta propiedad física se remonta a mediados del siglo XX. Los primeros trabajos que lo documentan hacen mención de los agregados en plantas de pino (Thornton *et al.* 1956) y esta propiedad tomó importancia en ecosistemas agrícolas. Sin embargo, es necesario ampliar los estudios hacia la estructura de suelo y a las variables que la afectan en zonas de aprovechamiento forestal, ya que puede representar el inicio de la degradación de los ecosistemas forestales. Además, las técnicas actuales de aprovechamiento forestal generan cambios estructurales de la vegetación, apareciendo especies de plantas que se asocian simbióticamente con hongos micorrízicos arbusculares más que el predominio de las asociaciones con hongos ectomicorrízicos, por lo que es importante el efecto de estos hongos en las propiedades del suelo.

A partir del conocimiento sobre la formación de los agregados del suelo se ha logrado identificar que el carbono incrementa en relación al tamaño de los agregados y que el carbono recientemente adicionado al suelo se incorpora en mayor medida en los macroagregados (Elliott 1986). Además, se ha propuesto que el carbono fotoasimilado por el hospedero se puede incorporar como carbono orgánico al suelo a través del micelio externo de hongos micorrízicos. Este carbono fotoasimilado puede variar grandemente, pero en el caso de hongos micorrízicos arbusculares se ha observado que se destina alrededor de un 20 % (Peng *et al.* 1993), mientras que en el caso de hongos ectomicorrízicos el carbono destinado para el hongo puede ser superior al 7 % del carbono fijado por el hospedero (Rygiewicz y Anderson 1994). Sin embargo, el conocimiento sobre el efecto de los hongos micorrízicos al aporte de carbono orgánico al suelo es desconocido, por lo que existe la necesidad de obtener conocimiento a este respecto.

La utilización de plantas nativas para mejorar las propiedades del suelo

deteriorado es una práctica ampliamente documentada. Sin embargo, esta práctica es una estrategia insuficiente para la rehabilitación de los ecosistemas forestales que han sido deteriorados. Además, existe poca información sobre una alternativa efectiva para rehabilitar dichos ecosistemas, por lo que es importante conocer la contribución de diferentes simbiosis mutualistas para hacer frente a esta problemática. En este sentido, puede representar un sistema interesante de estudio para entender estas interacciones. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende evaluar el efecto sinérgico de la interacción *Alnus*-Ectomicorriza-Endomicorriza sobre la estabilidad de agregados del suelo y contenido de carbono total del suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la producción de plántulas de *Alnus* sp. se utilizó semilla recolectada en la ciudad de Morelia en el mes de octubre de 2005, sometiéndolas a un proceso de esterilización superficial con peróxido de hidrógeno al 10 % (v:v) en agitación constante durante 30 min. Las semillas se pusieron a germinar en charolas conteniendo como sustrato vermiculita pasteurizada y después de 15 días se alcanzó la totalidad de semillas germinadas.

Las plántulas de las charolas de germinación se pasaron a bolsas de plástico, las cuales fueron llenadas con 450 g de suelo mineral procedente de la microcuenca de la Joya dentro del municipio de Morelia, Michoacán. El suelo se tamizó en el sitio de colecta con una malla de 5 mm de abertura y posteriormente se sometió a un proceso de pasteurización bajo las siguientes condiciones: 121 °C, 1.05 kg/cm² de presión, por un periodo de 15 minutos durante 3 días consecutivos. Las plántulas fueron colocadas en cámara de crecimiento bajo condiciones de 25 °C, 75 % de humedad relativa y 14 horas luz de foto-periodo.

La inoculación de las plántulas se llevó a cabo al momento del transplante. El hongo endomicorrízico *Glomus intraradices* fue aplicado en una suspensión de fitagel al 0.2 %, recibiendo cada plántula un promedio de 80 esporas, mientras que el hongo ectotrófico *Pisolithus tinctorius*, las esporas fueron aplicadas en una solución de agua destilada estéril, recibiendo en promedio 1×10^8 esporas por

planta. El experimento contó con 4 tratamientos los cuales fueron *Alnus* sp. como control, *Alnus* sp.-*P. tinctorius*, *Alnus* sp.-*G. intraradices* y *Alnus* sp.-*G. intraradices*-*P. tinctorius*. Después de 12 semanas de que las plántulas de aile se colocaron en macetas bajo las condiciones antes mencionadas, se procedió a evaluar los tratamientos, tomando 5 plántulas por tratamiento. Las variables que se consideraron para su evaluación fueron el peso seco de la parte aérea (PSPA), peso fresco de la parte aérea (PFPA), peso fresco de la raíz (PFR), peso seco de la raíz (PSR), área foliar (AF), estabilidad de agregados del suelo y carbono total de suelo.

El área foliar (AF) se determinó mediante las fotos foliares tomadas de cada planta con una cámara digital FinePix de 3.2 mega píxeles, con el uso de un software (Image J versión 4.1). La estabilidad de agregados se realizó bajo la técnica de Kemper y Rosenau (1986), determinándose la fracción de macroagregados (mayor a 1 mm) y microagregados (menor a 1 mm y mayor a 0.125 mm). Para el porcentaje de carbono total de suelo se tomó una muestra de cada maceta y se secó al aire libre a temperatura ambiente. Una vez que la muestra estaba seca se pasó por un molino (Restsch MM200) con una frecuencia de 30/s durante 2 min. y el suelo molido se colocó en un horno a 60 °C durante 24 hr para eliminar la humedad restante y hacer la determinación de carbono en un cromatógrafo de gases (Flash EA 1112 series). El análisis estadístico se realizó mediante la utilización de un diseño completamente al azar con 5 repeticiones por tratamiento y con ayuda del programa de estadística Assistat (2005).

RESULTADOS

Los valores promedio correspondientes para las variables de crecimiento evaluadas se presentan en la cuadro 1, observándose un aumento en los tratamientos inoculados con los hongos tanto en forma individual como en coinoculación en relación al no inoculado. De las variables de crecimiento consideradas, el área foliar fue la más sensible a la presencia de los hongos micorrízicos, mientras que los tratamientos donde se inoculó *P. tinctorius* y donde se inoculó *P. tinctorius* y *G. intraradices* en interacción, fueron los que aumentaron

en mayor medida las diferentes variables de crecimiento. El tratamiento donde se inoculó *G. intraradices* también presentó incremento en las variables de crecimiento, aunque no fue estadísticamente significativo en comparación al tratamiento no inoculado.

Cuadro 1. Valores promedio de las variables de crecimiento en las plantas de aile (*Alnus* sp.) en los tratamientos inoculados en forma individual y en interacción dual.

Tratamiento	AF (cm ²)	PFPA (g)	PSPA (g)	PFR (g)	PSR (g)
No inoculado	7.0 ^b	0.07 ^b	0.025 ^b	0.11 ^b	0.003 ^b
<i>Glomus intraradices</i>	19.4 ^a	0.16 ^{ab}	0.022 ^b	0.42 ^{ab}	0.008 ^{ab}
<i>Pisolithus tinctorius</i>	26.2 ^a	0.26 ^a	0.045 ^{ab}	0.65 ^a	0.017 ^a
<i>P. tinctorius-G. intraradices</i>	29.0 ^a	0.32 ^a	0.077 ^a	0.45 ^{ab}	0.018 ^a

AF = Área foliar; PFPA y PFR = Peso fresco de la parte aérea y de la raíz; PSPA y PSR = Peso seco de la parte aérea y de la raíz. Los tratamientos seguidos por la misma letra no son diferentes estadísticamente.

En el caso del tratamiento en donde se inoculó *G. intraradices* se observaron valores de 2.7, 2.2 y -1.5 veces en el área foliar, peso fresco y seco de la parte aérea respectivamente en comparación al tratamiento no inoculado. Por otra parte, en el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* se presentaron incrementos del orden de 3.7, 3.7 y 1.8 veces en el área foliar, peso fresco y seco de la parte aérea respectivamente en comparación al tratamiento no inoculado y en el tratamiento en donde se inocularon en interacción *P. tinctorius-G. intraradices* el incremento fue de 4.1, 4.5 y 3.0 veces en el área foliar, peso fresco y seco de la parte aérea respectivamente en comparación al no inoculado.

En el caso de las variables evaluadas en raíz se observaron incrementos en todos los tratamientos, pero sólo fue estadísticamente significativo el aumento en el peso fresco y seco de raíz en el tratamiento en donde se inoculó *P. tinctorius* y en el peso seco de raíz en el tratamiento donde se inocularon *P. tinctorius-G. intraradices*, en ambos casos en comparación al tratamiento no inoculado.

Dentro de las variables físicas del suelo se determinó la formación de agregados del suelo (Cuadro 2). En el caso de los macroagregados se pudo

observar una diferencia estadística significativa en el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* en comparación al tratamiento no inoculado. El aumento en la estabilidad de macroagregados en este tratamiento fue del 1.3 veces en comparación al no inoculado.

Cuadro 2. Volares promedio para macro y microagregados del suelo y carbono total de suelo en los tratamientos inoculados de forma individual y en interacción dual.

Tratamiento	MacroH (%)	MicroH (%)	C suelo (%)
No inoculado	36.9 ^b	32.1 ^{ab}	2.45 ^{ab}
<i>Glomus intraradices</i>	40.8 ^{ab}	31.6 ^{ab}	2.00 ^c
<i>Pisolithus tinctorius</i>	51.0 ^a	26.4 ^b	2.70 ^a
<i>P. tinctorius-G. intraradices</i>	37.4 ^b	42.8 ^a	2.23 ^{bc}

MacroH = Macroagregados en húmedo; MicroH = Microagregados en húmedo; C suelo = Carbono total de suelo. Los tratamientos seguidos por la misma letra no son diferentes estadísticamente.

En el caso de los tratamientos en donde se inoculó *G. intraradices* y la interacción dual, los aumentos en la estabilidad de macroagregados no fueron estadísticamente significativos en comparación al tratamiento no inoculado. Por otra parte, en los valores obtenidos para microagregados se observa una disminución de los microagregados en el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius*, aunque no fue estadísticamente significativo en comparación al tratamiento no inoculado. El otro tratamiento que influyó en la estabilidad de los microagregados fue el tratamiento en donde se inocularon *P. tinctorius* y *G. intraradices*, aunque no fue estadísticamente significativo el incremento en comparación al tratamiento no inoculado.

En relación a los valores observados para el carbono total del suelo se tiene que el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* fue el único tratamiento en el que se observó un incremento en el carbono del suelo. A pesar de que el tratamiento en donde se inoculó *P. tinctorius* se observó un incremento del un 10 % no fue estadísticamente significativo en comparación al tratamiento no inoculado. En el caso del tratamiento donde se inoculó *G. intraradices* y el tratamiento en donde se inocularon *P. tinctorius* y *G. intraradices* se observó una disminución importante en comparación al tratamiento no inoculado del orden de

22 y 10 % respectivamente, siendo estadísticamente significativa la disminución del carbono en el suelo para el tratamiento en donde se inoculó *G. intraradices* en comparación con el tratamiento no inoculado. Con base en los resultados obtenidos se puede observar que el contenido de carbono en el suelo se podría relacionar de mejor manera con la formación y estabilidad de macroagregados del suelo.

DISCUSIÓN

En general los hongos micorrízicos inoculados en plantas de aile en el presente trabajo, tanto en forma individual como en coinoculación, incrementaron las variables de crecimiento vegetal evaluadas. La aplicación de *Glomus intraradices* influyó en las variables de crecimiento de las plantas tal como se ha observado en otros experimentos (Jha *et al.* 1993, Monzón y Azcón 2001). Los HMA son organismos que han sido ampliamente reconocidos por su influencia en el crecimiento de su planta hospedera, debido a una mayor disponibilidad de nutrientes que permiten incorporar a las plantas, especialmente fósforo. Sin embargo, en este experimento el hongo micorrízico arbuscular no influyó en la acumulación de materia seca, lo cual se podría explicar en función de que *Glomus* es un hongo obligado (Allen *et al.* 2003, Lerat *et al.* 2003).

