



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**INOCULACIÓN DE PLANTAS DE *Fraxinus uhdei* CON HONGOS
MICORRÍZICOS: EFECTOS DE LA SIMBIOSIS Y FERTILIZACIÓN EN
EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE LAS PLANTAS EN
SUELOS DEGRADADOS DE ORIGEN VOLCÁNICO**

TESIS

Para la obtención del grado de

**Doctora en Ciencias Biológicas
Opción en Biología Experimental**

Presenta

**Maestra en Ciencias en Biología Experimental
Ana Laura Baez Pérez**

Director de tesis:

Co-director de tesis:

**Doctor en Ciencias en Biología
Javier Villegas Moreno**

**Doctor en Ciencias en Biología
Roberto Lindig Cisneros**

Morelia, Michoacán, Febrero de 2015.

CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Hongos micorrízicos.....	4
Hongos micorrízicos arbusculares	4
Clasificación	4
Hospederos	5
Proceso de colonización.....	5
Micelio externo	7
Adquisición de nutrientes	8
<i>Glomus intraradices</i>	10
Hongos ectomicorrízicos.....	12
Clasificación	12
Hospederos	12
Proceso de colonización.....	13
Micelio exteno.....	14
Adquisición de nutrientes	14
<i>Pisolithus tinctorius</i>	16
<i>Fraxinus uhdei</i>	17
Agregación del suelo.....	18
Raíces de las plantas	19
Materia orgánica.....	20
Microorganismos del suelo.....	20
Agentes inorganicos	21
Variables medioambientales.....	21
Efecto de la fertilidad del suelo en la simbiosis micorrizica.....	22
Fósforo	22
Nitrógeno	24

Micronutrientes	24
Descripción del sitio de estudio (Atecuaro)	25
Localización geográfica	25
Clima	26
Geología	26
Fisiografía	27
Suelos	27
Vegetación	28
Hidrología	28
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	29
Objetivos específicos	29
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL	30
RESULTADOS	31
CAPÍTULO I. Utilización de hongos micorrízicos para la restauración de suelos severamente degradados	31
CAPÍTULO II. Inoculación con hongos micorrízicos y fertilización con urea de plantas de <i>Fraxinus uhdei</i> en acrisoles provenientes de sitios degradados	39
CAPÍTULO III. Inoculación de plantas de <i>Fraxinus uhdei</i> con hongos micorrízicos: efectos de la simbiosis y fertilización en suelos degradados, un estudio de campo	55
DISCUSIÓN GENERAL	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GENERALES	78

RESUMEN

En suelos severamente degradados, deficientes en nutrientes y carentes de estructura, el establecimiento, desarrollo y supervivencia de plantas se dificulta. En estas condiciones, el uso de interacciones con hongos micorrízicos, podría ser una estrategia efectiva para la revegetación y la restauración ecológica. En el presente trabajo se establecieron dos ensayos con el objetivo de evaluar el desempeño de *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh (fresno) inoculado con los hongos micorrízicos; *Pisolithus tinctorius* y *G. intraradices*, solos o en interacción y en presencia/ausencia de fertilización nitrogenada en suelos de tipo acrisol ócrico. El primer ensayo consistió de un sistema de mesocosmos utilizando macetas con sustrato obtenido de un sitio severamente erosionado (acrisoles con presencia de cárcavas, en la localidad de Atecuaro), con 8 tratamientos y 18 réplicas por tratamiento, y que tuvo una duración de 20 meses. El segundo ensayo con los mismos tratamientos y 28 réplicas por tratamiento, fue establecido en campo y tuvo una duración de 21 meses. La fertilización se realizó durante la temporada de lluvias, recibiendo 0.096 g urea/planta a una concentración de 200 milimolar. En el sistema de mesocosmos, los resultados indicaron que la fertilización no tuvo efecto significativo sobre el desarrollo de las plantas pero, afectó negativamente la supervivencia (con urea 67%, sin urea 90%). Los mayores valores para las variables de crecimiento y la biomasa aérea siempre correspondieron a las plantas con inoculación dual, y los menores para las plantas control o las inoculadas con *P. tinctorius* (altura 23.3 cm contra 15.8 cm para *P. tinctorius*, DAB 0.74 cm contra 0.5 para *P. tinctorius*, el peso seco de las partes aéreas 2.0 g contra 1.0 g del control). En el experimento en campo, entre tratamientos de inoculación las diferencias no fueron significativas, sin embargo al comparar el 100 % de supervivencia del tratamiento con inoculación dual fertilizado, contra el control (61.54 %), se evidencia una clara diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$). Al analizar crecimiento de *F. uhdei*, los resultados indicaron que los valores menores corresponden al control para todas las variables analizadas, por lo que es importante la presencia de los hongos micorrízicos de manera individual o dual (no existiendo diferencia estadística entre tratamientos inoculados) ya que presentan valores mayores con respecto a las plantas control. El factor fertilización solo fue significativo para la altura de *F. uhdei*. Los resultados sugieren que en suelos con deficiencias nutricionales se requiere de interacciones entre plantas y hongos micorrízicos como las descritas en este estudio para mejorar el establecimiento, crecimiento y supervivencia ante estas condiciones, lo cual pudiera ser clave como estrategia en la restauración de sitios altamente degradados.

Palabras clave: co-inoculación, *Glomus intraradices*, *Pisolithus tinctorius*, simbiosis, restauración ecológica.

ABSTRACT

In severely degraded, nutrient deficient soils and unstructured, establishment, development and survival of plants is difficult. Under these conditions, the use of interactions with mycorrhizal fungi, could be an effective strategy for revegetation and ecological restoration. In this work, two trials in order to evaluate the performance of *Fraxinus uhdei* settled Lingelsh (ash) inoculated with mycorrhizal fungi (Wenz.); *Pisolithus tinctorius* and *G. intraradices*, alone or in interaction and presence / absence of nitrogen fertilization on soil type acrisol ochric. The first assay consisted of a mesocosm system using pots with substrate obtained from a severely eroded site (acrisols presence of gullies in the town of Atécuaro) with 8 treatments and 18 replicates per treatment, which lasted 20 months. The second trial with the same treatments and 28 replicates per treatment was established in the field and lasted 21 months. Fertilization was done during the rainy season, receiving 0.096 g urea / plant at a concentration of 200 millimolar. In the mesocosm system, the results indicated that fertilization had no significant effect on plant growth but negatively affected survival (67% urea without urea 90%). The highest values for the variables of growth and biomass plants always corresponded with dual inoculation and the lowest for the control plants or inoculated with *P. tinctorius* (height 23.3 cm to 15.8 cm for *P. tinctorius*, DAB 0.74 cm against 0.5 for *P. tinctorius*, the dry weight of the aerial parts 2.0 g to 1.0 g of control). In the field experiment, between inoculation treatments were not significant differences, however when comparing the 100% survival of the fertilized treatment with dual inoculation against control (61.54%), evidenced a clear statistically significant difference ($P < 0.0001$). When analyzing *F. uhdei* growth, the results indicated that the lower values correspond to control for all variables analyzed, so it is important the presence of mycorrhizal fungi individually or dual (no statistical difference exists between inoculated treatments) and which have higher values compared with control plants. The fertilization factor was only significant for the height of *F. uhdei*. The results suggest that nutritional deficiencies in soils requires interactions between plants and mycorrhizal fungi as described in this study to enhance the establishment, growth and survival in these conditions, which could be key as a strategy in the restoration of highly degraded sites.

Keywords: co-inoculation, *Glomus intraradices*, *Pisolithus tinctorius*, symbiosis, ecological restoration.

INTRODUCCIÓN

La restauración de ecosistemas es una estrategia de manejo para recuperar servicios ambientales y se ha reconocido la necesidad de abordarla desde una perspectiva ecosistémica (García-Oliva, 2005). La estructura del suelo se ve afectada por diversos tipos de manejo intensivos, como la deforestación, debido a que provoca cambios drásticos en la función del suelo (García-Oliva, *et al.* 1999) y pérdida de hábitat para muchos organismos (Nebel *et al.*, 1999). Una de las consecuencias más graves de la pérdida de esta estructura es la pérdida de agregados del suelo. (Tisdall 1994, Six *et al.* 2004). La agregación es esencial para mantener la porosidad del suelo, mantener un buen intercambio de gases, buen drenaje y en general, facilitar los ciclos biogeoquímicos (Díaz-Zorrilla *et al.*, 2002). Además, la conservación de la estructura del suelo es crucial para la resistencia a la erosión. Como resultado de la experiencia acumulada en restauración ecológica, se consideran como áreas con altos niveles de disturbio a aquellas que sufrieron tala inmoderada, agricultura intensiva y la consecuente pérdida del suelo (Hardwick *et al.*, 1997, Lindig- Cisneros *et al.*, 2005) ya que este es el medio de soporte para el crecimiento vegetal y por lo tanto, la base de todos los ecosistemas terrestres (Smith *et al.*, 2000), que son particularmente sensibles a la erosión por escorrentía que puede tener como consecuencia la formación de cárcavas (Wilson *et al.*, 1980). Cuando lo anterior ocurre, reestablecer la cubierta vegetal y la estructura del suelo es de suma importancia para la rehabilitación del ecosistema. La mejor opción utilizada hasta ahora ha sido plantar especies resistentes al estrés por sequía, capaces de sobrevivir bajo las condiciones de un suelo degradado (Plancarte-Barrera, 1990), por lo tanto es frecuente que la restauración inicie con el establecimiento de pocas especies resistentes que pueden ser tanto herbáceas como arbustivas o arbóreas (Bradshaw, 2000).

La adición de nutrientes ha sido también una estrategia común en restauración, asociada a la práctica anterior (Quoreshi y Timmer, 2000, Olliet *et al.*, 2005). Sin embargo, la aplicación de algunos métodos específicos de mejoramiento del suelo puede favorecer otro tipo de procesos de degradación. Por ejemplo, fertilizar con nitrógeno puede incrementar la acidez del suelo, favoreciendo así la reducción del fósforo disponible, de modo que es importante entender al suelo como un componente del ecosistema antes de aplicar métodos de restauración (García-Oliva, 2005). En este sentido, el fresno podría jugar un papel importante en la fertilidad del suelo, ya que es un género recomendado y utilizado para la restauración de sitios degradados (Stabler *et al.* 2001), debido a que se ha documentado que un bosque dominado por fresno puede aportar

cantidades importantes de nitrógeno y fósforo al suelo mediante la producción de litter (Rothstein y Vitousek 2004). Este aporte se debe al contenido importante de estos nutrientes en las hojas de este género (Douds y Chaney 1986, Rothstein *et al.* 2004).

Sin embargo, no existen estudios sobre el reestablecimiento de la dinámica del fósforo y nitrógeno en sitios forestales templados severamente degradados. En este sentido, es necesario desarrollar estrategias nuevas que permitan optimizar la dinámica del fosforo y nitrógeno en suelos.

Uno de los principales factores en ecosistemas terrestres, asociados a la sobrevivencia y crecimiento de la planta, así como y a la conservación del suelo son los hongos ectomicorrízicos (HEM) y los hongos Micorrizicos Arbusculares (HMA). Estos organismos tienen la capacidad de establecer asociaciones simbióticas mutualistas llamadas micorrizas, las cuales pueden contribuir al desarrollo de la planta huésped debido principalmente a un aumento en la absorción de nutrientes minerales, especialmente el fósforo (P), además de realizar otras funciones importantes como estimular la formación y estabilidad de agregados del suelo a través de su micelio externo (Buscardo *et al.* 2009). La utilización de estos organismos asociados a especies nativas fijadoras de nitrógeno y a especies arbóreas, tanto nativas como exóticas, representa una alternativa viable para la rehabilitación de ecosistemas degradados.

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 micorrizicos (Stabler *et al.* 2001). Ambriz *et al.*, (2010), documentó que el fresno puede formar asociación simbiótica tanto con HEM (*Pisolithus tinctorius*) como con HMA (*Glomus intraradices*) y que esta asociación contribuye significativamente en la formación de macroagregados estables al agua y en el desarrollo de la planta. Estudios preliminares sugieren además que la urea tiene un efecto significativo en desarrollo del micelio externo del hongo *Pisolithus tinctorius* asociados a esta planta huésped (Báez-Pérez, 2011).

El estudio de plantas con el potencial de formar asociaciones simbióticas tanto con HMA como con HEM puede contribuir de manera importante a mejorar las estrategias de restauración, al aumentar la capacidad de sobrevivencia y crecimiento de estas especies, así como para contribuir a mejorar la estructura del suelo. En este sentido *Fraxinus uhdei* es una planta nativa de México, fácilmente adaptable, de rápido y vigoroso crecimiento y vive de 80 a 100 años. Debido a su capacidad para prosperar en suelos perturbados y su tolerancia a la sequía, se ha considerado que tiene un potencial para ser utilizada en programas de

conservación y recuperación de suelos. No obstante la importancia de esta especie, la información en torno a su biología, manejo y capacidad de formar asociaciones simbióticas es escasa.

ANTECEDENTES

Hongos micorrízicos

Una de las relaciones más importantes entre plantas y microorganismos del suelo 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 simbiontes 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, monotropoide, ericoide y orquidáceas (Smith y Read 1997).

Hongos micorrízicos arbusculares

Clasificación

La clasificación taxonómica de los hongos micorrízicos arbusculares ha tenido muchos cambios a través del tiempo y se les ha clasificado como organismos micorrízicos arbusculares (vesículo-arbusculares). Esta clasificación se basó en aspectos relacionados con el desarrollo, morfología y estructura de la pared celular de las esporas. Los miembros del género *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Glomus* y *Sclerocystis* forman parte de este tipo de organismos formadores de micorriza. Recientemente se ha tomado la perspectiva filogenética y a partir de este aspecto se separó otro orden, Glomales dentro de los Endogonales (Brundrett 2004). Por último, a partir de los métodos moleculares (Smith y Read, 1997) fue que se establecieron dos subórdenes del orden Glomales, el *Glomineae* y *Gigasporineae*. El suborden *Glomineae* agrupa a la familia Glomaceae con los géneros *Glomus* (77 especies) y *Sclerocystis* (10 especies) y la familia Acaulosporaceae con los géneros *Acaulospora* (32 especies) y *Entrophospora* (3 especies). Por otra parte el suborden *Gigasporineae* sólo tiene a la familia Gigasporaceae con los géneros *Gigaspora* (7 especies) y *Scutellospora* (23 especies). Sin embargo, todos estos

organismos comparten la característica de que su micelio vegetativo es septado y multinucleado, mientras que sus esporas contienen 1000 o más núcleos y germinan y producen muy poco micelio en ausencia de planta hospedera.

Hospederos

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

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

Proceso de colonización

Existen distintos tipos de propágulos con capacidad para establecer la simbiosis, como son las esporas, que constituyen las formas de resistencia de estos hongos, los fragmentos de raíces micorrizadas de plantas preexistentes y finalmente, las redes de hifas que sobreviven en el suelo.

En condiciones favorables como la presencia de exudados radicales (Graham 1982), los cuales han sido determinados como flavonoides (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1989, Siqueira *et al.* 1991, Chabot *et al.* 1992), pueden favorecer a que las esporas germinen y se inicie el establecimiento de la simbiosis micorrízica. La germinación de la espora se logra utilizando las fuentes de carbono almacenadas (lípidos), las cuales se integran al metabolismo inicial de germinación (Bago *et al.* 1999). Si las hifas del hongo no encuentran las raíces de una planta hospedadora a las que colonizar, su citoplasma se retrae y la espora entra de nuevo en estado de

dormancia (o latencia) hasta que de nuevo pueda germinar para poder establecer la simbiosis, probablemente como una estrategia para conservar las reservas e intentar una nueva colonización (Bago *et al.* 2000).

Una vez que una hifa “infectiva” alcanza la superficie de la raíz, se adhiere a ella y la primera estructura que se forma con el contacto hongo-planta es el denominado “apresorio” generalmente alineado de forma paralela al eje de la célula epidérmica de la raíz. Al mismo tiempo, esta célula sufre un ensanchamiento en la pared celular en el punto de contacto del apresorio y se forma un área donde la lignina está en bajas proporciones (Smith y Read 1997).

Se inicia la penetración al interior de la raíz. Las hifas colonizan el cortex de la raíz de forma rápida, sin invadir endodermos ni meristemas. Simultáneamente tiene lugar una colonización intracelular, formándose las estructuras más características de la simbiosis, los “arbúsculos”. En cada célula sólo puede formarse un arbúsculo. El arbúsculo representa una extensa superficie de contacto entre ambos simbioses. Se asume que el papel fundamental de esta interfase es el de facilitar el intercambio bidireccional de nutrientes entre el hongo y la planta (Brundrett 2004). El desarrollo del hongo en el interior de la raíz va acompañado de una proliferación de hifas en el suelo que la rodea formando lo que se denomina el micelio externo o extrarradical.

El desarrollo del hongo dentro de la raíz se logra de dos formas, vía los espacios intercelulares e intracelulares. Para el primer caso se denomina colonización tipo Arum y la formación de los arbúsculos se logra mediante la penetración de pequeñas ramificaciones del micelio intercelular. La colonización que penetra la célula se denomina tipo Paris y se caracteriza por dispersarse en el córtex de célula a célula, formándose el arbúsculo a partir de la hifa que ingresa en la misma. Los arbúsculos se localizan en una región cerca del meristemo apical de la raíz, donde la elongación de las células ha cesado (Blee y Anderson 1998). Estas estructuras son usualmente de corta vida y se forman del segmento de hifa que penetra la célula en ambos tipos de colonización. Una vez que la hifa se encuentra en el interior de la célula se ramifica con la finalidad de incrementar el área superficial de contacto con el hospedero y se rodea de una membrana periarbuscular. Esta membrana sirve como zona de intercambio de metabolitos entre el hospedero y el hongo (Blee y Anderson 1998). La aparición de los arbúsculos es rápida y parece que está estrechamente relacionada con un intenso crecimiento de micelio externo (Hepper 1981, Bécard y Piche 1992).

La colonización de los HMA ocurre rápidamente en las raíces más jóvenes. El tiempo estimado de penetración dura alrededor de 2 días, mientras que la

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

Micelio externo

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

La longitud del micelio externo de HMA normalmente se expresa en unidad de masa por volumen de suelo o por unidad de longitud de raíz colonizada. En términos generales la longitud del micelio podría ser de entre 3 y 30 m de hifas / g de suelo (Leake *et al.* 2004), aunque puede variar de acuerdo al sistema utilizado. En un sistema de maceta el rango en la longitud es de 2 a 29 m de hifas / g de suelo y en un sistema experimental de compartimentos es de 2 a 36 m de hifas / g de suelo (Leake *et al.* 2004), mientras que en campo se ha estimado para ser de 68 a 101 m de hifas / g de suelo en zonas de pradera y de 45 a 74 m de hifas / g de suelo en zonas de pasto (Miller *et al.* 1995). En sistemas agrícolas los valores de longitud decrecen drásticamente, quedando del orden de 2 a 8 m de hifas / g de suelo (Leake *et al.* 2004).

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

Adquisición de nutrientes

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

La toma de nitrógeno por parte del micelio externo es aún controversial en relación a sí el hongo logra tomarlo en forma de nitrato (NO_3), amonio (NH_4) o ambas (Figura 1). En este sentido se ha observado en un sistema *in vitro* que el micelio externo toma el nitrógeno en forma de NH_4 pero no en forma de NO_3 (Villegas *et al.* 1996, Toussaint *et al.* 2004), mientras que en un sistema similar se logró observar que el micelio de HMA puede tomar el nitrógeno en forma de NO_3 (Bago *et al.* 1996, Govindarajulu *et al.* 2005). Otro sistema utilizado para evaluar la toma de nutrimentos por el micelio externo de HMA es el sistema de compartimentos utilizando diversas especies de plantas. En este tipo de sistema se ha observado que el micelio logra tomar ambas fuentes (Johansen *et al.* 1992, Frey y Schüepp 1993, Johansen *et al.* 1993a, Johansen *et al.* 1993b, Tobar *et al.* 1994), sin embargo, cuando se aplica NH_4NO_3 , el nitrógeno que se logra observar en el hongo y en la planta hospedera, es el de la molécula de NH_4 (Hawkins *et al.* 2000). En el caso del nitrógeno orgánico se ha observado que el micelio logra tomarlo de manera eficiente (Hodge *et al.* 2001, Hodge 2003).

