



---

---

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE  
HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES

---

**Efecto de la simbiosis *Pisolithus tinctorius-Fraxinus uhdei*  
bajo tres fuentes de nitrógeno ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , y Urea)  
sobre el desarrollo de la planta y los agregados  
del suelo.**

**T E S I S**

Presenta:

**Biól. Ana Laura Báez Pérez**

Como requisito para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Director de tesis:

Dr. Héctor Javier Anselmo Villegas Moreno

Co-director de tesis:

Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez

Morelia Mich., Enero del 2011



## ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
4. Antecedentes.....	10
4.1 Hongos ectomicorrízicos.....	10
4.2. Hospederos.....	12
4.3. Proceso de colonización.....	13
4.4. Micelio externo.....	14
4.5. Adquisición de nutrimentos.....	15
4.6 Agregados del suelo.....	17
4.7. Factores que promueven la formación de los agregados del suelo.....	18
4.8. <i>Pisolithus tinctorius</i> .....	21
4.9. <i>Fraxinus uhdei</i> .....	22
5. Justificación.....	24
6. Hipótesis.....	25
7. Objetivos.....	25
7.1. General	
7.2. Particulares	
8. Materiales y métodos.....	26
8.1. Material Biológico.....	26
8.2. Sustrato utilizado en el experimento.....	26
8.3. Desinfección, germinación de las semillas e inoculación del fresno.....	27

8.4. Fertilización.....	27
8.5. Diseño experimental.....	28
8.6. Medición de variables respuesta.....	29
8.6.1. Área Foliar.....	29
8.6.2. Peso fresco y seco.....	29
8.6.3. Longitud específica radicular.....	29
8.6.4. Dependencia micorrizica.....	29
8.6.5. Agregados estables al agua.....	30
8.6.6. Contenido del micelio externo de <i>Pisolithus tinctorius</i> en el sustrato.....	30
8.6.7. Análisis estadístico.....	31
9. Resultados.....	32
9.1. Colonización de <i>Pisolithus tinctorius</i> .....	32
9.2. Variables de crecimiento del fresno.....	32
9.3. Agregados estables al agua (AEA).....	38
9.4. Contenido de micelio en el sustrato .....	40
10. Discusión.....	42
11. Conclusiones.....	46
12. Literatura citada.....	48

13. Artículo aceptado en la revista Ciencia Nicolaita.....	61
--	----

### ÍNDICE DE TABLAS

I. Tabla 1. Análisis físico del suelo utilizado en el experimento.....	26
II. Tabla 2. Análisis químico del suelo utilizado en el experimento.....	27
III. Tabla 3. Valores promedio en las variables de crecimiento de las plantas de fresno de 16 semanas de edad en los diferentes tratamientos no inoculados e inoculados con <i>Pisolithus tinctorius</i> .....	35
IV. Tabla 4. Valores promedio (%) de los agregados estables al agua (AEA) en los tratamientos inoculados con <i>Pisolithus tinctorius</i> y/o fertilizados con diferentes fuentes de nitrógeno: nitrato, amonio y urea.....	38
V. Tabla 5. Correlación entre la longitud de micelio externo de <i>Pisolithus tinctorius</i> y porcentaje de agregados del suelo.....	41

### ÍNDICE DE FIGURAS

I. Figura 1. Ciclo biológico del nitrógeno.....	7
II. Figura 2. Distribución natural aproximada de <i>Fraxinus uhdei</i> , en México.....	23
III. Figura 3. a) germinación del fresno en agrolita-turba, b) fertilización del fresno.....	28
IV. Figura 4. Etapas para la obtención y medición del micelio externo de <i>P. tinctorius</i> .....	31
V. Figura 5. Raíces micorrizadas de <i>Fraxinus uhdei</i> con <i>Pisolithus tinctorius</i> .....	32
VI. Figura 6. Fresnos a las 16 semanas de crecimiento en los distintos tratamientos.....	35

VII.	Figura 7. Longitud específica de raíces de fresno no micorrizadas y micorrizadas.....	36
VIII.	Figura 8. Densidad de biomasa radicular del fresno no micorrizado y micorrizado.....	37
IX.	Figura 9. Dependencia micorrízica del fresno.....	37
X.	Figura 10. Longitud de micelio externo de <i>Pisolithus tinctorius</i> .....	40

## AGRADECIMIENTOS

- Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo de investigación.
- Agradezco al Programa de Maestría Institucional en Ciencias Biológicas por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de maestría.
- Agradezco al Corporativo de Desarrollo Sustentable S. A. de C. V por el apoyo financiero otorgado para la terminación del trabajo de investigación.
- Agradezco a cada uno de los integrantes del comité revisor por su apoyo académico y sus valiosas aportaciones para el desarrollo del trabajo de tesis.
- Agradezco a mi Director de Tesis, Dr. Javier Villegas por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un marco de confianza, comprensión y mucha paciencia, fundamentales para la concreción de este trabajo.
- Agradezco a mi coasesor, Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.
- A mis padres y hermanos les agradezco su apoyo, su cariño y comprensión. Gracias por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos. Gracias por darme la posibilidad de que de mi boca salga esa palabra...FAMILIA. Madre, serás siempre mi inspiración para alcanzar mis metas, por enseñarme que todo se aprende y que todo esfuerzo es al final recompensa.
- A mi hijo Emiliano por su paciencia y por enseñarme a enfrentar los obstáculos con alegría. Gracias porque nunca pensé que de tan pequeño cuerpecito emanara tanta fuerza y entusiasmo para sacar adelante a alguien. TE ADORO HIJO.

- A mi esposo, quien lloró y rió en cada momento junto a mi y fue capaz de contenerme cuando todo iba mal y sobre todo por soportar mi desaparición en presencia. Tu esfuerzo, se convirtió en tu triunfo y el mío, TE AMO. Gracias por amarme como solo tú lo puedes hacer.
- A mis compañeros de laboratorio porque estoy segura que sin su valiosa amistad, sus conocimientos y el apoyo que me brindaron no hubiese sido tan divertido y ameno el trabajo diario.
- Con mucho cariño a ti abuelo, donde quiera que estés, porque siempre me escuchaste y me aconsejaste sabiamente... TE EXTRAÑO.

Sinceramente... Muchas gracias.

## 1. RESUMEN

El uso de estrategias que aseguren el establecimiento exitoso de las especies vegetales, además de contribuir a conservar y/o mejorar la estructura del suelo y otras propiedades edáficas, es de suma importancia en el manejo de ecosistemas forestales. En este sentido, son de valor los hongos ectomicorrízicos asociados a plantas que son capaces de establecerse en ecosistemas perturbados. *Fraxinus* es un género recomendado y utilizado para la restauración de sitios degradados y tiene capacidad de formar asociaciones ectomicorrízicas. Sin embargo, la simbiosis fresno-ectomicorriza ha sido escasamente documentada. La simbiosis ectomicorrizas puede contribuir, a través de las hifas extraradicales, a la toma de nutrimentos del ambiente, como el nitrógeno (N), o en la formación de agregados del suelo. Sin embargo, los efectos de la fuente de N sobre la formación y estabilidad de agregados del suelo en la simbiosis *Fraxinus uhdei* - *Pisolithus tinctorius* no se conocen. En el presente trabajo se analizó la contribución de la asociación *F. Uhdei* - *P. tinctorius* en la formación y estabilidad de agregados y en el crecimiento de la planta, con N como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), y/o urea.

Los resultados muestran que *F. uhdei* inoculado con *P. tinctorius* produjo un aumento significativo en la mayoría de las variables de crecimiento de la planta. Sin embargo, la fertilización con las distintas fuentes de N produjo un efecto negativo en las variables de crecimiento comparadas con el fresno no fertilizados. Además, la inoculación de fresno con *P. tinctorius* incrementó la densidad de su biomasa radical, aunque no provocó un aumento de las raíces laterales. La inoculación con *P. tinctorius* no causó efectos significativos en el porcentaje de agregados estables en agua, salvo en el caso de la interacción urea - *P. tinctorius*, donde produjo una reducción en el porcentaje de agregados entre 1 y 2 mm. En base al análisis de los resultados se sugiere que esta disgregación estuvo estrechamente relacionada a la longitud de micelio externo.

Palabras clave: micorriza, agregados, suelo.



## 2. ABSTRACT

The implementation of strategies to ensure the successful establishment of plant species, as well as help to maintain and/or improve soil structure and other soil variables; it's a challenge in the management of forest soil ecosystems. Ectomycorrhizal fungi like *Fraxinus sp.*, a genus recommended for degraded sites and with the capacity to build ectomycorrhizal associations, should be considered in the rehabilitation of disturbed sites. However, the *Fraxinus sp.* - ectomycorrhizal symbiosis has been poorly documented. The significance of ectomycorrhizal fungus in the symbiosis lies on the extraradical hyphae ability to take up nutrients from the environment, such as nitrogen, and to participate in the formation of soil aggregates. The effects of nitrogen source on the formation and the stability of soil aggregates in the symbiosis *Fraxinus uhdei* - *Pisolithus tinctorius* have not been studied. In this work we analyzed the contribution of the association *Fraxinus uhdei* - *Pisolithus tinctorius* in the stability of aggregates and plant development in presence of nitrate, ammonium and/or urea as N source. The results show that *Fraxinus uhdei* inoculated with *Pisolithus tinctorius* significantly increased most of the growth variables of the plant. However, fertilization with different nitrogen sources had a negative effect on growth variables compared with unfertilized treatments. In addition, inoculation with *P. tinctorius* increased root biomass density. Inoculation with ectomycorrhizal fungi resulted in a reduction in the percentage of aggregates between 1 and 2 mm when was added urea to the the treatments. The correlation data suggest that this disintegration is closely related to the length of external mycelium.

Keywords: mycorrhiza, aggregates, soil.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los recursos naturales son la base del desarrollo económico y social de un país, por lo que su conservación es indispensable. La degradación del suelo es un problema que afecta a gran parte del territorio mexicano y provoca consecuencias que se traducen en un territorio cada vez menos productivo. La deforestación es una de las causas principales de la pérdida y la erosión del suelo (Pérez-Moreno 1998). Sin embargo, la perturbación de ecosistemas naturales, indistintamente de la fuente, afecta la biodiversidad y la dinámica de minerales, la fertilidad del suelo se agota, se deterioran las propiedades físicas y biológicas del suelo y estos son obstáculos que perjudican la regeneración de la cobertura vegetal.

Las especies vegetales son un componente esencial para el mantenimiento y recuperación de la estructura del suelo. El uso de estrategias que aseguren un establecimiento rápido y exitoso de estas especies, es una condición necesaria para asegurar buenos resultados en programas de conservación de suelos

Dentro de estas estrategias se debe considerar a los hongos ectomicorrízicos (HEM) debido a la importancia que tienen para el aporte de agua y nutrientes a la planta hospedera, así como por su contribución en la formación y estabilidad de agregados en el suelo (Tisdall 1994).

Las raíces HEM se caracterizan por la presencia de un manto de hifas que cubren las puntas de las raíces más finas y una red de hifas entre las células epidérmicas o células corticales conocida como red de Hartig. La presencia del HEM en las raíces modifica su morfología, promueven su bifurcación, ramificación, ensanchamiento y aumenta con ello su superficie de absorción (Smith y Read 1997). Las hifas que se proyectan hacia el exterior de la raíz exploran un mayor volumen de suelo. Algunas especies pueden formar cordones miceliales o rizomorfos, los cuales tienen una mayor capacidad exploratoria y pueden tolerar condiciones adversas más fácilmente, tal es el caso de *Pisolithus tinctorius*, el cual se ha reportado como una especie capaz de persistir bajo condiciones adversas y

superviven en suelos empobrecidos o terrenos perturbados (García-Rodríguez *et al.* 2009).

Este micelio funciona como un sistema radical complementario, fundamental para la absorción de nutrientes y agua por la planta, ya que explora microhábitats del suelo inaccesible para las raíces (Agerer, 2001).

A la fecha se ha estimado que existen más de 5000 especies de HEM, de los cuales alrededor del 90 % son Basidiomycetes (Smith y Read 1997) y el resto pertenece a los Ascomicetes. Prácticamente todos los árboles (más del 95 %) y abundantes arbustos de interés forestal (Smith y Read 1997, Koide y Kabir 2000, Founoune *et al.*, 2001, Dickie *et al.*, 2004, Duplessis *et al.*, 2004, André *et al.*, 2005) forman asociación HEM, existiendo solo algunas asociaciones de este tipo formadas con plantas herbáceas. La asociaciones ectomicorrízicas se han documentado principalmente en hospedantes pertenecen a las familias *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae*, *Myrcataceae*. Recientemente Ambriz *et al.* (2010), reportaron la asociación de *P. tinctorius* con *Fraxinus uhdei* (fresno) perteneciente a la familia de las *Oleáceas*.

*Fraxinus* es un género recomendado y utilizado para la restauración de suelos degradados (Stabler *et al.*, 2001). En este sentido se ha documentado que un bosque dominado por fresno aporta cantidades importantes de nitrógeno (N) y fósforo (P) al suelo mediante la producción de litter (Rothstein *et al.* 2004). Este aporte se debe al contenido importante de estos nutrientes en las hojas de esta especie (Douds y Chaney 1986, Lamar y Davey 1988, Rothstein *et al.* 2004).

La utilización de especies que superviven en suelos pobres, y capaces de establecer simbiosis con microorganismos que contribuyan en el proceso de agregación, puede constituir una solución viable para mejorar la estructura del los suelos y la dinámica de los ecosistemas. En este sentido los agregados del suelo pueden influir en variables importantes de los procesos biogeoquímicos del suelo como son la formación de macroporos y microporos, los cuales permiten que de

forma simultánea un suelo pueda drenar el exceso de agua (a través de los macroporos), así como retenerla a niveles de capacidad de campo (por el efecto capilar de los microporos); la estabilización de la materia orgánica, promoviendo su humificación (Jastrow, 1996) y manteniendo de la diversidad de microorganismos del suelo, (Caravaca *et al.*, 2002) .

Se ha reportado que las asociaciones simbióticas de *F. uhdei* con el HEM *P. tinctorius* contribuyen significativamente en la formación de agregados estables al agua (Ambriz *et al.* 2010).

La importancia del micelio extramatricial de HEM radica en que es la interface entre el suelo y la planta (Kodesová *et al.*, 2006). Se ha observado que el HEM forma redes miceliales que envuelven las partículas orgánicas y minerales además de formar y proporcionar estabilidad a los agregados en el suelo (Kranabetter *et al.*, 2009; Pérez-Moreno, 1998). Además se ha sugerido una relación positiva entre la longitud del micelio externo de HEM, con las propiedades físicas del suelo (Paz y Sánchez, 2007).

Al efecto de las hifas del micelio externo se suma el de las raíces de las plantas y el efecto adherente de los exudados radicales, polisacáridos y otros residuos microbianos, que actúan sobre la materia orgánica y mineral del suelo. La nucleación a partir de los componentes mas pequeños de la fracción mineral del suelo (arcillas) con la materia orgánica da lugar a la formación de microagregados, éstos a su vez se unen para formar agregados de mayor tamaño, con propiedades diferentes, este proceso se continua sucesivamente hasta formar los macroagregados (Tisdall, 1994). Si bien los suelos con mayor porcentaje de macroagregados son los que tienen la mayor capacidad de infiltración de agua y de captación de nutrientes. La formación de macroagregados estables en suelos es limitada, debido a que mientras mayor es el tamaño de los agregados estos son más frágiles y por lo tanto más vulnerables a procesos de disgregación (Tisdall 1994),

La principal ventaja de un suelo con mejor estructura radica en que se tendrá una mayor disponibilidad de nutrimentos y agua (Wright y Hons 2005), que se refleja en el crecimiento y mantenimiento tanto de la planta como de el HEM, es decir, la simbiosis HEM tiene una función importante al incrementar el estatus nutrimental de las especies vegetales leñosas.