La utilización de hongos ectomicorrízicos en asociación con plantas de *Alnus* ha sido poco descrita, sin embargo, en el presente trabajo se tuvo un aumento significativo del tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* en comparación al tratamiento no inoculado en las variables de crecimiento evaluadas. Existen datos que describen un aumento en algunas variables de crecimiento en plantas de aile en asociación con *Alpova diplophloeus* (Miller *et al.* 1992, Yamanaka *et al.* 2003), lo cual coincide con los resultados del presente experimento. Los hongos ectotróficos tienen la capacidad de producir una gran cantidad de micelio externo (Marschner y Dell 1994), explorando una mayor cantidad de suelo y penetrando en los poros inaccesibles para la raíz (Brandes *et al.* 1998), lo cual trae como consecuencia una mayor disponibilidad de nutrientes para su planta hospedera.

En el caso del tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius-G. intraradices* presentó un aumento significativo en el AF, PFPA y PSPA en las plantas de aile en comparación al tratamiento no inoculado. Se ha observado en diferentes especies el efecto benéfico de la simbiosis dual con hongos endo y ectomicorrízicos (Chatarpaul *et al.* 1989, Chen *et al.* 2000, Founoune *et al.* 2002, Duponnois *et al.* 2003, Tian *et al.* 2003), lo cual coincide con el presente experimento. El mayor crecimiento de las plantas por la presencia de hongos micorrízicos debido al aumento en la disponibilidad de nutrientes. En este sentido, Founoune y colaboradores (2002) observaron un aumento en el contenido de nitrógeno foliar en un tratamiento dual. Cuando se logra tener una situación óptima de nutrientes, la planta destina en su mayoría los fotoasimilados para la parte aérea (Giardina *et al.* 2003), por lo tanto el efecto sinérgico de la interacción dual podría ser por una adecuada disponibilidad de nutrientes. Si bien estas interacciones parecen tener influencia en el crecimiento de la planta, es importante conocer su participación en otros aspectos como estructura y carbono total de suelo.

La estructura del suelo es crucial para el desarrollo de las plantas y se evalúa en parte, mediante la determinación del porcentaje de agregados estables en húmedo. La estabilidad de macroagregados y microagregados se vio afectada en mayor proporción por el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* en el primer caso y por el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius-G. intraradices* en el segundo caso. Caravaca y colaboradores (2002) encontraron un aumento en la estabilidad de agregados del suelo utilizando plantas de *Pinus* en asociación con *Pisolithus arizus*, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius*. En relación a la interacción dual se desconoce su influencia en la formación de agregados del suelo.

Dentro de las variables que podrían afectar la agregación de suelo, se encuentra el volumen de raíz. Sin embargo, este factor es controversial ya que algunos autores han encontrado una correlación entre agregados y volumen de raíz (Andrade *et al.* 1998, Bearden y Petersen 2000), mientras que otros no han encontrado dicha correlación (Eviner y Chapin 2002). En los resultados del

presente experimento tampoco se encontró tal correlación (datos no mostrados).

Otro aspecto que puede estar relacionado con la estabilidad de agregados del suelo es el micelio y algunas sustancias secretadas por el mismo. En este contexto, se ha mostrado que el micelio externo de hongos micorrízicos arbusculares puede afectar la estabilidad de agregados del suelo (Tisdall 1991, Hamel *et al.* 1997, Schreiner *et al.* 1997, Bethlenfalvay *et al.* 1999, Wrigth *et al.* 1999, Bearden y Petersen 2000, Augé *et al.* 2001, Requena *et al.*, 2001, Rillig *et al.* 2002). Sin embargo, en el tratamiento en donde se aplicó *Glomus intraradices* no se observó un aumento significativo en la estabilidad de estos agregados.

Por otra parte el hongo ectomicorrízico ha sido clasificado como un hongo que presenta un micelio de tipo exploratorio a grandes distancias (Agerer 2001), por lo que esta característica podría hacerlo participe en la mayor estabilidad de macroagregados del suelo en el presente estudio. Al igual que los hongos micorrízicos arbusculares, los ectomicorrízicos producen micelio externo y sustancias que podrían participar como agentes de adhesión entre partículas de suelo llamadas hidrofobinas (Kershaw y Talbot 1998, Linder *et al.* 2002, Mankel *et al.* 2002, de Vocht *et al.* 2002). La importancia de la estabilidad de macroagregados radica en que le ofrece el tiempo adecuado al carbono para que se una a las partículas minerales y evitar con ello su mineralización (Balabane y Plante 2004).

Los resultados obtenidos en los tratamientos donde se inoculó *G. intraradices* y el tratamiento en donde se inoculó *P. tinctorius-G. intraradices* muestran una reducción en el carbono total del suelo del 22 y 10 % respectivamente. Estos hallazgos muestran la desventaja que podría traer la utilización de *G. intraradices* en suelos con un contenido carbono total por arriba del 2 %. Esta suposición es respaldada por los resultados obtenidos por Read y Pérez-Moreno (2003). Estos autores encontraron que los HMA son organismos dominantes bajo suelos minerales con baja proporción de materia orgánica y fuentes de nitrógeno y fósforo inorgánicos. Caso contrario sucede con el hongo ectomicorrízico, puesto que incrementó el contenido de carbono total en un 10 %

en comparación al tratamiento no inoculado. Se ha observado que la entrada de carbono al suelo mediante el micelio externo puede representar hasta un 1.6 % (Högberg y Högberg 2002). Este tipo de hongos suele presentarse en sitios en donde existe un contenido de materia orgánica alta y presencia de fuentes orgánicas e inorgánicas de nitrógeno y fósforo (Read y Pérez-Moreno 2003). Por lo tanto, las condiciones del presente experimento influyeron en la incorporación de carbono asimilado vía el micelio extraradicular al suelo.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el aile (*Alnus* sp.) puede establecer asociación simbiótica con hongos ectomicorrízicos y endomicorrízicos y que estos organismos en interacción dual promueven en mayor medida el crecimiento de las plantas comparadas con los organismos inoculados de forma individual. El tratamiento con inoculación individual en el que se observaron los mayores incrementos en las variables de crecimiento fue el tratamiento en donde se inoculó *G. intraradices*. El tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* fue el tratamiento que incrementó de forma significativa la formación de macroagregados estables en agua. En el tratamiento con la interacción dual incrementó de forma significativa la acumulación de materia seca en la parte aérea. Los resultados hacen suponer que la inoculación de hongos endomicorrízicos y ectomicorrízicos en interacción dual en plantas de aile (*Alnus* sp.) no mejora la estructura de suelo en un corto plazo, pero sí se observa la influencia de esta interacción a nivel biomasa de la planta huésped y en el contenido de carbono de suelo. Sin embargo, se necesitan mayores estudios para conocer si la adición de otro tipo de organismos de la rizosfera puede contribuir a que la simbiosis estudiada tenga un efecto significativo en la agregación de suelos.

LITERATURA CITADA

- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae: A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza*. 11:107-114.
- Allen, M.F.; Egerton-Warburton, L.M.; Allen, E.F.; Karen, O. 1999. Mycorrhizae in *Adenostoma fasciculatum* Hook. & Arn.: a combination of unusual ecto- and endo-forms. *Mycorrhiza*. 8(4):225-228.
- Allen, M.F.; Swenson, W.; Querejeta, J.I.; Egerton-Warburton, L.M.; Treseder, K.K. 2003. Ecology of mycorrhizae: A conceptual framework from complex interactions among plant and fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:271-303.
- Andrade, G.; Mihara, K.L.; Linderman, R.G. y Bethlenfalvay, G.J. 1998. Soil aggregation status and rhizobacteria in the mycorrhizosphere. *Plant and Soil*. 202:89-96.
- Augé, R.M.; Stodola, A.J.W.; Tims, J.E.; Saxton, A.M.. 2001. Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil*. 230(1):87-97.
- Balabane, M. y Plante, A.F. 2004. Aggregation and carbon storage in silty soil using physical fractionation techniques. *European Journal of Soil Science*. 55:415-427.
- Bearden, B.N.; Petersen, L. 2000. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of a vertisol. *Plant and Soil*. 218(1):173-183.
- Becerra, A.; Daniele, G.; Dominguez, L.; Nouhra, E.; Horton, T. 2002. Ectomycorrhizae between *Agnus acuminata* H.B.K. and *Naucoria escharoides* (Fr.:Fr.) Kummer from Argentina. *Mycorrhiza*. 12:61-66.
- Bethlenfalvay, G.J.; Cantrell, I.C.; Mihara, K.L.; Schreiner, R.P. 1999. Relationships between soil aggregation and mycorrhizae as influenced by soil biota and nitrogen nutrition. *Biology and Fertility of Soil*. 28(4):356-363.
- Brandes, B.; Godbold, D.L.; Kuhn, A.J. y Jentschke, G. 1998. Nitrogen and phosphorus acquisition by the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and its effect on host nutrition. *New Phytol.* 140:735-743.
- Caravaca, F.; García, C.; Hernández, M.T. y roldan, A. 2002. Aggregate stability after organic amendment and mycorrhizal inoculation in the afforestation of a semiarid site with *Pinus halapensis*. *Applied Soil Ecology*. 19:199-208.

- Chatarpaul, L.; Chakravarty, P.; Subramaniam, P. 1989. Studies in tetrapartite symbioses. I. Role of ecto- and endomycorrhizal fungi and *Frankia* on the growth performance of *Alnus incana* Plant and Soil. 118:145-150.
- Chen, Y.L.; Brundrett, M.C.; Dell, B. 2000. Effects of ectomycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizas, alone or in competition, on root colonization and growth of *Eucalyptus globulus* and *E. urophylla*. New Phytologist. 146(3):545-555.
- de Vocht, M.L.; Reviakine, I.; Jongsma-Schutter, W.; Wösten, H.A. B.; Vogel, H.; Brisson, A.; Wessels, J.G.H. y Robillard, G.T. 2002. Self-assembly of the hydrophobin SC3 proceeds via two structural intermediates. Protein Science. 11:1199-1205.
- Duponnois, R.; Diédhiou, S.; Chotte, J.L.; Ourey Sy, M. 2003. Relative importance of the endomycorrhizal and (or) ectomycorrhizal associations in *Allocasuarina* and *Casuarina* genera. Can. J. Microbiol./Rev. Can. Microbiol. 49(4): 281-287 (2003).
- Elliott, E.T. 1986. Aggregate structure and carbon, nitrogen, and phosphorus in native and cultivated soils. Soil Science Society of American Journal. 50:627-633.
- Eviner, V.T. y Chapin, F.S. 2002. The influence of plant species, fertilization and elevated CO₂ on soil aggregate stability. Plant and Soil. 246:211-219.
- Frioni, L.; Minasian, H.; Volfovicz, R. 1999. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. For. Ecol. Manage. 115(1):41-47.
- Founoune, H.; Duponnois, R.; Ba, A.M. y Bouami, F. 2002. Influence of dual arbuscular endomycorrhizal/ectomycorrhizal symbiosis on the growth of *Acacia holosericea* (A. Cunn. Ex G. Don) in glasshouse conditions. Ann. For. Sci. 59:93-98.
- Giardina, C.P.; Ryan, M.G.; Binkley, D.; Fownes, J.H. 2003. Primary production and carbon allocation in relation to nutrient supply in a tropical experimental forest. Global Change Biology. 9:1438-1450.
- Grau, A. 1985. La expansión del aliso del cerro (*Agnus acuminata* H.B.K. Subs. *acuminata*) en el noroeste de Argentina. Lilloa 36:237-247.
- Hamel, C.; Dalpé, Y.; Furlan, V.; Parent, S. 1997. Indigenous populations of