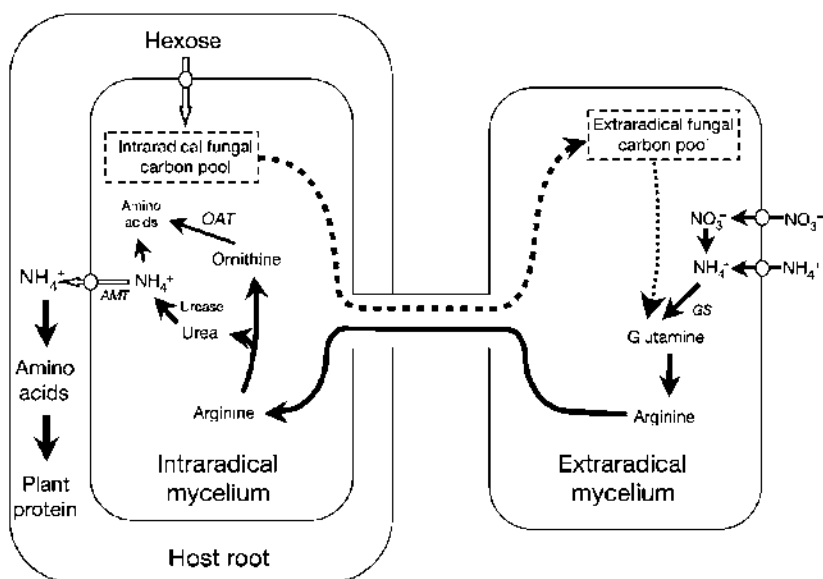


Figura 1.- Movimiento de nitrógeno en la simbiosis micorrízica (Govindarajulu *et al.* 2005)

Después que el nitrógeno se incorpora en el micelio se ha detectado actividad de nitrato reductasa en presencia de NO₃, mientras que cuando se aplica NH₄, se observa un incremento en la actividad de glutamina sintasa, lo cual hace suponer que el nitrógeno se incorpora en aminoácidos para su transporte, independiente de la fuente (Toussaint *et al.* 2004). El aminoácido que sirve como vehículo de transporte de nitrógeno del micelio externo al interno es la arginina (Bago *et al.* 2002). Con la finalidad de obtener conocimiento sobre la transferencia de nitrógeno al hospedero se estableció un experimento *in vitro*, concluyendo que el nitrógeno se transfiere a la planta en forma inorgánica (Govindarajulu *et al.* 2005).

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

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

Glomus intraradicens

Según la International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungí (INVAM) (2000) la clasificación taxonómica es:

Orden: Glomales.

Suborden: Glominae.

Familia: Glomaceae

Género: *Glomus* Tulasne & Tulasne.

Especie: *Glomus intraradices* Schenck & Smith.

Sin embargo en el 2010 se le nombró como *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) y recientemente en 2014 como *Rhizoglomus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) Sieverd., G.A. Silva & Oehl.

Las esporas son de color blanco, crema pálido a marrón amarillo, a veces con un tinte verde, de formas globosas, subglobosas, irregular, con muchas esporas elípticas (especialmente los que se extraen desde dentro raíces micorrizadas). Los tamaños van desde 40 a 140 μm (INVAM, 2000).

INVAM (2000) dice que posee una pared compuesta por 3 capas (L1, L2 y L3), donde solamente L1 está presente en las esporas juveniles y sigue hacia las hifas. L2 y L3, luego, se forman secuencialmente tanto en las esporas como en las hifas:

- L1: Es la capa más externa, hialina, mucilaginoso, de 0.6 a 3.2 μm de grosor. Con el tiempo, esta capa casi siempre se degrada y descompone naturalmente por acción de los microorganismos, después de lo cual aparecen granulos que se acumulan en restos.

- L2: Está adherida a la capa mucilaginosa externa, hialina, de 1.5 a 4.9 μm de grosor en esporas intactas. Con el tiempo, esta capa se degrada junto con L1 y también adquiere una apariencia granular. Esporas maduras comúnmente carecen de L1 y L2 o ellas están presentes juntas como parches.
- L3: Capa que posee el color blanco cremoso y algunas subcapas que pueden permanecer unidas o separadas cuando se aplica presión. El grado de separación entre las subcapas varía considerablemente entre esporas y siempre es afectado por la edad y grado de parasitismo. En esporas juveniles, la subcapa es de 0.5 a 1 μm de espesor y va engrosando con la formación de otras subcapas. El grosor varía entre 3.2 a 12 μm en esporas maduras. Esta capa se forma simultáneamente en la pared de las hifas.

Las hifas son de forma cilíndrica ligeramente achatadas. Poseen un ancho de 11 a 18 μm , y su pared es de 3.2 a 6.4 μm de ancho (INVAM, 2000). INVAM (2000) señala que la pared de la hifa está compuesta por 3 capas (L1, L2 y L3) que son continuas con las tres capas de las esporas. Las dos capas más externas son las únicas presentes en las etapas tempranas de formación de esporas; ambas son delgadas y se degradan con la maduración de la espora. Las subcapas de L3 también se pueden separar a lo largo de la hifa, aunque en menos ocasiones.

Un tubo germinativo emerge desde el lumen de la hifa. Este parece nacer desde la subcapa más interna de L3. Algunos especímenes muestran un tubo germinativo naciente desde terminales rotos de fragmentos de hifas, a una distancia de las esporas por el mismo mecanismo. Este comportamiento podría relacionarse por la alta infectividad de los fragmentos de hifas en esta especie (INVAM, 2000).

Numerosas vesículas (o esporas) a menudo forman puntos de entrada cercanos a lo largo con la red de arbúsculos e hifas. Es incierto cómo las vesículas intrarradicales son aun capaces, además, de diferenciarse en esporas, debido a que ello puede co-ocurrir en las raíces (INVAM, 2000).

La colonización arbuscular llega al máximo más temprano que otros hongos de *Glomus*; junto con raíces viejas, a menudo, se encuentra una extensiva red de hifas (sin arbúsculos) y numerosas esporas intrarradicales. Estas esporas tienden a agruparse y formar densos racimos.

Hongos ectomicorrízicos

Clasificación

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

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 ectomicorrízicas 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.) Cooke, 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).

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.

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.

Adquisición de nutrientes

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 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).

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 μ y con espinas de hasta 2 μ 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).

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 foliolos 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 foliolos (imparipinadas), deciduas, apareciendo comúnmente antes que las flores, foliolos 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 fuente de nitrógeno influyen sobre esta asociación.

La agregación 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 esta 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 (Deneff *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 (Deneff *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).

Factores que promueven la agregación de los suelos

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 ectomicorizas 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).

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 medioambientales

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).

Efecto de la fertilidad del suelo en la simbiosis micorrizica

El nivel de fertilidad del suelo y algunas practicas como la fertilización afectan el proceso de formación y desarrollo del sistema hongo-raíz (Diederichs y Moawad, 1993; Khasa et. al., 2001).

La aplicación excesiva de fertilizantes fosforados y nitrogenados afectan negativamente la formación de la simbiosis micorrizica, es decir, condicionan la selección de hongos adaptados a la formación de la simbiosis en suelos fértiles o fertilizados

Fósforo (P)

Los MVA pueden mejorar considerablemente el suministro de P para la planta hospedante mediante el uso de la capacidad absorbente de la extensa red de hifas externas asociadas a la raíz infectada. Las hifas de MVA, ligadas a la raíz, se extienden más allá de la zona de agotamiento de P que se desarrolla en los suelos deficientes en P, ya que la raíz absorbe iones fosfato más rápidamente de lo que se pueden difundir por el suelo para reabastecer el suministro a nivel de la superficie de la raíz. El movimiento de fosfatos que está mediado por las MVA ocurre en tres etapas: la absorción por la hifa endofita en el suelo, la translocación a la hifa dentro de la corteza radical mediante los puntos de entrada y la liberación hacia la planta.

El hongo probablemente toma el fosfato del suelo, principalmente en la forma de iones ortofosfato de las existencias inestables. Se cree que la translocación de este fosfato a la raíz ocurre principalmente mediante flujo citoplasmático de los gránulos polifosfatados en las vacuolas del hongo. Los MVA mejoran sustancialmente el crecimiento de las plantas a las cuales se les ha suministrado fuentes de fósforo relativamente insolubles, tales como harina de hueso, fosfato tricálcico y fosfato de hierro y aluminio. El P adicional fue tomado de la fracción de P soluble asociada con dichas fuentes fosfatadas o liberados por ellas en el suelo. Por consiguiente, las micorrizas aseguran una mejor utilización del fosfato disponible, en lugar de la movilización de la fracción insoluble (Saif, 1984). El fosfato está presente en el suelo entres formas: (i) P inorgánico soluble en la solución del suelo, (ii) P inorgánico insoluble encontrado en estructuras cristalinas, y (iii) componentes orgánicos tales como Phytate.

El fósforo en el suelo es relativamente inmóvil y se difunde lentamente a las raíces de la planta. Como resultado, en suelos con baja disponibilidad de P, las zonas de depleción se desarrollan alrededor de las raíces. En los suelos la cantidad de P que es disponible es poca y la cantidad es cerca del 1 al 5% del total del contenido de P (Cooper, 1984). En general, el mayor efecto en el desarrollo por la infección con micorrizas es causado por el incremento en la absorción de P. La efectividad para la toma de P por el hongo está relacionada por: (i) Formación de polifosfatos en la hifa y, mantenimiento de concentraciones internas bajas de fosfato (Pi), (ii) el diámetro pequeño de la hifa proporciona un volumen relativamente grande en el suelo por unidad de superficie comparada con el área superficial de la raíz, y (iii) producción de ácido fosfatasa extracelular el cual cataliza el P liberado de los complejos orgánicos del suelo (Marschner & Dell 1994).

Se calcula que la concentración de P en la parte externa de la hifa es alrededor de 0.3% de la materia seca comparada con las concentraciones del suelo "1 a 3 μM de ortofosfato (Pi). El P se absorbe como ortofosfato y es transferido a las hifas en forma de polifosfato, esta es la principal reserva de P en el hongo; los gránulos de polifosfatos se encuentran dentro de los arbúsculos jóvenes y en las vacuolas de las hifas. El modelo de transferencia de P a través de la interfase, generalmente involucra el flujo pasivo de Pi del hongo y activo de la absorción en la membrana plasmática de la célula de la planta. Cuando el hongo no se encuentra en simbiosis, la pérdida neta de Pi es poca, de esta manera las condiciones que promueven el flujo probablemente son importantes en la interfase hongo/raíz.

El arbúsculo es un órgano del haustorio especializado capaz de gran actividad metabólica y particularmente está adaptado como un sitio de intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta hospedante (Cooper, 1984). La concentración intercelular de Pi en ambos, hongo y planta, afecta el transporte de Pi. Altas concentraciones de P en la interfase de la hifa pueden, con el tiempo, reducir la reabsorción, maximizando la pérdida del hongo. Contenidos bajos de fósforo en las raíces en relación al hongo (mantenidos por el metabolismo y/o translocación ente la planta) y el concomitante incremento en el activo transporte de Pi a la membrana plasmática de la planta, puede permitir el movimiento neto de Pi dentro de la planta. La transferencia de Pi al tejido hospedante en ectomicorrizas es cerca de 10–20% del Pi absorbido por la hifa (Marschner & Dell, 1994; Smith, 1994).

Nitrógeno

Las investigaciones en toma de nitrógeno en plantas con VAM han sido en leguminosas. Cuando VAM mejora la nutrición de P en la planta hospedante, esto puede corresponder a un incremento en la nodulación, fijación de N_2 y desarrollo. En vista de los altos requerimientos de P para la nodulación, muchas especies de leguminosas que se desarrollan en suelos bajos de P son altamente dependientes de la infección VAM. Sin embargo, la simbiosis impone una gran competencia por los fotosintatos, usualmente a expensas del crecimiento de las raíces. De acuerdo a los efectos benéficos en la fijación con N_2 son uno u otro confinados a suelos con bajo P (Marschner & Dell, 1994).

Estudios con radioisótopos revelan que el micelio externo del hongo puede utilizar el N inorgánico del suelo eficientemente y es transportado 10–30 cm a través del suelo. Así, las plantas micorrizadas tienen acceso a formas de N que no son disponibles para plantas sin esta asociación. Bago *et al.* (1996) mostraron que *Glomus intraradices* es capaz de tomar NO_3^- y translocarlo a la planta. En muchos suelos agrícolas el ión NO_3^- es la forma predominante de N; aunque este ión es altamente móvil, cuando los suelos están restringidos por el contenido de agua, su movilidad se reduce drásticamente. En estas condiciones, el papel de las micorrizas en el transporte de NO_3^- a las raíces puede ser significativo. Estudios realizados en maíz (*Zea mays*) infectados con *G. intraradices*, evidencia que el transporte de la hifa a la planta fue del 33%, aunque puede variar con la compatibilidad funcional del hongo.

Johansen *et al.*, (1996) indican que ambas formas de nitrógeno NO_3^- y NH_4^+ son asimiladas en el micelio del hongo. Esta forma de incremento de toma de N puede estimular las enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno de la planta hospedante. Estos datos sugieren una relación positiva entre la contribución de N por la hifa y el estado metabólico/nutricional de la planta. Estos cambios pueden ayudar a la planta para resistir condiciones secas del suelo (Subramanian & Charest 1999).

Micronutrientes

La movilidad de Cu, Zn, Mn y Fe en suelos es baja. Como resultado, la toma de estos nutrientes por las raíces es limitada. Cuando no hay adición de estos micronutrientes al suelo, la disponibilidad es aún más baja y se forman zonas de depleción alrededor de las raíces.

Las plantas micorrizadas pueden tomar más nutrientes metales vía hifa extraradical, la cual provee grandes áreas de superficie (Jakobsen *et al.*, 1992).

De acuerdo a Bürket y Robson (1994) la toma de Zn está influenciada por la distribución y longitud de la hifa en tres especies de VAM en el suelo. La alta densidad de la hifa en el suelo, gran superficie de absorción, corta distancia de los metales para difundirse, y la efectividad de plantas micorrizadas pueden absorber estos nutrientes metales poco móviles. Liu *et al.*, (2000) encontraron que la contribución en la toma de Zn, Cu, Mn y Fe en maíz está significativamente influenciada por los niveles de P y micronutrientes en el suelo. Su efecto es positivo o negativo dependiendo no sólo del P sino también de los niveles de los micronutrientes en mención.

La hifa extraradical puede absorber y transportar Cu y Zn a su planta hospedante. El efecto benéfico de la inoculación con micorriza para la toma de Cu y Zn se elimina con la adición de estos micronutrientes al suelo. Bajo condiciones de Cu y Zn abundante, las raíces del maíz parecen depender menos de la micorriza. El efecto de P sobre la toma de Zn tiene dos componentes. Por un lado, las raíces de las plantas crecidas en bajo contenido de P poseen más hifas y, sin embargo, puede potencialmente absorber más Cu y Zn. Koothari *et al.*, (1991) reportaron en plantas de maíz crecido en suelos calcáreos, la contribución de la hifa de *G. Mosseae* a la toma total en un rango entre 16 y 25% de Zn y 13 – 20% de P.

Sitio de estudio (Atécuaro)

El ejido Atécuaro se compone de dos partes: la dotación ejidal y la ampliación ejidal. Los terrenos de la dotación ejidal comprenden una superficie de aproximadamente 284.25 ha y se localizan entre los 101° 11' 41" y 101° 11' 25" de longitud Oeste y los 19° 36' 55" y 19° 35' 50" de latitud Norte, esto se encuentra a 2.5 Km al NO de la comunidad de Atécuaro en el municipio de Morelia, Mich.. Los terrenos de la ampliación ejidal que comprenden una superficie de aproximadamente 1096.75 ha se ubican entre los 101° 13' 46' y los 101° 11' 23" de longitud Oeste y los 19° 32' 30" y 19° 29' 50" de latitud Norte, esto es, 4 Km al S de la comunidad de Atécuaro, también localizado en el municipio de Morelia, Mich, (Figura No. 1).

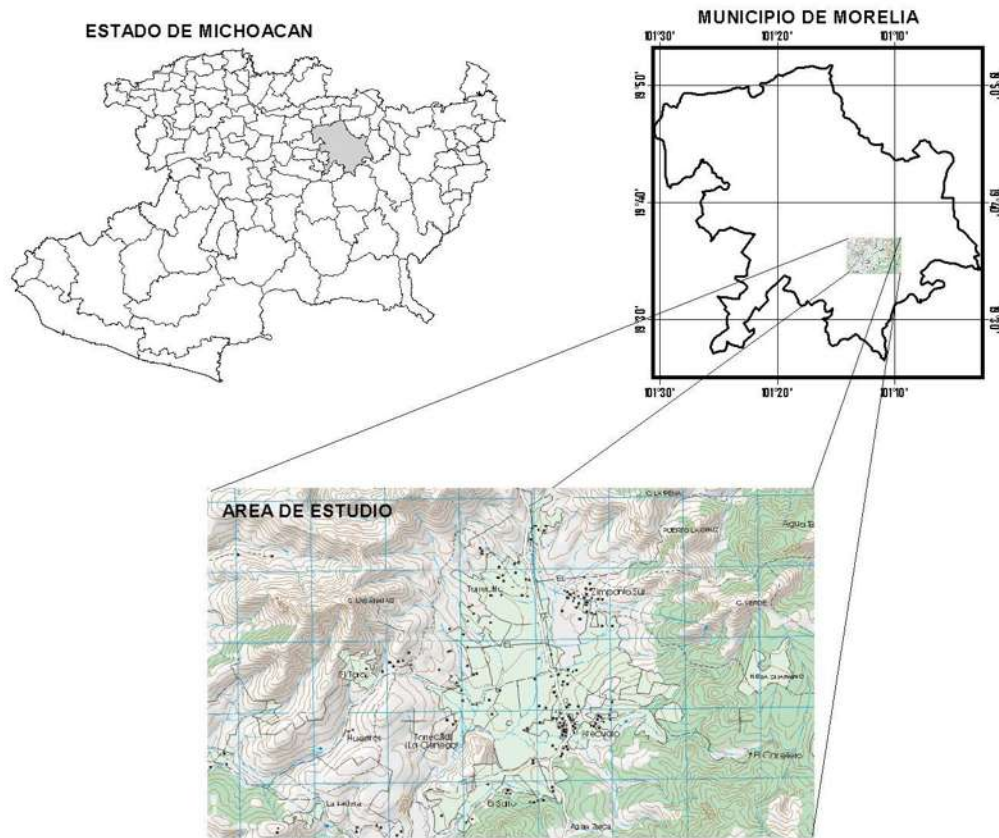


Figura 1. Ubicación del área de estudio.

Clima

De acuerdo con la información proporcionada por tres estaciones meteorológicas próximas a los terrenos del ejido Atécuaro y conforme al sistema de Koeppen modificado por García (1981), el clima predominante en la región es del tipo Cwbg, que corresponde a un clima templado subhúmedo con lluvias en verano, temperatura media del mes mas caliente menor de 22 °C y marcha de temperatura tipo gangas (el mes mas caliente se presenta antes del solsticio de verano).

Geología

La base geológica sobre la que se ubican los terrenos de la dotación están constituidos principalmente por rocas ígneas extrusivas ácidas (dacitas) formadas en el Terciario Superior y en menos proporción por Andesitas y brechas volcánicas andesíticas de la misma edad. En lo que se refiere a los terrenos de la ampliación,

estos se ubican sobre rocas basálticas del Cuaternario y en menor proporción sobre andesitas y brechas volcánicas intermedias del Terciario Superior.

Fisiografía

Tanto la dotación como la ampliación del ejido Atécuaro se encuentran sobre el eje Volcánico Transversal, específicamente en la subprovincia que el INEGI (1985) denomina Mil Cumbre. Las elevaciones máximas en el ejido alcanzan 2450 m s.n.m en la porción N de la dotación y 2360 m s.n.m. al NE del paraje “El Capulín” en los terrenos de la ampliación. Las elevaciones mínimas en la dotación llegan a los 22620 m s.n.m. y se encuentran al NE del asentamiento “Torrecillas”, en tanto que en la ampliación la elevación mínima corresponde a 2200 m s.n.m. al E del asentamiento “La Codorniz”.

La mayor parte de la superficie en la dotación presenta pendientes superior al 10% e incluso contiene áreas con pendientes mayores del 60% en tanto que los terrenos de la ampliación son en general menos abruptos, casi la mitad de su superficie tiene pendiente menores del 10% y las poblaciones mas inclinadas, con pendientes mayores al 25 % no cubren el 4% del área.

Suelos

Los terrenos de la dotación están constituidos principalmente por Acrisoles órticos (tierra charanda) combinados con otros tipos de suelo, todos ellos con texturas finas. Los acrisoles órticos se caracterizan por acumular en el subsuelo arcillas, por su coloración roja, amarilla o amarilla clara con manchas rojas. Su pH es ácido y por tanto su vocación es preferentemente forestal ya que usados en agricultura o ganadería presentan rendimientos bajos a medianos.

Por otra parte, en los terrenos de la ampliación son los andosoles húmicos (polvillas) de textura media los que predominan en combinación con los tipos de suelo. Los andosoles húmicos son suelos que generalmente se derivan de cenizas volcánicas y se caracterizan por poseer una capa superficial de color negro o muy oscuro, rico en materia orgánica, muy ácida, pobre en nutrientes y con una textura esponjosa o muy suelta.

Vegetación y uso del suelo

En los terrenos del ejido Atécuaro se presentan básicamente tres tipos de vegetación y cuatro diferentes categorías adicionales de uso del suelo derivados de la vegetación original:

1. Bosque de Pino (P)
2. Bosque de Pino-Encino (Pq y Qp)

3. Bosque de Encino
4. Áreas forestales de uso agrícola (F1)
5. Áreas forestales de uso pecuario (F2)
6. Áreas forestales con vegetación arbustiva (F3)
7. Áreas Forestales erosionadas (INEGI 1983)

Hidrología

La porción Norte del ejido pertenece a la microcuenca La Presa, mientras que la porción Sur (o ampliación) pertenece a la microcuenca Río Grande, ambas drenan hacia la laguna de Cuitzeo y se incluyen en la Región Hidrológica Lerma Santiago.