La importancia del micelio externo de la HEM en la captación de nutrimentos para las plantas radica en que la través de éstas hifas se realiza la absorción y el transporte de nutrientes hasta el interior de la raíz para posteriormente ser translocados a la planta huésped. Además el micelio del HEM, comparado con las raíces, tiene un área superficial mucho mayor, lo que le permite explorar el suelo y tomar nutrimentos minerales por encima de la zona de influencia de la raíz, especialmente los que se difunden lentamente en la solución del suelo (Tatry *et al.* 2009) o los que se encuentran en formas no disponibles. Tal es el caso del N (Alberton y Kuyper 2009), elemento esencial para el crecimiento vegetal. Naturalmente, la mayoría del nitrógeno se encuentra en forma de gas como  $N_2$  y no está disponible para la planta. La forma más importante en que este N puede incorporarse en los ecosistemas edáficos, es mediante el proceso de la “fijación del nitrógeno” donde este  $N_2$  se convierte en amoníaco iniciando así el ciclo del nitrógeno (fig 1). Este proceso lo llevan a cabo bacterias que viven en asociación simbiótica con ciertas plantas, como las de género *Rhizobium* las cuales se asocian normalmente con muchos tipos de leguminosas (Sirko y Brodzik, 2000).

En el suelo, el nitrógeno orgánico puede ser convertido en amonio por los microorganismos del suelo (entre ellos las ectomicorrizas y algunas bacterias como por ejemplo *Bacillus*, *Clostridium* y *Serratia*) en un proceso llamado “amonificación” donde las proteínas y ácidos nucleicos que formaron parte de la materia animal y vegetal muerta y que forman parte del suelo, se convierten en amonio. Bajo ciertas condiciones ambientales el amonio puede ser oxidado y transformado a nitrato ( $NO_3^-$ ) en un proceso llamado “nitrificación” (Taiz y Zeiger, 1991). Durante la nitrificación, las bacterias convierten el amoníaco en compuestos

que contienen nitratos. Existen dos géneros de bacterias nitrificantes, *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*; las bacterias *Nitrosomonas* transforman el amoníaco/amonio en nitritos y los nitritos son transformados en nitratos mediante la acción de las bacterias *Nitrobacter*. El nitrógeno en forma de nitratos es una forma que la mayor parte de las plantas y otros organismos autótrofos pueden usar en la síntesis de proteínas y otras moléculas nitrogenadas. Por medio de la desnitrificación los microorganismos del suelo (*Thiobacillus desnitrificans* como ejemplo) pueden convertir los nitratos nuevamente en  $N_2$  e incorporarlo al aire en forma de gas, completando así el ciclo del nitrógeno (Sirko y Brodzik, 2000).

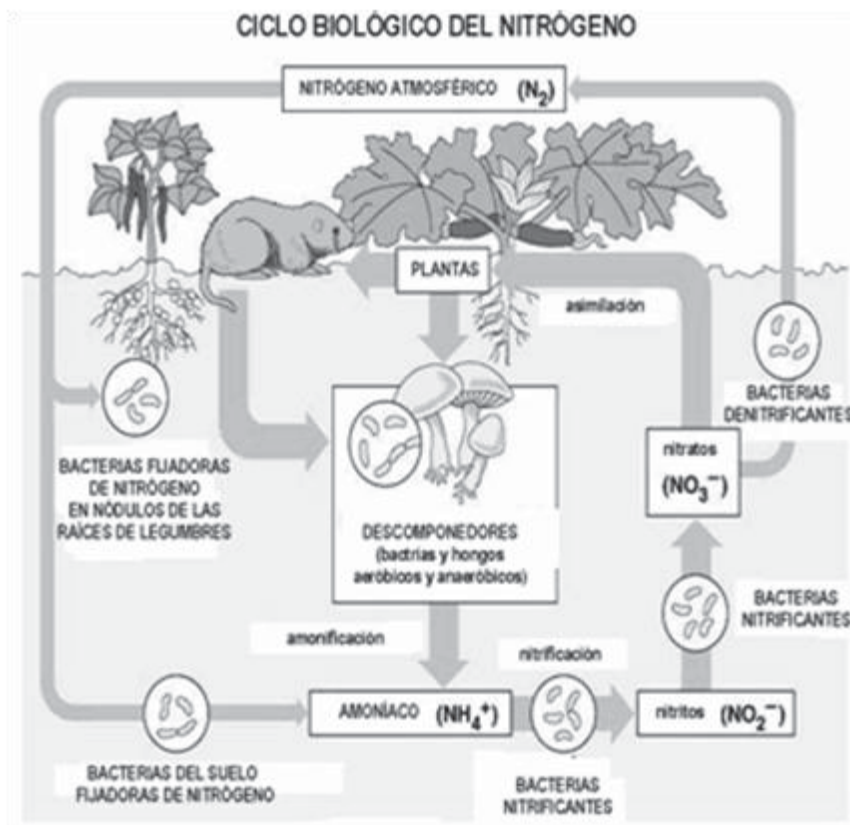


Fig. 1. Ciclo biológico del nitrógeno.

A diferencia de las raíces de las plantas, las hifas de los HEM pueden asimilar fósforo y nitrógeno de fuentes inorgánicas y orgánicas (Wallander 2002).

El N en el suelo se puede encontrar tanto en forma inorgánica, como asociado a distintas formas de materia orgánica. Sin embargo, las plantas para su crecimiento

solo son capaces de utilizar este elemento en su forma inorgánica, tanto de amonio como nitrato (Helmisaari *et al.* 2009)

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 capacidad de producir enzimas extracelulares como las proteasas, oxidazas y fosfatasas que participan en la mineralización de N (Bending y Read 1995). Pérez-Moreno y Read (2000) sugieren que el micelio externo es el encargado de la movilización de nutrientes de sustratos orgánicos naturales a la planta. La toma de nitrógeno en forma de N-orgánico por parte del micelio externo ha sido estudiada por varios autores (France y Reid 1984, Finlay *et al.* 1988).

En la mayoría de las especies de hongos la eficiencia en la absorción es mas grande en el amonio (France y Reid 1984, Ahmad *et al.* 1990, Rangel-Castro *et al.* 2002). La diferencia en la absorción de las dos fuentes inorgánicas oscila entre un 60 % de absorción N en forma de nitrato en relación a la absorción del 100 % de amonio (Finlay *et al.* 1989). Además, cuando se aplican ambos iones se denota una preferencia del hongo por el amonio (Colpaert *et al.* 1999).

Los cambios fisiológicos en el micelio externo de distintos HEM como consecuencia de ser sometidos a diferentes fuentes de N han sido documentados (Finlay *et al.* 1989, Smith y Read 1997). Sin embargo, se desconoce si estos cambios influyen en la formación y estabilidad de agregados.

Por otra parte, ha sido ampliamente documentado el papel de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la formación de agregados del suelo 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 (Nobrega *et al.* 2001, Augé *et al.* 2001, Rillig *et al.* 2002, Rillig 2006), 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). Mientras que en el caso de los HEM se conoce muy poco sobre su posible participación en la formación de macro y microagregados de suelo.

El uso de los HEM en interacción con *F. uhdei* puede constituir una estrategia viable para disminuir el impacto de la pérdida y degradación de suelos, así como contribuir en los programas de reforestación y revegetación. Si bien investigaciones preliminares apoyan una influencia positiva en la interacción fresco - ectomicorriza sobre la formación y estructura del suelo, se desconoce el impacto de esta asociación, bajo la influencia de diferentes fuentes de N, sobre el desarrollo de la plantas así como en la formación y estabilidad de agregados.



## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 Hongos ectomicorrízicos

Una de las relaciones más importantes entre plantas y microorganismos es la micorriza. Este término, acuñado por Frank en 1885 (Smith y Read 1997), es utilizado para describir diversos tipos de simbiosis que se establecen entre las raíces de las plantas y ciertos grupos de hongos. El principal beneficio para ambos simbioses micorrízicos es el intercambio de nutrientes (Pérez-Moreno y Read, 2004). Los hongos que establecen esta simbiosis reciben carbono de las plantas hospederas y las plantas en intercambio reciben fósforo, nitrógeno y otros nutrientes a través de las hifas asociadas.

La micorriza es una simbiosis que se establece entre alrededor de 5000 especies de hongos y más del 90 % de las especies de plantas vasculares. La simbiosis micorrízica juega un papel crucial en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas naturales de regiones tropicales, templadas y boreales del planeta (Smith y Read 1997).

Actualmente se reconocen siete tipos de simbiosis micorrízicas: arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutoide, monotropeide, ericoide y orquidáceas (Smith y Read 1997). Uno de los más importantes tipos de asociaciones micorrízicas, desde el punto de vista ecológico y biogeográfico, es la ectomicorriza, término propuesto por Peyrone en 1969.

Las ectomicorrizas son hongos pertenecen al grupo de los basidiomicetes y producen esporas en el exterior del suelo en un órgano llamado basidiocarpo o cuerpo fructífero que puede ser gelatinoso, cartilaginoso, carnoso, esponjoso y estar abiertos desde su formación, abrirse posteriormente o permanecer cerrado. Los cuerpos fructíferos se utilizan para la identificación de los hongos y como fuente de inóculo (Smith y Read 1997).

Agerer (2001) propuso una clasificación de las ectomicorrizas en “tipos exploratorios” basada en la cantidad y grado de diferenciación del micelio extraradicular. Según esta clasificación se pueden dividir en: 1) tipo exploratorio de contacto con un manto liso y pocas hifas; 2) tipo exploratorio de corta distancia con muchas hifas emergentes pero sin rizomorfos; 3) y tipo exploratorio de media y larga distancia, cuya característica típica es la existencia de rizomorfos, masas densas de hifas con estructuras diferenciadas siendo en este grupo donde se ha clasificado a *P. tinctorius*. Los dos últimos exploratorios están basados en el grado de diferenciación de sus rizomorfos que varían desde indiferenciados a altamente diferenciados, siendo estos últimos unas estructuras adaptadas para el transporte de nutrientes a larga distancia (Buscardo *et al.* 2009).

Las raíces ectomicorrícicas se caracterizan por la presencia de un manto de hifas que cubre las puntas de las raíces más finas y una red de hifas entre las células epidérmicas o células corticales conocida como red de Hartig. Las hifas que forman el manto, se prolongan y forman cordones miceliales que crecen entre las partículas del suelo, y son las responsables de la mayor absorción y traslocación de nutrimentos hacia el simbionte (Carreón *et al.*, 2007). Las estructuras diagnósticas de la ectomicorriza son: el manto fúngico, la red de Hartig, y el micelio externo vegetativo que emerge a partir de las raíces.

La presencia del hongo en la raíces modifica su morfología, promoviendo su bifurcación, ramificación y ensanchamiento, y aumentando con esto su superficie de absorción. Las hifas que se proyectan al exterior de la raíz exploran un volumen mayor de suelo, algunas especies pueden formar cordones miceliales o rizomorfos, los cuales tienen una mayor capacidad, de absorción (Smith y Read 1997).

Los HEM contribuyen significativamente al aporte de biomasa de los ecosistemas de bosque. Leake *et al.* (2004) señalan que el micelio extraradical constituye del 20 % al 30 % del total de la biomasa microbiana del suelo. Wallander *et al.* (2001)

estiman que, en suelos forestales, la biomasa total del micelio de ectomicorrizas (incluido el manto) en humus puede alcanzar de 700 a 900 kg. por hectárea.

La micorriza tiene ventaja sobre una raíz no micorrizada debido a que el micelio externo se extiende a mayor distancia que los pelos radiculares. Además les imparte otros beneficios como: incrementar la tasa fotosintética, aumentar la actividad microbiana del suelo, aumentar la fijación de nitrógeno por bacterias simbióticas, incrementar la resistencia a plagas y estrés ambiental, estimular la actividad de sustancias reguladoras de crecimiento, y aumentar la tolerancia a sequía. Además son mediadores de muchas de las interacciones entre la microflora y microfauna, que ocurre en la rizosfera (Pérez-Moreno 1998, Smith y Read 1997).

#### **4.2 Hospederos**

La mayoría de los hospederos de HEM son árboles, pero existen asociaciones con arbustos y en menor grado con herbáceas. Dickie *et al.* (2004) encontró ocho especies de micorrizas asociadas con *Helianthemum bicknellii*, una herbácea perenne a semi-leñosa arbustiva de zonas de sabanas y praderas.

Los árboles con asociaciones ectomicorrícicas son dominantes en bosques de coníferas, en regiones boreales frías o alpinas, y en muchos bosques de hoja ancha en regiones templadas o mediterráneas, pero también se presentan en sabanas tropicales o subtropicales o en bosques lluviosos (Smith y Read 1997).

Dentro de las familias de árboles ectomicorrizados de importancia comercial sobresalen las familias *Pinaceae* con los géneros *Cedrus*, *Abies* y *Pinus* (Koide y Wu 2003), *Fagaceae* con los géneros *Castanea* y *Quercus* (Dickie *et al.* 2004), *Betulaceae* con el género *Alnus*, *Myrtaceae* con el género *Eucalyptus* (Duplessis *et al.* 2004), *Mimosaceae* con el género *Acacia* (Founoune *et al.* 2001, André *et al.* 2005) y *Ericaceae* con el género *Arbutus*, (Smith y Read 1997).

Se considera que algunas especies fúngicas, tales como *P. tinctorius* (Pers.) Cooker, tienen la habilidad de formar simbiosis ECM con una gran cantidad de

plantas, incluyendo especies vegetales adscritas a diferentes familias. En contraste, otras especies fúngicas se asocian con un restringido número de especies vegetales adscritas a un género o una familia, como el género *Suillus* el cual esta restringido a *Pinaceae* (Pérez-Moreno y Read 2004).

### **4.3 Proceso de colonización**

La formación de las ectomicorrizas inicia cuando la espora o cualquier otra fuente de inóculo hace contacto con los exudados de la raíz. Una vez que la hifa alcanza la superficie de la raíz, se adhiere a ella y se produce la penetración al interior de la raíz y altera su morfología formándose las estructuras características como la red de Hartig y el manto hifal. Todos estos sucesos aparecen con la compatibilidad del hongo y la planta, ya que si no es el caso, la planta huésped puede producir compuestos fenólicos, limitando la formación de la red de Hartig en la capa exterior de las células corticales de la raíz (Feugey *et al.* 1999).

La formación de la ectomicorriza puede tardar de dos a cuatro días, contados a partir del inicio del contacto del inóculo con los exudados de la raíz. Después de que se forma parcialmente el 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 1984). 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 solo 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 zona en que el hongo logra ingresar en las células de su hospedero es muy específica y se localiza cerca del ápice. Se ha observado que la forma de penetrar puede ser mecánica (Duddridge y Read 1984), considerando que la relación

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 (Baldrian 2009). Todos estos procesos van acompañados de cambios morfológicos finales en la raíz colonizada. Entre los cambios más importantes destaca la formación de raíces laterales, la formación de estructuras coralinas (Kaska *et al.* 1999) y la supresión de la elongación de las raíces laterales (Ditengou *et al.* 2000).

El manto hifal es la estructura 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 emplearse en la identificación a nivel de especie; tiene la función de tomar, transportar y transferir nutrientes del suelo hacia el manto hifal (Smith y Read 1997) y al unirse dos micelios monocarióticos en uno dicariótico puede dar lugar a la producción de nuevas esporas en un basidio (Barker *et al.* 1998). Este último aspecto cierra el ciclo de vida de los HEM al dar lugar a nuevas esporas e iniciar la colonización de otras plantas.

#### **4.4 El micelio externo**

El micelio externo es la interface entre la planta y el medio. Puede ser una hifa simple o un grupo de hifas unidas directamente al manto hifal. La función de este tejido es la de incrementar la superficie de contacto con el suelo para facilitar la toma de nutrientes 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 han sido empleadas para la clasificación de estos hongos micorrízicos.