- arbuscular mycorrhizal fungi and soil aggregate stability are major determinants of leek (*Allium porrum* L.) response to inoculation with *Glomus intraradices* Schenck & Smith or *Glomus versiforme* (Karsten) Berch. *Mycorrhiza*. 7(4):187-196.
- Högberg, M.N. y Högberg, P. 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist*. 154:791-795.
- Jha, D.K.; Sharma, G.D. y Mishra, R.R. 1993. Mineral nutrition in the tripartite interaction between *Frankia*, *Glomus* and *Alnus* at different soil phosphorus regimes. *New Phytol.* 123:307-311.
- Jones, M.D.; Durall, D.M.; Cairney, J.W.G. 2003. Ectomycorrhizal fungal communities in young forest stands regenerating after clearcut logging. *New Phytologist*. 157:399-422.
- Kemper, W.A. y Rosenau, R.C. 1986. Aggregate stability and size distribution. *Methods of soil analysis: Part 1- Physical and mineralogical methods*. 2a edición. Madison WI. 423-442.
- Kershaw, M.J. y Talbot, N.J. 1998. Hydrophobins and repellents: Proteins with fundamental roles in fungal. *Fungal Genetics and Biology*. 23:18-33.
- Lerat, S.; Lapointe, L.; Piché, Y. y Vierheilig, H. 2003. Variable carbon-sink strength of different *Glomus mosseae* strains colonizing barley roots. *Can. J. Bot.* 81:886-889.
- Linder, M.; Szilvay, G.R.; Nakari-Setälä, T.; Söderlund, H. y Penttilä, M. 2002. Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobin HFBI and HFBI from *Trichoderma reesei*. *Protein Science*. 11:2257-2266.
- Mankel, A.; Krause, K. y Kothe, E. 2002. Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. *Applied and Environ. Microbiol.* 68:1408-1413.
- Marschner, H. y Dell, B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil*. 159:89-102.
- Miller, S.L.; Koo, C.D.; Molina, R. 1992. Early colonization of red alder and glass fir by ectomycorrhizal fungi and *Frankia* in soils from the Oregon coast range. *Mycorrhiza*. 2:53-61.

- Molina, R. 1981. Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*. *Can. J. Bot.* 59:325-334.
- Monzón, A.; Azcón, R. 2001. Growth responses and N and P use efficiency of three *Alnus* species as affected by arbuscular-mycorrhizal colonization. *Plant Growth Regulation.* 35(1):97-104.
- Nouhra, E.; Dimínguez, L.; Becerra, A.; Mangeaud, A. 2003. Colonización Micorrícica y Actinorrícica en Plantines de *Alnus acuminata* (Betulaceae) Cultivados en Suelos Nativos de *Alnus rubra*. *Mycology.* 38(3-4).
- Peng, S.; Eissenstat, D.M.; Graham, J.H.; Williams, K. y Hodge, N.C. 1993. Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply. *Plant physiol.* 101:1063-1071.
- Pritsch, K.; Boyle, H.; MURah, J.C.; Buscot, F. 1997. Characterization and identification of black alder ectomycorrhizas by PCR/RFLP analyses of the rDNA internal transcribed spacer (ITS). *The New Phytologist.* 137(2):357.
- Read, D.J. y Pérez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems- a journey to towards relevance?. *New Phytologist.* 157:475-492.
- Requena, N.; Perez-Solis, E.; Azcón-Aguilar, C.; Jeffries, P; Barea, J.M. 2001. Management of indigenous plant-microbe symbiosis aids restoration of desertified ecosystems. *Applied Environmental Microbiology.* 67(2):495-498.
- Rillig, M.C.; Writh, S.F.; Eviner, V. 2002. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. *Plant soil.* 238:325-333.
- Rygiewicz, P.T. y Andersen, C.P. 1994. Mycorrhizae alter quality and quantity of carbon allocation bellow ground. *Nature.* 369:58-60.
- Schreiner, R.P.; Mihara, K.L.; McDaniel, H.; Bethlenfalvay, G.J. 1997. Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant and Soil.* 188(2):199-209.
- Smith, S.F.; Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis.* 2ª Edición. Academic Press London. 605 p.
- Thornton, R.H.; Cowie, J.D.; McDonald, D.C. 1956. Mycelial aggregation on sand soil under *Pinus radiata*. *Nature.* 177:231-232.

- Tian, C.; He, X.; Zhong, Y.; Chen, J. 2003. Effect of inoculation with ecto- and arbuscular mycorrhizae and *Rhizobium* on the growth and nitrogen fixation by black locust, *Robinia pseudoacacia*. *New Forest*. 25:125-131.
- Tisdall, J.M. 1991. Fungal hyphae and structural stability of soil. *Australian Journal of Soil Research*. 29:729-743.
- Wright, S.F.; Starr, J.L.; Paltineanu, I.C. 1999. Changes in Aggregate Stability and Concentration of Glomalin during Tillage Management Transition. *Soil Science Society of America Journal* 63:1825-1829.
- Yamanaka, T.; Li, C.Y.; Bormann, B. y Okabe, H. 2003. Tripartite associations in an alder: effects of *Frankia* and *Alpova diplophloeus* on the growth, nitrogen fixation and mineral acquisition of *Alnus tenuifolia*. *Plant and Soil*. 00:1-8.

DISCUSIÓN

Las especies del género *Alnus* tienen la habilidad de asociarse simbióticamente con hongos ecto y endomicorrízicos, mientras que las especies de *Fraxinus* se han reportado como plantas que logran establecer asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos arbusculares (Douds y Chaney 1986, Lamar y Davey 1988). Sin embargo, este es el primer trabajo que muestra la habilidad de *Fraxinus* sp. para establecer una relación simbiótica con hongos ectomicorrízicos. *G. intraradices* inoculado de forma individual produjo incrementos en la mayoría de las variables determinadas en ambas especies en comparación al tratamiento no inoculado. Tales incrementos coinciden con los trabajos donde se observa un aumento en las variables de crecimiento por la aplicación de hongos micorrízicos arbusculares (Douds y Chaney 1982, Lamar y Davey 1988, Jha *et al.* 1993, Monzón y Azcón 2001). En el tratamiento con aile donde se inoculó *G. intraradices* no se observó un aumento en el peso seco de la parte aérea, lo cual podría ser por el hecho de que este hongo se ha catalogado como un organismo obligado (Allen *et al.*, 2003) que adquiere todo el carbono necesario par su desarrollo de su planta huésped (Peng *et al.* 1993, Lerat *et al.* 2003). En el caso del aile, el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* presentó un incremento significativo en comparación al tratamiento no inoculado en las variables de crecimiento, lo cual coincide con los reportes donde observan un incremento en el crecimiento por la presencia de un hongo ectomicorrízico (Miller *et al.* 1992).

Hasta la fecha no se ha documentado el efecto de de la interacción de *P. tinctorius* y *G. intraradices* en plantas de fresno. En el caso de de las plantas de aile se ha observado la presencia de hongos endo y ectomicorrízicos en un mismo segmento de raíz. Sin embargo los resultados con ambas especies de plantas, coinciden con los trabajos que han valorado el efecto de la interacción dual en otras especies (Jones *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2000; Egerton-Warburton y Allen, 2001; Founoune *et al.*, 2002; Ramanankierana *et al.*, 2007). El incremento en el peso fresco y seco de la parte aérea podría ser el resultado del aporte de nutrimentos, tal como se ha establecido ampliamente en hongos micorrízicos arbusculares y ectomicorrízicos. Estos resultados sugieren que la interacción repercute en mayor medida en la acumulación de materia seca en la parte aérea

de la planta en comparación a la acumulación de materia seca en la raíz. Lo anterior sugiere que el carbono fotoasimilado se destina en mayor proporción para la parte aérea de la planta huésped y que la proporción destinada al suelo es menor.

El porcentaje de macroagregados estables en húmedo en el tratamiento de aile inoculado con *P. tinctorius* presentó un incremento significativo en comparación con el tratamiento no inoculado. Estos resultados coinciden con el incremento en la formación de macroagregados utilizando plantas de pino inoculadas con *Pisolithus arizus* (Caravaca *et al.* 2002). Sin embargo, el conocimiento sobre la contribución de los hongos ectomicorrízicos en la formación de macroagregados del suelo es escasa. En el caso de los HMA, se ha descrito que el efecto de diferentes HMA en diferentes especies de plantas en la formación de macroagregados estables en agua no es significativo (Piotrowski *et al.*, 2004), lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente experimento utilizando plantas de fresno como planta huésped. En el caso del tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius* y donde se inocularon *P. tinctorius*-*G. intraradices* en combinación, no existen antecedentes que documenten el efecto de dichos organismos en la formación de macroagregación en húmedo. Si bien en la literatura existen investigaciones que han propuesto que tanto los microorganismos como la planta misma (Andrade *et al.* 1998, Bearden y Petersen, 2000) participan activamente en la formación de macroagregados en húmedo, los resultados del presente experimento muestran en este caso en particular que los endófitos no son los directos responsables en la formación de macroagregados en húmedo, sino que los hongos micorrízicos necesitan de elementos complementarios para magnificar su contribución en la formación de agregados.

En el caso de los microagregados, el tratamiento donde se inoculó *G. intraradices* y donde se inocularon *P. tinctorius*-*G. intraradices* en combinación, fueron los únicos que incrementaron el porcentaje de estos agregados, siendo significativo el incremento sólo en el tratamiento en donde se inoculó *G. intraradices* en comparación al tratamiento no inoculado. Andrade y colaboradores

(1998) han sugerido que el peso seco de la raíz es una variable que influye en el porcentaje de agregados estables en húmedo. Sin embargo, estos resultados difieren de esta hipótesis, ya que en este caso, las diferencias entre tratamientos en la formación de microagregados en húmedo no estuvieron asociadas a incrementos importantes en el peso seco de la raíz. Además, se ha establecido que en la formación de microagregados del suelo pueden influir factores distintos de los hongos micorrízicos.

En el caso del carbono total en el suelo en el experimento con fresno, se encontró un incremento del mismo en los tratamientos en donde se inocularon los hongos micorrízicos tanto en forma individual como co-inoculados, pero sólo el tratamiento donde se inocularon *P. tinctorius*-*G. intraradices* en combinación, fue significativo en comparación al no inoculado. El carbono del suelo ha sido ampliamente vinculado con la estructura de suelo y más específicamente con la formación de macroagregados en húmedo (Puget *et al.*, 2000; Bossuyt *et al.*, 2002; Chevallier *et al.*, 2004). Estos resultados muestran que si bien la interacción de *G. intraradices* y *P. tinctorius* contribuye de manera significativa en el aporte de carbono hacia el suelo, el carbono aportado por dichos organismos no influyó de forma significativa en la formación de macro o microagregados en húmedo. En el caso del experimento con plantas de aile, se observó un incremento en el contenido de carbono en el suelo en el tratamiento donde se inoculó *P. tinctorius*. Se ha observado que la entrada de carbono al suelo vía los hongos ectomicorrízicos puede representar hasta un 1.6 % (Högberg y Högberg, 2002). Este y otros reportes han hecho mención de la importancia del hongo para incrementar el reservorio de carbono en el suelo, tal como se pudo observar en el presente experimento utilizando plantas de aile.