JUSTIFICACIÓN

Una gran extensión del territorio nacional presenta graves problemas de deforestación y como consecuencia de erosión. Cuando los suelos son frágiles, el P, N y los agregados del suelo se vuelven elementos limitantes importantes; si se logran desarrollar técnicas para restablecer los ciclos biogeoquímicos de P y N, así como para mejorar la estructura del suelo, mediante la fertilización y/o adición de hongos micorrízicos, en estas condiciones, sería posible reincorporar grandes extensiones improductivas al manejo sostenible de ecosistemas forestales.

HIPÓTESIS

La inoculación de *Fraxinus uhdei* con los hongos micorrízicos *Pisolithus tinctorius* y *Glomus intraradices*, solos o en interacción dual y en presencia de nitrógeno incrementará el desempeño del fresno en comparación a sus contrapartes no inoculados, tanto en experimentos de mesocosmos como en experimentos de campo.

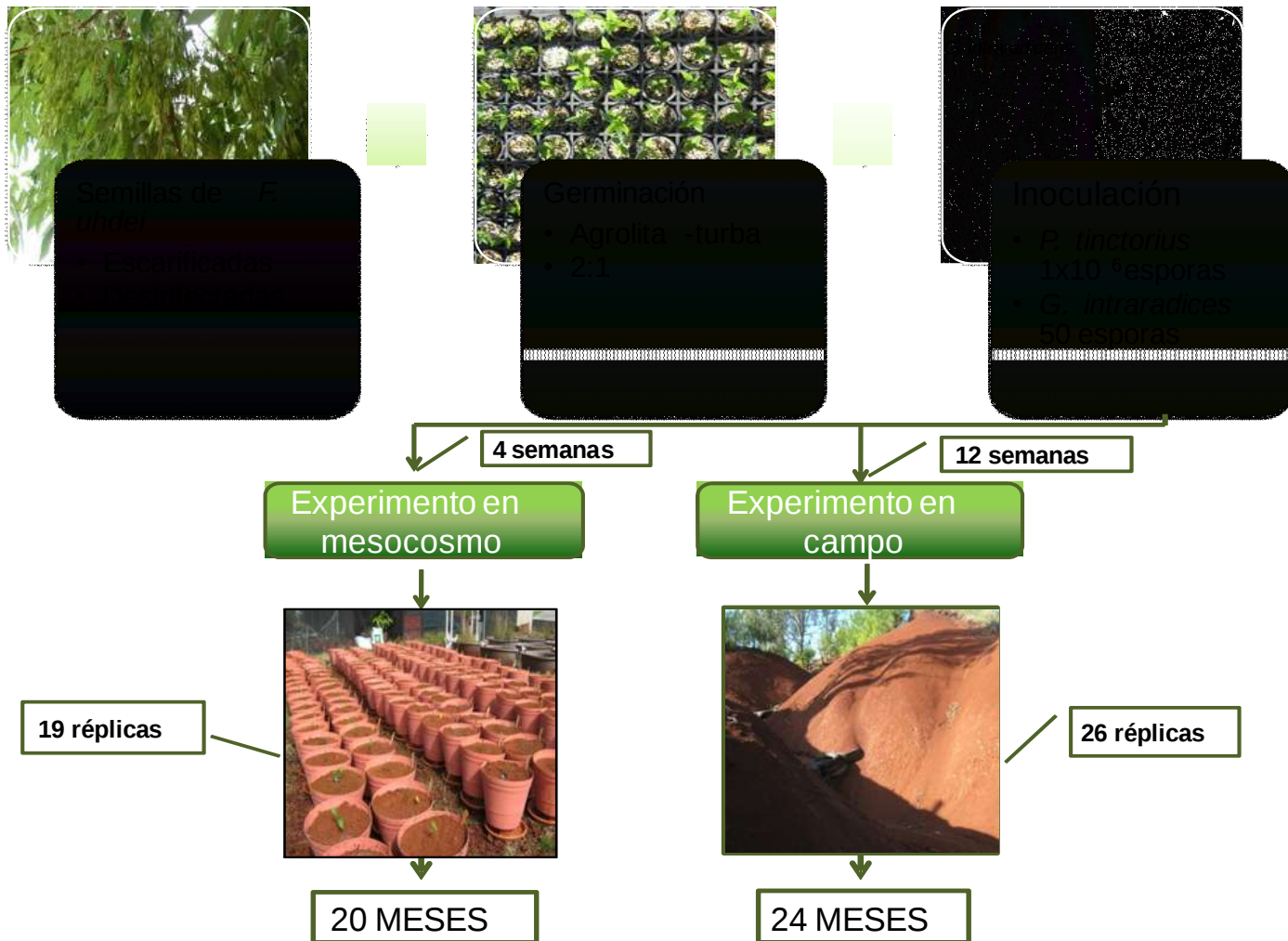
OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desempeño de *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh (fresno) inoculado con los hongos micorrízicos *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch (ectomicorriza HEM) y *Glomus intraradices* Schenk & Smith (endomicorriza HMA), solos o en interacción y en presencia/ausencia de fertilización nitrogenada bajo condiciones de campo y mesocosmos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar de experimento de campo y en condiciones de mesocosmos, la contribución de *Pisolithus tinctorius*, *Glomus intraradices* y urea, solos o en interacción, sobre el la sobrevivencia de *Fraxinus uhdei*.
2. Evaluar el efecto de *Pisolithus tinctorius*, *Glomus intraradices* y urea, solos o en interacción, sobre crecimiento y desarrollo de *Fraxinus uhdei*, mediante el desempeño *in situ* y en condiciones de mesocosmos.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



RESULTADOS

CAPITULO I

UTILIZACIÓN DE HONGOS MICORRÍZICOS PARA LA RESTAURACIÓN DE SUELOS SEVERAMENTE DEGRADADOS

Los suelos degradados son abundantes en todo el mundo y su aprovechamiento es muy difícil, antieconómico o impráctico.

La erosión del suelo es una forma severa de degradación física. Se estima que cerca del 80 % de la tierra agrícola en el mundo sufre erosión moderada a severa y 10 % ligera a moderada (Lal y Stewart, 1995).

La republica mexicana presenta de entre 60 y 80 % de su territorio con algún problema de erosión y específicamente en el estado de Michoacán aproximadamente 35 000 ha son deforestadas anualmente (COFOM, 2001)

La vegetación controla la erosión al incrementar la infiltración y al reducir la escorrentía impidiendo con ello la formación de cárcavas, o su posible crecimiento, además de que ofrece protección física al suelo frente al impacto de la lluvia o viento. En ese sentido, desde hace varias décadas, se ha tratado de hacer frente al creciente problema de la degradación del suelo. Morgar (1986) sugiere que la revegetación multiestrato con gramíneas, leguminosas, arbustos y aboles alrededor de las cárcavas es un buena estrategia para frenar los procesos erosivos, observando que la revegetación, logra reducir la escorrentía en cárcavas entre un 65 a 90 % y las pérdidas de suelo por erosión entre 75 a 90 %.

Sin embargo y pesar de que se ha tratado de profundizar en los distintos mecanismos para frenar el deterioro del suelo, es un hecho bien conocido que el funcionamiento, la estabilidad y la productividad de los ecosistemas terrestres dependen en gran medida de la riqueza de las especies de la cubierta vegetal, su diversidad y la estructura de las poblaciones de la misma (Pohl, 2009).

Por otra parte, el que algunas especies de plantas puedan o no desarrollar una cubierta vegetal adecuada, depende de las interacciones que se produzcan entre las distintas especies presentes y de la competencia temporal y espacial que se establezcan por los limitados recursos del suelo.

Las interacciones con los diferentes grupos de organismos que constituyen una comunidad, pueden favorecer el establecimiento de determinadas especies de

plantas y/o su posterior desarrollo mediante mecanismos de diversa índole (Smith *et al.* 2010; Pohl *et al.*, 2009).

De las interacciones entre plantas y otros organismos de un ecosistema, las que se establecen con microorganismos del suelo (grupo el cual carece de suficiente información) reviste de especial interés para esta revisión, son los denominados hongos formadores de micorrizas, los cuales juegan un papel clave en el establecimiento y desarrollo de la mayoría las plantas, constituyendo así una posibilidad para la utilización de dichas especies en la rehabilitación de suelos severamente degradados, donde las carencias de nutrientes minerales (especialmente el fósforo) son limitantes para el establecimiento vegetal.

Las asociaciones simbióticas entre raíces vegetales y hongos fueron denominadas en 1885 por el patólogo forestal alemán A. B. Fran como micorriza (Smith y Read 1997). El principal beneficio para ambos simbiosistas micorrízicos es el intercambio de nutrientes (Pérez-Moreno y Read, 2004). Los hongos que establecen esta simbiosis reciben carbono de las plantas hospedadas y las plantas en intercambio reciben fósforo, nitrógeno principalmente entre 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 (Brundrett, 2004).

Entre los múltiples beneficios que se le atribuyen a la micorrización, se destaca el efecto que ésta tiene sobre el desarrollo de la planta, ya que diversos estudios han demostrado que las micorrizas mejoran el crecimiento de la planta al aumentar la superficie de absorción del sistema radical por medio de sus hifas asociadas, debido a que el diámetro (3 a 30 μm) y longitud de sus hifas (0.03 a 6.95 m /g de suelo) les permite explorar un mayor volumen del sistema edáfico (Smith & Read, 1997); el absorber selectivamente y el acumular ciertos nutrientes, especialmente fósforo (Colpaert *et al.*, 1999); el solubilizar y hacer disponibles para la planta algunos minerales normalmente insolubles (Casarin *et al.* 2004; Liu *et al.*, 2004) el permitir que las raíces sean fisiológicamente activas por periodos mayores de tiempo en comparación con una raíz no micorrizada y además, el que sean más resistentes a la infección que ocasionan algunos hongos del suelo tales como *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.* y *Fusarium sp.*, entre otros (Azcón-Aguilar y Barea, 1996), siendo variados los mecanismos por lo que esto sucede, incluyendo principalmente la ocupación de un espacio en la raíz y cambios en la producción de exudados (Dehne, 1982, Likar y Ragvar, 2008).

Así pues, las plantas micorrizadas introducidas al campo en los programas de restauración poseen una mayor ventaja para resistir el ataque de patógenos, con lo

que se eleva su posibilidad de establecerse exitosamente, en comparación con una planta no micorrizada.

Además de ello, en la restauración de los sitios perturbados se debe considerar a los hongos micorrízicos, debido a que juegan un papel importante al contribuir a incrementar la formación y estabilidad de agregados en el suelo (Ambriz, *et. al.* 2010), por lo que podría llegar a constituir una solución viable en la recuperación de suelos severamente degradados (Pohl *et. al.* 2009).

En resumen, los procesos por los cuales los HMA participan en la agregación del suelo serían: 1) enlazamiento físico por desarrollo extensivo de las hifas externas en el suelo para crear un esqueleto estructural que participa en la adherencia de partículas del suelo (Tisdall, 1991, Rilling *et. al.* 2010; Borie *et. al.* 2008) enlazamiento químico, debido al mucigel (glomalina) que las hifas producen y excretan en las raíces colonizadas y en el suelo (Schindler *et. al.* 2007; Driver *et. al.* 2005; Spohn y Giani 2010); 3) creación de condiciones adecuadas para el desarrollo de raíces e hifas externas (Kodesova *et. al.* 2006; Milleret *et. al.* 2009); 4) envolvimiento de microagregados en macroagregados pequeños y la creación de la estructura del macroagregado (Tisdall, 1996); 5) protección contra los procesos de excesivo secado y humedecimiento de los agregados de los diferentes niveles jerárquicos, debido al carácter hidrofóbico de la glomalina (Rilling *et. al.* 2010; Spohn y Giani 2010; Lichner *et. al.* 2007; Czarnes *et. al.* 2000) y 6) creación de condiciones adecuadas para el desarrollo de otros microorganismos de la rizosfera que están involucrados en la formación y estabilidad de agregados (Young *et. al.* 1998; Tisdall, 1994; Bethlenfalvay *et. al.* 1999; Milleret *et. al.* 2009; Davidson *et. al.* 2006) .

Los hongos micorrízicos promueven además, la resistencia a deficiencias hídricas en la planta hospedera (Kodesová *et. al.*, 2004), lo cual es consecuencia de diferentes mecanismos, que van desde una respuesta física hasta una respuesta a nivel bioquímico (Azcón-Aguilar y Barea, 1997; Cordier *et. al.* 1998; Auge, 2001).

En este sentido se ha observado que los hongos micorrízicos influyen en el ambiente edáfico al prevenir la formación de claros entre las raíces y el suelo, lo que mantiene la continuidad del líquido, a través de la interface suelo-raíz (Czarnes *et. al.*, 2000). Además de que las hifas extraradicales incrementan la zona de captación de agua (Faber *et. al.* 1991; Davies *et. al.* 1992; Querejeta *et. al.* 2003), así mismo se ha observado que incluso pueden tomar agua del suelo cuando ésta se encuentra con un valor de potencial hídrico no accesible para ser extraído por las raíces de las plantas (Bethlenfalvay, 1992). Por lo tanto, la asociación micorrízica altera las relaciones hídricas, lo cual es de gran valor ecológico ya que favorece el establecimiento, vigor, productividad y supervivencia de las plantas (Auge, 2001),

incrementando con ello las probabilidades de establecer de nuevo la comunidad vegetal en un sitio perturbado con condiciones limitadas de agua.

Por otro lado, fundamentalmente, para que se forme la micorriza, en un medio natural, deberán existir principalmente dos condiciones, la presencia de una planta susceptible de ser micorrizada y la de algún tipo de propágulo en el medio (Smit and Read, 1997). En teoría cualquier medio natural puede reunirlos, sin embargo cuando se trata de suelos sumamente degradados, donde los nutrientes minerales sean deficientes y las condiciones hídricas no sean adecuadas para el desarrollo óptimo de la cubierta vegetal, se condiciona el establecimiento y desarrollo de los hongos micorrízicos (Smith *et. al.*, 2010).

Asimismo, las propiedades de infectividad de los hongos micorrízicos presentes así como de la efectividad de la simbiosis resultante dependerá de diversos factores, como por ejemplo, el grado de dependencia de las plantas a los hongos micorrízicos (Plenchette, 1983), observándose que, en ese sentido, las especies con más dificultad para captar fosfatos de la solución del suelo o con mayor demanda de ellos, son las que tienen mayores grados de dependencia micorrízica (Flores y Cuenca, 2004). Es decir, existe evidencia de que la micorriza puede tener un mayor efecto cuando el fósforo está presente en sus formas menos solubles (Brundrett, 1991). La adaptación de hongos micorrízicos a condiciones particulares del suelo, aparentemente es más común que interacciones específicas con plantas hospedantes. Así, en sistemas experimentales, son raras las combinaciones hospedante-hongo incompatibles, pero en ecosistemas naturales, muchas de estas combinaciones pueden ser menos exitosas porque los hongos son pobremente adaptados al hábitat normal de las plantas (Brundrett, 1991).

Además de ello, se debe de considerar, que la especificidad de los hongos, las condiciones físicas, químicas y biológicas del medio son factores determinantes (Azcón *et. al.* 1984), ya que se ha observado que dependiendo del tipo de hongo micorrízico del cual se trate, tomando en consideración que actualmente se reconocen 7 tipos de hongos micorrízicos (Smith and Read, 1997), se poseen características específicas individuales que les confiere diferentes aptitudes, como por ejemplo, tener mayor tolerancia a temperaturas extremas del suelo, humedad, baja fertilidad y salinidad, presencia de tóxicos y metales pesados, etc., los cuales pueden proveer a la planta hospedante ventajas de competencia ecológica e incrementar la supervivencia, crecimiento, nutrición o rendimiento en estas condiciones ((Daft, 1991).

Así pues, en base a lo anterior revisado se sugiere que es posible lograr la restauración de suelos severamente degradados o afectados por erosión severa mediante un estrategia integral basada en la participación de la simbiosis micorrízica.

LITERATURA CITADA

- 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
- Auge, R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*. 11: 3-42.
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6 :457–464.
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae*. 68: 1-24.
- Bethlenfalvay, G. J. 1992. Mycorrhizae in the agricultural plant-soil system. *Symbiosis*. 14: 413-425.
- Bethlenfalvay, G. J., Cantrell, I. C. Mihara, K. L., Schreiner, R. P. 1999. Relationships between soil aggregation and mycorrhizae as influenced by soil biota and nitrogen nutrition. *Biol Fertil Soils*. 28 :356–363.
- Borie, F., Rubio, R., Morales, A. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi and soil aggregation. *J. Soil Sc. Plant Nutr*. 8 (2):9-18.
- Brundrett, M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev*. 79:473–495.
- Bürkert, B. y Robson, A. 1994. HTZn uptake in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in root-free sandy soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 1117-1124.
- Casarin, V., Plassard, C., Hinsinger, P. y Arvieu, J. 2004. Quantification of ectomycorrhizal fungal effects on the bioavailability and mobilization of soil P in the rhizosphere of *Pinus pinaster*. *New Phytologist*. 163: 177-185.
- 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.
- Cordier, C., Pozo, M., Barea, J., Gianinazzi-Pearson, V. 1998. Relationships between soil aggregation and mycorrhizae as influenced by soil biota and nitrogen nutrition. *Biology and Fertility of soil*. 28:356-363.
- 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.

- Czarnes, S., Dexter, A. R., Bartoli, F. Wetting and drying cycles in the maize rhizosphere under controlled conditions. *Mechanics of the root-adhering soil. Plant and Soil*. 221: 253–271.
- Daft, M. J. 1991. Influences of genotypes, rock phosphate and plant densities on mycorrhizal development and the growth responses of five different crops. *Agricultural Ecosystems Environmental*. 35: 152-169.
- Davidson, D. A. y Grieve. I. C. 2006. Relationships between biodiversity and soil structure and function: Evidence from laboratory and field experiments. *Applied Soil Ecology*. 33: 176–185.
- Davies, J., Potter, J., Linderman, R. G. 1992. Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. *Journal of Plant Physiology*. 139: 289-294.
- Driver, J. D., Holben, W. E., Rilling, M. C. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 37:101–106.
- Flores, C. y Cuenca, G. 2004. Crecimiento y dependencia micorrízica de la especie pionera y polenectarífera *Oyedaea verbesinoides* (Tara Amarilla), Asteraceae. *INCI*. vol.29, no.11, p.632-637.
- Gregorich, E. G.; Beare, M. H.; Stoklas, U.; St-Georges, P. 2003. Biodegradability of soluble organic matter in maize-cropped soils. *Geoderma*. 113:237-252.
- Kodesová, R., Kodes, V., Zigová, A. y Simunek, J. 2006. Impact of plant roots and soil organisms on soil micromorphology and hydraulic properties. *Biologíá, Bratislava*. 61:339-343
- CRC Press. Inc. 555p in Rivera, P. J., Sinisterra, R. J., Calle, D. CRC Press. Inc. 555p in Rivera, P. J., Sinisterra, R. J., Calle, D. Z. Restauración ecológica de suelos degradados por erosión en cárcavas en el enclave xerófito de Dagua, Valle de Cauca, Colombia.
- Lichner, L., Hallett, P. D., Feeney, D. S., Dugová, O., Sir, M., Tesar, M. 2007. Field measurement of soil water repellency and its impact on water flow under different vegetation. *Biologia, Bratislava*, 62/5: 537—541.
- Likar, M. y Regvar, M. 2008. Early defense reactions in Norway spruce seedlings inoculated with the mycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Persoon) Coker & Couch and the pathogen *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *Trees*. 22:861–868

- Liu, Q., Loganathan, P., Hedley, M. J. y Skinner, M. F. 2004. The mobilisation and fate of soil and rock phosphate in the rhizosphere of ectomycorrhizal *Pinus radiata* seedlings in an Allophanic soil. *Plant and Soil* 264: 219–229.
- Milleret, R., Renée-Claire, L. B., Jean-Michel, G. Root, mycorrhiza and earthworm interactions: their effects on soil structuring processes, plant and soil nutrient concentration and plant biomass. *Plant Soil*. 316:1–12.
- Morgan, R. P. 1986. Soil erosion and conservation. New York United state. Edited by John Wiley & Sons INC. 605. Third Avenue. 298 p.
- Pérez-Moreno, J. y Read, D., 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. 29:239-247.
- 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.
- Pohl, M., Alig, D., Körner, C. y Rixen, C. 2009. Higher plant diversity enhances soil stability in disturbed alpine ecosystems. *Plant Soil*. 324:91–102.
- Querejeta, J., Egerton-Warburton, L., Allen, M. F. 2003. Direct nocturnal water transfer from oaks to their mycorrhizal symbionts during severe soil drying. *Oecologia*. 134: 55-64.
- Rilling, M. C., Mardatin, N. F., Leifheit, E. F., Antunes, P. M. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi increases soil water repellency and is sufficient to maintain water-stable soil aggregates. *Soil Biology & Biochemistry* 42:1189-1191.
- Schindler, F., Mercer, E. J., Rice, J. A. Chemical characteristics of glomalin-related soil protein (GRSP) extracted from soils of varying organic matter content. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 320–329.
- Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S. y Smith, F. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil*. 326:3–20
- Smith, S.E., Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edition, Academic Press, London, UK.
- Spohn, M. y Giani, L. Water-stable aggregates, glomalin-related soil protein, and carbohydrates in a chronosequence of sandy hydromorphic soils. *Soil Biology & Biochemistry* 42:1505-1511.
- Tisdall, J. M. 1991. Fungal Hyphae and Structural Stability of Soil. *Aust. J. Soil Res.* 29: 729-43.
- Tisdall, J.M. 1994. Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. *Plant and Soil*. 159:115-121.