El micelio externo es uno de los más importantes componentes en el funcionamiento de la simbiosis HEM debido a su habilidad para absorber y transportar nutrientes minerales (Finlay *et al.* 1989, Read *et al.* 1985) y orgánicos (Bending y Read 1995, Pérez-Moreno y Read 2000) del suelo. Por otra parte el micelio puede funcionar como propágulo, iniciar la formación de cuerpos

fructíferos como primordios y/o conectar árboles de la misma o diferente especie en la naturaleza (Pérez-Moreno y Read 2004).

Sin embargo, Read (1992) menciona que la estructura, la función y hasta la presencia de este componente han sido frecuentemente ignoradas. La principal razón de este hecho pudiera ser que, comparado con los otros componentes de la simbiosis HEM, el micelio externo es la parte más difícil de examinar y manipular experimentalmente de un modo no destructivo.

#### **4.5 Adquisición de nutrimentos**

Las hifas de los hongos micorrízicos se encuentran extensamente distribuidas por el suelo y contribuyen al reciclaje y absorción de nutrimentos en los ecosistemas forestales.

Sin embargo, los mecanismos que participan en la movilización de nutrientes de sustratos naturales han sido poco estudiados (Pérez-Moreno y Read 2000). 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 capacidad de producir enzimas extracelulares como las proteasas, oxidasas y fosfatasa, que participan en la mineralización de N (Bending y Read 1995).

Pérez-Moreno y Read (2000) sugiere que el micelio externo es el encargado de la movilización de nutrientes de sustratos orgánicos naturales a la planta. La toma de N en forma de nitrato por parte del micelio externo ha sido estudiada por varios autores (France y Reid 1984, Finlay *et al.* 1988). Gobert y Plassard (2001) señalan que una planta ectomicorrizada tiene una mayor capacidad de utilizar el  $\text{NO}_3^-$  a cualquier concentración en comparación con una planta no micorrizada.

El N tanto en forma de nitrato como amonio ingresa en el micelio externo y es incorporado en aminoácidos (Finlay *et al.* 1989). Una vez que ingresa al micelio externo, el amonio se integra como un grupo amino en un esqueleto carbonado (Smith y Read 1997) y este 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 (Martin *et al.* 1994). Cuando la glutamina sintasa se inhibe, la glutamato deshidrogenada incrementa su actividad, dando como producto el glutamato (Turnbull, *et al.* 1995). El nitrato por su parte es reducido por la nitrato reductasa/nitrito reductasa e incorporado en glutamato, glutamina y asparagina (Guescini *et al.* 2003).

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.* 2002). 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 este nutriente entra a la célula del hospedero por medio de transportadores específicos (Selle *et al.* 2005).

Ola y Wallander (2003) evaluaron el efecto que tiene la fertilización nitrogenada en el crecimiento del micelio externo de hongos EM y observaron que el crecimiento del micelio externo del hongo no guarda una relación directa con la concentración de N en el suelo, aunque otros factores que están inducidos por el N sí tienen influencia en el crecimiento del micelio. Avis *et al.* (2003) observaron que un aumento en el suministro de N disminuye la diversidad y composición de las comunidades de HEM en ecosistemas templados caducifolios.

Los cambios fisiológicos en el micelio externo de distintos HEM a consecuencia de diferentes fuentes de nitrógeno están documentados (Finlay *et al.* 1989, Smith y Read 1997). Sin embargo, se desconoce si estos cambios influyen en la formación y estabilidad de agregados.

Con respecto al amonio, la eficiencia en la absorción de este ión es grande en la mayoría de las especies (France y Reid 1984, Ahmad *et al.* 1990, Rangel-Castro *et al.* 2002). La diferencia en la absorción de las dos fuentes inorgánicas oscila

entre un 60 % de nitrato en relación a la absorción del 100 % de amonio (Finlay *et al.* 1989), normalmente cuando aplican ambos iones se denota una preferencia del hongo por el amonio (Colpaert *et al.* 1999).

Por otro lado, el N en forma de urea, presenta la ventaja de proporcionar un alto contenido de nitrógeno. La urea se encuentra en el suelo donde hay numerosos microorganismos que liberan una enzima llamada ureasa. La ureasa es una enzima hidrolítica que cataliza la reacción de descomposición de urea con formación de una molécula de anhídrido carbónico y dos moléculas de amoniaco, el cual en presencia de agua, se transforma rápidamente en amonio, que es entonces fácilmente accesible a las plantas (Sirko y Brodzik 2000).

#### **4.6 Agregados del suelo**

El papel de los hongos MA en la formación de agregados del suelo está ampliamente documentado (Tisdall 1994, Wright y Upadhyahya 1998, Augé *et al.* 2001, Rillig *et al.* 2002, Piotrowski *et al.* 2004, Milleret *et al.* 2008), mientras que en el caso de los HEM se conoce muy poco sobre su posible participación en este proceso.

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 como núcleo, 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.

La estabilidad de los agregados en el tiempo está en relación a su tamaño, siendo 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 y la presencia de compuestos ricos en N (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 a su vez se concentran dentro de los mismos (Gale *et al.* 2000). La baja transformación de la materia orgánica en los macroagregados, en comparación a la encontrada en suelo no consolidado, se pudo constatar en suelos forestales, 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).

Un suelo con una buena estructura (entendiéndose como una mayor presencia de macroagregados) crea condiciones favorables para el desarrollo de la planta, debido a su alta porosidad, movimiento de agua y circulación del aire; es más resistente a la erosión hídrica y eólica y a la compactación (Read 1992). Además de presentar una mayor disponibilidad de nutrientes (Wright y Hons 2005).

#### **4.7 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 como se describe a continuación.

##### **- Raíces de las plantas**

El efecto de las raíces sobre la formación y estabilidad de agregados de suelo se puede dar en dos aspectos; a través de un efecto físico por el crecimiento de la

raíz y mediante la secreción de sustancias que funcionan como agentes cementantes. Dentro de las sustancias encargadas de formar agregados resistentes están los compuestos de naturaleza fenólica (Martens 2002). El ácido poligaracturónico es un exudado de raíz que incrementa la estabilidad de agregados al incrementar la resistencia de la unión entre partículas minerales y orgánicas y disminuye los ciclos de humedecimiento y secado sobre estos (Czarnes *et al.* 2000). La importancia de los exudados radicales 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 autores se refleja una clara participación de este factor en la agregación (Bearden, 2001).

#### - La materia orgánica

La materia orgánica desempeña una función importante en la agregación, debido a que, como consecuencia de su descomposición y resíntesis, se producen compuestos que funcionan como enlace entre la fracción mineral (Velásquez *et al.* 2001). Además de favorecer el desarrollo de especies vegetales y microorganismos.

#### - 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 una proteína que es liberada al medio por el micelio de hongos MA llamada glomalina (Rilling y Mummey 2006). Otro factor relacionado con dicha estabilidad es la densidad de hifas del hongo (Nobrega *et al.* 2001, Augé *et al.* 2001, Rillig *et al.* 2002), La

presencia de hifas de hongos micorrízicos incrementa la resistencia a la tensión de los microporos en los agregados (Bearden 2001).

Además de los hongos MA, las ectomicorrizas también pueden contribuir a la agregación de los suelos (Tisdall 1994). Ambriz *et al.* (2010) han documentado que el género *Fraxinus* es capaz de formar asociaciones simbióticas con el hongo EM *P. tinctorius* y que esta asociación contribuye significativamente en la agregación del suelo.

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 influye significativamente en la estabilidad de los agregados (Eviner y Chapin 2002). Por medio de la exudación de compuestos 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 (*Tithonia tubiformis*) inoculado con *Rhizobium* (Alami *et al.* 2000).

#### - 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.* 2001), 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 observó un efecto en la estabilidad de agregados, cuando un suelo pobremente estructurado se adicionó con calcio (Stenberg *et al.* 2000). Por otra parte los óxidos de hierro y aluminio parecen participar activamente en la agregación en suelos con diferente mineralogía (Six *et al.* 2000) y en interacción con el contenido de materia orgánica (Duiker *et al.* 2003). En sentido contrario, Graham y colaboradores (2002) observaron que la aplicación de fertilizante puede producir una disminución de la estabilidad de agregados de suelo por el hecho de incrementar la concentración de cationes monovalentes.

#### - 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 un mayor porcentaje de agregados estables al agua (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).

#### **4.8 *Pisolithus tinctorius***

*P. tinctorius* (Pers.) Coker et Couch (syn.=*P. arhizus* (Scop.: Pers.) Rauschert) es un hongo del grupo de los basidiomicetos, comestible en estadios juveniles, y además se utiliza en la elaboración de tintes de colores café brillante y negro (García-Rodríguez 2009). El mayor interés en esta especie se deriva de su éxito en la inoculación de plantas forestales en países de los cinco continentes. Las plantas con las que *P. tinctorius* establece simbiosis ectomicorrizica incluyen más de veinte géneros de gimnospermas y angiospermas con distribución mundial; incluyendo especies forestales de las familias Casuarinaceae, Dipterocarpaceae, Pinaceae, Myrtaceae (Pérez-Moreno y Read 2004). Recientemente Ambriz *et al.*

(2010) documentaron la asociación de *P. tinctorius* con el género *Fraxinus* perteneciente a la familia Oleaceae.

El cuerpo fructífero de este hongo suele medir entre 5 y 20 cm de altura y hasta 10 cm de diámetro, fibroso de color pardo amarillento, sus esporas son de color marrón canela, globosas de 7 a 12  $\mu$  y con espinas de hasta 2  $\mu$  de largo. Su fructificación es al comienzo del otoño.

Puede sobrevivir en suelos empobrecidos o terrenos perturbados así como en suelos de alta acidez, o con altas concentraciones de metales pesados y resiste periodos de estrés por sequía (Kuo 2006).

#### **4.9 *Fraxinus uhdei***

El fresno es el nombre común de los miembros de un género de plantas formado por unas 65 especies de árboles y arbustos, en su mayor parte de la región templada del hemisferio norte, apreciados por su madera y por su valor ornamental. *Fraxinus uhdei* (Wenzig) Lingelsh es una especie nativa de México, fácilmente adaptable, de rápido y vigoroso crecimiento y vive de 80 a 100 años, posee una corteza rugosa y estriada, sus hojas están formadas de cinco a nueve folíolos y crece generalmente en climas templados.

Se caracteriza por poseer pequeñas flores verdosas o blancas inconspicuas, unisexuales, provistas o desprovistas de sépalos y pétalos, y dispuestas por lo general en ramilletes. Se abren al comienzo de la primavera y dan lugar a un fruto seco llamado sámara con una nuececilla convexa o comprimida y provisto de un ala plano-comprimida submembranacea o coriácea; semilla oval-oblonga, comprimida cubierta con una testa delgada, albumen carnosos, cotiledones planos y foliados. Las hojas finamente dentadas se insertan en las ramas en posición opuesta y son compuestas con un número impar de folíolos (imparipinadas), deciduas, apareciendo comúnmente antes que las flores, folíolos membranosos o coriáceos (Calderón y Rzedowski, 2005). Las raíces en esta especie son profundas por su distribución sobre suelos profundos, frescos y húmedos. Se

localiza generalmente en microhábitats más bien húmedos, como cañadas y barrancas, frecuentemente en asociaciones de bosque mixto o mesófilo.

El área de distribución natural del fresno se extiende desde el área central occidental de México a través de Guatemala, desde las latitudes 25° a la 14° N (Francis, 1990). La mayoría de su distribución natural en México se encuentra arriba de los 2,400 m de elevación (fig. 2).



Fig. 2. Distribución natural aproximada de *Fraxinus uhdei*, en México.

El fresno se ha recomendado para la restauración de sitios degradados. Aunado a eso, Rothstein *et al.* (2004) documentaron que hay grandes cantidades de N y P en la hojarasca de un bosque dominado por fresnos, y plantean que existe una gran disponibilidad de nutrientes para “descomponedores” de materia orgánica del bosque.

Por otra parte, se ha sugerido que el éxito del fresno para poder desarrollarse en zonas degradadas puede ser el resultado de su habilidad para formar asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos (Stabler *et al.* 2001). El efecto de esta asociación en las variables que influyen en la agregación del suelo ha sido muy poco estudiado. Debido a ello, el presente proyecto se propone medir el efecto de la simbiosis sobre el desarrollo de la planta y sobre la estabilidad de los agregados en el suelo de *P. tinctorius* – *F. uhdei* así como analizar si distintas fuentes de nitrógeno influyen sobre esta asociación.

## 5. JUSTIFICACIÓN

La rehabilitación de estos suelos es muy complicada, necesitándose la implementación de estrategias en las que se incluya una buena selección de plantas así como de técnicas innovadoras para el óptimo establecimiento de dichas plantas. El fresno (*Fraxinus uhdei*) es un género que se establece en suelos degradados por su habilidad para crecer en condiciones de estrés. Existen muy pocos trabajos que muestran la contribución del fresno en la estructura del suelo. En contraparte, la importancia de los hongos micorrízicos en la rehabilitación de los suelos y su contribución en el mantenimiento de la estructura de este han sido ampliamente reconocidos. Por lo anterior, el uso de los HEM en interacción con *Fraxinus uhdei* puede constituir una estrategia viable para disminuir el impacto de la pérdida y degradación de suelos e incluirse en los programas de reforestación y revegetación. Si bien investigaciones preliminares soportan el efecto benéfico de esta simbiosis en la formación de agregados y estructura del suelo, las variables que afectan esta asociación y sus efectos sobre el suelo no han sido suficientemente estudiadas. En este orden de ideas, investigar el efecto de diferentes fuentes de N sobre la asociación *Fraxinus*-HEM y su contribución en el desarrollo de la plantas y en la agregación del suelo, nos puede ayudar a entender mejor el papel de esta asociación en los ecosistemas edáficos

## 6. HIPOTESIS

La simbiosis de *F. uhdei* con *P. tinctorius* bajo diferentes fuentes de N tiene efectos diferentes en la estabilidad de agregados del suelo y en el desarrollo de la planta.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1 GENERAL

Analizar, en condiciones de cámara de crecimiento, la contribución de la asociación *Pisolithus tinctorius* – *Fraxinus uhdei* en la estabilidad de agregados y en el desarrollo del fresno, en suelo fertilizado con nitrógeno en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y/o urea.

### 7.2 PARTICULARES

- Analizar, en condiciones de cámara de crecimiento, la estabilidad de agregados, en la rizosfera de plantas de fresno inoculadas con el HEM *Pisolithus tinctorius* fertilizadas con nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), y/o urea.
- Analizar, en condiciones de cámara de crecimiento, el crecimiento del micelio externo del HEM y de la parte aérea y raíz de fresnos, inoculados con el HEM *Pisolithus tinctorius*, fertilizados con nitrógeno en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), y/o urea.



## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Material biológico

Las esporas del HEM *P. tinctorius* (contenidas en turba micronizada) fueron provistas por Biosineterra Solutions inc. a una concentración de 500 millones de esporas por gramo de turba micronizada, dicha concentración fue diluida hasta obtener una concentración de un millón de esporas en 1.0 g de turba micronizada.

Las semillas de *Fraxinus uhdei* fueron colectadas en el municipio de Morelia en la primavera del 2008.

### 8.2. Sustrato utilizado en el experimento

El suelo utilizado para el experimento fue de tipo franco-arcilloso-arenoso colectado en el municipio de Morelia y presentó las características físico-químicas que se muestran en la tabla 1 y 2:

Tabla 1. Análisis físico del suelo utilizado en el experimento

ANÁLISIS FÍSICO	
Clasificación	Franco-Arcillo-Arenoso
% Arcilla	24.36
% Limo	26
% Arena	49.64
Densidad aparente	1.17
Densidad real	1.92
% poros	39.06

Tabla 2. Análisis químico del suelo utilizado en el experimento

<b>ANÁLISIS QUÍMICO</b>	
Nitrógeno orgánico kg/ha	19.60 (Muy bajo)
Nitrógeno amoniacal ppm	116.80 (Muy alto)
Fósforo	21.38 ppm
	Bajo
<b>CATIONES INTERCAMBIABLES EN meq/100 g s.s</b>	
Calcio	8.75
Magnesio	7.00
% Calcio intercambiable	51.09 Insuficiente
% Magnesio intercambiable	40.87 Excesivo

Dicho suelo fue secado, triturado y tamizado con una malla de 2 mm. de abertura y esterilizado a 121 °C, 15 psi de presión, por un periodo de 20 minutos repitiendo el proceso por tres ocasiones.

