



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

**FORMACIÓN DE AGREGADOS DE SUELO EN LA
INTERACCIÓN SUELO-RAÍZ-MICROORGANISMOS
ENDÓFITOS: MICROMORFOLOGÍA Y ANÁLISIS DE
IMÁGENES**

ARTURO JIMÉNEZ MARTÍNEZ

T E S I S

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

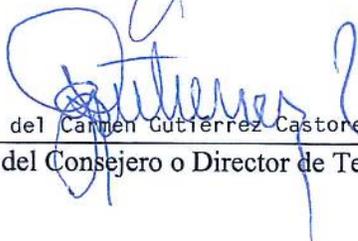
En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Arturo Jimenez Martínez, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor a Dra. Ma. del Carmen Gutiérrez Castorena, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis: Formación de agregados de suelo en la interacción suelo-raíz-microorganismos endófitos: micromorfología y análisis de imágenes.

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 17 de octubre de 2018


Firma del
Alumno (a)

*cbb.


Dra. Ma. del Carmen Gutiérrez Castorena
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **FORMACIÓN DE AGREGADOS DE SUELO EN LA INTERACCIÓN SUELO-RAÍZ –MICROORGANISMOS ENDÓFITOS: MICROMORFOLOGÍA Y ANÁLISIS DE IMÁGENES**, realizada por el alumno: **Arturo Jiménez Martínez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



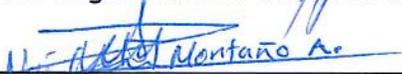
Dra. Ma. del Carmen Gutiérrez Castorena

ASESOR



Dr. Edgar Vladimir Gutiérrez Castorena

ASESOR



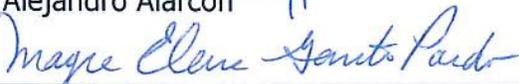
Dr. Noé Manuel Montaña Árias

ASESOR



Dr. Alejandro Alarcón

ASESORA



Dra. Mayra Elena Gavito Pardo

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2018

FORMACIÓN DE AGREGADOS DE SUELO EN LA INTERACCIÓN SUELO-RAÍZ-MICROORGANISMOS ENDÓFITOS: Micromorfología y análisis de imágenes

Arturo Jiménez Martínez, Dr.
Colegio de Postgraduados 2018

RESUMEN

Los agregados de suelo son unidades estructurales entre partículas elementales, que se constituyen como producto de las interacciones bióticas y abióticas. Entre los componentes bióticos interactúan las raíces, los hongos (saprótrofos, micorrízicos), la mesofauna y las bacterias. En el caso de los hongos se ha generalizado que su función es el enlazamiento de las partículas para dar origen a macroagregados, sin considerar que su morfología, capacidad de exploración y relación con el fitobionte son diferentes. Además, las metodologías que se han utilizado alteran el sistema edáfico por lo que se desconoce todo el proceso de agregación *in situ* y la participación de cada una de las especies de hongos. Este estudio se realizó utilizando varias escalas, desde macro (campo, invernadero y laboratorio campo) hasta micro-micromorfología. Además, se construyeron mosaicos de imágenes microscópicas de alta resolución usando diversas fuentes de luz, y con operadores espaciales (GIS) se construyeron mapas temáticos, y fueron llevados a cabo análisis de imágenes y matrices de confusión, además se usaron herramientas estadísticas. El suelo investigado corresponde a un Vitric Andosol de Calpulalpan, Tlaxcala México. En este suelo se presentaron en la capa superficial 10 especies de hongos micorrízico arbusculares, donde dominó *Funneliformis mosseae*. Los hongos se relacionaron con diferentes componentes del suelo a través de su micelio, algunos sólo con materia orgánica en diversas etapas de descomposición en el horizonte A, otros enlazando agregados y minerales amorfos como alofano e imogolita o bien, ensartando partículas inorgánicas (lapillis pomáceos de 3 mm con poros cavidad tubulares) en los horizontes subsuperficiales lo que evita la degradación de los Andosols. En invernadero (experimento de un año) se demostró que sin la participación de los hongos micorrízicos arbusculares (tratamiento testigo) la dinámica en la agregación de partículas es menor; *F. mosseae* y *Rhizophagus intraradices*, enlazaron agregados de tamaño medio hasta formar agregados muy gruesos (> 4.7 mm) y modifican la estructura apedal a migajosa con poros de empaquetamiento compuesto. *Gigaspora gigantea* sólo se relacionó con agregados finos y partículas inorgánicas en los primeros dos meses, pero sin modificar la estructura. Finalmente, en la interacción hongos ectomicorrízicos (*Suillus* sp., *Laccaria proxima* y *Hebeloma leucosarx*) con *Pinus greggii* y *P. patula* se encontró que cada especie varió tanto en su función para formar agregados de diferente tamaño (racimos, micro y cinco clases de macroagregados) como en su asociación con los componentes órgano-minerales (encapsulando o enlazando) y su distribución por el espacio poroso. Además, este proceso puede ser estimulado aún más dependiendo del fitobionte. La conclusión general es que los hongos interactúan e impactan de diferente manera en el proceso de agregación enlazando, encapsulando e insertando partículas orgánicas e inorgánicas de diferente naturaleza y formando diferentes tamaños de agregados, pero la jerarquía de agregación se manifiesta principalmente en macroagregados.