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.

CAPITULO II

Aceptado para su publicación en Botanical Sciences

INOCULACIÓN CON HONGOS MICORRÍZICOS Y FERTILIZACIÓN CON UREA DE PLANTAS DE *FRAXINUS UHDEI* EN ACRISOLES PROVENIENTES DE SITIOS DEGRADADOS

Ana Laura Báez-Pérez¹, Mariela Gómez-Romero², Javier Villegas¹, Erick de la Barrera³, Lorena Carreto Montoya¹ y Roberto Lindig-Cisneros^{3,4}

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.

²Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia. Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, México.

³Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México. Campus Morelia, Michoacán, México.

⁴Autor para correspondencia: rlindig@cieco.unam.mx. Domicilio actual: University of California Institute for Mexico and the United States (UC MEXUS), Riverside, California, United States of America.

Resumen

En suelos severamente degradados el establecimiento de plantas se dificulta por la ausencia de estructura, de microorganismos del suelo y en muchos casos por las bajas concentraciones de macronutrientes. En estas condiciones, el uso de interacciones con hongos micorrízicos, podría ser una estrategia efectiva para la revegetación y la restauración ecológica. Se realizó un experimento con sustrato obtenido de un sitio severamente erosionado (acrisoles con presencia de cárcavas) en un sistema de mesocosmos, con el objetivo de evaluar el desempeño de *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh (fresno) inoculado con los hongos micorrízicos *Pisolithus tinctorius* y *Rhizophagus intraradices*, solos o en interacción y en presencia/ausencia de fertilización nitrogenada. Se evaluó la altura, la cobertura de la copas, el diámetro a la altura de la base del tallo y el número de hojas al finalizar el experimento y se cosechó la biomasa. Se prepararon muestras para verificar la micorrización. Los resultados indicaron que la fertilización no tuvo efecto significativo sobre el desarrollo de las plantas pero, afectó negativamente la supervivencia (con urea 67%, sin urea 90%). Los mayores valores para las variables de crecimiento y la biomasa aérea siempre correspondieron a las plantas con inoculación dual, y los menores para las plantas control o las inoculadas con *P. tinctorius* (altura 23.3 cm contra 15.8 cm para

P. tinctorius, diámetro a la altura de la base 0.74 cm contra 0.5 para *P. tinctorius*, el peso seco de las partes aéreas 2.0 g contra 1.0 g del control). Los resultados sugieren que en suelos que presentan condiciones severas de degradación la co-inoculación de plantas adaptadas a condiciones adversas puede ser una estrategia eficiente de revegetación

Palabras clave: co-inoculación, *Glomus intraradices*, *Pisolithus tinctorius*, simbiosis, restauración ecológica.

Abstract

In severely degraded soils, plant establishment is difficult because of lack of structure, a depleted community of microorganisms and in many sites low concentrations of macronutrients. Under these conditions, the use of interactions with mycorrhizic fungi could be an effective strategy for revegetation and ecological restoration. An experiment was established in mesocosms with soil gathered from a severely degraded site (acrisols with gully formations). The objective of the study was the evaluation of the performance of *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh (ash) inoculated with the mycorrhizic fungi *Pisolithus tinctorius* and *Rhizophagus intraradices*, each species by itself or in combination and also with presence or absence of nitrogen fertilization. Height, canopy cover, diameter at the base of the stem and number of leaves were evaluated at the end of the experiment, afterwards biomass was harvested. Samples were prepared to verify mycorrhization. Results showed that fertilization had no significant effect on plant development but had a negative effect on survival (with urea 67%, without urea 90%). The highest values for growth variables and biomass were those of plants with dual inoculation, and the lowest for control plants or plants inoculated with *P. tinctorius* (height 23.3 cm against 15.8 cm, DAB 0.74 cm against 0.5, dry aboveground weight 2.0 g against 1.0 g). These results suggest that in severely degraded soils dual inoculation of plant species tolerant to degraded sites can be an efficient revegetation strategy.

Key words: co-inoculation, ecological restoration, *Glomus intraradices*, *Pisolithus tinctorius*, symbiosis.

Uno de los problemas ambientales más graves y mundialmente reconocidos es la erosión del suelo, resultado principalmente de la deforestación. En México, la tasa de deforestación alcanzó hace 20 años cerca de 800 000 ha/año (Masera *et al.*, 1992), y se estima que se perdió más suelo en la segunda mitad del siglo XX que en los cuatro siglos anteriores (Maass y García-Oliva, 1990). La erosión recurrente de la capa superficial del suelo, y la erosión en cárcavas como consecuencia de la deforestación y técnicas de cultivo inadecuadas, han sido documentadas para el 65 o

el 85 % de la superficie de México (Bocco y García-Oliva, 1992; Maass y García-Oliva, 1990), lo anterior implica que cerca de 535 millones de toneladas de suelo se pierden anualmente (SEMARNAT, 1997).

La lluvia, el viento, el tipo de suelo, la pendiente, la cobertura vegetal y la presencia o ausencia de medidas de conservación son los factores principales que determinan la erosión del suelo (Pimentel, 2006). Debido a que en los suelos altamente erosionados no existe una cubierta vegetal que brinde protección, la lluvia cae directamente, provocando con ello que el flujo de agua de lluvia empiece a arrastrar el suelo provocando la erosión por cárcavas, un grado avanzado de erosión (Tyler, 1994). En suelos con alto grado de erosión, se altera o pierde considerablemente la diversidad de microbiota (Nie *et al.*, 2013), se reduce la capacidad de retención de la humedad, se modifica la estructura, el nivel de compactación, se puede dar el afloramiento de subhorizontes con menor fertilidad, lo que en su conjunto se traduce eventualmente en la pérdida total del suelo y en la presencia de un sustrato sin las propiedades físicas y químicas mínimas para el desarrollo y supervivencia de las plantas (Durán y Rodríguez, 2008).

En suelos altamente erosionados, para evitar mayores daños en el sitio y en las cuencas en los que se encuentran, es recomendable establecer programas de restauración que entre otras medidas deben contemplar el establecimiento de una cobertura vegetal para mejorar la estructura de suelo y por lo tanto facilitar su regeneración y protección. En ese sentido el estudio de plantas con potencial para formar asociaciones simbióticas tanto con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) como con hongos ectomicorrízicos (HE), puede contribuir a mejorar las estrategias de restauración ecológica (Gómez-Romero *et al.*, 2012), en particular lo relacionado con la diversidad microbiana del suelo y las funciones que esta diversidad sostiene.

Una función bien documentada de los hongos micorrízicos es la de facilitar a la planta la adquisición y la absorción de fósforo. Sin embargo, estos hongos procuran otros beneficios a las plantas, tanto a escala poblacional como de comunidades: mejoran la adquisición y la absorción del nitrógeno y del cobre, limitan la absorción de metales pesados tóxicos como el zinc y el cadmio. Además, mejoran el flujo de agua, aumentando la resistencia de las plantas a la sequía, particularmente en las primeras etapas de vida. También incrementan la resistencia contra agentes patógenos y, por consiguiente, aumentan la adecuación de las plantas, su supervivencia y su fecundidad (Smith y Read, 1997; Pérez-Moreno y Read, 2004).

Las especies vegetales que forman asociaciones micorrízicas presentan una fisiología y una ecología diferentes de aquellas que no forman esta asociación, y se considera a la asociación micorrízica como uno de los factores promotores de la

diversidad vegetal, al facilitar el establecimiento de las plantas (Pohl *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010).

Unas de las especies vegetales capaces de establecerse en sitios degradados son los fresnos (*Fraxinus*), en particular *F. uhdei*, pues son resistentes a suelos pobres en nutrientes y materia orgánica (Francis, 1990; Stabler *et al.*, 2001). *Fraxinus uhdei* es una especie endémica a México capaz de formar asociaciones simbióticas en condiciones de laboratorio (Ambríz *et al.*, 2010) tanto con hongos ectomicorrízicos (HEM) como con hongos endomicorrízicos (HMA). Aunado a ello, Rothstein *et al.* (2004), documentaron que hay grandes cantidades de N y P en la hojarasca de un bosque dominado por fresnos, y por ende plantean que esta especie favorece la recuperación de la dinámica biogeoquímica del suelo.

Por otro lado, 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). Sin embargo, existen pocos trabajos que muestran la contribución del sistema fresno-hongos micorrízicos en el desempeño de la planta en sustratos limitantes.

Las variables que afectan esta asociación bajo condiciones más realistas pero aun controladas no han sido estudiadas. Lo anterior se puede lograr con el uso de mesocosmos y que han probado ser una aproximación experimental útil para la restauración ecológica (Callaway *et al.*, 1997; Szanser *et al.*, 2011). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el desempeño de *Fraxinus uhdei* inoculado con los hongos micorrízicos *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch y *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler (antes *Glomus intraradices*; Schüßler y Walker 2010; Krüger *et al.*, 2012), solos o en interacción en un experimento de mesocosmos, a fin de evaluar el comportamiento del sistema en un suelo con las características antes mencionadas, partiendo de la hipótesis de que la adición de N incrementará el desempeño y supervivencia del sistema *F. uhdei*-*R. intraradices*-*P. tinctorius*.

Materiales y métodos

Se propagaron plantas de *Fraxinus uhdei* en agosto de 2011 en condiciones de casa de sombra (20%), para lo cual se escarificaron semillas de forma manual y se desinfectaron con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10% (v:v) por 15 min. Posteriormente fueron sembradas en contenedores rígidos de plástico (240 cm³), utilizando como sustrato agrolita-turba (2:1 v/v) esterilizada en autoclave por 30 minutos a 121 °C y 15 PSI. A las 9 semanas de crecimiento, las plantas fueron separadas en cuatro grupos, las del primer grupo no fueron inoculadas y las pertenecientes a los tres restantes fueron inoculadas: a) el hongo ectomicorrízico *P.*

tinctorius (1×10^6 esporas/planta) utilizando como vehículo turba micronizada, b) el hongo micorrízico arbuscular *R. intraradices* (50 esporas/planta), aplicado como una suspensión en agua destilada y c) con una mezcla de ambas especies de hongos (inoculación dual), cada especie aplicada como ya se mencionó. El inóculo de *P. tinctorius* fue obtenido de Biosyneterra Solutions Inc. (L'Assomption, Québec, Canada), y *R. intraradices* a partir de cultivos aislados en el Laboratorio de Interacción Suelo-Planta-Microorganismo del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Cuando las plantas de fresno cumplieron 17 semanas de inoculación, fueron trasplantadas a contenedores de plástico de 20 l que contenían como sustrato suelo extraído de la localidad Huertitas, en el Ejido de Atécuaro ($19^{\circ} 33' 05''$ y $19^{\circ} 37' 08''$ N y $101^{\circ} 05' 07''$ O y altitud de 2275 m) localizado a 15 Km al sur de la ciudad de Morelia, Michoacán. El suelo no fue esterilizado porque el experimento buscaba lograr condiciones similares a las que las plantas encontrarían en campo pero controlando el mayor número de variables posibles. No esterilizar el sustrato potencialmente permitiría a las plantas asociarse con bacterias presentes en el mismo aunque podría también implicar que las plantas adquirieran otras especies de hongos micorrízicos. Esta localidad se caracteriza por tener un alto grado de erosión y numerosas cárcavas, formadas en suelos de tipo acrisol ócrico (Duvert *et al.*, 2010). En las condiciones actuales de degradación, el suelo de la localidad contiene muy poca materia orgánica (0.78%), es muy bajo en nitrógeno total aprovechable (19.60 kg/Ha) y extremadamente pobre en fósforo asimilable (0.347 mg/kg). El experimento fue establecido en el Centro de Investigaciones en Ecosistemas de la UNAM Campus Morelia, al aire libre. Las macetas fueron distribuidas en un diseño completamente al azar con ocho tratamientos (4 de inoculación y dos de fertilización en un diseño ortogonal) y 18 réplicas conteniendo una planta de fresno por maceta. El experimento fue evaluado durante 20 meses.

Para los tratamientos con fertilización, urea (NH_2CONH_2) fue disuelta en agua a una concentración 200 mM, de tal forma que cada planta recibió 0.096 g de urea, cada tercer día durante la temporada de lluvias. El riego se mantuvo constante cada tercer día para todos los tratamientos durante todo el experimento, con excepción de la época de lluvias en la que se suspendió el riego.

Para evaluar el desempeño de los fresnos, se registró al finalizar el experimento la supervivencia, la altura, el diámetro a la altura de la base (DAB en el cuello de la planta a un cm del suelo), la cobertura (evaluado mediante la fórmula de la elipse $r_1 r_2 \pi$ con dos radios de la copa para inferir el dosel), el número de hojas. Se cosechó la biomasa aérea y de raíces de 10 plantas por tratamiento elegidas al azar. A partir de este material se obtuvo el peso fresco y seco, y para las raíces se midió la longitud, se obtuvo el volumen, por el método de desplazamiento de agua.

El hongo micorrizico arbuscular se identificó por medio de la técnica de tinción tinta y vinagre descrita por Vierheilig et al. (1998), clareando las raíces con KOH al 10% (peso / vol) por 30 min, para posteriormente teñir con tinta shaeffer Negra disuelta al 10% con ácido acético al 25%, y posteriormente lavando el exceso de colorante con agua corriente. Una vez tenidas las raíces se buscaron estructuras características propias de la especie (arbusculos, vesículas y/o micelio) fotografiando 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). *P. tinctorius* se detectó en base a la técnica de Thomson et al. (1993), tiñendo el manto y el micelio externo, del hongo asociado a los segmentos finos de raíces de fresno, con azul de tripano al 0.05 % por 24 horas y retirándose posteriormente el exceso de colorante con agua destilada, antes de ser observados al microscopio.

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo a través de análisis de varianza de dos vías, inoculación y fertilización), y se verificó que se cumpliera con los supuestos de este método estadístico. Debido a la mortalidad, y debido a la sensibilidad del análisis de varianza de más de una vía a datos desbalanceados, se eliminaron réplicas al azar de tal forma que se contara con el mismo número de réplicas por tratamientos (Underwood 1997). En el caso de que para alguna de las variables uno de los factores no fuera significativo, el factor fue eliminado del análisis, lo que permitió en estos casos utilizar la base de datos completa (Crawley 2007).

Resultados

Las preparaciones de tejido de raíz mostraron que la inoculación con *Rhizophagus intraradices* y *Pisolithus tinctorius* fue efectiva (Figura 1), tanto para las plantas inoculadas con cada una de estas especies como para aquellas que fueron inoculadas por ambas. Al finalizar el experimento, a los 20 meses de establecido, la mortalidad entre los individuos asignados a los diferentes tratamientos difirió. Entre tratamientos de inoculación las diferencias no fueron significativas ($\chi^2 = 2.72$, g.l. = 3, $P = 0.43$), pero entre tratamientos de fertilización si ($\chi^2 = 12.64$, g.l. = 1, $P = 0.0004$), debido a que la supervivencia sin aplicación de urea fue del 90% y con aplicación de 67%.

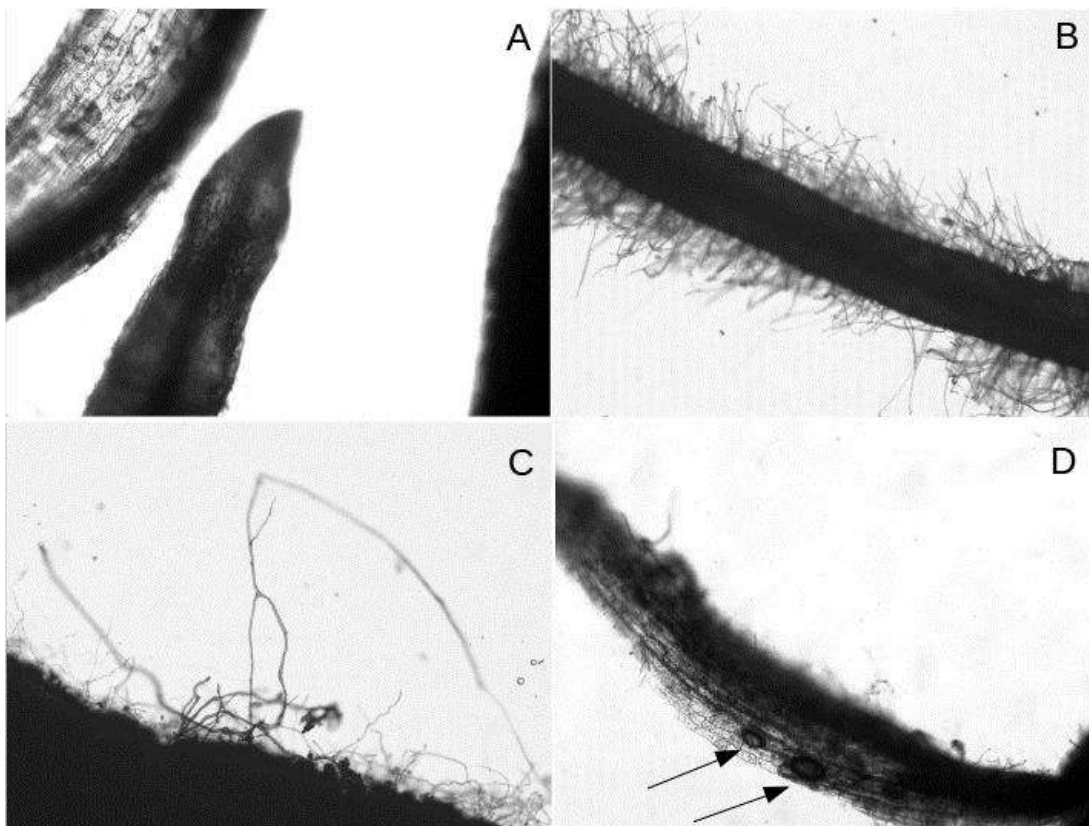


Figura 1. En (A) raíces de *Fraxinus uhdei* pertenecientes al tratamiento control; en (B), raíces de la misma especie con micelio externo de *Pisolithus tinctorius*; en (C), raíces con micelio externo de *Rhizophagus intraradices* ; y en (D), vesículas de *Rhizophagus intraradices* (indicadas por las flechas).

Las variables de crecimiento mostraron, al igual que todas las variables de respuesta consideradas, sólo diferencias entre tratamientos de inoculación. La altura (figura 2a), fue mayor para las plantas con inoculación dual (GP), que alcanzaron una altura de 23.3 ± 6.9 cm, y la menor fue para las plantas inoculadas con *P. tinctorius* (P), que alcanzaron una altura de 15.8 ± 4.4 cm, las diferencias entre tratamientos fueron significativas ($F_{(3, 109)} = 7.15$, $P = 0.0002$). El diámetro a la altura de la base (DAB) mostró un patrón similar, el mayor diámetro lo presentaron las plantas con inoculación dual, 0.74 ± 0.27 cm y el menor las plantas inoculadas con *P. tinctorius*, 0.50 ± 0.12 cm, las diferencias entre tratamientos fueron significativas ($F_{(3, 109)} = 5.43$, $P = 0.002$). La cobertura mostró un patrón similar al de las dos variables anteriores pero en este caso las diferencias se dieron entre las plantas con inoculación dual, las que fueron inoculadas con *P. tinctorius* y las que pertenecían al grupo control (Figura 2c), con coberturas de 88.9 ± 74.7 cm², 21.2 ± 33.1 y 45.6 ± 57.9 cm²,

respectivamente ($F_{(3, 109)} = 5.3$, $P = 0.002$). Finalmente, para este tipo de variables, el número de hojas siguió el mismo patrón que la cobertura, con el mayor número de hojas para la inoculación dual y la menor para las plantas inoculadas con *P. tinctorius* y las plantas control, 9.6 ± 5.9 , 6.3 ± 3.6 y 6.5 ± 3.5 respectivamente ($F_{(3, 109)} = 3.42$, $P = 0.02$).

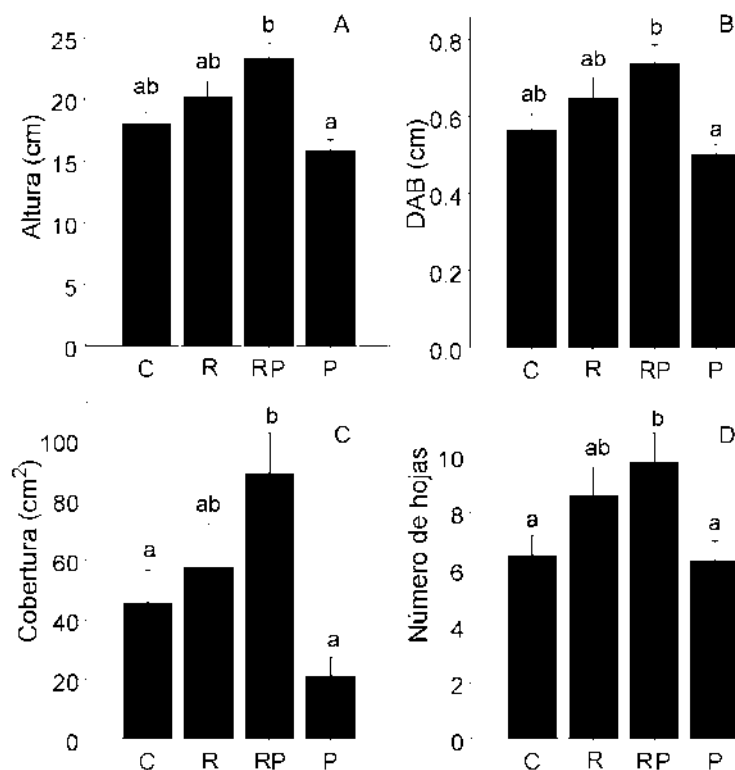


Figura 2. a) Altura, b) diámetro a la altura de la base, c) cobertura y d) número de hojas de *F. uhdei* en los distintos tratamientos de inoculación (C = control, G = *Rhizophagus intraradices*, P = *Pisolithus tinctorius*, GP = inoculación dual). Los datos son medias y desviaciones estándar, las medias no identificadas con la misma letra son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

La biomasa de las partes aéreas fue mayor para las plantas con inoculación dual (Figura 3), la biomasa fresca alcanzó 4.77 ± 3.4 g para estas plantas en contraste con 2.3 ± 2.2 g para las plantas control ($F_{(3, 74)} = 4.85$, $P = 0.004$), la biomasa seca siguió el mismo patrón entre tratamientos, las plantas con inoculación dual alcanzaron un peso promedio de 2.0 ± 1.42 g contra 1.0 ± 0.99 de las plantas control ($F_{(3, 74)} = 4.42$, $P = 0.006$).