### **8.3. Desinfección, germinación de las semillas e inoculación del fresno**

A las semillas de fresno se les retiro la testa de manera manual y fueron desinfectadas con peróxido de hidrogeno al 10 % (v:v) por 15 minutos. Se germinaron en contenedores de 30 ml teniendo como sustrato una mezcla estéril de agrolita-turba (2:1) (fig. 3a), y se trasplantaron a bolsas de plástico con 1 kg del suelo estéril antes mencionado e inoculadas con aproximadamente 1 000 000 de esporas de *P. tinctorius* por maceta (fig. 3b), utilizando como vehículo turba micronizada.

### **8.4. Fertilización**

Los fresnos fueron fertilizados cada tercer día después del transplante con solución nutritiva que contenía 0.4723 g/l de  $\text{Ca} (\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , 0.26428 g/l de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  ó 0.12012 g/l de  $\text{NH}_2 \text{CONH}_2$  como fuente de nitrógeno dependiendo

del tratamiento fertilizado, conjuntamente con una solución base para todos los tratamientos fertilizados que contenían los siguientes compuestos: 0.01361 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2526 g/l de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0.2582 g/l de  $\text{CaSO}_4$ , 0.3697 g/l de  $\text{MgSO}_4$ , 0.01655 g/l de EDTA, 0.064 g/l de  $\text{MnSO}_4$ , 0.0003 g/l de  $\text{CuSO}_4$ , 0.217 g/l de  $\text{ZnSO}_4$ , 0.0223 g/l de  $\text{H}_3\text{BO}_4$  y 0.0027 g/l de  $(\text{Na})_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (fig. 1b).

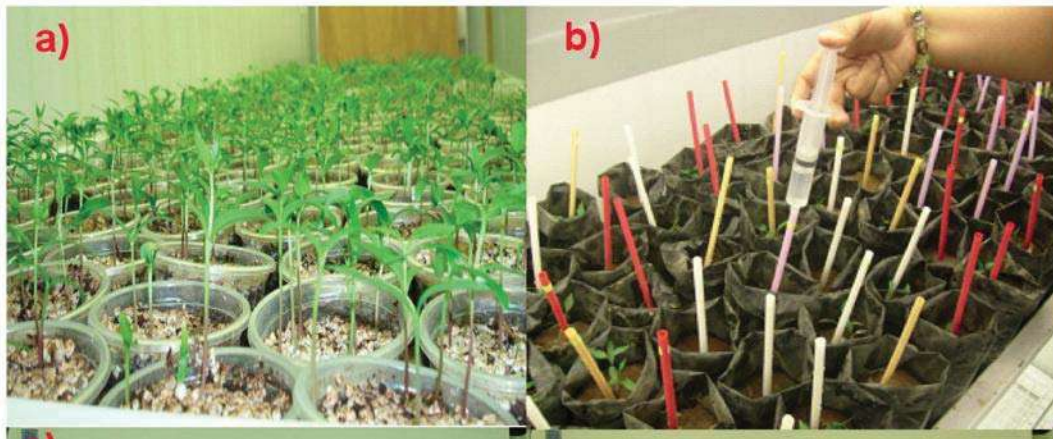


Fig. 3. a) germinación del fresno en agrolita-turba, b) fertilización del fresno,.

### 8.5. Diseño experimental

El experimento contó con 8 tratamientos y 17 repeticiones organizadas de la siguiente manera:

- Tratamiento 1: *Fraxinus uhdei* sin nitrógeno (control).
- Tratamiento 2: *Fraxinus uhdei* + nitrato.
- Tratamiento 3: *Fraxinus uhdei* + amonio.
- Tratamiento 4: *Fraxinus uhdei* + urea.
- Tratamiento 5: *Fraxinus uhdei* sin nitrógeno + *Pisolithus tinctorius*.
- Tratamiento 6: *Fraxinus uhdei* + nitrato + *Pisolithus tinctorius*.
- Tratamiento 7: *Fraxinus uhdei* + amonio + *Pisolithus tinctorius*.
- Tratamiento 8: *Fraxinus uhdei* + urea + *Pisolithus tinctorius*.

## **8.6. Medición de variables respuesta**

A las 16 semanas de crecimiento se cosechó y se analizaron las variables de respuesta. El experimento se realizó en cámara de crecimiento bajo condiciones de 25 °C, 75 % de humedad relativa y 14 horas de fotoperiodo.

Las variables respuesta determinadas en la parte aérea de la planta fueron: peso fresco y seco, altura y área foliar. En la raíz: peso fresco y seco, longitud, volumen, longitud específica de raíz, densidad radical y dependencia micorrízica. En el suelo se determinaron: agregados estables al agua y contenido de micelio en el sustrato.

### **8.6.1. Área foliar**

El área foliar se determinó mediante fotografías tomadas a cada fresa al concluir 16 semanas de crecimiento, se utilizó una cámara digital Sony ® Cyber-Shot de 7.2 megapíxeles para posteriormente analizar las imágenes mediante un programa de edición digital fotográfica (SideLook 1.1. 01).

### **8.6.2. Peso fresco y seco**

El peso fresco de parte aérea y de la raíz se determinó por medio de una balanza analítica (Adventurer™). El peso seco fue determinado de igual manera (previo secado en horno a 60 °C durante 48 hrs).

### **8.6.3. Longitud específica radicular**

La longitud específica radicular (el cual es un parámetro indicativo de la cantidad de raíces secundarias producidas) se calculó mediante la relación entre la longitud de raíz y la masa radical. La densidad de la biomasa radicular se calculó por la relación entre el peso seco de la raíz y su volumen.

### **8.6.4 Dependencia micorrízica**

Una más de las variables que se consideró en el experimento fue la dependencia micorrízica, esta se calculó según Plenchette *et al.* (1983), mediante la fórmula:

$$DM = [Ps(+M) - Ps(-M)] / Ps(-M)$$

donde Ps(+M): peso seco total de las plantas inoculadas con *P. tinctorius*, y Ps(-M): peso seco total de las plantas no inoculadas.

#### **8.6.5. Agregados estables al agua**

La estabilidad de agregados se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Kemper y Rosenau (1986) determinándose la fracción de agregados de diferentes tamaños. Se colocó una muestra de 50 g de suelo en el tamiz de malla mayor. El orden de colocación de los tamices fue de > a < abertura de malla (2.00 mm, 1.00 mm, 0.50 mm, 0.250 mm y 0.125 mm). Se acomodaron los tamices en ese orden sobre una malla y se sumergieron en un recipiente con agua cubriendo la muestra y agitando suavemente dentro y fuera del agua, para lograr que la muestra de suelo en su conjunto se homogenizara y pudieran retenerse los agregados estables en los tamices correspondientes.

El tiempo que se requirió para cada muestra fue de diez minutos, transcurrido ese tiempo se dejaron escurrir. Se pusieron a secar las muestras en estufa a 80° C por 24 hrs. Se tomó el peso de las muestras (incluyendo el tamiz) y posteriormente se retiró el suelo del tamiz, y se volvió a tomar el peso. La diferencia de los pesos de los tamices con suelo con respecto a los pesos de los tamices sin suelo nos dio como resultado el peso real de cada una de las muestras y se determinó la fracción de agregados retenidos en cada tamiz.

#### **8.6.6. Contenido del micelio externo de *Pisolithus tinctorius* en el sustrato**

El contenido de micelio externo en el sustrato se determinó en base a la técnica utilizada por Thomson *et al.* (1993) modificada, la cual se desarrolló siguiendo los siguientes pasos (fig. 4):

1. Se tomó una muestra de suelo de 2.0 g de suelo
2. Se mezcló con 50 ml de agua desionizada por 20 segundos en licuadora.
3. Esta solución se pasó por un tamiz de 0.50 mm de abertura y se dejó reposar por 60 s y se decantó.

4. Se tomó una alícuota de 50 ml del sobrenadante.
5. La cual se filtró por succión en una malla de 41  $\mu$ .
6. El micelio retenido en la malla fue teñido con azul de tripano al 0.5 % por 24 hrs y posteriormente se retiró el exceso de colorante con agua destilada.
7. El micelio teñido fue observado y fotografiado con una cámara Leica DFC 295 (versión 7.0.1.0) la cual está integrada a un software especializado (Leica Application Suite Versión 3.4.1), por medio del cual se midieron los fragmentos de micelio teñidos mediante una reglilla micrométrica y finalmente se cuantificó la longitud de micelio externo (cm de micelio/g de suelo) por tratamiento.

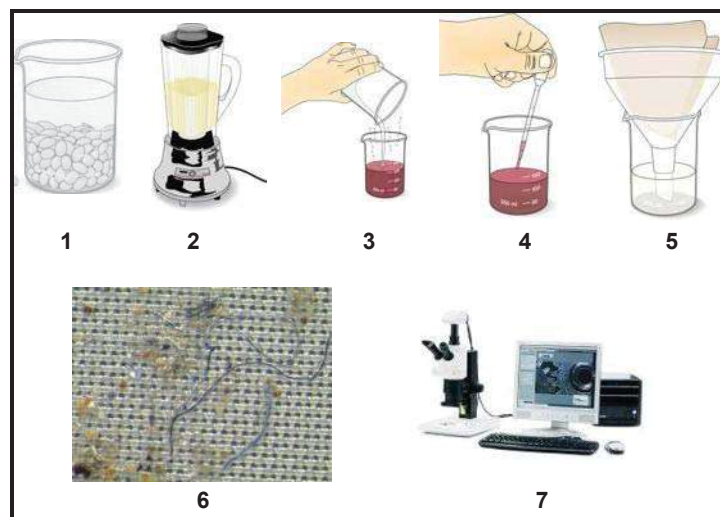


Fig. 4. Etapas para la obtención y medición del micelio externo de *P. tinctorius*.

#### 8.6.7. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA, y la prueba de comparación de medias de Tukey. El programa estadístico que se utilizó fue ASSISTAT 7.5 beta.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Colonización de *Pisolithus tinctorius*

El HEM *P. tinctorius* se observó en las raíces de *F. uhdei* de todos los tratamientos inoculados. La inoculación produjo estructuras características como ápices bifurcados, la red de Hartig y la presencia del micelio externo, mostrados en la figura 5. La aparición del micelio externo fue más abundante en el fresno micorrizado no fertilizados así como en el fresno micorrizado fertilizado con urea, no detectándose la presencia de este en el fresno usado como control (Fig. 5).

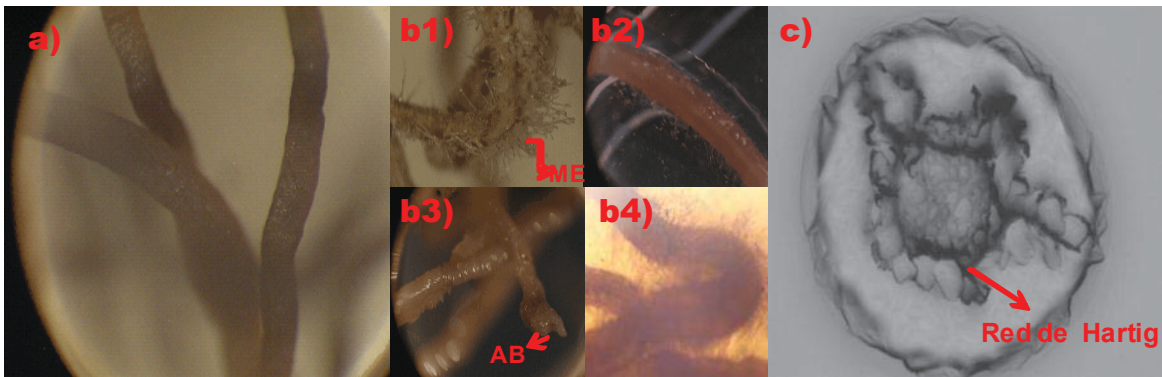


Fig 5. Raíces micorrizadas de *F. uhdei*. La aparición del HEM se caracteriza por la presencia de micelio externo (ME) además de ápices bifurcados (AB) y el desarrollo de la red de Hartig. a) raíz no micorrizada, no fertilizada, b1) raíz micorrizada, no fertilizada, b2) raíz micorrizada fertilizada con  $\text{NO}_3^-$ , b3) raíz micorrizada fertilizada con  $\text{NH}_4^+$ , b4) raíz micorrizada fertilizada con urea, c) corte transversal de raíz de fresno micorrizado teñida con azul de tripano mostrando la red de Hartig.

### 9.2. Variables de crecimiento en el fresno

Los valores promedio obtenidos en las diferentes variables de crecimiento del fresno no inoculado e inoculado con *P. tinctorius*, después de 16 semanas de crecimiento, se muestran en la Tabla 3. Una vez concluido dicho periodo, se pudo observar en el fresno no inoculado, un decremento significativo en sus variables de crecimiento de la parte aérea (peso seco, fresco y aérea foliar), en los fresnos

fertilizados con  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  o urea en comparación con el fresno utilizado como control.

Dentro de los fresnos fertilizados, el  $\text{NO}_3^-$  fue la fuente de N que tuvo mayor efecto negativo en las variables de crecimiento de la parte aérea (área foliar, peso seco y peso fresco) al compararse con el fresno usado como control, presentando disminuciones que van desde el 92 % para el peso seco, 146 % para el peso fresco y del 170 % para el área foliar. También se observó en el fresno fertilizado con  $\text{NH}_4^+$  una disminución en las variables de crecimiento analizadas al compararse con el fresno control, y tales disminuciones van desde el 66 % para el peso seco, 27.5 % para el peso fresco y sólo del 14 % para el área foliar. En el caso de la fertilización con urea al igual que para el  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ , se pudo observar una disminución en las variables de crecimiento comparado con el fresno usado como control observando decrementos de entre 51 y 92 %.

Cuando el fresno fue inoculado con *P. tinctorius*, se observó un efecto sinérgico en los valores de las variables de crecimiento de la parte aérea (área foliar, peso seco y peso fresco) al comparar las variables de crecimiento del fresno usado como control. Además se observaron aumentos, debido a la presencia del HEM, en el peso fresco, área foliar y peso seco aunque solo fueron significativos el peso fresco y el área foliar. Por otra parte el efecto benéfico del HEM en la parte aérea del fresno fertilizado fue significativo solo en los fresnos pertenecientes al tratamiento fertilizado con urea en comparación a los fresnos fertilizados no inoculados. Además, los resultados muestran la misma tendencia de los fresnos no inoculados a presentar disminuciones significativas en las variables de crecimiento analizadas para todos los tratamientos fertilizados con las diferentes formas de N en comparación con el tratamiento inoculado no fertilizado (fig. 6).

De las fuentes de nitrógeno utilizadas en el experimento, el  $\text{NO}_3^-$  nuevamente fue la fuente que tuvo mayor efecto negativo en las variables de crecimiento de la parte aérea (área folia, peso seco y fresco) al compararse con el fresno inoculado no fertilizado, observándose porcentajes de disminuciones del 171, 117 y 87 % para el área foliar, peso seco y fresco respectivamente. Mientras que la urea fue la



fueron de nitrógeno que menos efecto negativo tuvo sobre las variables de crecimiento analizadas, puesto que los porcentajes de disminución fueron de 36, 31 y sólo del 12 % para el área foliar, peso fresco y peso seco respectivamente.