Por último sería importante señalar en base a los resultados obtenidos, que en los programas de revegetación en suelos deteriorados se puede utilizar la interacción dual tanto en plantas de aile como de fresno, lo cual podría proporcionar una mayor rentabilidad en términos de acumulación de biomasa.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados aquí muestran que el fresno (*Fraxinus* sp.) y el aile (*Alnus* sp.) pueden establecer asociación simbiótica con hongos ectomicorrízicos y endomicorrízicos y que estos organismos en interacción dual promueven en mayor medida el crecimiento de las plantas comparadas con los organismos inoculados de forma individual. La inoculación con *G. intraradices* afectó en mayor medida las variables de crecimiento en las plantas de fresno en comparación con las plantas de aile, mientras que en el caso de *P. tinctorius* el efecto fue mayor en las plantas de aile en comparación con las plantas de fresno. El tratamiento en donde se inocularon *P. tinctorius* y *G. intraradices* en interacción influyó de forma significativa en las variables de crecimiento tanto en las plantas de fresno como en las plantas de aile, siendo el mejor tratamiento en ambas especies de plantas. En el caso de la formación de macro y microagregados del suelo se observó que *P. tinctorius* en asociación con plantas de aile incrementó de forma significativa la formación de macroagregados del suelo en relación al tratamiento no inoculado, mientras que *G. intraradices* en asociación con plantas de fresno incrementó de forma significativa la formación de microagregados en comparación del tratamiento no inoculado. Por último, la interacción dual en asociación con plantas de fresno incrementó de forma significativa el carbono total de suelo en comparación con el tratamiento no inoculado. Los resultados hacen suponer que la inoculación de hongos endomicorrízicos y ectomicorrízicos en interacción dual favorece el incremento de la biomasa de la plantas en las primeras etapas de crecimiento tanto en aile como en fresno, pero no mejora las propiedades del suelo. Si embargo, se necesitan mayores estudios para conocer si la adición de otro tipo de organismos de la rizosfera puede contribuir a que la interacción dual estudiada tenga un efecto significativo en las propiedades del suelo.

LITERATURA CITADA

- Abbas, Y.; Ducouso, M.; Abourouh, M.; Azcón, R.; Duponnois, R. 2006. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters woodlands in Morocco. *Annals of Forest Science*. 63:285-291.
- Abbott, L.K. y Robson, A.D. 1985. Formation of External hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 99:245-255.
- Abuzinadah, R.A. y Read, D.J. 1986. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. I. Utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 103:481-493.
- Abuzinadah, R.A. y Read, D.J. 1988. Amino acids as nitrogen sources for ectomycorrhizal fungi: utilization of individual amino acids. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 91:473-479.
- Ahmad, I.; Carleton, T.J.; Malloch, D.W.; Hellebust, J.A. 1990. Nitrogen metabolism in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (R. Mre.) Orton. *New Phytologist*. 116:431-441.
- Alami, Y. Achouak, W. Marol, C. Heulin, T. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp strain isolated from sunflower roots. *Applied Environmental Microbiology*. 66:-3393–3398.
- Albiach, R. Canet, R. Pomares, F. Ingelmo, F. 2001. Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. *Bioresource Technology*. 77:109-114.
- Andrade, A.C.S.; Queiroz, M.H.; Hermes, R.A.L.; Oliveira, V.L. 2000. Mycorrhizal status of some plants of the *Araucaria* forest and the Atlantic rainforest in Santa Catarina, Brazil. *Mycorrhiza*. 10:131-136.
- Antibus, R.K.; Sinsabaugh, R.L.; Linkings, A.E. 1992. Phosphatase-activities and phosphorus uptake from inositol phosphate by ectomycorrhizal fungi. *Canadian and Journal of Botany*. 70:794-801.
- Antibus, R.K.; Bower, D.; Dighton, J. 1997. Root surface phpsphatase activities and uptake of ³²P-labelled inositol phosphate in field-collected gray birch and red maple roots. *Mycorrhiza*. 7:39-46.

- Alvarez, M.; Härtel, S.; Godoy, R.; Heyser, W. 2005. Anatomical-physiological determination of surface bound phosphatase activity in ectomycorrhizae of *Nothofagus obliqua*. *Soil Biology and Biochemistry*. 37:125-132.
- Ashford, A.E.; Ryde, S.; Barrow, K.D. 1994. Demonstration of a short chain polyphosphate in *Pisolithus tinctorius* and implications for phosphorus transport. *New Phytologist*. 126:239-247.
- Ashford, A.E. y Allaway, W.G. 2002. The role of the motile tubular vacuole system in mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. 244:177-187.
- Ayling, S.M.; S. E. Smith, S.E.; Smith, F.A. 2000. Transmembrane electric potential difference of germ tubes of arbuscular mycorrhizal fungi responds to external stimuli. *New Phytologist*. 147:631–639.
- Bago, B.; Vierheilig, H.; Piche, Y.; Azcon-Aguilar, C. 1996. Nitrate Depletion and pH Changes Induced by the Extraradical Mycelium of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* Grown in Monoxenic Culture. *New Phytologist*. 133:273-280.
- Bago, B.; Pfeffer, P.E.; Douds-Jr., D.D.; Brouillette, J., Bécard, G.; Shachar-Hill, Y. 1999. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology*. 121:263-271.
- Bago, B.; Pfeffer, P.E.; Shachar-Hill, Y. 2000. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*. 124:949-957.
- Bago, B.; Zipfel, W.; Williams, R.M.; Jun, J.; Arreola, R.; Lammers, P.J.; Pfeffer, P.E.; Shachar-Hill, Y. 2002. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*. 128:108-124.
- Bago, B.; Pfeffer, P.E.; Abubaker, J.; Jun, J.; Allen, J.W.; Brouillette, J.; Douds, D.D.; Lammers, P.J.; Shachar-Hill, Y. 2003. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrates as well as lipid. *Plant Physiology*. 131:1496-1507.
- Barker, S.J.; Tagu, D.; Delp, G. 1998. Update on plant-microbe interactions. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*. 116:1201-1207.
- Bearden, B. N. 2001. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure

- and soil water characteristics of vertisols. *Plant and Soil*. 229:245-258.
- Bécard, G. y Piché, Y. 1989. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 55:2320-2325.
- Becerra, A.; Zak, M.R.; Horton, T.R.; Micolini, J. 2005. Ectomycorrhizal and arbuscular colonization of *Alnus acuminata* from Calilegua National Park (Argentina). *Mycorrhiza*. 15:525-531.
- Beguiristain, T. y Lapeyrie, F. 1997. Host plant stimulates hyphaphorine accumulation in *Pisolithus tinctorius* hyphae during ectomycorrhizal infection while excreted fungal hyphaphorine controls root hair development. *New Phytologist*. 136:525-532.
- Bending, G.D. y Read, D.J. 1995. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. 6. Activities of nutrient mobilizing enzymes in birch litter colonized by *Paxillus involutus* (FR) FR. *New Phytologist*. 130:411-417.
- Benjdia, M.; Rikirsch, E.; Müller, T.; Morel, M.; Corratgé, C.; Zimmermann, S.; Chalot, M.; Frommer, W.B.; Wipf, D. 2006. Peptide uptake in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*: characterization of two di- and tripeptide transporter (HcPTR2A and B). *New Phytologist*. 170:401-410.
- Biermann, B. y Linderman, R.G. 1983. use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytologist*. 95:97-105.
- Binkley, D. 1981. Nodule biomass and acetylene reduction rates of red alder and Sitka alder on Vancouver Island, B.C.. *Canadian Journal of Forest Research*. 11:282-287.
- Binkley, D.; Sollins, P.; Bell, R.; Sachs, D.; Myrold, D. 1992. Biogeochemistry of Adjacent Conifer and Alder-Conifer Stands. *Ecology*. 73:2022-2033.
- Blaudez, D.; Botton, B.; Dizengremel, P.; Chalot, M. 2001. The fate of (¹⁴C)glutamate and (¹⁴C)malate in birch roots is strongly modified under inoculation with *Paxillus involutus*. *Plant, Cell and environmental*. 24:449-457.
- Blee, K.A. y Anderson, A.J. 1998. Regulation of arbuscule formation by carbon in

- the plant. *The Plant Journal*. 16:523-530.
- Bolan, N.S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and Soil*. 134:189-207.
- Bonfante, P.; Balestrini, R.; Martino, E.; Perotto, S.; Plassard, C.; Mousain, D. 1998. Morphological analysis of early contacts between pine roots and two ectomycorrhizal *Suillus* strains. *Mycorrhiza*. 8:1-10.
- Borie, F. R. Rubio, R. Morales, A. Castillo, C. 2000. Relationships between arbuscular mycorrhizal hyphal density and glomalin production with physical and chemical characteristics of soils under no-tillage. *Revista Chilena de Historia Natural*. 73:749-756.
- Botton, B.; Chalot, M.; Garnier, A.; Martin, F. 1994. Assimilation of inorganic nitrogen in ectomycorrhizas. *Acta Botanica Gallica*. 141:469-481.
- Bresson, L. M. Koch, C. Le Bissonnais, Y. Barriuso, E. Lecomte, V. 2001. Soil surface structure stabilization by municipal waste compost application. *Soil Science Society of America Journal*. 65:1804-1811.
- Breuninger, M.; Einig, W.; Magel, E.; Cardoso, E.; Hampp, R. 2000. Mycorrhiza of Brazil pine (*Araucaria angustiflora* [Bert. O. Ktze.]). *Plant Biology*. 2:4-10.
- Brownlee, C.; Duddridge, J.A.; Malibari, A.; Read, D.J. 1983. The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. *Plant and Soil*. 71:433-443.
- Brundrett, M.C.; Piche, Y.; Peterson, R.L. 1985. A development study of the early stages in vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Canadian Journal of Botany*. 63:184-194.
- Bücking, H. y Heyser, W. 2000. Subcellular compartmentation of elements in non-mycorrhizal and mycorrhizal roots of *Pinus sylvestris*: and X-ray microanalytical study. I. The distribution of Phosphate. *New Phytologist*. 145:311-320.
- Bücking, H. y Heyser, W. 2003. Uptake and transfer of nutrients in ectomycorrhizal associations: interactions between photosynthesis and photosynthate nutrition. *Mycorrhiza*. 13:59-68.
- Cairney, J.W.G. y Alexander, I.J. 1992. A study of ageing of spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] ectomycorrhizas. III. Phosphate absorption and

- transfer in ageing *Picea sitchensis*/*Tylospora fibrillosa* (Burt.) Donk ectomycorrhizas. *New Phytologist*. 122:159-164.
- Cairney, J.W.G. y Chambers, S.M. 1997. Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge. *Mycorrhiza*. 7:117-131.
- Caravaca, F. Figueroa, D. Alguacil, M. M. Roldan, A. 2003. Application of composted urban residue enhanced the performance of afforested shrub species in a degraded semiarid land. *Bioresource Technology*. 90:65-70.
- Carter, M. R. Skjemstad, J. O. MacEwan, R. J. 2002. Comparison of structural stability, carbon fractions and chemistry of krasnozem soils from adjacent forest and pasture areas in south-western Victoria. *Australian Journal of Soil Research*. 40:283-297.
- Castellano, M.A.; Trappe, J.M. 1991. *Pisolithus tinctorius* fails to improve plantation performance of inoculated conifers in southwestern Oregon. *New Forest*. 5:349-358.
- Cázares, E. y Trappe, J.M. 1993. Vesicular endophytes in roots of the *Pinaceae*. *Mycorrhiza*. 2:153-156.
- Cázares, E. y Smith, J.E. 1995. Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Pseudotsuga menziesii* and *Tsuga heterophylla* seedlings grown in Oregon Coast Range soils. *Mycorrhiza*. 6:65-67.
- Ceccaroli, P.; Saltarelli, R.; Buffalini, M.; Piccoli, G.; Stocchi, V. 1999. Three different forms of hexokinase are identified during *Tuber borchii* mycelium growth. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 194:71-77.
- Cerda, A. 2000. Aggregate stability against water forces under different climates on agriculture land and scrubland in southern Bolivia. *Soil & Tillage Research*. 57:159-166.
- Chabot, S.; Bel-Rhlid, R.; Chenevert, R.; Piche, Y. 1992. Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂ enriched conditions. *New Phytologist*. 122:461-467.
- Chalot, M.; Brun, A.; Finlay, R.D.; Soederstroem, B. 1994. Metabolism of ¹⁴C glutamate and ¹⁴C glutamine by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Microbiology*. 140:1641-1649.
- Chalot, M. y Brun, A. 1998. Physiology of organic nitrogen acquisition by

- ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Reviews*. 22:21-44.
- Chalot, M.; Javelle, A.; Blaudez, D.; Lambilliotte, R.; Cooke, R.; Sentenac, H.; Wipf, D.; Botton, B. 2002. An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant and Soil*. 244:165-175.
- Chen, X.Y. y Hampp, R. 1993. Sugar Uptake by Protoplasts of the Ectomycorrhizal Fungus, *Amanita muscaria* (L. ex fr.) Hooker. *New Phytologist*. 125:601-608.
- Chen, D.M.; Bastias, B.A.; Taylor, A.F.S.; Cairney, W.G. 2003. Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen *Piloderma byssinum*. *New Phytologist*. 157:547-554.
- Chenu, C. Le Bissonnais, Y. Arrouays, D. 2000. Organic matter influence on clay wettability and soil aggregate stability. *Soil Science Society of America Journal*. 64:1479-1486.
- Chuyoung, C.B.; Newbery, D.M.; Songwe, N.C. 2000. Litter nutrients and translocation in a central African rain forest dominated by ectomycorrhizal trees. *New Phytologist*. 148:493-510.
- Chuyong, G.B.; Newbery, D.M.; Songwe, N.C. 2002. Litter breakdown and mineralization in a central African rain forest dominated by ectomycorrhizal trees. *Biogeochemistry*. 61:73-94.
- Clark, R.B. y Zeto, S.K. 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition*. 23:867-902.
- Colpaert, J.V. y van Laere, A. 1996. A comparison of the extracellular enzyme activities of two ectomycorrhizal and a leaf-saprotrophic basidiomycete colonizing beech leaf litter. *New Phytologist*. 134:133-141.
- Colpaert, J.V.; van Laere, A.; van Tichelen, K.K.; van Assche, J.A. 1997. The use inositol hexaphosphate as a phosphorus source by mycorrhizal and non-mycorrhizal Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Functional Ecology*. 11:407-415.
- Colpaert, J.V.; van Tichelen, K.K.; van Assche, J.A.; van Laere, A. 1999. Short-term phosphorus uptake rates in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of intact *Pinus sylvestris* seedlings. *New Phytologist*. 143:589-597.
- Côté, B.; Vogel, C.S. and Dawson, J.O. 1989. Autumnal changes in tissue nitrogen of autumn olive, black alder and eastern cottonwood. *Plant and*

Soil. 118:23-32.

- Cox, G.; Moran, K.J.; Sanders, F.; Nockolds, C. Tinker, P.B. 1980. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. Polyphosphate granules and phosphorus translocation. *New Phytologist*. 84:649-659.
- Cumming, J.R. 1993. Growth and nutrition of nonmycorrhizal and mycorrhizal pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings under phosphorus limitation. *Tree Physiology*. 13:173-187.
- Czarnes, S. Hallett, P. D. Bengough, A. G. Young, I. M. 2000. Root- and microbial-derived mucilages affect soil structure and water transport. *European Journal of Soil Science*. 51:435-443.
- de Leon-Gonzalez, F. Hernandez-Serrano, M. M. Etchevers, J. D. Payan-Zelaya, F. Ordaz-Chaparro, V. 2000. Short-term compost effect on macroaggregation in a sandy soil under low rainfall in the valley of Mexico. *Soil & Tillage Research*. 56:213-217.
- Denef, K. Six, J. Bossuyt, H. Frey, S. D. Elliott, E. T. Merckx, R. Paustian, K. 2001. Influence of dry-wet cycles on the interrelationship between aggregate, particulate organic matter, and microbial community dynamics. *Soil Biology & Biochemistry*. 33:1599-1611.
- Denef, K. Six, J. Merckx, R. Paustian, K. 2002. Short-term effects of biological and physical forces on aggregate formation in soils with different clay mineralogy. *Plant and Soil*. 246:185-200.
- Díaz, G. y Horubia, M. 1993. Arbuscular mycorrhizae on *Tetraclinis articulata* (*Cupressaceae*) : development of mycorrhizal colonization and effect of fertilization and inoculation. *Agronomie*. 13:267-274.
- Dickie, I.A.; Koide, R.T.; Stevens, C.M. 1998. Tissue density and growth response of ectomycorrhizal fungi to nitrogen source and concentration. *Mycorrhiza*. 8:145-148.
- Ditengou, F.A.; Béguiristain, T.; Lapeyrie, F. 2000. Root hair elongation is inhibited by hypaphorine, the indole alkaloid from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*, and restored by indole-3-acetic acid. *Planta*. 211:722-728.
- Dixon, R.K. y Hielhol, F. 1992. Mineral nutrition of *Pinus caribea* and *Eucalyptus*

- camaldulensis* seedlings inoculated with *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris*. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 23:1387-1396.
- Dorado, J. Zancada, M. C. Almendros, G. Lopez-Fando, C. 2003. Changes in soil properties and humic substances after long-term amendments with manure and crop residues in dryland farming systems Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 166:31-38.
- Douds-Jr., D.D.; Pfeffer, P.E.; Shachar-Hill, Y. 2000. Application of *in vitro* methods to study carbon uptake and transport by AM fungi. 226:255-261.
- Duddridge, J.A. y Read, D.J. 1984a. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. II. Ectomycorrhizal development on pine *in vitro*. New Phytologist. 96:575-582.
- Duddridge, J.A. y Read, D.J. 1984b. Modification of the host-fungus interface in mycorrhizas synthesized between *Suillus bovinus* (FR.) O. Kuntz and *Pinus sylvestris* L. New Phytologist. 96:583-588.
- Duiker, S. W. Rhoton, F. E. Torrent, J. Smeck, N. E. Lal, R. 2003. Iron (hydr)oxide crystallinity effects on soil aggregation. Soil Science Society of America Journal. 67:606-611.
- Eltrop, L. y Marschner, H. 1996. Growth and mineral nutrition of non-mycorrhizal and mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies*) seedlings grown in semi-hydroponic sand culture. Growth and mineral nutrient uptake in plants supplied with different forms of nitrogen. New Phytologist. 133:469-478.
- Ekblad, A.; Wallander, H.; Carlsson, R.; Huss-Danell, K. 1995. Fungal biomass in roots and extramatrical mycelium in relation to micronutrients and plant biomass of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* and *Alnus incana*. New Phytologist. 131:443-451.
- Ellies, A. Ramirez, C. Mac Donald, R. 2005. Organic matter and wetting capacity distribution in aggregates of Chilean soils. Catena. 59:69-78.
- Ezawa, T.; Smith, S.E.; Smith, F.A. 2001. Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist. 149:555-563.
- Feeney, D. S. Daniell, T. Hallett, P. D. Illian, J. Ritz, K. Young, I. M. 2004. Does the presence of glomalin relate to reduced water infiltration through

- hydrophobicity?. Canadian Journal of Soil Science. 84:365-372.
- Ferrol, N.; Barea, J.M.; Azcón-Aguilar, C. 2002. Mechanism of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas. Plant and Soil. 244:231-237.
- Feugey, L.; Strullu, D.G.; Poupard, P.; Simoneau, P. 1999. Induced defense responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. New Phytologist. 144:541-547.
- Finlay, R.D. y Read, D.J. 1986. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. II. The uptake and distribution of phosphorus by mycelial strands interconnecting host plants. New Phytologist. 103:157-165.
- Finlay, R.D.; Ek, H.; Odham, G.; Söderström, B. 1988. Mycelial uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ¹⁵N-labelled ammonium by *Pinus sylvestris* plants infected with four different ectomycorrhizal fungi. New Phytologist. 110:59-66.
- Finlay, R.D.; Ek, H.; Odham, G.; Söderström, B. 1989. Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ¹⁵labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*. New Phytologist. 113:47-55.
- Fontaine, J.; Grandmougin-Ferjani, A.; Durand, G.R. 2004. 24-methyl/methylene sterols increase in monoxenic root after colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. 163:259-167.
- Fortin, J.A.; Bécard, G.; Declerck, S.; Dalpé, Y.; St-Arnaud, M.; Coughlan, A.P.; Piché, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures. Canadian Journal of Botany. 80:1-20.
- Fraga-Beddiar, A.; Le Tacon, F. 1990. Interactions between a VA mycorrhizal fungus and Frankia associated with alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaetn.). Symbiosis. 9:
- France, C. y Reid, C.P.P. 1984. Pure culture growth of ectomycorrhizal fungi on inorganic nitrogen sources. Microbial Ecology. 10:187-195.
- Frey, B. y Schuepp, H. 1993. Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. New Phytologist. 124-221-230.
- Gagnon, B. Lalande, R. Fahmy, S. H. 2001. Organic matter and aggregation in a

- degraded potato soil as affected by raw and composted pulp residue. *Biology and Fertility of Soils*. 34:441-447.
- Gale, W. J. Cambardella, C. A. Bailey, T. B. 2000a. Root-derived carbon and the formation and stabilization of aggregates. *Soil Science Society of America Journal*. 64:201-207.
- Garcia-Oliva, F. Sveshtarova, B. Oliva, M. 2003. Seasonal effects on soil organic carbon dynamics in a tropical deciduous forest ecosystem in western Mexico. *Journal of Tropical Ecology*. 19:179-188.
- Gardner, J.H.; Malajczuk, N. 1988. Recolonisation of rehabilitated bauxite mine sites in Western Australia by mycorrhizal fungi. *Forest Ecology and Management*. 24:27-42.
- Gianinazzi-Pearson, V.; Branzanti, B.; Gianinazzi, S. 1989. *In vitro* enhanced of spores germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Symbiosis*. 7:243-255.
- Gianinazzi-Pearson, V.; Smith, S.E.; Gianinazzi, S., Smith, F.A. 1991. Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. V. Is H⁺-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interface?. *New Phytologist*. 117:61-74.
- Giovannetti, M.; Sbrana, C.; Avio, L.; Citernes, A.S.; Logi, C. 1993. Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist*. 125: 587-593.
- Gobert, A. y Plassard, C. 2002. Differential NO₃⁻ dependent patterns of NO₃⁻ uptake in *Pinus pinaster*, *rhizopogon roseolus* and their ectomycorrhizal association. *New Phytologist*. 154:509-516.
- Godbout, C.; Fotin, J.A. 1983. Morphological features of synthesized ectomycorrhizae of *Alnus crispa* and *A. rugosa*. *New Phytologist*. 94:249-262.
- Godbold, D.L.; Hoosbeek, M.R.; Lukac, M.; Cotrufo, M.F.; Janssens, I.A.; Ceulemans, R.; Polle, A.; Velthorst, E.J.; Scarascia-Mugnozza, G.; de Angelis, P.; Miglietta, F.; Peressotti, A. 2006. Mycorrhizal hyphae turnover as a dominant process for carbon input into soil organic matter. *Plant and Soil*. 281:15-24.
- Goulet, E. Dousset, S. Chaussod, R. Bartoli, F. Doledec, A. F. Andreux, F. 2004.