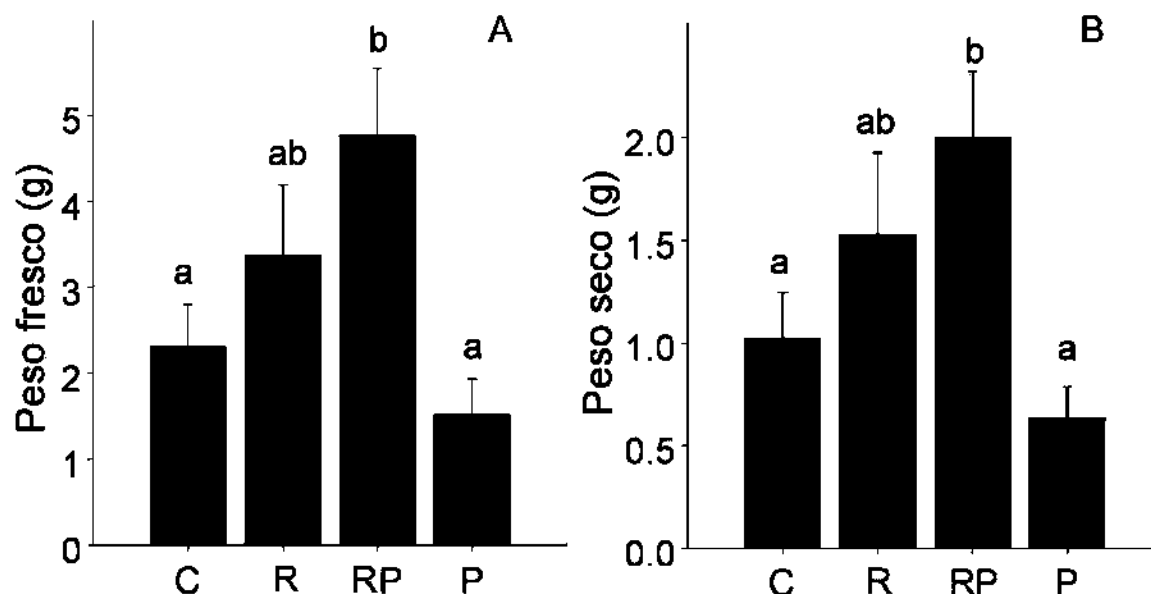


Figura 3. Peso fresco y peso seco de las partes aéreas de los individuos de *F. udhei* cosechados de los diferentes tratamientos de inoculación (C = control, G = *Rhizophagus intraradices*, P = *Pisolithus tinctorius*, GP = inoculación dual). Los datos son medias y desviaciones estándar, las medias no identificadas con la misma letra son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

El peso fresco y seco de las raíces (Figura 4a y 4b) muestran nuevamente un patrón en donde los valores mayores son para las plantas con inoculación dual (peso fresco = 13.9 ± 9.6 , peso seco = 3.3 ± 2.6) y los menores para las plantas inoculadas con *P. tinctorius* (peso fresco = 4.4 ± 3.6 , peso seco = 1.0 ± 0.8), que no difirieron estadísticamente de los valores para las plantas control (peso fresco = 5.1 ± 4.1 , peso seco = 1.1 ± 0.9); las diferencias tanto para el peso fresco ($F_{(3, 74)} = 7.19$, $P = 0.0003$), como para el peso seco ($F_{(3, 74)} = 6.29$, $P = 0.0007$), fueron significativas. El volumen de las raíces (Figura 4c) mostró el mismo patrón pues las plantas con inoculación dual tuvieron un volumen de $13.6 \pm 8.8 \text{ cm}^3$, y las plantas inoculadas con *P. tinctorius* y las control de $4.5 \pm 3.7 \text{ cm}^3$ y $5.3 \pm 3.2 \text{ cm}^3$ respectivamente ($F_{(3, 74)} = 7.68$, $P = 0.0002$). La longitud específica (Figura 4d) fue menor para las plantas con inoculación dual ($35.1 \pm 26.7 \text{ cm g}^{-1}$) que en las plantas control ($104.7 \pm 89.4 \text{ cm g}^{-1}$), que representaron los extremos para esta variable que fue la última en mostrar diferencias significativas entre tratamientos ($F_{(3, 74)} = 4.66$, $P = 0.005$).

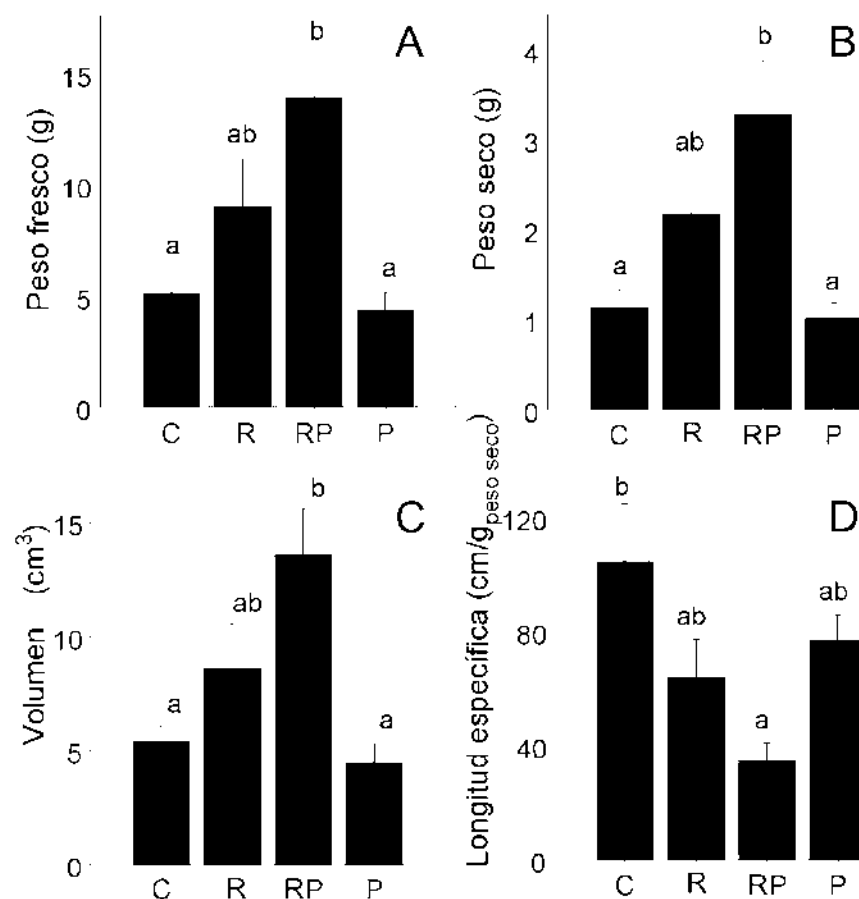


Figura 4. a) Peso fresco, b) peso seco, c) volumen y d) longitud específica de las raíces de *F. uhdei* cosechadas de los distintos tratamientos de inoculación (C = control, G = *Rhizophagus intraradices*, P = *Pisolithus tinctorius*, GP = inoculación dual). Los datos son medias y desviaciones estándar, las medias no identificadas con la misma letra son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

En suelos degradados que son deficientes en nutrientes, carentes de estructura y depauperados en diversidad de microorganismos, puede ser útil el uso de plantas resistentes a situaciones adversas y de aprovechar asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos (Smith *et al.*, 2010; Gómez-Romero *et al.*, 2012). En este sentido, en el presente trabajo se estableció un ensayo en suelo de tipo acrisol ócrico, con deficiencias nutricionales que dificultan el desarrollo de las plantas. En el suelo utilizado, el fósforo se encuentra unido a minerales de hierro, lo que lo hace insoluble y poco disponible para las plantas (ISRIC, 2013). Sin embargo, a pesar de estas características del sustrato se observó que *Fraxinus uhdei* es capaz de establecerse satisfactoriamente, particularmente si se encuentra formando asociaciones micorrízicas como lo indican los resultados del presente estudio. El ensayo mostró que el fresno es resistente a condiciones adversas del sustrato y sugiere que puede sobrevivir en suelos pobres en nutrientes, aún más pobres que los reportados en otros estudios (Francis, 1990; Stabler *et al.*, 2001).

Es interesante notar que el efecto de la adición de urea fue adverso para la supervivencia de las plantas de fresno en las condiciones experimentales del presente trabajo, y que no tuvo ningún efecto para el resto de las variables evaluadas. Existen pocos trabajos que documenten los efectos de la fertilización nitrogenada en especies arbóreas, y con los que se cuenta, son principalmente de especies del género *Pinus*. Por ejemplo, para *P. pinea* L., la fertilización no afecta la supervivencia pero si su crecimiento (Canellas *et al.*, 1999), resultados que son contrarios a lo obtenido en el presente ensayo, donde la supervivencia si se vio afectada pero no así el crecimiento de las plantas, aunque en este sentido los resultados son similares a los obtenidos por Davel *et al.* (2001), donde se observó que la fertilización nitrogenada no tuvo efecto alguno sobre el desarrollo de *P. ponderosa*. La micorrización puede verse afectada por la adición de nitrógeno, variando la proporción de las micorrizas presentes, tanto en tipos como en abundancia relativa (Alexander y Fairley, 1983), de hecho, la adición de nitrógeno inhibe la colonización de los hongos micorrízicos en algunas especies de plantas cultivadas, siendo su efecto depresivo mayor que el del fósforo (Ocampo y Hayman, 1981; Hayman, 1983).

La micorrización tuvo un efecto en todas las variables evaluadas, en particular la micorrización dual, pero no en la supervivencia, lo que contrasta con otros trabajos recientes realizados con leguminosas en zonas semiáridas (Monroy-Ata *et al.*, 2007), *Cedrela odorata* (Méndez-Cortés *et al.*, 2013) y *Pinus halepensis* (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2013).

Se sabe que la simbiosis micorrízica estimula el crecimiento vegetal debido principalmente al efecto benéfico sobre la nutrición mineral y el aporte de agua hacia

las plantas (Simard y Durall, 2004; Pringle *et al.*, 2010), sin embargo, debe tenerse en cuenta que hay asociaciones distintas que se establecen entre el hongo y su hospedante, y que cada combinación puede tener efectos distintos sobre el crecimiento de la planta. En ese sentido, en este estudio se observó que a pesar de que *F. udhei* puede formar asociaciones simbióticas tanto con *R. intraradices* (endomycorriza) como con *P. tinctorius* (ectomycorriza), las plantas respondieron de manera distinta a cada especie. Las plantas inoculadas con *R. intraradices* tuvieron un mejor crecimiento en comparación con las inoculadas con *P. tinctorius* y cuando ambos hongos micorrízicos se encuentran en coinoculación se presenta una sinergia que repercute positivamente en el crecimiento de *F. uhdei*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Ambriz *et al.* (2010) para la misma especie de hospedero, sin embargo, el ensayo desarrollado por este autor se realizó bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento y en periodo menor de tiempo (12 semanas de duración).

Existen reportes que muestran el efecto benéfico de la inoculación dual con *R. intraradices* y *P. tinctorius* (Founoune *et al.*, 2001; Misbahuzzaman y Newton, 2006), sin embargo, la información en torno al sistema *F. uhdei*-*R. intraradices*-*P. tinctorius* es casi inexistente, debido a que sólo se contaba con reportes de que las familias que forman asociación simbiótica tanto con hongos endomicorrízicos como con hongos ectomicorrízicos son: Juglandaceae, Tiliaceae, Myrtaceae, Salicaceae, Fagaceae y Caesalpiniaceae (Harley y Smith, 1993), por lo tanto este trabajo confirma lo reportado por Ambriz *et al.* (2010) en términos de la respuesta de la planta, pero en un sistema menos controlado. Desde luego no demuestra que la simbiosis simultánea ocurra de forma natural, pero sugiere que al menos una especie del género *Fraxinus* podría ser capaz de formar asociaciones con hongos ectomicorrízicos, lo que indica la necesidad de explorar esta posibilidad con individuos creciendo en condiciones naturales. Finalmente, debido al mejor desempeño de las plantas con inoculación dual, se podría sugerir que el uso de hongos micorrízicos (HMA y HEM) asociados a esta especie podría ser una herramienta para programas de restauración de suelos severamente degradados.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo otorgado por la DGAPA de la UNAM a través del proyecto IN20212 y la beca PASPA para estancia sabática otorgada a RLC. ALBP agradece a beca doctoral otorgada por el CONACYT.

Literatura citada

- Alexander I.J. y Fairley I.R. 1983. Effects of N fertilization on populations of fine roots and mycorrhizas in spruce humus. *Plant and soil* **71**:49-53.
- Álvarez-Sánchez M.E., Hernández-Acosta E., Maldonado-Torres R. y Rivera-González M. 2013. Encalado y micorriza para corregir deficiencia de fósforo en un Andisol cultivado con *Pinus halepensis*. *Madera y Bosques* **19**:7-16.
- 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.
- Bocco G. y García-Oliva F. 1992. Researching gully erosion in Mexico. *Journal of Soil and Water Conservation* **47**:365-367.
- Callaway J.C., Zedler J.B. y Ross, D.L. 1997. Using tidal salt marsh mesocosms to aid wetland restoration. *Restoration Ecology* **5**:135-146.
- Canellas I., Finat L., Bachiller A. y Montero G. 1999. Comportamiento de planta de *Pinus pinea* en vivero y campo: ensayos de técnicas de cultivo de planta, fertilización y aplicación de herbicidas. *Investigaciones Agrícolas: Producción y Protección Vegetal* **8**:335-359.
- Crawley R. 2007. The R Book. John Wiley and Sons, Ltd.
- Davel A., Tejera L., Honorato M. y Sepúlveda E. 2001. Plantación de pino ponderosa: Control de malezas, tipos de plantas y fertilizantes. *Forestal* **1**:1-4.
- Durán Z.V.H. y Rodríguez P.C.R. 2008. Soil-erosion and runoff prevention by plant covers. A review. *Agronomy for Sustainable Development* **28**:65-86.
- Duvert C., Gratiot N., Evrard O., Navratil O., Némery J., Prat C. y Esteves, M. 2010. Drivers of erosion and suspended sediment transport in three headwater catchments of the Mexican Central Highlands. *Geomorphology* **123**:243-256.
- 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.
- Francis J.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.
- Gómez-Romero M., Soto-Correa J.C., Blanco-García J.A., Sáenz Romero C., Villegas J. y Lindig-Cisneros R. 2012. Estudio de especies de pino para

- restauración de sitios degradados. *Agrociencia* **46**:795-807.
- Harley J.L. y Smith S.E. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.
- Hayman D.S. 1983. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal of Botany* **61**:944-963.
- ISRIC World Soil Information. 2013. http://www.isric.org/isric/webdocs/docs//major_soils_of_the_world/set6/ac/acrisol.pdf. Consultado Mayo, 2013.
- Krüger M., Krüger C., Walker C., Stockinger H. y Schüßler A. 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* **193**:970-984.
- Maass J.M.M. y García-Oliva F. 1990. La conservación de suelos en zonas tropicales: el caso de México. *Ciencia y Desarrollo* **90**:21-36.
- Masera O., Ordoñez M.J. y Dirzo R. 1992. Emisiones de Carbono a partir de la deforestación en México. *Ciencia* **43**:151- 153.
- Méndez-Cortés H., Marmolejo-Monsiváis J.G., Cantú-Ayala C., Olalde-Portugal V., Estrada-Castillón E. y Posadas-Leal C. 2013. Respuesta de *Cedrela odorata* L. a diversos inoculantes micorrízicos procedentes de dos ecosistemas tropicales. *Madera y Bosques* **19**:23-34.
- Misbahuzzaman K. y Newton A. 2006. Effect of dual arbuscular ectomycorrhizal inoculation on mycorrhiza formation and growth in *E. camaldulensis* Dehnh. seedlings under different nutrient regimes. *International Journal of Agriculture and Biology* **8**:848-854.
- Monroy-Ata A., Estevez-Torres J., García-Sánchez R. y Ríos-Gómez R. 2007. Establecimiento de plantas mediante el uso de micorrizas y de islas de recursos en un matorral xerófilo deteriorado. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **80**(suplemento):49-57.
- Nie X.J., Zhang J.H. y Su Z.A. 2013. Dynamics of soil organic carbon and microbial biomass carbon in relation to water erosion and tillage erosion. *Plos One* DOI: 10.1371/journal.pone.0064059.
- Ocampo J.A. y Hayman D.S. 1981. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection. II. Crop rotation and residual effects of non-host plants. *New Phytologist* **87**:333-343.
- Pérez-Moreno J. y Read D. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivos que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* **29**:239-247.

- Pimentel D. 2006. Soil erosion: a food and environmental threat. *Environment, Development and Sustainability* **8**:119-137
- Pohl M., Alig D., Körner C. y Rixen, C. 2009. Higher plant diversity enhances soil stability in disturbed alpine ecosystems. *Plant and Soil* **324**:91-102.
- Pringle A., Bever J.D., Gardes M., Parrent J.L., Rillig M.C. y Klironomos, J. N. 2009. Mycorrhizal symbioses and plant invasions. *Annual Review in Ecology Evolution and Systematics* **40**:699-715.
- R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org>.
- 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.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 1997. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. <http://www.semarnat.gob.mx>.
- Schüßler A. y Walker C. 2010. The Glomeromycota, A Species List With New Families and New Genera. Edinburgh & Kew, UK: The Royal Botanic Garden; Munich, Germany: Botanische Staatssammlung Munich; Oregon, USA: Oregon State University.
- Simard S.W. y Durall D.M. 2004. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany* **82**:1140-1165.
- Smith S.E., Facelli E., Pope S. y Smith, S.E. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* **326**:3-20
- Smith S.E. y Read D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis, 2nd edition, Academic Press, Londres, Reino Unido.
- 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.
- Szanser M., Kusinska A., Kisiel M. y Sieminiak D. 2011. Possibility of using diverse plant litter in soil restoration processes. *Procedia Environmental Sciences* **9**:169-173.

- 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.
- Tyler G. 1994. Ecología y Medio ambiente. 7° Ed. Grupo Editorial Iberoamericana, México, D.F.
- Underwood A.J. 1997. Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variance. Cambridge University Press, Cambridge.
- Vierhelig H., Coughlan A.P., Wyss U. y Piche Y. 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 5004-5007.

CAPITULO III

INOCULACIÓN DE PLANTAS DE *FRAXINUS UHDEI* CON HONGOS MICORRÍZICOS: EFECTOS DE LA SIMBIOSIS Y FERTILIZACIÓN EN SUELOS DEGRADADOS, UN ESTUDIO DE CAMPO.

Resumen

En suelos severamente degradados, deficientes en nutrientes y carentes de estructura, el establecimiento, desarrollo y supervivencia de plantas se dificulta. Ante estas condiciones, el uso de interacciones micorrízicas, podría ser una estrategia efectiva para la revegetación y restauración ecológica. Se realizó un experimento en una localidad caracterizada por su alto grado de erosión y numerosas cárcavas, en suelos tipo acrisol ócrico, con el objetivo de evaluar el desempeño de *Fraxinus uhdei* inoculado con los hongos micorrízicos *Pisolithus tinctorius* y *Glomus intraradices*, solos o en interacción y en presencia/ausencia de urea. Se evaluó la altura, cobertura foliar, diámetro a la altura de la base y número de hojas, al finalizar el experimento (21 meses de establecido). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo a través de análisis de varianza de dos vías (inoculación y fertilización). Se prepararon muestras para verificar la micorrización, siendo ésta efectiva. Entre tratamientos de inoculación las diferencias no fueron significativas, sin embargo al comparar el 100 % de supervivencia del tratamiento con inoculación dual fertilizado, contra el control (61.54 %), se evidencia una clara diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$). Al analizar crecimiento de *F. uhdei*, los resultados indicaron que los valores menores corresponden al control para todas las variables analizadas, por lo que es importante la presencia de los hongos micorrízicos de manera individual o dual (no existiendo diferencia estadística entre tratamientos inoculados) ya que presentan valores mayores con respecto a las plantas control. El factor fertilización solo fue significativo para la altura de *F. uhdei*. Los resultados sugieren que en suelos con deficiencias nutricionales se requiere de interacciones entre plantas y hongos micorrízicos como las descritas en este estudio para mejorar el establecimiento, crecimiento y supervivencia ante estas condiciones, lo cual pudiera ser clave como estrategia en la restauración de sitios altamente degradados.