En las variables relacionadas con la raíz (Tabla 3), se observó una disminución en el volumen, peso seco y peso fresco en el fresno no inoculado fertilizado con las distintas formas de N ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y urea) al compararse con el fresno utilizado como control, aunque cabe mencionar que esta disminución sólo fue significativa para el peso seco y peso fresco. En cuanto a la longitud radicular, el amonio provocó un aumento significativo al compararse con el fresno control, mientras que el  $\text{NO}_3^-$  y la urea no tuvieron un efecto significativo sobre la longitud radicular en comparación al fresno control.

Cuando los fresnos fueron inoculados con *P. tinctorius*, se observó un aumento en la longitud radicular, volumen, peso seco y peso fresco en los fresnos inoculados sin fertilizar en comparación con el control, aunque este aumento fue significativo sólo para el peso seco con un incremento del 39 %.

La fertilización con N inorgánico ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ), provocó una disminución en los valores de las variables analizadas en la raíz del fresno inoculado al compararse con su contraparte no micorrizada, mientras que el fresno fertilizado con N orgánico (urea) no presentó disminuciones en las variables de raíz consideradas al compararse con su contraparte no micorrizada. Además se observó que este tratamiento fue el que presentó mayor peso fresco de raíz en comparación con el resto de los tratamientos, siendo significativo el aumento, con excepción del fresno inoculado no fertilizado.

Tabla 3. Valores promedio en las variables de crecimiento de las plantas de fresno de 16 semanas de edad en los diferentes tratamientos no inoculados e inoculados con *P. tinctorius*.

FRESNO NO INOCULADO					FRESNO INOCULADO			
TRATAMIENTOS	CONTROL	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	UREA	S/F + <i>P. tinctorius</i>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + <i>P. tinctorius</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + <i>P. tinctorius</i>	UREA + <i>P. tinctorius</i>
<b>PARTE AÉREA</b>								
<b>VARIABLES</b>								
PESO SECO (g)	0.48 ab	0.25 c	0.29 c	0.25 c	0.63 a	0.29 c	0.37 bc	0.56 a
PESO FRESCO (g)	1.80 b	0.73 d	1.41 bc	1.19 cd	2.49 a	1.33 bcd	1.00 cd	1.90 b
AREA FOLIAR (cm <sup>2</sup> )	104.82 b	38.77e	91.66 bcd	61.32cde	148.22 a	54.62 de	93.81 bc	108.49 b
<b>RAIZ</b>								
LONGITUD (cm)	21.43 b	25.75 ab	32.25 a	18.64 b	22.10 b	21.00 b	20.17 b	22.25 b
VOLUMEN (cm <sup>3</sup> )	0.12 a	0.11 a	0.12 a	0.10 ab	0.12 a	0.06 b	0.06 b	0.10 ab
PESO SECO (g)	0.23 b	0.15 cd	0.09 d	0.13 d	0.32 a	0.09 d	0.10 d	0.22 bc
PESO FRESCO (g)	0.97 b	0.60 c	0.61 c	0.67 c	1.25 ab	0.56 c	0.43 c	1.52 a

S/F= Sin fertilizar, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = Amonio. Los tratamientos seguidos por la misma letra no son diferentes estadísticamente ( $\alpha=0.05$ ).

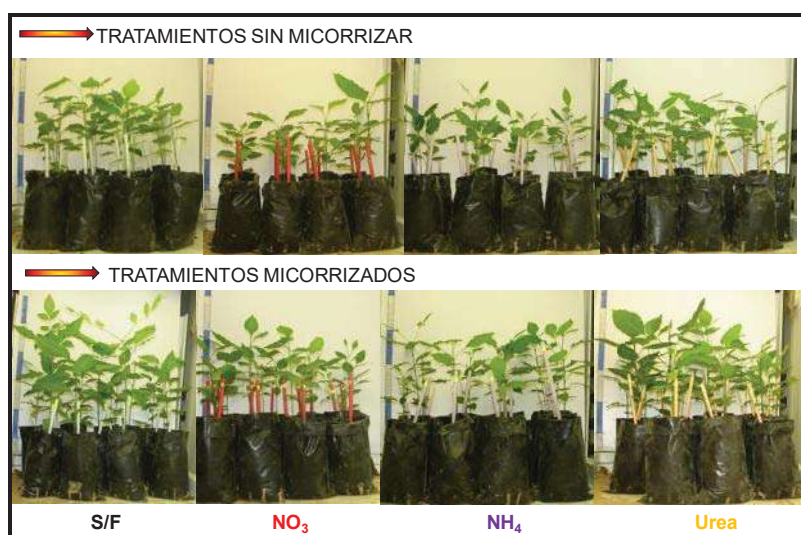


Fig. 6. Fresnos a las 16 semanas de crecimiento en los distintos tratamientos. S/F= Sin fertilizar, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = Amonio.

La longitud específica radicular (LER) fue mayor en el fresno no micorrizado en comparación a el micorrizado a excepción del fresno fertilizados con nitrato y urea (Fig. 7). El tratamiento que presentó mayores valores de LER fue el no inoculado y fertilizado con amonio con valores de 300 cm/g peso seco, seguido su contraparte micorrizada con valores de 224 cm/g peso seco. Por último se pudo observar que el fresno inoculado no fertilizado fue el que menor valor de LER presentó en comparación al resto de los tratamientos.

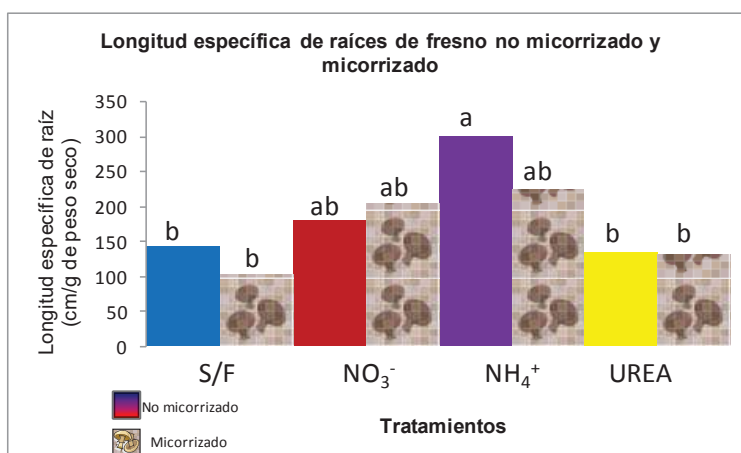


Fig. 7 Longitud específica de raíces no micorrizadas y micorrizadas. S/F= Sin fertilizar, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = Amonio. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ).

Cuando el fresno no inoculado fue fertilizado con las distintas fuentes de nitrógeno (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y urea) la densidad de biomasa radicular disminuyó en comparación con el control, aunque esta disminución no fue significativa para ningún caso (fig. 8). Mientras que cuando los fresnos fueron inoculados, la densidad aumentó en todos los tratamientos inoculados al compararse con su contraparte no micorrizada, aunque dicho aumento sólo fue significativo en el caso de los fresnos no fertilizados y en los fertilizados con urea.

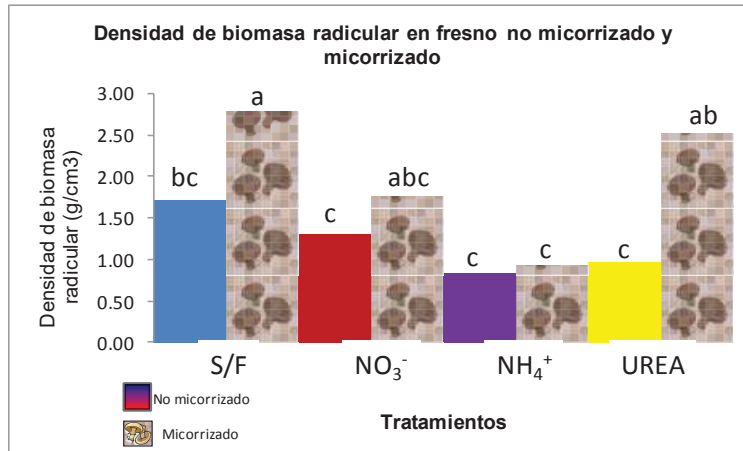


Fig. 8 Densidad de biomasa radicular de fresnos no micorrizados y micorrizados. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ). S/F= Sin fertilizar, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = Amonio.

Una más de las variables que se consideró en el experimento fue la dependencia micorrízica, debido a que aunque la mayoría de las plantas (>80 %) forman micorrizas, el grado de dependencia micorrízica varía para las distintas especies. En general las plantas leñosas suelen ser más dependientes de esta simbiosis que las herbáceas.

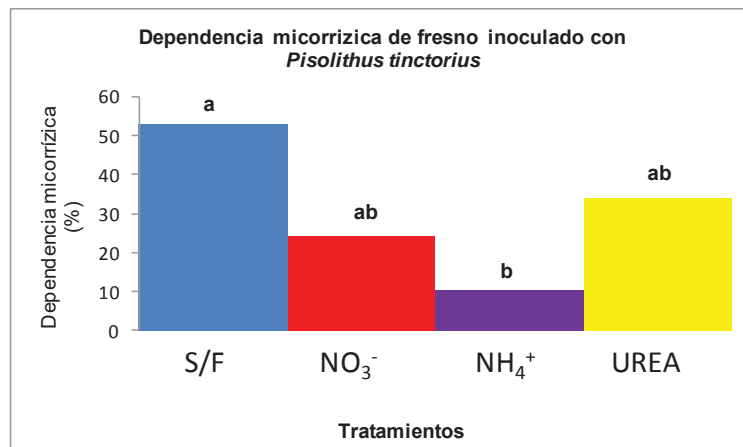


Fig. 9 Dependencia micorrízica del fresno. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ). S/F= Sin fertilizar, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Nitrato, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = Amonio.

El parámetro nos indica la ganancia de carbono del fresno micorrizado con respecto al fresno no micorrizado, por lo tanto pudimos observar que un 53 % de

ganancia de carbono del fresno micorrizados sin fertilizar se debió a la presencia de *P. tinctorius*. Por lo contrario, cuando el fresno fue fertilizado con las distintas fuentes de N ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y urea), se pudo observar que la dependencia micorrízica disminuyó, aunque sólo fue significativo para el caso del fresno fertilizado con amonio comparado con el fresno sin fertilizar. En dicho tratamiento solamente un 10 % de la ganancia de carbono se debió a el efecto de *P. tinctorius* (fig. 9).

### 9.3. Agregados estables al agua (AEA)

Una vez concluido el periodo de crecimiento de los fresnos (16 semanas) se analizaron los AEA en el fresno inoculado con *P. tinctorius* y/o fertilizado con nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y urea y los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Valores promedio (%) de los agregados estables al agua (AEA) en los tratamientos inoculados con *P. tinctorius* y/o fertilizados con diferentes fuentes de nitrógeno: nitrato, amonio y urea.

TRATAMIENTOS	DIAMETRO DE AGREGADOS ESTABLES AL AGUA				
	2 mm	1 mm	0.5 mm	0.250 mm	0.125 mm
Control	0.03 a	36.30 a	23.54 a	8.68 ab	4.94 b
S/F + <i>P. tinctorius</i>	0.08 a	33.54 ab	25.14 a	11.54 ab	6.55 ab
$\text{NO}_3^-$	0.02 a	38.44 a	20.24 a	7.64 b	4.54 b
$\text{NO}_3^-$ + <i>P. tinctorius</i>	0.00 a	21.26 ab	25.02 a	11.47 a	6.55 ab
$\text{NH}_4^+$	0.11 a	33.18 ab	20.20 a	7.81 b	4.82 b
$\text{NH}_4^+$ + <i>P. tinctorius</i>	0.02 a	23.48 ab	25.96 a	10.01 ab	6.07 ab
UREA	0.05 a	36.41 a	19.43 a	9.22 ab	5.49 ab
UREA + <i>P. tinctorius</i>	0.01 a	16.06 b	27.16 a	11.96 a	8.00 a

Control = Tratamiento sin fertilizar y sin HEM, S/F= Tratamiento sin fertilizar,  $\text{NO}_3^-$  = Tratamiento fertilizado con nitrato,  $\text{NH}_4^+$  = Tratamiento fertilizado con amonio, *P.*

*tinctorius* = *Pisolithus tinctorius*. Los tratamientos seguidos por la misma letra no son diferentes estadísticamente ( $\alpha=0.05$ ).

Los resultados muestran que para el caso de los AEA mayores a 2 mm de diámetro no se observó diferencia estadística entre ningún tratamiento.

En los agregados del suelo mayores a 1 mm y menores a 2 mm de diámetro hubo una reducción en el porcentaje de AEA en el fresno inoculado al compararse con su contraparte no micorrizada, así mismo se pudo observar que la interacción entre la fertilización y el HEM provocó una disgregación mayor. El fresno inoculado y fertilizado con urea fue el que mayor disgregación presentó, con una disminución del 58 %, siendo significativa esta reducción al compararse con su contraparte no micorrizada y con el fresno utilizado como control. El fresno inoculado y fertilizado con nitrato presentó un 45 % de disminución en el porcentaje de AEA en comparación con su contraparte micorrizada y una reducción del 41 % al compararse con el fresno usado como control. Finalmente el fresno inoculado y fertilizado con amonio presentó un 29 % de disminución de los AEA en comparación con su contraparte micorrizada y el tratamiento control. Cabe mencionar que dichas reducciones en el porcentaje de AEA no fueron significativas para ambos casos.

En los agregados mayores a 0.5 mm y menores a 1mm de diámetro se pudo observar un incremento en el porcentaje de AEA por la presencia del HEM, ya que todos los fresnos micorrizados fertilizados y micorrizados no fertilizados presentaron porcentajes mayores de AEA en comparación con el fresno utilizado como control y el fresno no micorrizados fertilizados. En el caso de los AEA de 0.25 y 0.125 mm de diámetro presentaron un patrón de comportamiento similar al observado en los AEA de 0.5 mm de diámetro, es decir, todos los fresnos inoculados con el HEM, ya sea fertilizados y no fertilizados, mostraron incrementos en el porcentaje de AEA en comparación con el fresno fertilizado y no fertilizado (control). También se pudo observar que en los agregados de 0.5, 0.25 y 0.125 mm de diámetro, el tratamiento que presentó los mayores valores de AEA en

comparación con el resto de los tratamientos fue el micorrizado y fertilizado con urea.

#### 9.4. Contenido de micelio en el sustrato

La longitud de micelio externo fue evaluada en el fresno inoculado con el HEM y se observó que el fresno que presentó mayor longitud de micelio externo fue el fertilizado con urea, presentando 4 cm de micelio externo por gramo de suelo, siendo significativo dicho incremento en comparación los demás tratamientos. Por otra parte, en el fresno inoculado no fertilizado presentó 1.6 cm de micelio por gramo de suelo, siendo este valor mayor significativamente en comparación con el fresno fertilizado con nitrato y amonio. Finalmente el fresno fertilizado con nitrato y amonio fue el que menor longitud de micelio externo presentó, con 0.7 y 0.8 cm por gramo de suelo respectivamente, cabe mencionar que no hubo diferencia significativa entre ambos tratamientos (Figura 10).

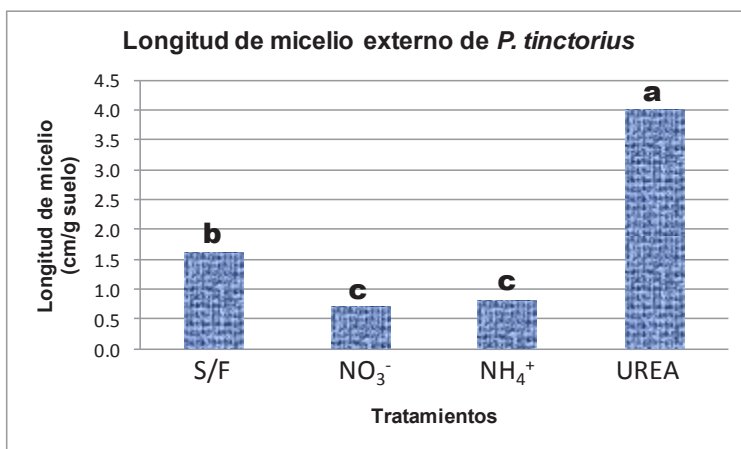


Fig. 10. Longitud de micelio externo de *Pisolithus tinctorius*. Letras distintas indican diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ). S/F= Tratamiento sin fertilizar, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Tratamiento fertilizado con nitrato, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = Tratamiento fertilizado con amonio.