- Water-stable aggregates and organic matter pools in a calcareous vineyard soil under four soil-surface management systems. *Soil Use and Management*. 20:318-324.
- Govindarajulu, M.; Pfeffer, P.E.; Jin, H.; Abubaker, J.; Douds, D.D.; Allen, J.W.; Bücking, H.; Lammers, P.J.; Shachar-Hill, Y. 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*. 435:819-823.
- Graham, J.H. 1982. Effect of citrus root exudates on germination of Chlamydospores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeum*. *Mycologia*. 74:831-835.
- Graham, M. H. Haynes, R. J. Meyer, J. H. 2002. Changes in soil chemistry and aggregate stability induced by fertilizer applications, burning and trash retention on a long-term sugarcane experiment in South Africa. *European Journal of Soil Science*. 53:589-598.
- Grandy, A. S. Porter, G. A. Erich, M. S. 2002. Organic amendment and rotation crop effects on the recovery of soil organic matter and aggregation in potato cropping systems. *Soil Science Society of America Journal*. 66:1311-1319.
- Gregorich, E. G.; Beare, M. H.; Stoklas, U.; St-Georges, P. 2003. Biodegradability of soluble organic matter in maize-cropped soils. *Geoderma*. 113:237-252.
- Grunze, N.; Willmann, M.; Nehls, U. 2004. The impact of ectomycorrhizal formation on monosaccharide transporter gene expression in poplar roots. *New Phytologist*. 164:147-155.
- Guerrero, C. Gomez, I. Solera, J. M. Moral, R. Beneyto, J. M. Hernandez, M. T. 2000. Effect of solid waste compost on microbiological and physical properties of a burnt forest soil in field experiments. *Biology and Fertility of Soils*. 32:410-414.
- Guescini, M.; Pierleoni, R.; Palma, F.; Zeppa, S.; Vallorani, L.; Potenza, L.; Sacconi, C.; Giomaro, G.; Stocchi, V. 2003. Characterization of the *Tuber borchii* nitrate reductase gene and its role in ectomycorrhizae. *Mol. Gen. Genomics*. 269:807-816.
- Guidot, A.; Debaud, J.C.; Effosse, A.; Marmeisse, R. 2004. Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytologist*. 161:539-547.
- Harrison, M.J. y van Buuren, M.L. 1995. A phosphate transporter from the

- mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature*. 378:626-629.
- Harrison, M.J. 1996. A sugar transporter from *Medicago truncatula*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *The Plant Journal*. 9:491-503.
- Harrison, M.J. 1999. Biotrophic interfaces and nutrient transport in plant/fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany*. 50:1013-1022.
- Harrison, M.J.; Dewbre, G.R.; Liu, J. 2002. A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *The Plant Cell*. 14:2413-2429.
- Hawkins, H.J.; Johansen, A.; George, E. 2000. Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. 226:275-285.
- Heinrich, P.A.; Mulligan, D.R.; Patrick, J.W. 1988. The effect of ectomycorrhizas on the phosphorus and dry weight acquisition of *Eucalyptus* seedlings. *Plant and soil*. 1:147-149.
- Hepper, C.M. 1981. Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions. *New Phytologist*. 88:641-647.
- Hilbert, J.L.; Costa, G.; Martin, F. 1991. ectomycorrhizal synthesis and polypeptide changes during the early stage of eucalypt mycorrhiza development. *Plant Physiology*. 97:977-984.
- Hilger, A.B. y Krause, H.H. 1989. Growth characteristics of *Laccaria laccata* and *Paxillus involutus* in liquid culture media with inorganic and organic phosphorus sources. *Canadian Journal of Botany*. 67:1782-1789.
- Ho, I. 1987. Comparison of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rate, enzyme activity, and phytohormone production. *Canadian Journal of Forest Research*. 17:31-35.
- Ho, I. 1989. Acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nitrate reductase activity of select ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany*. 67:750-753.
- Hodge, A.; Campbell, C.D.; Fitter, A.H. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquire nitrogen directly from organic matter. *Nature*. 413:297-299.

- Hodge, A. 2003. N capture by *Plantago lanceolata* and *Brassica napus* from organic material: the influence of spatial dispersion, plant competition and an arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Experimental Botany*. 54:2331-2342.
- Högberg, P.; Högberg, M.N.; Quist, M.E.; Ekblom, A.; Näsholm, T. 1999. Nitrogen isotope fractionation during nitrogen uptake by ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris*. *New phytologist*. 142:569-576.
- Igwe, C. A. Stahr, K. 2004. Water-stable aggregates of flooded inceptisols from south-eastern Nigeria in relation to mineralogy and chemical properties. *Australian Journal of Soil Research*. 42:171-179.
- Isopi, R; Lumini, E; Frattegiani, M; Puppi, G*; Bosco, M; Favilli, F; Buresti, E. 1994. Inoculation of *Alnus cordata* with selected microsymbionts: Effects of *Frankia* and *Glomus* spp. on seedling growth and development. *Symbiosis*. 17:237-245.
- Izquierdo, I. Caravaca, F. Alguacil, M. M. Roldan, A. 2003. Changes in physical and biological soil quality indicators in a tropical crop system (Havana, Cuba) in response to different agroecological management practices. *Environmental Management*. 32:639-645.
- Jakobsen, I. y Rosendahl, L. 1990. Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist*. 115:77-83.
- Jargeat, P.; Gay, G.; Debaud, J.C.; Marmeisse, R. 2000. Transcription of a nitrate reductase gene isolated from the symbiotic basidiomycete fungus *Hebeloma cylindrosporum* does not require induction by nitrate. *Mol. Gen. Genet*. 263:948-956.
- Javelle, A.; Rodriguez-Pastrana, B. R.; Jacob, C.; Botton, B.; Brun, A.; André, B.; Marini, A.M.; Chalot, M. 2001. Molecular characterization of two ammonium transporters from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *FEBS Lett*. 505:393-298.
- Javelle, A.; Morel, M.; Rodriguez-Pastrana, B. R.; Botton, B.; André, B.; Marini, A.M.; Brun, A.; Chalot, M. 2003. Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Microbiology*. 47:411-430.

- Johansen, A.; Jakobsen, I.; Jensen, E.S. 1992. Hyphal transport of ^{15}N -labelled nitrogen by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and its effect on depletion of inorganic soil N. *New Phytologist*. 122:281-288.
- Johansen, A.; Jakobsen, L.; Jensen, E.S. 1993a. Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. *Biology and fertility of Soils*. 16:66-70.
- Johansen, A.; Jakobsen, L.; Jensen, E.S. 1993b. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 3. Hyphal transport ^{32}P and ^{15}N . *New Phytologist*. 124:61-68.
- Jones, M.D.; Dural, D.M.; Tinker, P.B. 1991. Fluxes of carbon and phosphorus between symbionts in willow ectomycorrhizas and their changes with time. *New Phytologist*. 119:99-106.
- Joner, E.; Ravnskov, S.; Jakobsen, I. 2000. Arbuscular mycorrhizal phosphate transport under monoxenic conditions using radio-labelled inorganic and organic phosphate. *Biotechnology Letters*. 22:1705-1708.
- Jongbloed, R.H.; Clement, J.M.A.M.; Borstpauwels, G.W.F.H. 1991. Kinetics of NH_4^+ and K^+ uptake by ectomycorrhizal fungi. Effect of NH_4^+ on K^+ uptake. *Physiologia Plantarum*. 83:427-432.
- Jongbloed, R.H. y Borstpauwels, G.W.F.H. 1991. Effect of ammonium and pH on growth of some ectomycorrhizal fungi in vitro. *Acta Botanica Neerlandica*. 39:349-358.
- Jordy, M.N.; Azémar-Lorentz, S.; Brun, A.; Botton, B.; Pargney, J.C. 1998. Cytolocalization of glycogen, starch, and other insoluble polysaccharides during ontogeny of *Paxillus involutus-Betula pendula* ectomycorrhizas. *New Phytologist*. 140:331-341.
- Karabaghli-Degron, C.; Sotta, B.; Bonnet, M.; Gay, G.; Le Tacon, F. 1998. The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of *in vitro* lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *New Phytologist*. 140:723-733.
- Kaska, D.D.; Myllyla, R.; Cooper, J.B. 1999. Auxin transport inhibitors act through ethylene to regulate dichotomous branching of lateral root meristems in pine. *New Phytologist*. 142:49-57.

- Kerley, S.J. y Read, D.J. 1995. The Biology of Mycorrhiza in the Ericaceae. XVIII. Chitin Degradation by *Hymenoscyphus ericae* and Transfer of Chitin-Nitrogen to the Host Plant. *New Phytologist*. 131:369-375.
- Keller, G. 1996. Utilization of inorganic and organic nitrogen sources by high-subalpine ectomycorrhizal fungi of *Pinus cembra* in pure culture. *Mycological Research*. 100:989-998.
- Kershaw, J.L. y Stewart, G.R. 1992. Metabolism of ¹⁵N-labelled ammonium by the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch. *Mycorrhiza*. 1:71-77.
- Kitöviita, M.M. y Arnebrant, K. 2000. Effects of inorganic and phosphorus supply on nitrogen acquisition from alanine by birch seedlings in symbiosis with *Paxillus involutus*. *Plant and Soil*. 219:243-250.
- Koide, R.T.; Kabir, Z. 2000. Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist*. 148:511-517.
- Kough, J.L.; Molina, R.; Linderman, R.G. 1985. Mycorrhizal responsiveness of *Thuja*, *Calocedrus*, *Sequoia*, and *Sequoiadendron* species of western North America. *Canadian Journal of Forest Research*. 15:1049-1054.
- Lagrange, H.; Jay-Allmand, C.; Lapeyrie, F. 2001. Rutin, the phenoglycoside from eucalyptus root exudates, stimulates *Pisolithus* hyphal growth at picomolar concentrations. *New Phytologist*. 149:349-355.
- Lammers, P.J.; Jun, J.; Abubaker, J.; Arreola, R.; Gopalan, A.; Bago, B.; Hernandez-Sebastia, C.; Allen, J.W.; Douds, D.D.; Pfeffer, P.E., Shachar-Hill, Y. 2001. The glyoxylate cycle in arbuscular mycorrhizal fungus. Carbon flux and gene expression. *Plant Physiology*. 127:1287-1298.
- Lehmann, J. Cravo, M. D. Zech, W. 2001. Organic matter stabilization in a Xanthic Ferralsol of the central Amazon as affected by single trees: chemical characterization of density, aggregate, and particle size fractions. *Geoderma*. 99:147-168.
- Lapeyrie, F.; Ranger, J.; Vairelles, D. 1991. Phosphate solubilizing activity of ectomycorrhizal fungi in vitro. *Canadian Journal of Botany*. 69:342-346.
- Leake, J.R. y Read, D.J. 1990. Chitin as a nitrogen source for mycorrhizal fungi. *Mycological Research*. 94:993-995.