Palabras clave: co-inoculación, *Glomus intraradices*, *Pisolithus tinctorius*, simbiosis, restauración ecológica.

INTRODUCCIÓN

Los suelos degradados son abundantes en todo el mundo y su recuperación aunque necesaria puede ser muy difícil, e incluso en ocasiones no realizable por los altos costos o la falta de conocimiento científico y desarrollos tecnológicos (Bradshaw y Chadwick, 1980).

La erosión del suelo es una forma severa de degradación física. Se estima que cerca del 80% de la tierra agrícola en el mundo sufre erosión moderada a severa y 10% ligera a moderada (Lal y Stewart, 1995). Específicamente en México, en los últimos 45 años se han degradado (de forma moderada a extrema) 60.9 millones de ha, lo que representa un 24.1% de su superficie con cobertura vegetal (Maass 1993); particularmente en el estado de Michoacán aproximadamente 35 000 ha son deforestadas anualmente (COFOM, 2001) viéndose reflejado en un aumento de la erosión del suelo.

La vegetación controla la erosión al incrementar la infiltración y al reducir la escorrentía impidiendo con ello la formación de cárcavas, o su posible crecimiento, además de que ofrece protección física al suelo frente al impacto de la lluvia o viento. En ese sentido, desde hace varias décadas, se ha tratado de hacer frente al creciente problema de la degradación del suelo. Morgar (1986) sugiere que la revegetación multiestrato con gramíneas, leguminosas, arbustos y árboles alrededor de las cárcavas es una buena estrategia para frenar los procesos erosivos, observando que la revegetación, logra reducir la escorrentía en cárcavas entre un 65 a 90% y las pérdidas de suelo por erosión entre 75 a 90%.

Sin embargo y pesar de que se ha tratado de profundizar en los distintos mecanismos para frenar el deterioro del suelo, es un hecho bien conocido que el funcionamiento, la estabilidad y la productividad de los ecosistemas terrestres dependen en gran medida de la riqueza de las especies de la cubierta vegetal, su diversidad y la estructura de las poblaciones de la misma (Pohl, 2009).

Por otra parte, el que algunas especies de plantas puedan o no desarrollar una cubierta vegetal adecuada, depende de las interacciones que se produzcan entre las distintas especies presentes y de la competencia temporal y espacial que se establezcan por los recursos del suelo.

Las interacciones con los diferentes grupos de organismos que constituyen una comunidad, pueden favorecer el establecimiento de determinadas especies de plantas y/o su posterior desarrollo mediante mecanismos de diversa índole (Smith *et al.* 2010; Pohl *et al.*, 2009).

De las interacciones entre plantas y otros organismos de un ecosistema, las que se establecen con microorganismos del suelo, un grupo muy amplio de organismos pertenecientes a diversos phyla de los cuales se carece hoy en día de suficiente información. Para el presente estudio, son de particular importancia los hongos formadores de micorrizas, los cuales juegan un papel clave en el establecimiento y desarrollo de la mayoría las plantas, constituyendo así una posibilidad para la utilización de dichas especies en la rehabilitación de suelos severamente degradados, por una lado para reducir los efectos negativos de las carencias de nutrientes minerales (especialmente el fósforo). En las plantas, y por otro por su papel en la formación de estructuras que contribuyen a la estructura del suelo (Colpaert et. al., 1999, Ambriz, et. al. 2010).

Entre los múltiples beneficios que se le atribuyen a la micorrización, se destaca el efecto que ésta tiene sobre el desarrollo de la planta, ya que diversos estudios han demostrado que las micorrizas mejoran el crecimiento de la planta al aumentar la superficie de absorción del sistema radical por medio de sus hifas asociadas, debido a que el diámetro (3 a 30 μm) y longitud de sus hifas (0.03 a 6.95 m /g de suelo) les permite explorar un mayor volumen del sistema edáfico (Smith & Read, 1997); absorber selectivamente y el acumular ciertos nutrientes, especialmente fósforo (Colpaert et. al., 1999); solubilizar y hacer disponibles para la planta algunos minerales normalmente insolubles (Casarin et. al. 2004; Liu et. al., 2004); permitir que las raíces sean fisiológicamente activas por periodos mayores de tiempo en comparación con una raíz no micorrizada y además, el que sean más resistentes a la infección que ocasionan algunos hongos del suelo tales como *Phytophthora sp.*, *Pythium sp.* y *Fusarium sp.* (Azcón-Aguilar y Barea, 1996), siendo variados los mecanismos por lo que esto sucede, incluyendo principalmente la ocupación de un espacio en la raíz y cambios en la producción de exudados (Dehne, 1982, Likar y Ragvar, 2008). Por otro lado, en la restauración de los sitios perturbados se debe considerar a los hongos micorrízicos, debido a que juegan un papel importante al contribuir a incrementar la formación y estabilidad de agregados en el suelo (Ambriz, et. al. 2010), por lo que podría llegar a constituir una solución viable en la recuperación de suelos severamente degradados (Pohl et. al. 2009).

Asi mismo, el estudio de plantas con potencial para formar asociaciones simbióticas tanto con hongos micorrízicos arbusculares (HMA) como con hongos ectomicorrízicos (HE), puede contribuir a mejorar las estrategias de restauración ecológica (Gómez-Romero et al., 2012), en particular lo relacionado con la diversidad microbiana del suelo y las funciones que esta diversidad sostiene.

Unas de las especies vegetales capaces de establecerse en sitios degradados son los fresnos (*Fraxinus*), entre ellos *F. uhdei*, pues las especies de este género son resistentes a condiciones de estrés causadas por suelos pobres en nutrientes y

materia orgánica (Francis, 1990; Stabler *et al.*, 2001). *Fraxinus uhdei* es una especie endémica a México capaz de formar asociaciones simbióticas con hongos formadores de micorrizas. En términos ecosistémicos, se ha demostrado que en bosque dominado por fresnos hay grandes cantidades de N y P en la hojarasca y se favorece la recuperación de la dinámica biogeoquímica del suelo (Rothstein *et al.* 2004).

Además de ello, 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). Sin embargo, existen pocos trabajos que muestran la contribución del sistema fresno-hongos micorrízicos en el desempeño de la planta en sustratos limitantes.

Así pues, en base a lo anterior revisado se sugiere que es posible lograr la restauración de suelos severamente degradados o afectados por erosión severa mediante una estrategia integral basada en la participación de la simbiosis micorrízica, debido a lo cual el presente ensayo tiene como finalidad contribuir a esclarecer el comportamiento de *F. uhdei* inoculado con hongos micorrízicos y en presencia de fertilización nitrogenada, ante un escenario como la problemática antes descrita.

MATERIALES Y METODOS

Se propagaron 500 plantas de *F. uhdei* en marzo del 2012 en condiciones de casa de sombra (20 %), para lo cual se escarificaron semillas de forma manual y se desinfectaron con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 10% (v:v) por 15 min. Posteriormente fueron sembradas en contenedores rígidos de plástico (375 cm³), utilizando como sustrato agrolita-turba (2:1 v/v) esterilizada en autoclave por 30 minutos a 121 °C y 15 PSI.

A las 9 semanas de crecimiento, las plantas fueron separadas en cuatro grupos, las del primer grupo no fueron inoculadas y las pertenecientes a los tres restantes fueron inoculadas: a) el hongo ectomicorrízico *P. tinctorius* (1×10^6 esporas/planta) utilizando como vehículo turba micronizada, b) el hongo micorrízico arbuscular *G. intraradices* (50 esporas/planta), aplicado como una suspensión en agua destilada y c) con una mezcla de ambas especies de hongos (inoculación dual), cada especie aplicada como ya se mencionó. El inóculo de *P. tinctorius* fue obtenido de Biosyneterra Solutions Inc. (L'Assomption, Québec, Canada), y *G. intraradices* a partir de cultivos aislados en el Laboratorio de Interacción Suelo-Planta-Microorganismo del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Cuando las plantas de fresno tuvieron 17 semanas de inoculación, fueron trasplantados a campo, a una localidad llamada Huertitas, en el Ejido de Atécuaro (19° 33' 05" y 19° 37' 08" N y 101°05'07"O y altitud de 2275 m) localizado a 15 Km al sur de la ciudad de Morelia, Michoacán. Esta localidad se caracteriza por tener un alto grado de erosión y numerosas cárcavas, formadas en suelos de tipo Acrisol ócrico (Duvert *et. al.* 2010). En las condiciones actuales de degradación, el suelo de la localidad contiene muy poca materia orgánica (0.78 %), es muy bajo en nitrógeno total aprovechable (19.60 kg/Ha) y extremadamente pobre en fósforo asimilable (0.347 mg/kg). Las plantas de fresnos fueron distribuidos en un diseño completamente al azar con ocho tratamientos (4 de inoculación y dos de fertilización, tabla 1) y 28 réplicas por tratamiento a los largo de las dos laderas de una cárcava con orientación de Este y Oeste con una profundidad de alrededor de 6 m, para contar con 14 réplicas en cada ladera de cada tratamiento. El experimento fue evaluado durante 20 meses.

Tabla 1. Tratamientos experimentales

TRATAMIENTOS	
1	<i>Fraxinus uhdei</i> (control)
2	<i>Fraxinus uhdei</i> + <i>Glomus intraradices</i>
3	<i>Fraxinus uhdei</i> + <i>Pisolithus tinctorius</i>
4	<i>Fraxinus uhdei</i> + <i>Glomus intraradices</i> + <i>Pisolithus tinctorius</i>
5	<i>Fraxinus uhdei</i> + urea
6	<i>Fraxinus uhdei</i> + <i>Glomus intraradices</i> + urea
7	<i>Fraxinus uhdei</i> + <i>Pisolithus tinctorius</i> + urea
8	<i>Fraxinus uhdei</i> + <i>Glomus intraradices</i> + <i>Pisolithus tinctorius</i> + urea

Para los tratamientos con fertilización, la urea (NH_2CONH_2) se disolvió en agua a una concentración 200 mM, recibiendo 0.384 g urea/planta en 250 ml de disolución, cada 15 días durante la temporada de lluvias (junio-octubre) y no se realizó riego de auxilio en temporada de secas (diciembre-mayo).

Para evaluar el desempeño de los fresnos, se registró mensualmente la altura, y semestralmente el diámetro a la altura de la base (DAB en el cuello de la planta a un

cm del suelo), la cobertura (evaluado mediante la fórmula de la elipse $r_1 r_2 \pi$ con dos radios de la copa para inferir el dosel), el número de hojas y la supervivencia.

Debido a que en la ladera con orientación Este, la mortalidad fue muy alta, con la pérdida de todas réplicas de algunos tratamientos, los análisis estadísticos se llevaron a cabo solamente para la ladera Oeste a través de análisis de varianza de dos vías, inoculación y fertilización, y se verificó que se cumpliera con los supuestos de este método estadístico. Debido a la mortalidad, y debido a la sensibilidad del análisis de varianza de más de una vía a datos desbalanceados, se eliminaron réplicas al azar de tal forma que se contara con el mismo número de réplicas por tratamientos (Underwood 1997). En el caso de que para alguna de las variables uno de los factores del modelo no fuera significativo, el factor fue eliminado del análisis, lo que permitió en estos casos utilizar la base de datos completa (Crawley 2007).

RESULTADOS

Las preparaciones de tejido de raíz de *Glomus intraradices* y *Pisolithus tinctorius* mostraron que la micorrización fue efectiva (figura 1), tanto para las plantas inoculadas con una sola especie de hongo, como para aquellas donde ambas especies de hongos estaban presentes.

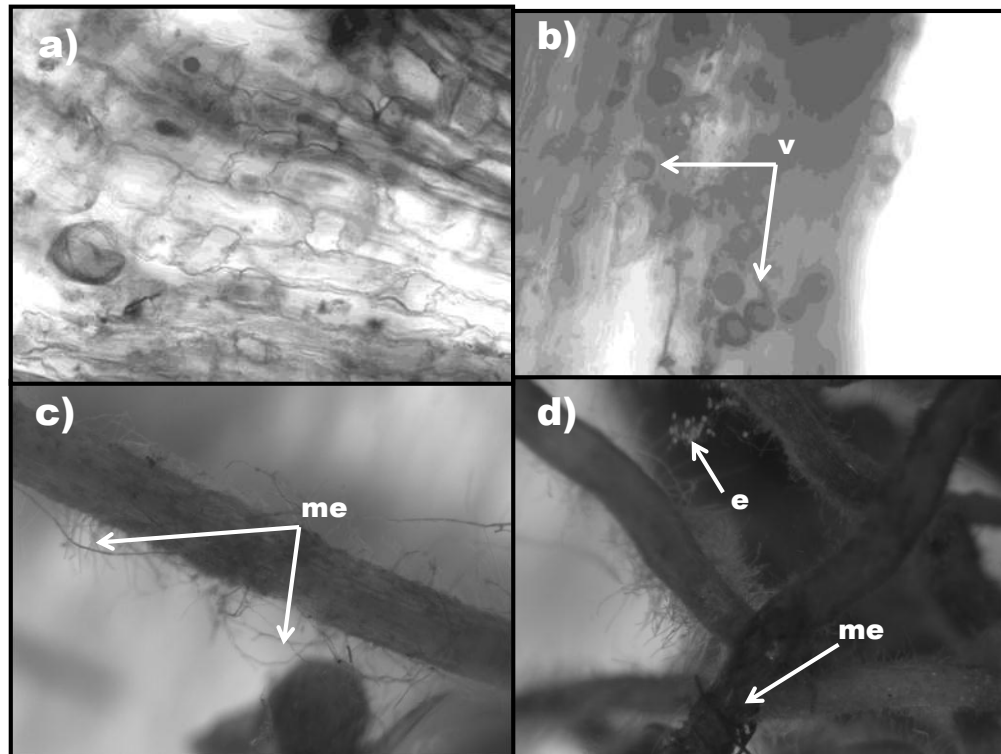


Figura 1. Evidencia de colonización micorrizica. En (a) raíces de *Fraxinus uhdei* pertenecientes al tratamiento control; en (b), raíces de la misma especie con vesículas de *Glomus intraradices*; en (c), raíces con micelio externo (me) de *Pisolithus tinctorius*; y en (d), esporas de *Glomus intraradices* y micelio externo (me) de *Pisolithus tinctorius* (indicadas por las flechas).

Al finalizar el experimento, a los 21 meses de establecido, la mortalidad de los individuos asignados a los diferentes tratamientos difirió (fig. 2). Entre tratamientos de inoculación las diferencias no fueron significativas, sin embargo al comparar el 100 % de supervivencia del tratamiento con inoculación dual fertilizado, contra el control, el cual presentó una supervivencia del 61.54 %, se evidencia una clara diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$).

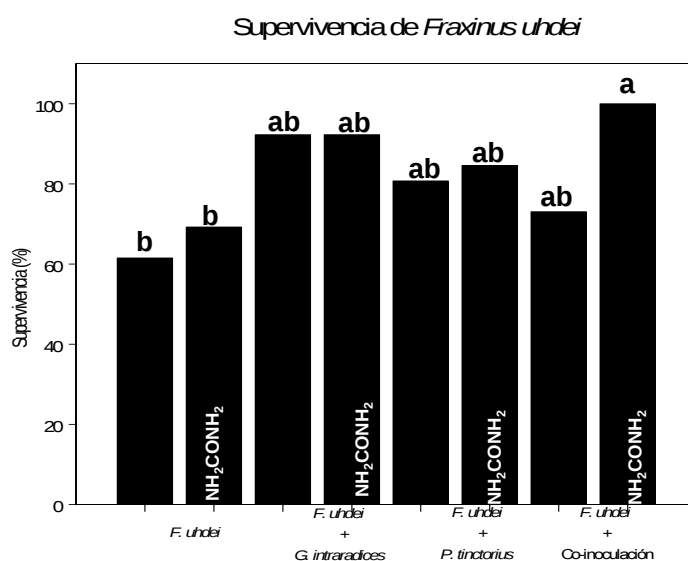


Fig. 2 Supervivencia de *F. uhdei* en los distintos tratamientos. Las primeras barras de cada tratamiento corresponden a los tratamientos sin fertilización nitrogenada, las segundas barras de cada tratamiento corresponden a los tratamientos con fertilización nitrogenada. NH_2CONH_2 = urea. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.0001$).

En el lapso de tiempo evaluado, se observó que desde el inicio de establecido el experimento, los valores menores en altura correspondieron a los tratamientos no inoculados, manteniendo esta tendencia a lo largo de los meses evaluados (Fig. 3). Es a partir de los 12 meses de evaluación (en temporada de lluvias) donde se evidencian claramente dos grupos, los tratamientos inoculados, presentan las mayores alturas en comparación con los tratamientos no inoculados, y específicamente el tratamiento inoculado con *G. intraradices* (indistintamente de la

fertilización) el que presentó los valores mayores en altura hasta finalizar el experimento.

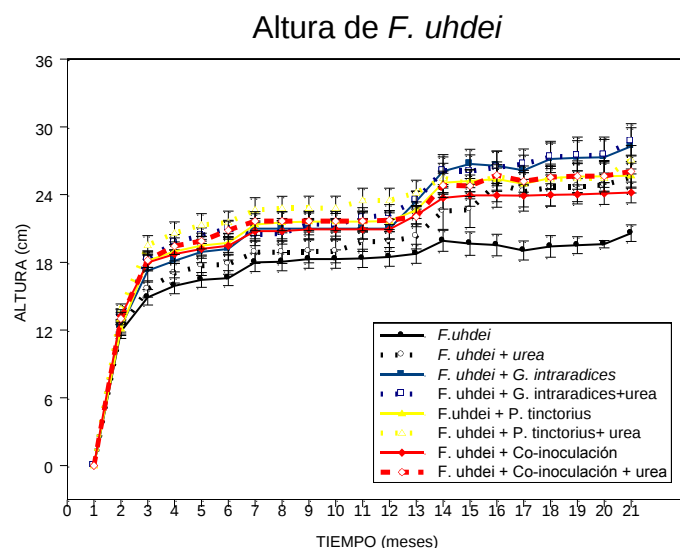


Fig. 3 Altura de *Fraxinus uhdei* en el experimento en campo ($P < 0.0005$). Barras verticales indican el error estándar.

Las variables de crecimientos analizadas al finalizar el experimento difirieron, mostrando solo para la altura un efecto de la inoculación y de la fertilización sobre la variable, y para las demás variables (cobertura, DAB y número de hojas) solo la inoculación fue significativa y no así la fertilización o la interacción entre ambos factores.

La altura fue mayor en los tratamientos micorrizados, siendo el tratamiento inoculado con *G. intraradices* (G), el que presentó las mayores alturas (26.25 ± 5.28 cm) siendo estadísticamente diferentes al compararse con el control ($P < 0.003043$) (fig. 3a). Sin embargo, entre grupos micorrizados no hubo diferencia estadísticamente significativa. Al analizar la variable, se observó que la fertilización tuvo efecto sobre la altura de los fresnos, siendo significativa la diferencia para los fresnos que recibieron fertilización nitrogenada en comparación que carecieron de fertilización.

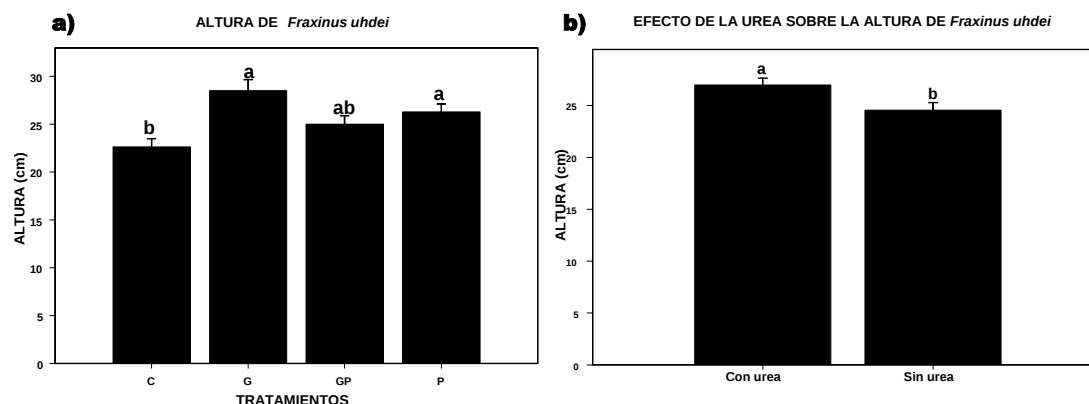


Fig. 3. a) Altura de *Fraxinus uhdei* en los distintos tratamientos de inoculación. b) Efecto de la fertilización sobre la altura de *Fraxinus uhdei* en los distintos tratamientos de inoculación. C = control, G = *Glomus intraradices*, P = *Pisolithus tinctorius* y GP = inoculación dual. Los datos son medias y las barras verticales errores estándar; las medias no identificadas con la misma letra son significativamente diferentes.

La cobertura mostró que el efecto de la micorrización, ya sea por individual, o en inoculación dual (GP) fue mayor (en comparación con el grupo control que presentó las menores coberturas $56.05 \pm 31.36 \text{ cm}^2$). Las diferencias entre tratamientos inoculados y el grupo control fue significativa estadísticamente ($P < 0.01021$) y no así entre tratamientos inoculados donde no existe una diferencia estadísticamente significativa.