Se realizó un análisis de correlación entre la longitud de micelio externo del HEM y el porcentaje de agregados estables al agua mostrado en la Tabla 5, y se observó que el fresno fertilizado con urea fue el que presentó mayor correlación con la longitud de micelio externo del HEM, con una correlación inversa de 0.87 en los

agregados de 1 mm de diámetro y una correlación directa de 0.7 y 0.8 mm para el caso de los agregados de 0.5 y 0.250 mm de diámetro respectivamente.

Tabla 5. Correlación entre la longitud de micelio externo del HEM y el porcentaje de agregados del suelo.

CORRELACION ENTRE LONGITUD DE MICELIO EXTERNO Y PORCENTAJE DE AGREGADOS ESTABLES AL AGUA					
TRATAMIENTOS	DIÁMETRO DE AGREGADOS				
	2 mm	1 mm	0.5 mm	0.250 mm	0.125 mm
S/F	0.198	0.585	-0.451	0.542	0.152
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0.316	0.552	0.145	0.116	0.602
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0.154	0.369	-0.023	0.099	-0.048
Urea	-0.252	<b>-0.871</b>	<b>0.747</b>	<b>0.851</b>	0.237

S/F= Tratamiento sin fertilizar, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> = Tratamiento fertilizado con nitrato, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = Tratamiento fertilizado con amonio.



## 10. DISCUSIÓN

Los resultados muestran que *F. uhdei* establecen una asociación simbiótica con *P. tinctorius*, lo que confirma los resultados reportados por Ambriz *et al.*, (2010), donde se documenta por primera vez esta asociación. Las estructuras bifurcadas, las cuales son características esenciales de este tipo de asociación simbiótica, aparecieron de manera infrecuente en el fresno inoculado. Este patrón de comportamiento de la simbiosis *Fraxinus* - *P. tinctorius* también ha sido observado en otras especies arbóreas con HEM (Allen *et al.*, 1999; Alberton y Kuyper, 2009; Bai *et al.*, 2009). La mayoría de los trabajos enfocados a estudiar las relaciones simbióticas con HEM se centran en la descripción de la simbiosis. Sin embargo, los factores involucrados en la formación de estructuras infrecuentes o poco características de los HEM han sido poco estudiados (Karst, 2009). Por lo que en futuros trabajos se podría contemplar analizar los factores relacionados con ese patrón en la simbiosis micorrízica.

*F. uhdei* inoculado con *P. tinctorius* causó un aumento significativo en la mayoría de las variables de crecimiento determinadas, tanto de la parte aérea como de la raíz, en comparación con el fresno no inoculado. Tales incrementos coinciden con lo reportado por Ambriz *et al.*, (2010) donde se observó de igual manera un aumento en las variables de crecimiento en el fresno inoculado con *P. tinctorius*. Sin embargo cabe mencionar que dicho trabajo de investigación no consideró la influencia de la fuente de N sobre el desarrollo de *F. uhdei* en asociación con *P. tinctorius* por lo que este es el primer reporte que muestra el efecto de la fuente de N sobre la asociación.

Giardina *et al.*, (2003) sugieren que cuando se logra tener una situación óptima de nutrientes, la planta destina en su mayoría los fotoasimilados para la parte aérea, por lo tanto el efecto de promoción del crecimiento de la interacción *F. udhei* - *P. tinctorius* podría deberse a una adecuada disponibilidad de nutrientes.

Las distintas fuentes de nitrógeno influyen directamente en el desarrollo tanto del HEM como de la planta (Knops *et al.*, 2002; Twieg *et al.*, 2009). Nuestros resultados sugieren que la fertilización con las distintas fuentes de N causaron un

efecto negativo en el fresno comparado con el fresno usado como control, tanto en el fresno no inoculado como en el inoculado. Dicho efecto negativo se observó tanto en la parte aérea como a nivel de la raíz.

La inoculación del fresno con *P. tinctorius* no causó un aumento significativo en la cantidad de raíces laterales, en ninguno de los tratamientos a excepción del tratamiento no inoculado fertilizado con amonio el cual fue el que mayor longitud específica radicular presentó.

Felten *et al.* (2009) sugieren que la presencia del HEM incrementa las raíces laterales debido probablemente a un aumento en la producción de auxinas producidas por el hongo en los ápices de las raíces. Nuestros resultados sugieren también que la interacción del HEM con ciertas fuentes de N podrían inhibir este efecto estimulante.

No obstante que nuestros resultados revelan una baja producción de raíces laterales, muestran también que la presencia del HEM puede incrementar significativamente la densidad de la biomasa radical del fresno. Este ensayo sugiere también una relación importante entre la dependencia micorrízica del fresno con los valores de densidad de biomasa radical, ya que el fresno con porcentajes más elevados de dependencia micorrízica fue el que presentó una mayor biomasa radicular. Lo anterior podría ser de un valor práctico importante en el uso de estrategias de revegetación y conservación de suelos, sin embargo se requieren más estudios para confirmar esta relación (Ramos y Guadarrama 2004).

Caravaca *et al.* (2002) encontraron un aumento en la estabilidad de agregados del suelo utilizando plantas de *Pinus sp.* en asociación con *Pisolithus arizus*, sin embargo nuestros datos no coinciden con lo reportado, debido a que los resultados obtenidos en el experimento nos muestran que para el caso de los agregados mayores (agregados mayores a 1 mm) se pudo observar que la interacción entre la fertilización y el HEM produjo un efecto de disgregación muy marcado ya que se observó una reducción en el porcentaje de agregación en los fresnos micorrizados y fertilizados con las distintas fuentes de nitrógeno. Sin

embargo en el fresno donde no se fertilizó, el efecto de disgregación del suelo no fue tan marcado en comparación con el fresno fertilizado con las distintas fuentes de N donde se presentaron reducciones mayores.

El efecto en la disgregación en los agregados mayores fertilizados con las distintas fuentes de N pudiera estar relacionado con un mayor aumento en la densidad radicular en el fresno fertilizado y micorrizado debido a que la micorrización causó en las raíces del fresno un aumento en su volumen por lo que el crecimiento de la raíz pudo haber particulado los agregados por acción mecánica. Esto coincide con lo reportado por Velázquez-Rodríguez y colaboradores (2001), quienes sugieren que es posible que las raíces rompan el material cercano a ellas y ejerzan una presión que ayuda a la desintegración de los agregados.

Dentro de las variables que podrían contribuir en la producción de AEA, 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.* 2000, Bearden, 2001), mientras que otros no han encontrado dicha correlación (Eviner y Chapin 2002, Young *et al.* 1998). En los resultados del presente experimento tampoco se encontró tal correlación.

Aunado a ello, nuestros datos coinciden con lo reportado por Graham *et al.* (2002) y Velázquez-Rodríguez *et al.* (2001) quienes documentaron que la aplicación de fertilizante provocó una disminución de la estabilidad de agregados de suelo por el hecho de incrementar la concentración de cationes monovalentes. En este estudio se pudo observar que la interacción entre la fertilización con N y el HEM produjo un efecto de disgregación muy marcado durante el cual, las unidades de diámetro mayor a 1 mm se rompieron, dando lugar a una acumulación de agregados en los intervalos de menor tamaño.

Felten *et al.*, (2009) sugieren que el amonio es mejor fuente de N que el nitrato, basándose en el hecho de que para reducir el nitrato a amonio se produce un consumo de energía, reduciendo de esta manera la cantidad de carbohidratos disponible para el desarrollo del HEM. Este efecto puede extrapolarse fácilmente a

la urea, ya que en el suelo, por efecto de la acción microbiana, esta se transforma en amoníaco y  $\text{CO}_2$  y el primero se transforma rápidamente en amonio (Eviner y Chapin 2002). En el caso del desarrollo del HEM solo la fuente de N orgánico (urea) promovió el crecimiento del micelio externo, las fuentes de N inorgánico ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ) tuvieron un efecto “inhibidor” de este micelio. Helmisaari *et. al*, (2009) sugieren que la incorporación de N orgánico puede imponer menos demandas de energía para su uso y asimilación. En este sentido probablemente la urea se convierte un una fuente más atractiva de N para el HEM en interacción con la planta que la fuente inorgánica como el amonio. Además, en el sistema bajo el cual se desarrollo el experimento, la urea pudo haberse convertido en una fuente de N atractiva para organismos desnitrificante del suelo (Young *et al.* 1998), lo anterior pudo haber originado niveles menores de amonio en los sustratos que pudieran ser más adecuados para el crecimiento del HEM. En este sentido, Holopainen y Heinonen-Tanski (1993), reportaron que altos niveles de N pudieran provocar inhibición o incluso desaparición del micelio externo, sin embargo hay que profundizar más en las investigaciones en torno a este último punto.

Dentro de las variables que se han indicado pueden contribuir en la producción de agregados estables en agua, se encuentra el micelio externo del HEM (Bearden 2001). En los resultados del presente experimento, al menos en el corto plazo, no se encontraron correlaciones importantes (positivas o negativas) entre el porcentaje de agregados estable en agua mayores de 2 mm. Sin embargo la alta correlación negativa en el fresno con agregados de entre 1 y 2 mm sugieren que el efecto del hongo en la formación de estos agregados, al menos en el corto plazo, es el de provocar la disgregación. Este efecto de destrucción de agregados, en los tratamientos micorrizados y fertilizados con urea, pudo deberse a la acción mecánica ejercida por el micelio sobre los agregados (como sucede en el caso de las raíces). Dicho efecto pudo además ser magnificado debido a una elevada concentración del micelio en el sustrato, como consecuencia del espacio limitado de los contenedores donde se desarrollaron los ensayos.

## 11. CONCLUSIONES

- Los resultados muestran que *F. udhei* establece una relación simbiótica con *P. tinctorius*.
- *F. udhei* inoculado con *P. tinctorius* generó un aumento significativo en la mayoría de las variables de crecimiento determinadas, tanto de la parte aérea como de la raíz, en comparación con el fresno no inoculados.
- La fertilización con las distintas fuentes de N causó un efecto negativo en las variables de crecimiento del fresno al compararse el fresno no fertilizado, tanto en los no inoculados como en los inoculados.
- La inoculación del fresno con *P. tinctorius* no causó un aumento significativo en la cantidad de raíces laterales, en ninguno de los tratamientos sin embargo el HEM incrementó la biomasa radical en el fresno inoculado.
- La inoculación con HEM no produjo efectos significativos en el porcentaje de agregados estables en agua del sistema, como tampoco los produjo la interacción N inorgánico - HEM. Sin embargo la interacción N orgánico - HEM causó una reducción significativa en el porcentaje de agregados estables en agua entre 1 y 2 mm. Además los datos de correlación sugieren que la desintegración de este tipo de agregados está estrechamente relacionada a la longitud de micelio externo del HEM cuantificado en la micorrizosfera del fresno.
- Es importante seguir estudiando la asociación *F. udhei* - HEM y como ésta se modifica por factores bióticos para así determinar su potencial real en la rehabilitación de suelos.
- Bajo las condiciones estudiadas, la fertilización nitrogenada orgánica o inorgánica no tuvo un efecto sinérgico con la asociación *Fraxinus udhei*-*Pisolithus tinctorius*, en el desarrollo del fresno y en la agregación del suelo. Sin embargo la fertilización con N orgánico incrementó significativamente el desarrollo del micelio extramatricial del HEM. Es importante a futuro

realizar ensayos a largo plazo y en condiciones de campo, donde no exista un espacio limitado para el desarrollo del micelio y las raíces, para determinar más claramente los efectos de estas interacciones sobre los agregados del suelo.

Los resultados anteriores confirman la hipótesis de que las distintas fuentes de nitrógeno pueden tener efectos diferentes sobre el desarrollo del fresno y en la estabilidad de agregados del suelo, como fue el caso de la urea que tuvo un efecto positivo en las variables de crecimiento de esta especie y un efecto inhibitor en el porcentaje de agregados estables.

## 12. 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.
- Ahmad, I., Carleton, T.J., Malloch, D.W. y 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. y 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.
- Alberton, O. y Kuyper, T. W. 2009. Ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus sylvestris* seedlings respond differently to increased carbon and nitrogen availability: implications for ecosystem responses to global change. *Global Change Biology*. 15:166–175.
- Allen, M.F., Egerton-Warburton, L.M., Allen, E.F. y Karen, O. 1999. Mycorrhizae in *Adenostoma fasciculatum* Hook. & Arn.: a combination of unusual ecto- and endo-forms. *Mycorrhiza*. 8(4):225-228.
- Ambriz, E., Báez-Pérez, A., Sánchez-Yáñez, J. M., Moutoglis, P. y Villegas, J. 2010. *Fraxinus–Glomus–Pisolithus* symbiosis: Plant growth and soil aggregation effects. *Pedobiologia*. 53:369-373
- Andrade, A.C.S., Queiroz, M.H., Hermes, R.A.L. y 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.
- André, S., Galiana, A., Roux, L. C., Prin, Y., Neyra, M., y Duponnois, R. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis enhanced the efficiency of inoculation with two

- Bradyrhizobium strains and Acacia holosericea growth. *Mycorrhiza*. 15:357-364.
- 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.
- Augé, R.M., Stodola, A.J.W., Tims, J.E. y Saxton, A.M. 2001. Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil*. 230(1):87-97.
- Avis, G. P., McLaughlin, J. D., Dentinger, C. B. y Reich, B. P. 2003. Long-term increase in nitrogen supply alters aboveand below-ground ectomycorrhizal communities and increases the dominance of *Russula* spp. in a temperate oak savanna. *New Phytologist*. 160:239-253.
- Bai, S, Li, G., Liu, Y., Kasten, R. y Liv, R. 2009. *Ostryopsis davidiana* seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi facilitate formation of mycorrhizae on *Pinus tabulaeformis* seedlings. *Mycorrhiza*. 19:425-434.
- Baldrian, P. 2009. Ectomycorrhizal fungi and their enzymes in soils: is there enough evidence for their role as facultative soil saprotrophs?. *Oecologia*. 161:657-660.
- Barker, S.J., Tagu, D. y 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.
- Bending, G.D. y Read, D. J. 1995. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants VI. Activities of nutrient mobilizing enzymes in birch litter colonised by *Paxillus involutus*. *New Phytologist*. 130:411-417.
- Buscardo, E., Rodríguez-Echeverría, S., De Angelis, P. y Freitas, H. 2009. Comunidades de hongos ectomicorrícicos en ambientes propensos al



fuego: compañeros esenciales para el restablecimiento de pinares mediterráneos. *Ecosistemas*. 18 (2):55-63.

Calderón de Rzedowski, G. y J. Rzedowski, 2005. Flora fanerogámica del Valle de México, Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán.

Caravaca, F., C. García, M. T., Hernández y A. Roldán. 2002. Aggregate stability changes after organic amendment and mycorrhizal inoculation in the afforestation of a semiarid site with *Pinus halepensis*. *Applied Soil Ecology*. 19:199-208

Carreón, A. J., Gómez, D. N. y Martínez, T. M. 2007. Hongos micorrizógenos arbusculares y su uso como fertilizantes. UMSNH. Fundación Produce Michoacán. Morelia, Michoacán, México.

Colpaert, J.V., Tichelen, K.K., Assche, J.A. y Laere, A. 1999. Short-term phosphorus uptake rates in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of intact *Pinus sylvestris* seedlings. *New Phytologist*. 143:589-597.