- Leake, J., Johnson, D.; Donnelly, D.; Muckle, G.; Boddy, L.; Read, D. 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*. 82:1016-1045.
- Louis, I.; Lim, G. 1987. Spore density and root colonization of vesicular-arbuscular mycorrhizas in tropical soil. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 88:207-212.
- Lowry, G.L.; Brokow, F.C.; Breeding, C.H.J. 1962. Alder for reforesting coal spoils in Ohio. *Journal of Forestry* 60: 196-199.
- Lutgen, E. R. Rillig, M. C. 2004. Influence of spotted knapweed (*Centaurea maculosa*) management treatments on arbuscular mycorrhizae and soil aggregation. *Weed Science*. 52:172-177.
- MacFall, J.; Slack, S.A.; Iyer, J. 1991. Effect of *Hebeloma arenosa* and phosphorus fertility on root acid phosphatase activity of red pine (*Pinus resinosa*) seedlings. *Canadian Journal of Botany*. 69:380-383.
- Maldonado-Mendoza, I.E.; Dewbre, G.R.; Harrison, M.J. 2001. A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14:1140-1148.
- Marini, A.M.; Soussi-Boudekou, S.; Vissers, S.; André, B. 1997. A family of ammonium transports in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17:4282-4293.
- Martens, D. A. 2002. Relationship between plant phenolic acids released during soil mineralization and aggregate stabilization. *Soil Science Society of America Journal*. 66:1857-1867.
- Martin, F.; Corte, R.; Canet, D. 1994. NH₄⁺ assimilation in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (MAIRE) Orton, a N-15-NMR study. *New Phytologist*. 128:479-485.
- Martin, F.; Boiffin, V.; Pfeffer, P.E. 1998. Carbohydrate and amino acid metabolism in the *Eucalyptus globulus*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza during glucose utilization. *Plant Physiology*. 118:627-635.
- Martins, A.; Santos, M.; Santos, H.; Pais, M.S. 1999. A ³¹P nuclear magnetic resonance study of phosphate levels in roots of ectomycorrhizal and

- nonmycorrhizal plants of *Castanea sativa* Mill.. Trees. 13:168-172.
- Massicotte, H. B.; Melville, L. H.; Peterson, R. L.; Unestam, T. 1999. Comparative studies of ectomycorrhiza formation in *Alnus glutinosa* and *Pinus resinosa* with *Paxillus involutus*. Mycorrhiza. 8:229-240.
- Mataix-Solera, J. Doerr, S. H. 2004. Hydrophobicity and aggregate stability in calcareous topsoils from fire-affected pine forests in southeastern Spain. Geoderma. 118:77-88.
- Mikha, M. M. Rice, C. W. 2004. Tillage and manure effects on soil and aggregate-associated carbon and nitrogen. Soil Science Society of America Journal. 68:809-816.
- Miller, R.M.; Reinhardt, D.R.; Jastrow, J.D. 1995. External hyphae production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. Oecologia. 103:17-23.
- Molina, N. C. Caceres, M. R. Pietroboni, A. M. 2001. Factors affecting aggregate stability and water dispersible clay of recently cultivated semiarid soils of Argentina. Arid Land Research and Management. 15:77-87.
- Moreira-Zouza, M.; Trufem, S.F.B.; Gomes-da-Costa, S.M.; Cardoso, E.J.K.N. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Mycorrhiza. 13:211-215.
- Mrabet, R. Saber, N. El-Brahli, A. Lahlou, S. Bessam, F. 2001. Total, particulate organic matter and structural stability of a Calcixeroll soil under different wheat rotations and tillage systems in a semiarid area of Morocco. Soil & Tillage Research. 57:225-235.
- Murphy, J.F. y Miller, O.K.Jr. 1994. Mycorrhizal syntheses with *Alnus serrulata* (Ait.) Willd. Castanea. 59:156-166.
- Nehls, U. Béguiristain, T.; Ditengou, F.; Lapeyrie, F.; Martin, F. 1998. The expression of a symbiosis-regulated gene in eucalypt roots is regulated by auxins and hypaphorine, the tryptophan betaine of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Planta. 207:296-302.
- Nehls, U.; Kleber, R.; Wiese, J.; Hampp, R. 1999. Isolation and characterization of a general amino acid permease from the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. New Phytologist. 144:343-349.
- Nehls, U.; Wiese, J.; Hampp, R. 2000. Cloning of a *Picea abies* monosaccharide

- transport gene and expression –analysis in plant tissue and ectomycorrhizas. 14:334-338.
- Nehls, U.; Bock, A.; Einig, W.; Hampp, R. 2001. Excretion of two proteases by the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. Plant, Cell and Environmental. 24:741-747.
- Nielsen, J.S.; Joner, E.J.; Declerck, S.; Olsson, S.; Jakobsen, I. 2002. Phosphoimaging as a tool for visualization and noninvasive measurement of P transport dynamics in arbuscular mycorrhizas. New Phytologist. 154:809-819.
- Nobrega, J. C. A. de Lima, J. M. Curi, N. Siqueira, J. O. da Motta, P. E. F. 2001. Aggregate stability in two cropped and no-cropped Oxisols as affected by phosphate addition and mycorrhiza. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 36:
- Oliveira, R.S.; Castro, P.M.L.; Dodd, J.C.; Vosátka, M. 2005. Synergistic effect of *Glomus intraradices* and *Frankia* spp. on the growth and stress recovery of *Alnus glutinosa* in an alkaline anthropogenic sediment. Chemosphere. 60:1462-1470.
- Olsson, P.A.; Thingstrup, I.; Jakobsen, I.; Bååth, E. 1999. Estimation of biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. Soil Biology and Biochemistry. 31:1879-1887.
- Olsson, P.A.; Wilhelmsson, P. 2000. The growth of external AM fungal mycelium in sand dunes and in experimental systems. Plant and Soil. 226:161-169.
- Olsson, P.A.; Burleigh, S.H.; van Aarle, I.M. 2005. The influence of external nitrogen on carbon allocation to *Glomus intraradices* in monoxenic arbuscular mycorrhiza. New Phytologist. 168:677-686.
- Pacovsky, R.S.; Bethlenfalvay, G.J. 1982. Measurement of the extraradical mycelium of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil by chitin determination. Plant and Soil. 68:143-147.
- Pagliai, M. Vignozzi, N. Pellegrini, S. 2004. Soil structure and the effect of management practices. Soil & Tillage Research. 79:131-143.
- Percival, G.C.; Giggs, M.; Dixon, G.R. 1998. The influence of sodium chloride and waterlogging stress on *Alnus cordata*. Journal of Arboriculture. 24:19-27.
- Perez-Moreno, J. y Read, D.J. 2000. Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal

- plants. *New Phytologist*. 145:301-309.
- Pfeffer, P.E., Douds-Jr., D.D.; Bécard, G.; Shachar-Hill, Y. 1999. Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology*. 120:587-598.
- Pfeffer, P.E.; Douds-Jr., D.D.; Bücking, H.; Schwartz, D.P., Shachar-Hill, Y. 2004. The fungus does not transfer carbon to or between roots in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 163:617-627.
- Phillips, R.P. y Faey, T.J. 2005. Patterns of rhizosphere carbon flux in sugar maple (*Acer saccharum*) and yellow birch (*Betula allegheniensis*) saplings. *Global Change Biology*. 11:983-995.
- Plante, A. F. McGill, W. B. 2002. Intraseasonal soil macroaggregate dynamics in two contrasting field soils using labeled tracer spheres. *Soil Science Society of America Journal*. 66:1285-1295.
- Plassard, C.; Barry, D.; Eltrop, R.; Mousain, D. 1994. Nitrate uptake in maritime pine (*Pinus pinaster*) and the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* effect of ectomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal of Botany*. 72:189-197.
- Plassard, C.; Bonafos, B.; Touraine, B. 2000. Differential effects of mineral and organic N sources, and of ectomycorrhizal infection by *Hebeloma cylindrosporum*, on growth and N nutrition in *Pinus pinaster*. *Plant, Cell and Environmental*. 23:1195-1205.
- Rangel-Castro, J.I.; Danell, E.; Taylor, A.F.S. 2002. Use of different nitrogen sources by the edible ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycorrhiza*. 12:131-137.
- Rasmussen, N.; Lloyd, D.C.; Ratcliffe, R.G.; Hansen, P.E.; Jakobsen, I. 2000. ³¹P NMR for the study of P metabolism and translocation in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. 226:245-253.
- Rasse, D. P. Smucker, A. J. M. Santos, D. 2000. Alfalfa root and shoot mulching effects on soil hydraulic properties and aggregation. *Soil Science Society of America Journal* 64:725-731.
- Rausch, C.; Daram, P.; Brunner, S.; Jansa, J.; Laloi, M.; Leggewie, G.; Amrhein, N.; Bucher, M. 2001. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature*. 414:462-470.

- Read, D.J.; Francis, R.; Finlay, R.D. 1985. Mycorrhizal mycelia and nutrient cycling in plant communities. 4:193-217.
- Regvar, M.; Gogala, N.; Žnidaršič, N. 1997. Jasmonic acid affects mycorrhization of spruce seedlings with *Laccaria laccata*. Trees. 11:511-514.
- Reinsvold, R.J.; Reeves, F.B. 1986. The mycorrhizae of *Juniperus osteosperma*: identity of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiont, and Resynthesis of VA mycorrhizae. Mycologia. 78:108-113.
- Rodionov, A. Amelung, W. Urusevskaja, I. Zech, W. 2000. Carbon and nitrogen in the enriched labile fraction along a climosequence of zonal steppe soils in Russia. Soil Science Society of America Journal. 64:1467-1473.
- Roncadori, R.W.; Pokorny, F.A. 1982. Growth of *Juniperus chinensis* var. *sargentii* as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil fertility. Hort Science. 17:917-918.
- Rosewarne, G.M.; Barker, S.J.; Smith, S.E.; Smith, F.A.; Schachtman, D.P. 1999. A *Lycopersicon esculentum* Phosphate Transporter (LePT1) Involved in Phosphorus Uptake from a Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus. New Phytologist. 144:507-516.
- Rothstein, D.E.; Vitousek, P.M.; Simmons, B.L. 2004. An exotic tree alters decomposition and nutrient cycling in a Hawaiian montane forest. Ecosystems. 7:805-814.
- Rousseau, J.V.D.; Sylvia, D.M.; Fox, A.J. 1994. Contribution of Ectomycorrhiza to the Potential Nutrient-Absorbing Surface of Pine New Phytologist. 128: 639-644.
- Rudawska, M.L.; Kieliszewska-Rokicka, B.; Debaud, J.C.; Lewandowski, A.; Gay, G. 1994. Enzymes of ammonium metabolism in ectendomycorrhizal and ectomycorrhizal symbionts of pine. Physiologia Plantarum. 92:279-285.
- Rudawska, M.L. y Kieliszewska-Rokicka, B. 1997. Mycorrhizal formation by *Paxillus involutus* strains in relation to their IAA-synthesizing activity. New Phytologist. 137:509-517.
- Russo, R.O. 1989. Evaluating alder-endophyte (*Alnus acuminata*-*Frankia*-Mycorrhizae) interactions. I. Acetylene reduction in seedlings inoculated with *Frankia* strain Ar13 and *Glomus* intra-radices, under three phosphorus levels. Plant and Soil. 118:151-155.