En el caso del número de hojas, el tratamiento inoculado con *P. tinctorius* (P) fue el que presentó los valores mayores (13.69 ± 5.37), siendo estadísticamente diferente al compararlo con el grupo control ($P < 0.04032$), sin embargo no se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos inoculados.

Finalmente en el diámetro a la altura de la base se observó que el tratamiento inoculado con la ectomicorriza *P. tinctorius* (P) fue el que presentó los valores mayores ($0.95 \pm 0.19 \text{ cm}$), siendo estadísticamente significativo al compararse con el grupo control ($P < 0.001$) que presentó el DAB menor entre todos los tratamientos ($8.70 \pm 3.9 \text{ cm}$).

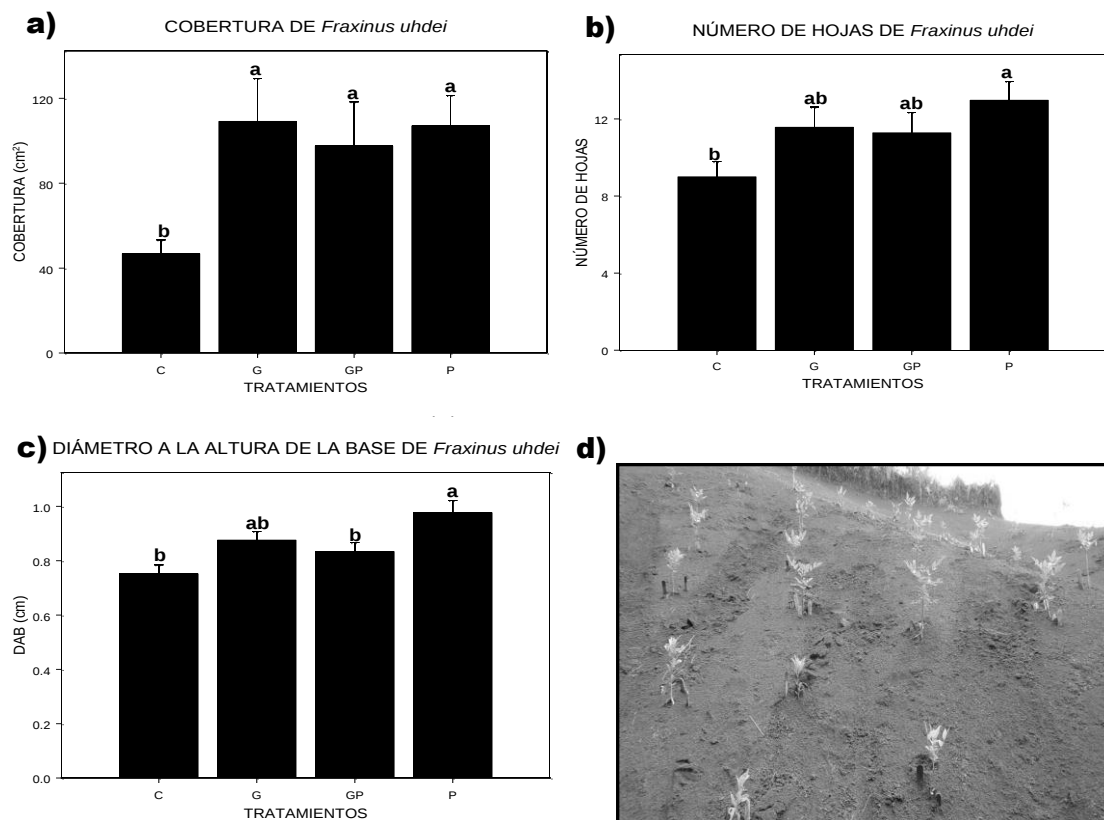


Fig. 4. a) Cobertura de *Fraxinus uhdei* en los distintos tratamientos de inoculación; b) número de hojas de *Fraxinus uhdei*; c) diámetro a la altura de la base de *Fraxinus uhdei*. d) imagen del ensayo en campo. C = control, G = *Glomus intraradices*, P = *Pisolithus tinctorius* y GP = inoculación dual. Los datos son medias y las barras verticales errores estándar, las medias no identificadas con la misma letra son significativamente diferentes.

Al analizar esta misma variable en el lapso de tiempo evaluado, podemos observar interesantemente que el tratamiento con inoculación dual en presencia de fertilización mantenía los valores mayores en DAB. Sin embargo, en la segunda temporada de lluvias (12 meses) empiezan a declinar los valores y es hasta esta temporada en donde se observa que el tratamiento inoculado con *P. tinctorius* incrementa sus valores manteniendo esta tendencia hasta finalizar el experimento. Cabe mencionar que el grupo control fue el que presentó los valores menores en DAB a lo largo del tiempo evaluado.

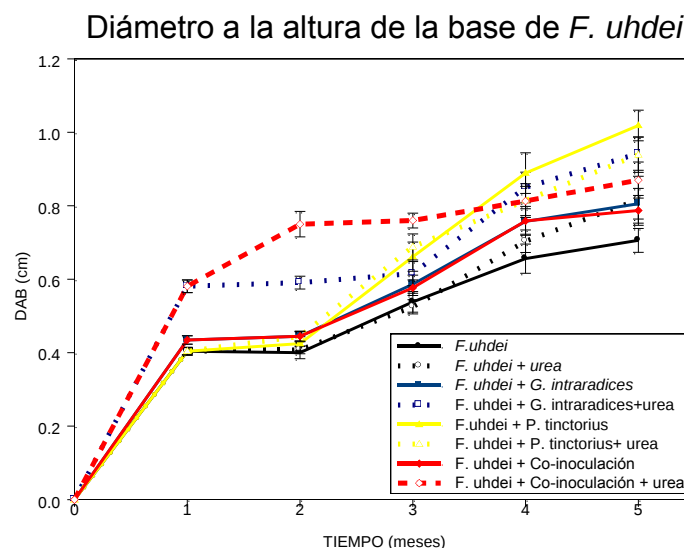


Fig. Diámetro a la altura de la base de *Fraxinus uhdei* en el experimento en campo ($P < 0.0005$)

DISCUSIÓN

La fertilidad de los suelos es un factor clave para el crecimiento y supervivencia de las plantas y tiene gran influencia sobre su productividad y desempeño; en suelos con deficiencias nutricionales, bajos en actividad microbiológica y carentes de estructura, una estrategia integral basada en la interacción entre hongos micorrízicos y plantas resistentes ante este tipo de condiciones pudiera ser clave para mejorar las estrategias de restauración, al aumentar la capacidad de sobrevivencia y crecimiento de las especies (Gómez-Romero et. al., 2012), así como para contribuir a mejorar la estructura del suelo pudiéndose ver reflejado en la estabilización del sustrato (Ramos-Zapata y Guadarrama, 2004).

En este sentido, en el presente trabajo, se estableció un ensayo en una localidad caracterizada por tener un alto grado de erosión (numerosas cárcavas) y con deficiencia nutricionales extremas ($MO\ 0.78\ \%$, $N_{TA}\ 19.60\ kg/Ha$ y $P_A\ 0.347\ mg/kg$), lo que dificulta el desarrollo vegetal (Duvert et. al. 2010); sin embargo y bajo este escenario, en el presente ensayo, se observó que *Fraxinus uhdei* (fresno) fue capaz de establecerse favorablemente en un sitio extremadamente pobre en nutrientes, con un suelo muy degradado. Estos resultados que coinciden con lo reportado por Francis (1990) y Stabler et al. (2001) quienes reportan que esta planta puede establecerse en suelos empobrecidos o terrenos perturbados, no obstante, las

condiciones que se presentan en la localidad de estudio son aún más adversas que las reportadas en dichos estudios.

Además de ello, existen pocos estudios donde se contempla la interacción micorrízica bajo este tipo de escenario. En ese sentido, en el presente estudio se observó que la supervivencia de *F. uhdei* se vió aumentada cuando se encontraban formando asociación simbiótica con los hongos micorrízicos *P. tinctorius* y *G. intraradices* y mas aun cuando estos interactuaban en inoculación dual, además de que el aumento fue significativo cuando se le adicionaba urea como fertilizante.

La interacción entre *F. uhdei*-*G. intraradices*-*P. tinctorius* ha sido poco estudiada, y solo abordada bajo condiciones controladas en sistemas de cámara de crecimiento (Ambriz *et. al.*, 2011) o bajo un sistema de mesocosmo (Baez-Pérez *et.al.*, 2014 *en prensa*) y hasta donde sabemos, nunca bajo condiciones de campo como en el presente estudio. Sin embargo, los resultados coinciden con lo reportado por Ambriz *et. al.* (2011), donde se reporta por primera vez la asociación simbiótica con ambas especies de hongos micorrízicos, observando un efecto sinérgico de la inoculación dual sobre el desarrollo del fresno en comparación con la inoculación por individual. Sin embargo dicho estudio es desarrollado bajo condiciones controladas y no considera la fertilización nitrogenada.

En el ensayo desarrollado por Baez-Pérez *et. al.* (2014), bajo un sistema de mesocosmo, la inoculación dual de *P. tinctorius* y *G. intraradices* repercutió positivamente en la sobrevivencia y el desarrollo de *F. uhdei* en comparación de los fresno inoculados de manera individual, sin embargo, los resultados de dicho ensayo indicaron que la fertilización no tuvo efecto significativo sobre el desarrollo de las plantas pero, afecto negativamente la supervivencia (con urea 67%, sin urea 90%).

Cabe resaltar que a pesar de que el sustrato utilizado en el ensayo realizado por Baez-Pérez *et. al.* (2014) fué similar a las condiciones locales donde se desarrolló nuestro experimento, en esté ensayo no se aplicó riego de auxilio, por lo que los resultados de nuestro experimento demuestran que *F. uhdei* asociado a *P. tinctorius* y *G. intraradices* además, es resistente a periodos de estrés por sequía.

Es interesante notar que la fertilización nitrogenada solo tuvo efecto sobre la supervivencia y la altura de *F. uhdei* y no tuvo ningún efecto para el resto de variables analizadas. En este sentido, existen pocos estudios que muestran el efecto de la fertilización nitrogenada sobre especies arbóreas y principalmente son para especies del genero *Pinus*. Así, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Canellas *et. al.* (1999), donde se reporta que la fertilización nitrogenada tiene un efecto positivo sobre la altura de la planta, sin embargo no tiene efecto sobre la

sobrevivencia contrario a lo mostrado en este ensayo donde la fertilización repercute positivamente sobre la supervivencia de *F. uhdei*.

Por otro lado, se ha reportado que la fertilización nitrogenada puede afectar la micorrización pudiendo inhibir la colonización y el desarrollo *per se* de la micorriza (Ocampo y Hayman, 1981; Hayman, 1983), sin embargo en este ensayo la micorrización tuvo un efecto positivo sobre el desarrollo *F. uhdei*, resultados que concuerdan con lo reportados para otras especies de plantas inoculadas con *P. tinctorius* y *G. intraradices*, principalmente para *Acacia holosericea* (Founoune *et. al.*, 2001) y *Eucalyptus camaldulensis* (Misbahuzzaman y Newton, 2006), de manera individual y más aún cuando se encontraban en inoculación dual. No obstante que la micorrización fue positiva, se observó que a pesar de que *F. udhei* puede formar asociaciones simbióticas tanto con *G. intraradices* como con *P. tinctorius*, las plantas respondieron de manera distinta a cada especie de hongo.

El ensayo mostró que *P. tinctorius* obtuvo los valores mayores en las variables analizadas en comparación a las inoculadas con *G. intraradices* o de manera dual, lo que contrasta con los otros trabajos realizados donde se muestra una sinergia en las variables de crecimiento en plantas con inoculación dual (Founoune *et. al.*, 2001; Misbahuzzaman y Newton, 2006; Ambriz *et. al.*, 2011; Baez-Pérez *et. al.*, 2014). Sin embargo los resultados del presente experimento concuerdan con lo reportado con Gómez-Romero *et. al.*, 2013, donde la inoculación de *Pinus pseudostrobus* con *P. tinctorius* respondió de manera positiva ante un escenario similar al utilizado en nuestro ensayo.

Finalmente, debido al mejor desarrollo y supervivencia de *F. uhdei*, los resultados sugieren que en suelos que presentan condiciones severas de degradación, la inoculación con hongos micorrízicos y específicamente con *P. tinctorius* de plantas usadas para reforestar sitios con condiciones adversas, puede ser una estrategia eficiente de restauración de suelos severamente degradados.

LITERATURA CONSULTADA

- 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
- Azcón-Aguilar, C. y Barea, J. M. 1996. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6 :457–464.
- Bradshaw, A.D. y M. J. Chadwick. 1980. The restoration of land: the ecology and reclamation of derelict and degraded land. University of California Press. Los Angeles.
- EUA. Bücking H., Kuhn A. J., Schröder W. H. y Heyser W. 2002. The fungal sheath of ectomycorrhizal pine roots an apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium, and potassium into the root cortex? *Journal of Experimental Botany* 53: 1659-1669.
- Canellas I., Finat L., Bachiller A. y Montero G. 1999. Comportamiento de planta de *Pinus pinea* en vivero y campo: ensayos de técnicas de cultivo de planta, fertilización y aplicación de herbicidas. *Investigaciones Agrícolas: Producción y Protección Vegetal* 8:335-359.
- Casarin, V., Plassard, C., Hinsinger, P. y Arvieu, J. 2004. Quantification of ectomycorrhizal fungal effects on the bioavailability and mobilization of soil P in the rhizosphere of *Pinus pinaster*. *New Phytologist*. 163: 177-185.
- 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.
- Crawley R. 2007. The R Book. John Wiley and Sons, Ltd.
- Duvert C., Gratiot N., Evrard O., Navratil O., Némery J., Prat C. y Esteves, M. 2010. Drivers of erosion and suspended sediment transport in three headwater catchments of the Mexican Central Highlands. *Geomorphology* 123:243-256.
- 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.
- Francis J.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.
- Gómez-Romero M., Soto-Correa J.C., Blanco-García J.A., Sáenz Romero C., Villegas J. y Lindig-Cisneros R. 2012. Estudio de especies de pino para

- restauración de sitios degradados. *Agrociencia* 46:795-807.
- Gómez-Romero, M., Villegas, J., Sáenz-Romero, C. y Lindig-Cisneros, R. 2013. Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. *Madera y Bosques*. 19(3): 51-63.
- Hayman D.S. 1983. The physiology of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis. *Canadian Journal of Botany* 61:944-963.
- Lal, R. y Stewart, B. A. 1995. Soil Management, Experimental Basis for Sustainability and Environmental Quality. CRC Press, Inc. 555 p.
- Likar, M. y Regvar, M. 2008. Early defense reactions in Norway spruce seedlings inoculated with the mycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Persoon) Coker & Couch and the pathogen *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref. *Trees*. 22:861–868
- Liu, Q., Loganathan, P., Hedley, M. J. y Skinner, M. F. 2004. The mobilisation and fate of soil and rock phosphate in the rhizosphere of ectomycorrhizal *Pinus radiata* seedlings in an Allophanic soil. *Plant and Soil* 264: 219–229.
- Maass J.M.M. y García-Oliva F. 1990. La conservación de suelos en zonas tropicales: el caso de México. *Ciencia y Desarrollo* 90:21-36.
- Misbahuzzaman K. y Newton A. 2006. Effect of dual arbuscular ectomycorrhizal inoculation on mycorrhiza formation and growth in *E. camaldulensis* Dehnh. seedlings under different nutrient regimes. *International Journal of Agriculture and Biology* 8:848-854.
- Morgan, R. P. 1986. Soil erosion and conservation. New York United state. Edited by John Wiley & Sons INC. 605. Third Avenue. 298 p.
- Ocampo J.A. y Hayman D.S. 1981. Influence of plant interactions on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection. II. Crop rotation and residual effects of non-host plants. *New Phytologist* 87:333-343.
- Pohl, M., Alig, D., Körner, C. y Rixen, C. 2009. Higher plant diversity enhances soil stability in disturbed alpine ecosystems. *Plant Soil*. 324:91–102.
- Ramos, Z., J. y Guadarrama, P. 2004. Los hongos micorrizógenos en la restauración de comunidades tropicales. *Universidad y Ciencia*. Número especial I: 59-65.
- 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.

- Smith S.E., Facelli E., Pope S. y Smith, S.E. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 326:3-20
- Smith, S.F. and Read, D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2ª Edición. Academic Press London. P: 605
- 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.
- Underwood A.J. 1997. Experiments in Ecology: Their Logical Design and Interpretation Using Analysis of Variance. Cambridge University Press, Cambridge.

DISCUSIÓN GENERAL

En sitios severamente degradados la cobertura vegetal es muy difícil de regenerar por varios factores asociados con el suelo: la deficiencia de nutrientes, la carencia de estructura y una baja diversidad de microorganismo. En estas condiciones el desarrollo de estrategias integrales basadas en la participación de la simbiosis micorrízica, podrían ser clave para en el establecimiento, desarrollo y supervivencia de las plantas, constituyendo así una posibilidad para la rehabilitación de suelos severamente degradados, donde las carencias de nutrientes minerales (especialmente el fósforo) son limitantes.

Para contribuir a lo anterior, en el presente trabajo se establecieron dos ensayos con el objetivo de evaluar el desempeño de *Fraxinus uhdei* (Wenz.) Lingelsh (fresno) inoculado con los hongos micorrízicos; *Pisolithus tinctorius* y *G. intraradices*, solos o en interacción y en presencia/ausencia de fertilización nitrogenada en suelos de tipo acrisol ócrico severamente degradados que presentan deficiencias nutricionales que dificultan el desarrollo de las plantas.

El primer ensayo consistió de un sistema de mesocosmos utilizando macetas con sustrato obtenido de un sitio severamente erosionado (acrisoles con presencia de cárcavas, en la localidad de Atecuaro), con 8 tratamientos y 18 réplicas por tratamiento, y que tuvo una duración de 20 meses. El segundo ensayo con los mismos tratamientos y 28 réplicas por tratamiento, fue establecido *in situ* y tuvo una duración de 21 meses. Para ambos experimentos las evaluaciones de altura se realizaron de forma mensual y los diámetros a la altura de base, coberturas de copa y número de hojas, de forma semestral.

Los tratamientos para ambos experimentos fueron los siguientes:

- Tratamiento 1: *Fraxinus uhdei* (control).
- Tratamiento 2: *Fraxinus uhdei* + *Glomus intraradices*.
- Tratamiento 3: *Fraxinus uhdei* + *Pisolithus tinctorius*.
- Tratamiento 4: *Fraxinus uhdei* + *Glomus intraradices* + *Pisolithus tinctorius*
- Tratamiento 5: *Fraxinus uhdei* + urea.
- Tratamiento 6: *Fraxinus uhdei* + *Glomus intraradices* + urea.
- Tratamiento 7: *Fraxinus uhdei* + *Pisolithus tinctorius* + urea
- Tratamiento 8: *Fraxinus uhdei* + *Glomus intraradices* + *Pisolithus tinctorius* + urea.

Para ambos experimentos, la fertilización se realizó durante la temporada de lluvias, recibiendo 0.096 g urea/planta a una concentración de 200 milimolar cada tres días

en el caso del sistema de mesocosmos y 0.384 g urea/planta en la misma concentración cada 15 días para el experimento en campo.

La utilidad de llevar a cabo básicamente el mismo experimento en dos condiciones distintas, de mesocosmos y campo, es que bajo las condiciones de mesocosmos se cuenta con un mejor control de variables, en particular de la disponibilidad de agua, el efecto de herbívoros y otras contingencias que son difíciles o imposibles de controlar en campo.

Al realizar un análisis comparativo entre los dos ensayos realizados en el presente estudio, al finalizar el lapso de tiempo planeado para cada uno (cuadro 3), podemos notar diferencias en el comportamiento del sistema *F.uhdei-P.tinctorius-G.intraradices*. Teniendo en cuenta las principales diferencias entre sistemas, que fueron: 1) control de la disponibilidad de agua en los mesocosmos 2) posibles efectos por el espacio limitado para el desarrollo de la raíces en los mesocosmos; 3) sequía estacional en campo.

Por lo anterior, en campo el estrés por sequía fue mayor que en condiciones de mesocosmos.

Cuadro 1. Cuadro comparativo de las variables analizadas en experimento en sistema de mesocosmo y en experimento en campo. Celdas sombreadas indican valores mayores en cada experimento. Celdas sombreadas punteadas indican valores menores.