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.

Denef, K. Six, J. Bossuyt, H. Frey, S. D. Elliott, E. T. Merckx, R. y 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.

Dickie, A. I., Guza, C. R., Krazewski, E. S. y Reich, B. P. 2004. Shared ectomycorrhizal fungi between a herbaceous perennial (*Helianthemum bicknellii*) and oak (*Quercus*) seedlings. *New Phytologist*. 164:375-382.

Ditengou, F.A., Béguiristain, T. y 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. *Plant Physiology*. 211:722-728.
- 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.
- Duddridge, J.A. y Read, D.J. 1984. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. II. Ectomycorrhizal development on pine in vitro. *New Phytologist*. 96:575-582.
- Duiker, S. W. Rhoton, F. E. Torrent, J. Smeck, N. E. y Lal, R. 2003. Iron (hydr)oxide crystallinity effects on soil aggregation. *Soil Science Society of America Journal*. 67:606-611.
- Duplessis, S., Courty, P., Tagu, D. y Martin, F. 2004. Transcript patterns associated with ectomycorrhiza development in *Eucalyptus globules* and *Pisolithus microcarpus*. *New Phytologist*. 165:599-606.
- Eviner, V.T. y Chapin, F.S. 2002. The influence of plant species, fertilization and elevated CO<sub>2</sub> on soil aggregate stability. *Plant and Soil*. 246:211-219.
- Felten, J., Kohler, A., Morin, E., Bhalerao, R., Palme, K., Martin, F., Ditengou, F. y Legue, V. 2009. The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* stimulates lateral root formation in poplar and *Arabidopsis* through auxin transport and signaling. *Plant Physiology*. 10:119-131
- Feugey, L., Strullu, D.G., Poupard, P. y Simoneau, P. 1999. Induced defense responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. *New Phytologist*. 144:541-547.
- Finlay, R. D., Ek, H., Odham, G. y Söderström, B. 1988. Mycelial uptake, traslocation and assimilation of nitrogen from <sup>15</sup>N-labelled ammonium by

*Pinus sylvestris* plants infected with four different ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist*. 110:59-66

Finlay, R.D., Ek, H., Odham, G. y Söderström, B. 1989. Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from <sup>15</sup>labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*. *New Phytologist*. 113:47-55.

Founoune, H. Duponnois, R., Ba, M. A., Sall, S., Branget, I., Lorquin, J., Neyra, M. y Chotte, L. J. 2001. Mycorrhiza Helper Bacteria stimulate ectomycorrhizal symbiosis of *Acacia holosericea* with *Pisolithus alba*. *New Phytologist*. 153:81-89.

France, C. y Reid, C.P.P. 1984. Pure culture growth of ectomycorrhizal fungi on inorganic nitrogen sources. *Microbial Ecology*. 10:187-195.

Francis, John K. 1990. *Fraxinus uhdei* (Wenzig) Lingelsh. Fresno, tropical ash. SO-ITF-SM-28. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 4 p.

Gale, W. J., Cambardella, C. A. y Bailey, T. B. 2000. Root-derived carbon and the formation and stabilization of aggregates. *Soil Science Society of America Journal*. 64:201-207.

García-Oliva, F., Sveshtarova, B. y 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.

García-Rodríguez, J. L., Pérez-Moreno, J., Aldrete, A., Cetina-Alcalá, V.M. y Vaquera-Huerta, H. 2009. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia*. 40: 665-676.

- Giardina, C.P., Ryan, M.G., Binkley, D. y 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.
- Gobert, A. y Plassard, C. 2000. Differential  $\text{NO}_3^-$  dependent patterns of  $\text{NO}_3^-$  uptake in *Pinus pinaster*, *Rhizopogon roseolus* and their ectomycorrhizal association. *New Phytologist*. 154:509-516.
- Graham, M. H., Haynes, R. J. y 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.
- Gregorich, E. G., Beare, M. H., Stoklas, U. y St-Georges, P. 2003. Biodegradability of soluble organic matter in maize-cropped soils. *Geoderma*. 113:237-252.
- Guescini, M., Pierleoni, R., Palma, F., Zeppa, S., Vallorani, L., Potenza, L., Sacconi, C., Giomaro, G. y Stocchi, V. 2003. Characterization of the *Tuber borchii* nitrate reductase gene and its role in ectomycorrhizae. *Mol. Gen. Genomics*. 269:807-816.
- Helmisaari, H., Ostonen, I., Lohmus, K., Derome, J., Lindroos, A., Merila, P. y Nôjd, P. 2009. Ectomycorrhizal root tips in relation to site and stand characteristics in Norway spruce and Scots pine stands in boreal forests. *Tree Physiology*. 29: 445–456.
- Holopainen, T. y Heinonen-Tanski, H. 1993. Effects of different nitrogen sources on the growth of Scots pine seedlings on the ultrastructure and development of their mycorrhizae. *Canadian Journal of Forest Research*. 23: 362-372.
- Igwe, C. A. y 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.

- Izquierdo, I., Caravaca, F., Alguacil, M. M., y 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.
- Jastrow, J.D. 1996. Soil aggregate formation and the accrual of particulate and mineral-associated organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*. Volume 28: 665-676
- Jordy, M.N., Azémar-Lorentz, S., Brun, A., Botton, B. y 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.
- Karst, J., D. Jones, M. y Turkington, R. 2009. Ectomycorrhizal colonization and intraspecific variation in growth responses of lodgepole pine. *Plant Ecology* 200:161-165.
- Kaska, D.D., Myllyla, R. y 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.
- 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.
- Kemper, W.D. y Rosenau, R.C. 1986. Aggregate Stability and Size Distribution. In: *Methods of Soil Analysis, Part 1. Physical and Mineralogical Methods* (2nd Edition). En *Agronomy Monograph*, No. 9. pp. 425-442.
- Knops, J. M., Bradley, K. L. y Wedin, D. A. 2002. Mechanisms of plant species impacts on ecosystem nitrogen cycling. *Ecology Letters*, 5:454-466

- Kodesová, R., Kodes, V., Zigorová, A. y Simunek, J. 2006. Impact of plant roots and soil organisms on soil micromorphology and hydraulic properties. *Biologia*, Bratislava. 61:339-343.
- Koide, R.T. y Kabir, Z. 2000. Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist*. 148:511-517.
- Koide, T. R. y Wu, T. 2003. Ectomycorrhizas and retarded decomposition in a *Pinus resinosa* plantation. *New Phytologist*. 158:401-407.
- Kranabetter, J. M., Durall, D. M. y MacKenzie, W. H. 2009. Diversity and species distribution of ectomycorrhizal fungi along productivity gradients of a southern boreal forest. *Mycorrhiza*. 19:99-111.
- Kuo, M. (2006, noviembre). *Pisolithus tinctorius*. *MushroomExpert.Com* Obtenido de:[http://www.mushroomexpert.com/pisolithus\\_tinctorius.html](http://www.mushroomexpert.com/pisolithus_tinctorius.html)
- 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.
- Leake, J. R., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G. E., Boddy, L. y Read, D. J. 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Special Issue on Mycorrhizae*. 82:1016-1045.
- 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. y Canet, D. 1994.  $\text{NH}_4^+$  assimilation in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (MAIRE) Orton, a N-15-NMR study. *New Phytologist*. 128:479-485.

- Mataix-Solera, J. y Doerr, S. H. 2004. Hydrophobicity and aggregate stability in calcareous topsoils from fire-affected pine forests in southeastern Spain. *Geoderma*. 118:77-88.
- Milleret, R., Clare-Renné, L. B. y Michael-Jean, G. 2008. Root, mycorrhiza and earthworm interactions: their effects on soil structuring processes, plant and soil nutrient concentration and plant biomass. *Plant soil*. DOI 10.1007/s11104-008-9753-7
- 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*. 36:1425-1435.
- Ola, N. L. and Wallander H. 2003. Production of external mycelium by ectomycorrhizal fungi in a norway spruce forest was reduced in response to nitrogen fertilization. *New Phytologist*. 158: 409-416.
- Paz, N. I. y Sanchez de P. M. 2007. Relation between extraradical mycelium length of arbuscular mycorrhizal fungi and some properties of the ground under two shading systems of coffee, plateau of popayán. *New Phytologist* 5:1
- Pérez-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.
- Pérez-Moreno, J. y Read, D. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*. 29:239-247.
- Pérez-Moreno, J. 1998. La ectomicorriza una simbiosis mutualista en el sostenimiento de Gaia, el planeta viviente. En Ferrera-Cerrato R., Pérez-Moreno J. (Eds) Manejo de agroecosistemas sostenibles. Universidad Veracruzana. Xalapa, México. pp. 93-120.

- Piotrowski, J. S., Denich, J. N., Klironomos, J. M., Graham, y Rillig, M. C. 2004. The effects of arbuscular mycorrhizas on soil aggregation depend on the interaction between plant and fungal species. *New Phytologist*. 164:365-373
- Plenchette, C., Fortin, J.A. y Furlan, V. 1983. Growth response of several plant species to mycorrhiza under field conditions. *Plant Soil*. 70:191-209.
- Puget, P., Chenu, C. y 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.
- Ramos, Z., J. y Guadarrama, P. 2004. Los hongos micorrizógenos en la restauración de comunidades tropicales. *Universidad y Ciencia*. Número especial I:59-65.
- Rangel-Castro, J.I., Danell, E. and Taylor, A.F.S. 2002. Use of different nitrogen sources by the edible ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycorrhiza*. 12:131-137.
- Rasse, D. P., Smucker, A. J. M. y Santos, D. 2000. Alfalfa root and shoot mulching effects on soil hydraulic properties and aggregation. *Soil Science Society of America Journal*. 64:725-731.
- Read, D.J., Francis, R. y Finlay, R.D. 1985. Mycorrhizal mycelia and nutrient cycling in plant communities. 4:193-217.
- Read, D. J. 1992. The mycorrhizal mycelium. En Allen M.F. (Ed.) *Mycorrhizal functioning, an integrative plant-fungal process*. Chapman and Hall. Nueva York, EEUU. pp. 102-133.
- Rillig, M.C., Writh, S.F. y 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.
- Rilling, M, C. y Mummey, D. L. 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist*. 171:41-53.



- Rodionov, A., Amelung, W., Urusevskaja, I. y 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.
- Rothstein, D.E., Vitousek, P.M., y Simmons, B.L. 2004. An exotic tree alters decomposition and nutrient cycling in a Hawaiian montane forest. *Ecosystems*. 7:805-814.
- Sawyer, N.A., Chambers, S.M. y Cairney, J.W.G. 2003. Variation in nitrogen source utilization by nine *Amanita muscaria* genotypes from Australian *Pinus radiata* plantations. *Mycorrhiza*. 13:217-221.
- Selle, A., Willmann, M., Grunze, N., GeBler, A., WeiB, M. y Nehls, U. 2005. The high-affinity poplar ammonium importer PttAMT1.2 and its role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*. 168:697-706.
- Shein, E. V. y Milanovskii, E. Y. 2003. The role of organic matter in the formation and stability of soil aggregates. *Eurasian Soil Science*. 36:51-58.
- SideLook 1.1. 01. (<http://www.appleco.ch/>)
- Sirko, A. y Brodzik, R. 2000. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Polonica* 47(4):1189-1195
- Six, J., Merckx, R., Kimpe, K., Paustian, K. y Elliott, E. T. 2000. A re-evaluation of the enriched labile soil organic matter fraction. *European Journal of Soil Science*. 51:283-293.
- Smith, S.E. y Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edition, Academic Press, London, UK.
- Spaccini, R., Piccolo, A., Mbagwu, J., S. C. Teshale, A. Z. y 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. y Stutz, J.C. 2001. Effect of urban expansion on arbuscular mycorrhizal fungal mediation of landscape tree growth. *Journal of Arboriculture*. 27:193-202.
- Stenberg, M., Stenberg, B. y 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.
- Taboada, M. A., Barbosa, O. A., Rodriguez, M. B. y Cosentino, D. J. 2004. Mechanisms of aggregation in a silty loam under different simulated management regimes. *Geoderma*. 123:233-244.
- Tagu, D., Lapeyrie, F. y Martin, F. 2002. The ectomycorrhizal symbiosis: genetics and development. *Plant and Soil*. 244:97-105.
- Taiz, L. y Zeiger, E. *Plant Physiology*. 1991. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Tarchitzky, J., Hatcher, P. G. y Chen, Y. 2000. Properties and distribution of humic substances and inorganic structure-stabilizing components in particle-size fractions of cultivated Mediterranean soils. *Soil Science*. 165:328-342.
- Tatry, M. V., Kassis, E. E., Lambilliotte, R., Corratge, C., Aarle, I., Amenc, L. K., Alary, R., Zimmermann, S., Sentenac, H. y Plassard, C. 2009. Two differentially regulated phosphate transporters from the symbiotic fungus *Hebeloma cylindrosporum* and phosphorus acquisition by ectomycorrhizal *Pinus pinaster*. *The Plant Journal*. 57:1092-1102.
- Thomson, B. D., Grove, T. S., Malajczuk, N. y Hardy, G. T. 1993. 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.
- Tisdall, J.M. 1994. Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil*. 159:115-121.

- Turnbull, M.H., Goodall, R. y 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.
- Twieg, B., Durall, D., Simard, S. y Jones, M. 2009. Influence of soil nutrients on ectomycorrhizal communities in a chronosequence of mixed temperate forests. *Mycorrhiza*. 19:305-316.
- Velázquez-Rodríguez, A., Flores-Román, D. y Acevedo-Sandova, O. 2001. Aggregate formation in tepetate by effect of plant species. *Agrociencia* 35: 311-320.
- 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.
- Wallander, H., Nilsson, L. O., Hagerberg, D., y Baath, E. 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytologist*. 151:753-76.
- Wright, A. L. y 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.
- 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.
- Young, I., Blanchart, E., Chenu, C., Dangerfield, M., Fragoso, C., Grimaldi, M., Ingram, J. y Jocteur, L. 1998. The interaction of soil biota and soil structure under global change. *Global change biology*. 4:703-712.

### 13. ARTICULO ACEPTADO EN LA REVISTA CIENCIA NICOLAITA

#### EFFECTO DE LA SIMBIOSIS *PISOLITHUS TINCTORIUS-FRAXINUS UHDEI* SOBRE LOS AGREGADOS Y EL CARBONO DEL SUELO, BAJO TRES FUENTES DE N ( $\text{NO}_3^-$ , $\text{NH}_4^+$ Y UREA)

Ana L. Báez-Pérez<sup>1</sup>, Juan M. Sánchez<sup>2</sup> y Héctor J. Villegas<sup>3</sup>

1 y 3. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 01 443 326 57 88, ext. 129. (darkiana@gmail.com<sup>1</sup>, vilj4455@yahoo.com.mx<sup>3</sup>.)

2. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 01 443 326 57 88, ext. 112 (azotobacter56@yahoo.com.mx).

#### RESUMEN

Se estudió la interacción entre plantas de *Fraxinus uhdei* inoculadas con el hongo ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* y fertilizadas con 3 fuentes de nitrógeno:  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y Urea. Se analizó el efecto en el desarrollo de las plantas, el contenido de carbono del suelo y la formación y estabilidad de los agregados del suelo. Las semillas se germinaron en contenedores, se trasplantaron a bolsas de plástico conteniendo 1 kg de suelo estéril y se inocularon con 1 000 000 de esporas de *P. tinctorius* por maceta, utilizando como carrier turba micronizada la cual fue colocada cerca de la raíz de la plántula. Después de 16 semanas se analizaron las variables respuesta. El experimento contó con 8 tratamientos y 17 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron: 1.- *Fraxinus* sin nitrógeno, 2.- *Fraxinus* +  $\text{NO}_3^-$ , 3.- *Fraxinus* +  $\text{NH}_4^+$ , 4.- *Fraxinus* + Urea. Los tratamientos 5, 6, 7 y 8 son idénticos a los anteriores, además de ser inoculados con *Pisolithus tinctorius*.