- Russo, R.O.; Gordon, J.C.; Berlyn, G.P. 1992. Evaluating alder-endophyte (*Alnus acuminata*-*Frankia* -mycorrhizae) interactions. II. Growth response of *Alnus acuminata* seedlings to inoculation with *Frankia* strain Ar13 and *Glomus* intra-radices, under three phosphorus levels. *Journal of Sustainable Forestry*. 1:87-95.
- Salzer, P. y Hager, A. 1993. Characterization of wall-bound invertase isoforms of *Picea abies* cells and regulation by ectomycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*. 88:52-59.
- Sarjala, T. 1999. Effect of organic and inorganic nitrogen sources on endogenous polyamines and growth of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Mycorrhiza*. 8:277-281.
- Sawyer, N.A.; Chambers, S.M.; Cairney, J.W.G. 2003. Variation in nitrogen source utilization by nine *Amanita muscaria* genotypes from Australian *Pinus radiata* plantations. *Mycorrhiza*. 13:217-221.
- Scheromm, P.; Plassard, D.; Salsac, L. 1990a. Nitrate nutrition of maritime pine (*Pinus pinaster* Soland in Ait.) ectomycorrhizal with *Hebeloma cylindrosporum* Romagn. *New Phytologist*. 114:93-98.
- Scheromm, P.; Plassard, D.; Salsac, L. 1990b. Effect of nitrate and ammonium nutrition on the metabolism of the ectomycorrhizal Basidiomycete, *Hebeloma cylindrosporum* Romagn. *New Phytologist*. 114:227-234.
- Schubert, A.; Allara, P.; Morte, A. 2004. Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist*. 161:195-501.
- Selle, A.; Willmann, M.; Grunze, N.; GeBler, A.; WeiB, M.; Nehls, U. 2005. The high-affinity poplar ammonium importer PttAMT1.2 and its role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 168:697-706.
- Shachar-Hill, Y.; Pfeffer, P.E.; Douds, D.; Osman, S.F.; Doner, L.W.; Ratcliffe, R.G. 1995. Partitioning of intermediated carbon metabolism in VAM colonized leek. *Plant Physiology*. 108:7-15.
- Shein, E. V. Milanovskii, E. Y. 2003. The role of organic matter in the formation and stability of soil aggregates. *Eurasian Soil Science*. 36:51-58.
- Shepherd, T. G. Saggarr, S. Newman, R. H. Ross, C. W. Dando, J. L. 2001. Tillage-induced changes to soil structure and organic carbon fractions in

- New Zealand soils. Australian Journal of Soil Research 39(3) 465 – 489.
- Shi, L.; Guttenberger, M.; Kottke, I.; Hampp, R. 2002. The effect of drought on mycorrhizas of beech (*Fagus sylvatica* L.): changes in community structure, and the content of carbohydrates and nitrogen storage bodies of the fungi. Mycorrhiza. 12:303-311.
- Shrestha, B. M. Sitaula, B. K. Singh, B. R. Bajracharya, R. M. 2004. Soil organic carbon stocks in soil aggregates under different land use systems in Nepal. Nutrient Cycling in Agroecosystems. 70:201-213.
- Siqueira, J.O.; Safir, G.R.; Nair, M.G. 1991. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. New Phytologist. 118:87-93.
- Six, J. Merckx, R. Kimpe, K. Paustian, K. Elliott, E. T. 2000. A re-evaluation of the enriched labile soil organic matter fraction. European Journal of Soil Science. 51:283-293.
- Six, J. Conant, R. T. Paul, E. A. Paustian, K. 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. Plant and Soil. 241:155-176.
- Six, J. Bossuyt, H. Degryze, S. Deneff, K. 2004. A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. Soil & Tillage Research. 79:7-31.
- Smith, S.E.; Smith, F.A. 1990. Tansley Review No. 20. Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. 1990. New Phytologist. 114:1-38.
- Smith, S.E. y Dickson, S. 1991. Quantification of Active Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Infection Using Image Analysis and Other Techniques. Australian Journal of Plant Physiology. 18:637-648.
- Solaiman, M.D.Z. y Saito, M. 1997. Use of sugar by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. New Phytologist. 136:533-538.
- Spaccini, R. Conte, P. Zena, A. Piccolo, A. 2000. Carbohydrates distribution in size-aggregates of three European soils under different climate. Soil and Tillage Research. 75:161-172.
- Spaccini, R. Piccolo, A. Mbagwu, J. S. C. Teshale, A. Z. Igwe, C. A. 2002.

- Influence of the addition of organic residues on carbohydrate content and structural stability of some highland soils in Ethiopia. *Soil Use and Management*. 18:404-411.
- Stabler, L.B.; Martin, C.A.; Stutz, J.C. 2001. Effect of urban expansion on arbuscular mycorrhizal fungal mediation of landscape tree growth. *Journal of Arboriculture*. 27:193-202.
- Staddon, P.L.; Ramsey, C.B.; Ostle, N.; Ineson, P.; Fitter, A.H. 2003. Rapid turnover of hyphae of mycorrhizal fungi determined by AMS microanalysis of ¹⁴C. *Science*. 300:1138-1140.
- Stenberg, M. Stenberg, B. Rydberg, T. 2000. Effects of reduced tillage and liming on microbial activity and soil properties in a weakly-structured soil. *Applied Soil Ecology*. 14:135-145.
- Sundari, S.K. y Adholeya, A. 2000a. Retention of enzyme activity following freeze-drying the mycelium of ectomycorrhizal isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16:373-376.
- Sundari, S.K. y Adholeya, A. 2000b. Retention of enzyme activity following freeze-drying the mycelium of ectomycorrhizal isolates: part II. Enzyme acting upon carbon compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16:865-868.
- Suriadi, A. Murray, R. S. Grant, C. D. Nelson, P. N. 2002. Structural stability of sodic soils in sugarcane production as influenced by gypsum and molasses. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 42:315-322.
- Taboada, M. A. Barbosa, O. A. Rodriguez, M. B. Cosentino, D. J. 2004. Mechanisms of aggregation in a silty loam under different simulated management regimes. *Geoderma*. 123:233-244.
- Tagu, D.; Lapeyrie, F.; Martin, F. 2002. The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. *Plant and Soil*. 244:97-105.
- Tarchitzky, J. Hatcher, P. G. Chen, Y. 2000. Properties and distribution of humic substances and inorganic structure-stabilizing components in particle-size fractions of cultivated Mediterranean soils. *Soil Science*. 165(4):328-342
- Thingstrup, I.; Kahiluoto, H.; Jakobse, I. 2000. Phosphate transport by hyphae of field communities of arbuscular mycorrhizal fungi at two levels of P fertilization. *Plant and Soil*. 221:181-187.

- Thomson, B.D.; Grove, T.S.; Malajczuk, N.; Hardy, G.E.St.J. 1994. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill. in relation to root colonization and hyphal development in soil. *New Phytologist*. 126:517-524.
- Tibbett, M.; Sanders, F.E.; Cairney, J.W.G. 2002. Low-temperature-induced changes in trehalose, mannitol and arabitol associated with enhanced tolerance to freezing in ectomycorrhizal basidiomycetes (*Hebeloma* spp.). *Mycorrhiza*. 12:249-255.
- Tisdall, J.M. 1994. Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil*. 159:115-121.
- Tisserant, B; Gianinazzi-Pearson, V; Gianinazzi, S; Golotte, A. 1993. In planta histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research*. 97:245-250.
- Tobar, R.; Azcón, R.; Barea, J.M. 1994. Improved nitrogen uptake and transport from ¹⁵N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. 1994. *New Phytologist*. 126:119-122.
- Toussaint, J.P.; St-Arnaud, M.; Cahrest, C. 2004. Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck and Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an in vitro compartmented system. *Canadian Journal of Microbiology*. 50:251-260.
- Traore, O. Groleau-Renaud, V. Plantureux, S. Tubeileh, A. Boeuf-Tremblay, V. 2000. Effect of root mucilage and modelled root exudates on soil structure. *European Journal of Soil Science*. 51:575-581.
- Tripathy, R. Singh, A. K. 2004. Effect of water and nitrogen management on aggregate size and carbon enrichment of soil in rice-wheat cropping system. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 167:216-228.
- Turnbull, M.H.; Goodall, R.; Stewart, G.R. 1995. The impact of mycorrhizal colonization upon nitrogen source utilization and metabolism in seedlings of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden and *Eucalyptus maculata* Hook. *Plant, Cell and Environment*. 18:1386-1394.
- Turnbull, M.H.; Goodall, R.; Stewart, G.R. 1996. Evaluating the contribution of

- glutamate dehydrogenase and the glutamate syntase cycle to ammonium assimilation by four ectomycorrhizal fungal isolates. *Australian Journal of Plant Physiology*. 23:151-159.
- van Aarle, I.M. y Olsson, P.A. 2003. Fungal lipid accumulation and development of mycelial structures by two arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:6762-6767.
- Villar, M. C. Petrikova, V. Diaz-Ravina, M. Carballas, T. 2004. Changes in soil microbial biomass and aggregate stability following burning and soil rehabilitation. *Geoderma*. 122:73-82.
- Villegas, J.; Williams, R.D.; Nantais, L.; Archambault, J.; Fotin, J.A. 1996. Effects of N source on pH and nutrient exchange of extramatrical mycelium in a mycorrhizal Ri T-DNA transformed root system. 6:247-251.
- Vogt, K.A.; Publicover, D.A.; Vogt, D.J. 1991. A critique of the role of ectomycorrhizas in forest ecology. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 35:171-190.
- Wallander, H.; Arnebrant, K.; Östrand, F.; Kårén, O. 1997a. Uptake of ¹⁵N-labelled alanine, ammonium and nitrate in *Pinus sylvestris* L. ectomycorrhiza growing in forest soil treated with nitrogen, sulphur or lime. *Plant and Soil*. 195:329-338.
- Wallander, H.; Wickman, T.; Jacks, G. 1997b. Apatite as a P source in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant and Soil*. 196:123-131.
- Wallander, H. 2000. Uptake of P from apatite by *Pinus sylvestris* seedlings colonized by different ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. 218:249-256.
- Wallander, H. 2002. Utilization of organic nitrogen at two different substrate pH by different ectomycorrhizal fungi growing in symbiosis with *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant and Soil*. 243:23-30.
- Wang, X. Yost, R. S. Linqvist, B. A. 2001. Soil aggregate size affects phosphorus desorption from highly weathered soils and plant growth. *Soil Science Society of America Journal*. 65:139-146.
- Whalen, J. K. Hu, Q. C. Liu, A. G. 2003. Compost applications increase water-stable aggregates in conventional and no-tillage systems. *Soil Science Society of America Journal*. 67:1842-1847.

- Watts, C. W. Whalley, W. R. Longstaff, D. White, R. P. Brooke, P. C. Whitmore, A. P. 2001. Aggregation of a soil with different cropping histories following the addition of organic materials. *Soil Use and Management*. 17:263-268.
- Wisser, G.; Guttenberger, M.; Hampp, R.; Nehls, U. 2000. Identification and characterization of an extracellular acid trhealase from the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *New Phytologist*. 146:169-175.
- Wright, D.P.; Scholes, J.D.; Read, D.J.; Rolfe, S.A. 2000. Changes in carbon allocation and expression on carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. Colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch.) Fr.. *Plant, Cell and Environmental*. 23:39-49.
- Wright, A. L. Hons, F. M. 2005. Soil carbon and nitrogen storage in aggregates from different tillage and crop regimes. *Soil Science Society of America Journal*. 69:141-147.
- Wullschleger, S.D.; Reid, C.P.P. 1990. Implication of ectomycorrhizal fungi in the cytokinin relations of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *New Phytologist*. 116:681-688.
- Yamaguchi, T. Takei, T. Yazawa, Y. Wong, M. T. F. Gilkes, R. J. Swift, R. S. 2004. Effect of humic acid, sodium, and calcium additions on the formation of water-stable aggregates in Western Australian wheatbelt soils. *Australian Journal of Soil Research*. 42:435-439.
- Yuksel, O. Kavdir, Y. Bahtiyar, M. 2004. The effect of municipal waste compost on physical characteristics of clay soils. *Fresenius Environmental Bulletin*. 13:1094-1098.
- Zhu, H.; Guo, D.C.; Dancik, B.P. 1990. Purification and Characterization of an Extracellular Acid Proteinase from the Ectomycorrhizal Fungus *Hebeloma crustuliniforme*. *Applied Environmental Microbiology*. 56:837-843.