VARIABLE	EXPERIMENTO EN MESOCOSMO				EXPERIMENTO EN CAMPO			
	C	G	P	GP	C	G	P	GP
Altura (cm)	16.8 ± 1.5	21.1 ± 1.9	15.8 ± 4.4	23.3 ± 6.9	22.09 ± 4.17	26.43 ± 4.58	25.93 ± 4.75	24.018 ± 4.61
DAB (cm)	0.52 ± 0.04	0.68 ± 0.07	0.50 ± 0.03	0.74 ± 0.27	0.73 ± 0.17	0.82 ± 0.18	0.94 ± 0.19	0.81 ± 0.19
Cobertura (cm ²)	45.6 ± 57.9	58.8 ± 23.2	21.2 ± 33.1	88.9 ± 74.7	44.99 ± 35.61	67.98 ± 44.71	102.76 ± 87.01	68.66 ± 55.13
# Hojas	6.5 ± 3.5	9.2 ± 1.27	6.3 ± 3.6	9.6 ± 5.9	8.70 ± 3.9	9.72 ± 4.64	12.79 ± 5.87	10.50 ± 5.49

En experimento en el sistema de mesocosmos podemos ver que el inoculación dual es la que presentó los valores más altos para todas las variables analizadas. En ese sentido se ha documentado que una mayor altura relacionada a un mayor número de hojas representa una mayor calidad de las plantas por tener mayor capacidad fotosintética y transpiratoria y define la capacidad para almacenar carbohidratos (Thompson, 1985); esta tendencia la observamos en los resultados de nuestro ensayo en el sistema en mesocosmos. Aunado a ello, se midió la actividad fotosintética de los fresnos (fig. 1) y observamos que los valores menores

correspondieron a los fresnos control, por lo que podríamos deducir que las condiciones del sustrato son realmente complicadas ya que las plantas están presentando una actividad fotosintética menor cuando no reciben ningún tratamiento de fertilización ni presencia de hongos micorrízicos. Aunado a ello, es bien conocido que unos de los beneficios más importantes de la simbiosis micorrízica es incrementar el área fotosintética de la planta (Leake *et al.*, 2004), como lo pudimos apreciar en el análisis se realizó.

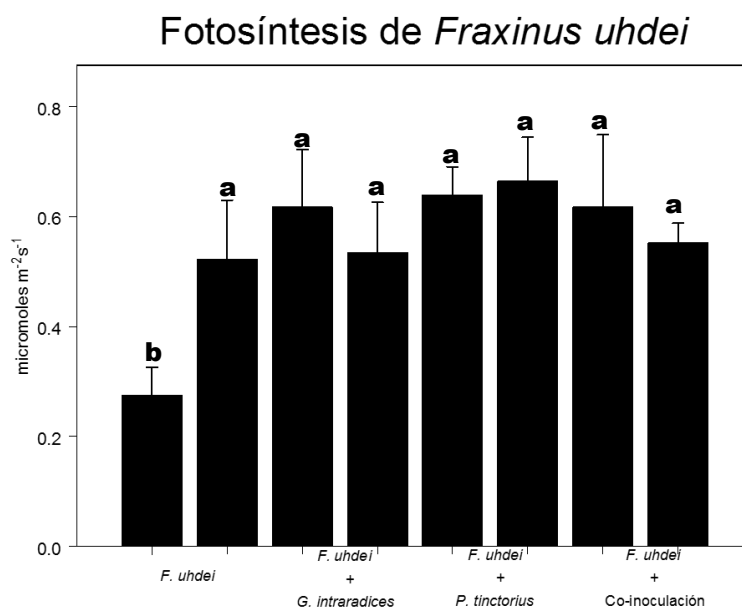


Fig. 1. Fotosíntesis de *F. uhdei* en los distintos tratamientos. Las primeras barras de cada tratamiento corresponden a los tratamientos sin fertilización nitrogenada, las segundas barras de cada tratamiento corresponden a los tratamientos con fertilización nitrogenada. NH_2CONH_2 = urea. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ($P < 0.0001$).

Se ha observado además, que una buena relación de altura con el peso total de la planta es imprescindible para la supervivencia en campo, especialmente en sitios secos (Cano, 1998). En ese sentido en el sistema de mesocosmos donde se cosecharon los fresnos al finalizar el experimento, observamos que la biomasa de las partes aéreas fue mayor para las plantas con inoculación dual (la biomasa fresca alcanzó 4.77 ± 3.4 g y la biomasa la biomasa seca siguió el mismo patrón entre tratamientos, las plantas con inoculación dual alcanzaron un peso seco promedio de 2.0 ± 1.42 g) además de ser el tratamiento que presentó los valores mayores en altura.

Con estos resultados podemos inferir que, probablemente debido a esta relación entre la altura y el peso total de la planta, en el ensayo en campo, el tratamiento con inoculación dual fertilizado fue el que presentó el mayor porcentaje en supervivencia (100 % de supervivencia) y valores mayores en altura (siendo la única variable para la cual el factor fertilización fue significativa), en comparación con los fresnos control,

Al comparar los valores de DAB (diámetro a la altura de la base) entre el ensayo en el sistema de mesocosmo y el ensayo en campo, pudimos ver que los valores casi se duplican en el ensayo en campo. Esta tendencia probablemente puede deberse a que en plantas leñosas el DAB está muy relacionado con la cantidad de sustancias de reserva ya que, a mayor diámetro puede existir mayor cantidad de tales sustancias, que en condiciones de extremo estrés como el que presenta el sitio donde se desarrollo el ensayo es de suma importancia el contar con reservas que le permitan a la planta sobrevivir ante estas condiciones por lo que esta variable representa un buen parámetro de predicción de crecimiento y supervivencia. El diámetro también se relaciona con las características de la raíz, incluyendo su peso seco y su morfología.

Generalmente a un mayor diámetro del tallo se presentan más raíces laterales (Thompson, 1985), característica que observamos en el ensayo en mesocosmo donde se analizó el sistema radicular del fresno, denotando que el tratamiento con inoculación dual fué el que presentó la mayor cantidad de raíces laterales (parámetro medido a través del análisis de longitud específica) y valores mayores en DAB. Las implicaciones de que un sistema radical sea fibroso y tenga una mayor cantidad de raíces laterales, pudiera reflejarse en abarcar una gran superficie para la absorción de agua y nutrimentos, lo cual ante condiciones de estrés como las del sitio de estudio, es de gran utilidad.

Como hemos analizado al momento, la inoculación dual fue la que presentó los valores más altos en las variables analizadas y, las plantas control y aquellas inoculadas con *P. tinctorius* los valores más bajos. Sin embargo, en el ensayo en campo esta tendencia cambia, pues a pesar de que el aporte en el desarrollo y supervivencia de los hongos micorrízicos es evidente, el comportamiento de *P. tinctorius* fue mejor en comparación de la endomicorriza y de la inoculación dual.

En ese sentido el que la inoculación con *P. tinctorius* presentara los valores mayores para todas las variables analizadas en campo, podría deberse a que se ha documentado que de manera generalizada las raíces micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* se desarrollan con mayor profusión que aquellas micorrizadas con otras especies de hongos micorrízicos, incluso se han observado redes de micelio de *Pisolithus* en el interior de rocas, lo que da idea de la capacidad pionera de este

hongo micorrízico capaz de utilizar agua y nutrientes inaccesibles a las raíces de los árboles.

Trabajos realizados por Plamboeck et al. (2007) muestran que la red de hifas participa activamente en el transporte del agua hacia la planta; fenómeno que explicaría también la tolerancia al estrés por sequía. En este sentido, investigaciones realizadas por Tagu et al. (1996) y Bucking et al. (2002) en plantas de *Eucalyptus globulus* Labill micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* muestran la expresión de genes que sintetizan pequeñas proteínas hidrofóbicas, llamadas hidrofobinas, que participan en la agregación de la hifa del HEM. La función principal de estas proteínas no se conoce con exactitud, pero se sabe que evitan la deshidratación del manto hifal y generan una barrera que limita la difusión de elementos como Ca, Mg y K a la raíz micorrizada, contribuyendo a la disminución del estrés por pH ácidos (Mankel et al. 2002), característica que también presenta el sustrato utilizado en nuestro ensayo. Así pues es de singular importancia el hecho de que *P. tinctorius* también pueda desarrollarse en los suelos con un pH elevado. En ese sentido se ha destacado la capacidad que tiene *P. tinctorius* a soportar suelos extremadamente ácidos convirtiéndolo en uno de los hongos micorrízicos más eficaces en suelos con condiciones de acidez extrema y elevadas concentraciones de metales pesados (Oria de Rueda, J. A., 1991).

Aunado a ello, Johansen et al., (1996), indican que la toma de N (tanto NO_3^- como NH_4^+), son asimiladas en el micelio del hongo. Esta forma de incremento de toma de N, puede estimular las enzimas involucradas en la asimilación de nitrógeno de la planta hospedante. Estos datos sugieren una relación positiva entre la contribución de N por la hifa y el estado metabólico/nutricional de la planta. Estos cambios pueden ayudar a la planta para resistir condiciones de sequía del suelo (Subramanian y Charest 1999) y coinciden con los resultados mostrados en campo, donde la fertilización nitrogenada si produjo un efecto positivo sobre la supervivencia de la planta y sobre su altura. A diferencia del ensayo en condiciones de mesocosmo, donde no se tenía el factor estrés por sequía y donde por el contrario, la fertilización nitrogenada causó un efecto negativo en la supervivencia en el crecimiento del fresno quedando por esclarecer si la dosis utilizada en los ensayos sería la adecuada para ser utilizada en el sistema, teniendo como antecedente el trabajo realizado por Baez-Pérez, (2011). Debido a lo cual se verificó mediante un experimento dosis-respuesta, diferentes concentraciones de fertilización nitrogenada (urea) y la respuesta en porcentaje de daño del fresno (fig. 1) en dos sustratos diferentes. Sin embargo, los resultados nos indicaron que la dosis utilizada en los ensayos (0.096 g de urea/planta) fué la idónea para el sistema, pues no causó daño aparente a la planta.

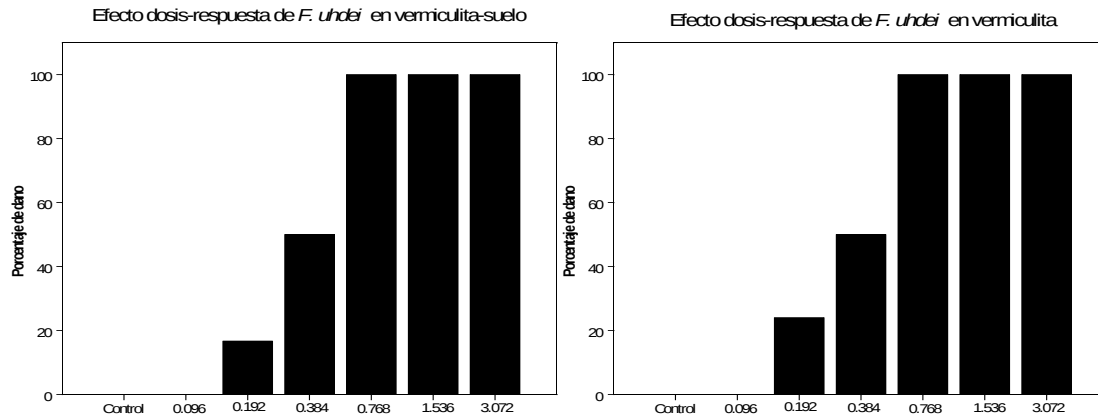


Figura 1. Porcentaje de daño de *F. uhdei* en las distintas dosis de urea

Otro factor que podría marcar la diferencia en la comparación que se está analizando, es en lo referente a la presencia de un mayor estrés por herbivoría en campo. En ese sentido se realizó un análisis (fig. 1), a fin de evaluar el porcentaje de daño en la planta causado por herbivoría (4 niveles de daño en la planta: 0-25, 25-50, 50-75 y 75-100 % de daño). El resultados reflejaron que las plantas que mayor porcentaje de daño presentaron fueron las inoculadas con *P. tinctorius*, interesantemente el tratamiento que presentó los valores mayores en las variables de crecimiento.

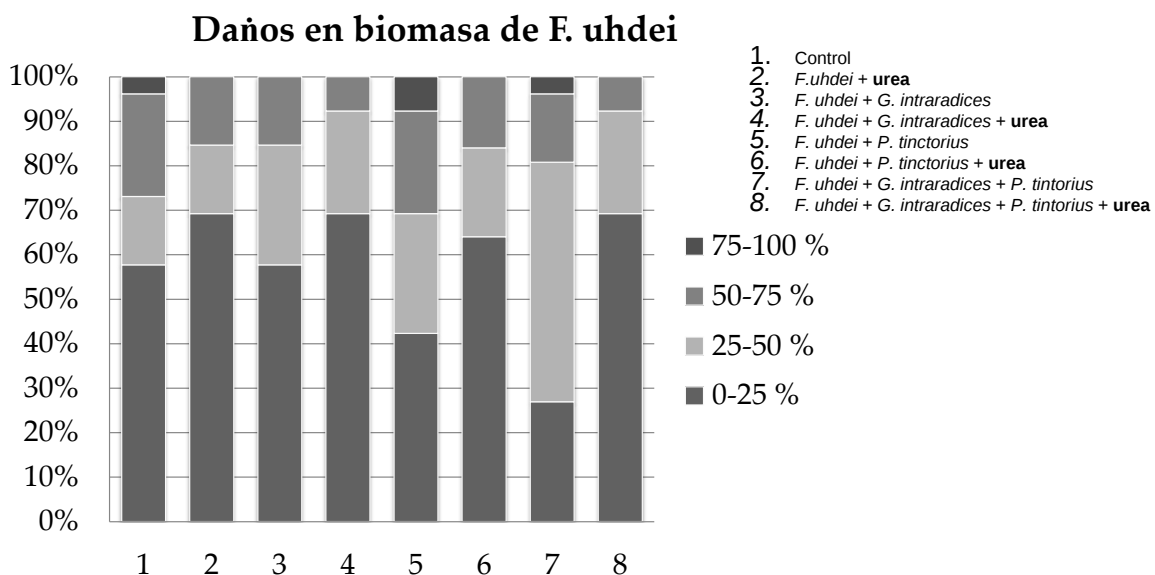


Figura 1. Porcentaje de daño en plantas de *F. uhdei* crecidas en campo en los diferentes tratamientos.

En ese sentido se ha documentado que la herbivoría afecta negativamente a las micorrizas, pero no es lo mismo si es acompañado de estrés ambiental. Si hay defoliación por herbívoros sumado al estrés ambiental no afecta mucho a las micorrizas. No hay una relación directa entre impacto de herbívoros y cambios en la colonización de micorrizas, pues las plantas tienen muchas estrategias de respuesta. Algunas ante la defoliación pierden raíces, en cambio otras incrementan la biomasa radicular y la exudación de las raíces, esto beneficia a las micorrizas, la respuesta es pues condicional.

Incluso altos niveles de crecimiento en las plantas y tejidos con nutrientes asociados con micorrizas no tienen por qué afectar positivamente a los herbívoros. Incrementos en el vigor de la planta pueden aumentar las habilidades de la misma para tolerar la herbivoría, aunque esto no está totalmente esclarecido.

Por otra parte, el que *P. tinctorius* desempeñe un papel más importante en el desarrollo de *F. uhdei* en condiciones de campo como las descritas en el presente estudio, pudiera ser clave para ser utilizada en estrategias de restauración de sitios severamente degradados ya que se ha documentado que la inoculación de plantas con *P. tinctorius* desde vivero disminuye el stress post-plantación, además de que una vez en campo los carpóforos permanecen de primavera al otoño siguiente. Esta larga permanencia, es un mecanismo que favorece la dispersión lenta y continuada aunado a que al emerger los carpóforos de *P. tinctorius*, éstos son capaces de romper las costras cuando no sean excesivamente gruesas (menores de 35 mm de grosor), por lo cual ejercen una labor realmente eficaz y beneficiosa ante escenarios como los descritos en el presente estudio. Sin embargo se tiene que seguir estudiando las interacciones entre una planta huésped y más de una especie de hongo micorrízico de manera simultánea ya que puede abrir posibilidades importantes para avanzar en la ciencia de las interacciones simbióticas y en sus aplicaciones para el manejo de ecosistemas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS GENERALES

- Ambriz, E., A. Báez-Pérez, J.M. Sánchez-Yáñez, P. Moutoglou y J. Villegas. 2010. *Fraxinus–Glomus–Pisolithus* symbiosis: Plant growth and soil aggregation effects. *Pedobiologia*. 53:369-373.
- Báez, P. A. L., Sánchez, N. J. y Villegas, M. J. 2010. Efecto de la simbiosis *Pisolithus tinctorius*-*Fraxinus uhdei*, bajo tres fuentes de N (NO_3^- , NH_4^+ y urea). *Ciencia Nicolaita* No. Especial 2010.
- Baez-Pérez, A. L., Gómez-Romero, M., Villegas J., De la Barrera E., Carreto M. L. y Lindig-Cisneros R. 2014. Inoculación con hongos micorrízicos y fertilización con urea de plantas de *Fraxinus uhdei* en acrisoles provenientes de sitios degradados. *Botanical Sciences*. *En prensa*.
- 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.
- Bocco, G. y F. García-Oliva. 1992. Researching gully erosion in Mexico. *Journal of Soil & Water Conservation*. 47: 365-367.
- Cañellas, I., Finat, L., Bachiller, A. y Montero, G. 1999. Comportamiento de planta de *Pinus pinea* en vivero y campo: ensayos de técnicas de cultivo de planta, fertilización y aplicación de herbicidas. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 8 (2): 335-359.
- Cicek, E., Yilmaz, F. y Yilmaz, M. 2010. Effect of N and NPK fertilizers on early field performance of narrow-leaved ash, *Fraxinus angustifolia*. 31: 109-114.
- 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.
- Davel, A., Tejera, L., Honorato, M. y Sepúlveda, E. 2001. Plantación de pino ponderosa: Control de malezas, tipos de plantas y fertilizantes. *Forestal*. 1:1-4.
- 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.
- Durán, Z. V. H. y Rodríguez, P. C. R. 2008. Soil-erosion and runoff prevention by plant covers. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 28:65–86
- Duryea, M. L. and T. D. Landis. 1984. Forest nursery manual. Production of Bareroot Seedlings. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers. Forest Research Laboratory, Oregon State University, Corvallis. Oregon USA. 385 p.
- Duvert, C., Gratiot, N., Evrard, O., Navratil, O., Némery, J., Prat, C. y Esteves, M. 2010. Drivers of erosion and suspended sediment transport in three headwater catchments of the Mexican Central Highlands. *Geomorphology*. 123: 243–256.
- Finlay, R.D., Ek, H., Odham, G. and Söderström, B. 1989. Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ¹⁵labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*. *New Phytologist*. 113:47-55.
- 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.
- 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.
- 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 NO₃⁻ dependent patterns of NO₃⁻ uptake in *Pinus pinaster*, *Rhizopogon roseolus* and their ectomycorrhizal association. *New Phytologist*. 154:509-516.
- Gómez-Romero, M., J. C. Soto-Correa, J. A. Blanco-García, C. Sáenz Romero, J. Villegas y R. Lindig Cisneros. 2012. Estudio de especies de pino para restauración de sitios degradados. *Agrociencia*. 46:795-807.
- Harley, J. L., y Smith S. E. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London. Pp. 180-190. Mycorrhizal Research (N. C. Schent, ed), pp 15-22. Am Phytopathol. Soc., st. Paul, Minnesota.

- ISRIC World Soil Information. 2013. http://www.isric.org/isric/webdocs/docs//major_soils_of_the_world/set6/ac/acrisol.pdf. Consultado Mayo, 2013.
- Johansen, A., Jakobsen, I. y Jense, E. S. 1993. Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N applied to the soil as ammonium or nitrate. *Biol Fert Soils*. 16:66-70.
- 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*. 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.
- Maass, J.M.M. y F. García-Oliva. 1990. La conservación de suelos en zonas tropicales: el caso de México. *Ciencia y desarrollo*, 90: 21-36.
- Mankel A., Krause K. y Kot E. 2002. Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1408-1413.
- Misbahuzzaman, K. y Newton, A. 2006. Effect of Dual Arbuscular ectomycorrhizal Inoculation on Mycorrhiza Formation and Growth in *E. camaldulensis* Dehnh. Seedlings Under Different Nutrient Regimes. *Int. J. Agri. Biol.* 8(6): 848-854.
- Oria de Rueda, J. A. 1991. Ecología de *Pisolithus tinctorius* en la provincia de Almería (SE de España). *Ecología* 5: 223-231.
- Plamboeck A. H., Dawson T., Egerton-Warburton L. M., North M., Bruns T. D. y Querejeta J.I. 2007. Water transfer via ectomycorrhizal fungal hyphae to conifer seedlings. *Mycorrhiza* 17: 439-447.
- 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.
- Pérez-Moreno, J. y Read, D. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivos que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*. 29:239-247.

- Pimentel, D. 2006. Soil erosion: a food and environmental threat. *Environment, Development and Sustainability*. 8:119–137
- Pohl, M., Alig, D., Körner, C., Rixen, C. 2009. Higher plant diversity enhances soil stability in disturbed alpine ecosystems. *Plant Soil*. 324:91–102.
- Pringle, A., Bever, J. D., Gardes, M., Parrent, J. L., Rillig, M. C. y Klironomos, J. N. 2009. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40:699–715
- R Development Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 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.
- 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.
- Schweiger, F., Rouhier, H. y Söderström, B. 2002. Visualisation of ectomycorrhizal rhizomorph structure using laser scanning confocal microscopy. *Mycological*. 116: 349-354.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 1997. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. <http://www.semarnat.gob.mx>
- Simard, S. W. y Durall, D. M. 2004. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Can. J. Bot.* 82: 1140–1165
- Smith, S. E., Facelli, E., Pope, S., Smith, S. E. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil*. 326:3–20
- Smith, S.E. y Read, D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edition, Academic Press, London, UK.
- 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.
- 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.
- Tagu D., Nasse B. y Martin F. 1996. Cloning and characterization of hydrophobins-encoding cDNAs from the ectomycorrhizal Basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. *Gene* 168: 93-97.
- 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
- Tyler, G. 1994. Ecología y Medio ambiente. 7° Ed. Grupo Editorial Iberoamericana, S.A. de C.V. México. 865 p.
- 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.