Las plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico sin fuente de nitrógeno se desarrollaron mejor que sus contrapartes no micorrizadas con o sin fuente de nitrógeno, presentando incrementos significativos en las variables de peso fresco de parte aérea, área foliar y peso seco de raíz. Asimismo se observaron

diferencias morfológicas en las raíces de todos los fresnos micorrizados, acentuándose mayormente en los fresnos micorrizados sin fertilización y en los que se fertilizaron con Urea. Los resultados sugieren que la interacción *Pisolithus tinctorius* tiene un efecto diferencial en el desarrollo de la planta.

**Palabras clave:** hongos micorrízicos, *Fraxinus*, Simbiosis.

## INTRODUCCIÓN

Los recursos naturales son un factor de desarrollo económico y social de un país, por lo que su conservación es indispensable. La degradación del suelo es un problema que afecta a gran parte del territorio mexicano y provoca consecuencias que se traducen en un territorio cada vez menos productivo. La deforestación es una de las causas principales de la pérdida y la erosión del suelo. La perturbación de ecosistemas naturales, indistintamente de la fuente, causa la pérdida de los agregados del suelo y de la materia orgánica, y por lo tanto de su estructura, y con ello la incapacidad del suelo para regenerar su cobertura vegetal. En este sentido, es necesario buscar alternativas para frenar el deterioro del suelo y regenerar así estos ecosistemas. Dentro de estas alternativas están el uso de los hongos ectomicorrízicos que pueden asociarse a plantas y dotarlas de un mejor desarrollo así como contribuir a formar parte de una estrategia viable para disminuir el impacto de la pérdida y degradación de suelos, y favorecer así los programas de reforestación y revegetación.

El fresno (*Fraxinus uhdei*) es un género con potencial para establecerse en suelos degradados por su habilidad para crecer en condiciones de estrés y su rápido crecimiento (Stabler *et al.* 2001). Existen pocos trabajos que muestren el efecto de los hongos ectomicorrízicos en interacción con *Fraxinus uhdei* en la estructura del suelo y desarrollo de la planta, si bien las investigaciones preliminares apoyan el efecto benéfico en la interacción fresno-ectomicorriza en la formación y estructura del suelo así como en el desarrollo de la planta (Ambriz, 2007), se desconoce el impacto de esta asociación y su interacción con diferentes fuentes de nitrógeno sobre el desarrollo vegetal y en la formación y estabilidad de agregados del suelo.

Las ectomicorrizas son hongos que pertenecen al grupo de los basidiomicetes. Las raíces ectomicorrízicas se caracterizan por la presencia de un manto de hifas que cubre las puntas de las raíces más finas y una red de hifas entre las células epidérmicas o células corticales conocida como red de Hartig (Smith & Read, 1997). Las hifas que forman el manto, se prolongan y forman cordones miceliales que crecen entre las partículas del suelo, y son las responsables de la mayor absorción y traslocación de nutrimentos hacia el simbionte. Las hifas que se proyectan al exterior de la raíz exploran un volumen mayor de suelo. Las fuentes orgánicas de N que puede tomar el micelio externo son muy variadas gracias a su capacidad de producir enzimas extracelulares como las proteasas, oxidasas y fosfatasa que participan en la mineralización de N (Bending y Read 1995). Pérez-Moreno (2000), sugiere que el micelio externo es el encargado de la movilización de nutrientes de sustratos orgánicos naturales a la planta.

Fresno es el nombre común de los miembros del género *Fraxinus*, formado por unas 65 especies de árboles y arbustos pertenecientes a la familia Oleaceae. Este árbol de tronco recto y cilíndrico, alcanza de 15 a 20 m de altura y se ha recomendado para la restauración de sitios degradados, aunado a eso, Rothstein *et al.* (2004), documentó que hay grandes cantidades de N y P en la hojarasca de un bosque dominado por fresnos, y por ende plantea que existe una gran disponibilidad de nutrientes para descomponedores de materia orgánica del bosque. Se ha sugerido que el éxito del fresno para poder desarrollarse en zonas degradadas puede ser el resultado de su habilidad para formar asociaciones simbióticas con hongos micorrízico (Stabler *et al.* 2001), sin embargo el efecto de esta asociación ha sido muy poco estudiado.

Este trabajo ha sido planteado sobre la siguiente hipótesis: la inoculación de *Fraxinus uhdei* con *Pisolithus tinctorius* y la interacción con la fuente de nitrógeno influyen en el desarrollo de la planta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo analizar la contribución de la asociación *Pisolithus tinctorius* – *Fraxinus uhdei*. en el contenido de C del suelo y en la formación y estabilidad de agregados, así como analizar el desarrollo de las plantas de fresno tanto de su parte aérea como de su raíz, además de examinar el crecimiento del micelio externo del hongo, en suelo fertilizado con nitrógeno en forma de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), y/o urea.

El experimento contó con 8 tratamientos y 17 repeticiones (por tratamiento): 1.- *Fraxinus* sin nitrógeno, 2.- *Fraxinus* +  $\text{NO}_3^-$ , 3.-*Fraxinus* +  $\text{NH}_4^+$ , 4.- *Fraxinus* + Urea. Los tratamientos 5, 6, 7 y 8 son idénticos a los anteriores, pero inoculados con *Pisolithus tinctorius*.

El suelo utilizado es de tipo franco-arcilloso-arenoso colectado en el municipio de Morelia seleccionado por su bajo contenido de Nitrógeno y Carbono. Este fue tamizado en malla de 2 mm de abertura y esterilizado a 121 °C, 15 psi de presión, por un periodo de 20 min por tres ocasiones. Las semillas fueron escaldadas y desinfestadas con peróxido de hidrogeno al 10 % (v:v) por 15 minutos. Se germinaron en contenedores de 30 ml teniendo como sustrato una mezcla estéril de agrolita-turba (2:1), y se trasplantaron a bolsas de plástico con 1 kg del suelo estéril antes mencionado e inoculadas con 1 000 000 de esporas de *P. tinctorius* por maceta. Los fresnos fueron fertilizados cada tercer día con solución nutritiva de Long Ashton y al cabo de 16 semanas se analizaron las variables respuesta. El experimento se realizó en cámara de crecimiento bajo condiciones de 25 °C, 75 % de humedad relativa y 14 horas de fotoperiodo.

Las variables respuesta determinadas para la planta fueron: altura, área foliar, peso fresco y seco y para la raíz: longitud, volumen, peso fresco y seco. El área foliar se determinó por medio de edición digital fotográfica; el peso fresco se tomara con balanza analítica; el peso seco de la parte aérea y de raíz se determinó mediante el secado en horno a 60 °C durante 48 hrs.

Los datos serán analizados mediante un ANOVA, seguido de la prueba de comparación de medias de Tukey. El programa estadístico que se utilizará será ASSISTAT 7.5 beta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores promedio obtenidos en las diferentes variables de crecimiento de fresnos no inoculados se presentan en la tabla 1. Una vez concluido el periodo de crecimiento se pudo observar en los fresnos no inoculados con *P. tinctorius* un decremento significativo en todas variables de crecimiento de la parte aérea de la planta en comparación con el tratamiento no fertilizado.

Por otra parte en las variables relacionadas con la raíz, al igual que en la parte aérea, se presentó un decremento significativo en las variables consideradas en comparación con el tratamiento no fertilizado con ninguna fuente de nitrógeno, a excepción de la longitud de la raíz en el tratamiento fertilizado con amonio, donde se presentó un aumento significativo en comparación en el tratamiento no fertilizado.

Tabla 1. Valores promedio en las variables de crecimiento de las plantas de fresno de 16 semanas de edad en los tratamientos no inoculados con *P. tinctorius*.

<b>FRESNOS NO INOCULADOS</b>				
<b>TRATAMIENTOS</b>	CONTROL	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	UREA
<b>PARTEAEREA</b>				
<b>VARIABLES</b>				
PESO SECO (g)	<b>0.48 a</b>	0.25 b	0.29 b	0.25 b
PESO FRESCO (g)	<b>1.80 a</b>	0.73 c	1.41 b	1.19 b
ÁREA FOLIAR (cm <sup>2</sup> )	<b>104.82 a</b>	38.77b	91.66a	61.32b
<b>RAÍZ</b>				
LONGITUD (cm)	21.43 b	25.75 ab	<b>32.25 a</b>	18.64 b
VOLUMEN (cm <sup>3</sup> )	<b>0.12 a</b>	0.11 a	<b>0.12 a</b>	0.10 ab
PESO SECO (g)	<b>0.23 a</b>	0.15 b	0.09 c	0.13 bc
PESO FRESCO (g)	<b>0.97 a</b>	0.60 b	0.61 b	0.67 b



Los tratamientos seguidos por la misma letra no son diferentes estadísticamente.

En los tratamientos donde se inoculo con *Pisolithus tinctorius* (tabla 2), se observó la misma tendencia a presentar decrementos significativos en todos los tratamientos fertilizados a nivel de la parte aérea en comparación con el tratamiento no fertilizado y, de igual manera en las variables consideradas para la raíz se observo un decremento significativo en los tratamientos fertilizados en comparación en el tratamiento no fertilizado presentándose la excepción en la longitud de la raíz donde no hubo diferencias significativas entre los tratamientos sin embargo hubo un ligero incremento en la longitud de raíz en el tratamiento fertilizado con urea.

Cabe señalar que se observo un efecto sinérgico en los valores de todas las variables de crecimiento para los fresnos inoculados con *Pisolithus tinctorius* en comparación con los fresnos no micorrizados.

Tabla 2. Valores promedio en las variables de crecimiento de las plantas de fresno de 16 semanas de edad en los tratamientos inoculados con *P. tinctorius*.

<b>FRESNOS INOCULADOS</b>				
<b>TRATAMIENTOS</b>	CONTROL + <i>P. tinctorius</i>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> + <i>P. tinctorius</i>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + <i>P. tinctorius</i>	UREA + <i>P. tinctorius</i>
<b>PARTEAEREA</b>				
<b>VARIABLES</b>				
PESO SECO (g)	<b>0.63 a</b>	0.29 b	0.37 b	0.56 a
PESO FRESCO (g)	<b>2.49 a</b>	1.33 bc	1.00 c	1.90 ab
ÁREA FOLIAR (cm <sup>2</sup> )	<b>148.22 a</b>	54.62 c	93.81 b	108.49 b
<b>RAÍZ</b>				
LONGITUD (cm)	22.10 a	21.00 a	20.17 a	<b>22.25 a</b>
VOLUMEN (cm <sup>3</sup> )	<b>0.12 a</b>	0.06 b	0.06 b	0.10 ab
PESO SECO (g)	<b>0.32 a</b>	0.09 c	0.10 c	0.22 b
PESO FRESCO (g)	1.52 a	0.56 b	0.43 b	<b>1.25 a</b>

Los tratamientos seguidos por la misma letra no son diferentes estadísticamente.

Los resultados sugieren que las plantas inoculadas con el hongo ectomicorrízico sin fuente de nitrógeno se desarrollaron mejor que sus contrapartes no micorrizadas con o sin fuente de nitrógeno. Además se observó que la adición de nitrato en plantas inoculadas y no inoculadas tuvo efectos negativos en la mayoría de las variables de crecimiento con excepción del volumen (en fresnos no micorrizados) y longitud de la raíz (en fresnos tanto no micorrizados como micorrizados) y que la adición de amonio en plantas inoculadas y no inoculadas tuvo efectos negativos en la mayoría de las variables de crecimiento con excepción del área foliar (en fresnos no micorrizados), longitud de raíz en fresnos tanto no micorrizados como micorrizados) y altura de la planta (en fresnos micorrizados). Lo anterior sugiere que las fuentes de nitrógeno inorgánico pueden tener efectos negativos sobre el crecimiento de *Fraxinus uhdei* solo o asociado a *Pisolithus tinctorius* sin embargo, en el caso de la fuente de nitrógeno orgánica (urea) la inoculación de los fresnos con *Pisolithus tinctorius* revirtió este efecto negativo.

Las especies del genero *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 existen pocos trabajos que muestren la habilidad de *Fraxinus sp.* para establecer una relación simbiótica con hongos ectomicorrízicos (Ambriz, 2007). *Fraxinus udhei* inoculado con *Pisolithus tinctorius* produjo un aumento sinérgico en la mayoría de las variables determinadas en comparación con los tratamientos no inoculados. Tales incrementos coinciden con lo reportado por Ambriz, (2007) donde se observó de igual manera un aumento en las variables de crecimiento en los fresnos inoculado con *P. tinctorius*. Sin embargo cabe mencionar que dicho trabajo de investigación no considero la influencia de la fuente de nitrógeno sobre el desarrollo de *Fraxinus udhei* en asociación con *P. tintorius* por lo que este es el primer reporte que muestra el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la asociación.

## LITERATURA CITADA

- Ambriz, E. 2007. **Efecto de la interacción *Glomus-Pisolithus-Aile* y *Glomus-Pisolithus-Fraxinus* en el crecimiento de la planta y formación de agregados del suelo.** Tesis de Doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 102 pp. (Inedito)
- Bending, G.D. and Read, D. J. **The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants VI. Activities of nutrient mobilising enzymes in birch litter colonised by *Paxillus involutus*.** *New Phytologist*. 130: 411-417.
- Colpaert, J.V., Tichelen, K.K., Assche, J.A. and Laere, A. 1999. **Short-term phosphorus uptake rates in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of intact *Pinus sylvestris* seedlings.** *New Phytologist*. 143:589-597.
- 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.
- 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.
- Finlay, R.D., Ek, H., Odham, G. and Söderström, B. 1989. **Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from <sup>15</sup>labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*.** *New Phytologist*. 113:47-55.
- García, G. J y Ballesteros, G. M. I. 2002. **Quality parameters evaluation for organic carbon determining in soils.** *Rev.Colomb.Quim.* 34: 201-209.

- Gobert, A. and Plassard, C. 2000. **Differential  $\text{NO}_3^-$  dependent patterns of  $\text{NO}_3^-$  uptake in *Pinus pinaster*, *Rhizopogon roseolus* and their ectomycorrhizal association.** *New Phytologist*. 154:509-516.
- Kemper, W.D. and Rosenau, R.C. 1986. **Aggregate Stability and Size Distribution.** In: Methods of Soil Analysis, Part 1. Physical and Mineralogical Methods (2nd Edition). *Agronomy Monograph*, No. 9. pp. 425-442.
- 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*. *New Phytologist*. 109(2):171-181.
- Leake, J. R., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G. E., Boddy, L. and Read, D. J. 2004. **Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning.** *Special Issue on Mycorrhizae*. 82: 1016–1045.
- Pérez-Moreno, J. and 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.
- Rothstein, D.E., Vitousek, P.M., and Simmons, B.L. 2004. **An exotic tree alters decomposition and nutrient cycling in a Hawaiian montane forest.** *Ecosystems*. 7:805-814.
- Schweiger, F., Rouhier, H. y Söderström, B. 2002. **Visualisation of ectomycorrhizal rhizomorph structure using laser scanning confocal microscopy.** *Mycological*. 116: 349-354.
- Smith, S.F. and Read, D.J. 1997. **Mycorrhizal symbiosis.** 2ª Edición. Academic Press London. P: 605

- 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. and Stutz, J.C. 2001. **Effect of urban expansion on arbuscular mycorrhizal fungal mediation of landscape tree growth.** *Journal of Arboriculture.* 27:193-202.
- Tarchitzky, J. Hatcher, P. G. and Chen, Y. 2000. **Properties and distribution of humic substances and inorganic structure-stabilizing components in particle-size fractions of cultivated Mediterranean soils.** *Soil Science.* 165:328-342
- Wallander, H., Nilsson, L. O., Hagerberg, D., and Baath, E. 2001. **Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field.** *New Phytologist.* 151: 753–76.
- Wright, A. L. and 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.