Palabras clave: Endo y Ecto micorrizas, estabilidad y tamaños de agregados, Andosols.

SOIL AGGREGATES FORMATION IN THE SOIL-ROOT ENDOPHYTIC MICROORGANISMS INTERACTION: Micromorphology and images analysis

Arturo Jiménez Martínez, Dr.
Colegio de Postgraduados 2018

ABSTRACT

Soil aggregates are structural units between elementary particles, which are formed as a product of biotic and abiotic interactions. Among the biotic components, roots, fungi (saprotrophic, mycorrhizal), mesofauna and bacteria interact with each other. In the case of fungi, it has been generalized that their function is binding particles to form macroaggregates, without considering that their morphology and exploration capacity and relationship with the phytobiont are different. In addition, the methodologies used alter the edaphic system, and the aggregation process *in situ* and the participation of each fungal species is unknown. This study was carried out using several scales, from macro (field, greenhouse and laboratory) to micro-micromorphology. In addition, high resolution microscopic mosaics were built using different light sources and with spatial operators (GIS), were constructed thematic maps, carried out image analysis and confusion matrices and statistical tools were also used. The soil investigated corresponds to a Vitric Andosol from Calpulalpan, Tlaxcala, Mexico. In this soil, 10 species of fungi dominated by *Funneliformis mosseae*, were present on the surface layer. Fungi were related to different soil components through their mycelium, some only with organic matter at several stages of decomposition in the A horizon, others link aggregates and amorphous minerals such as allophane and imogolite or thread inorganic particles (pomaceous lapillis of 3 mm with vesicles) in the subsurface horizons, which prevents the degradation of the Andosols. In one a 1-year greenhouse experiment there was less the dynamics in the aggregation of particles without the participation of mycorrhizal fungi (control treatment) *Funneliformis mosseae* and *Rhizophagus intraradices*, linked aggregates of medium size until forming very thick aggregates (> 4.7 mm) and modified the apedal to migajosa structure with compound packing voids. *Gigaspora gigantea* was related only to fine aggregates and inorganic particles in the first two months and did not modify soil structure. Finally, in the interaction ectomycorrhizal fungi (*Suillus sp.*, *Laccaria proxima* and *Hebeloma leucosarx*) with *Pinus greggii* and *P. patula* each species varied widely in its capacity to form aggregates of different sizes (clusters, micro and five macroaggregate classes) as well as in its association with the organo-mineral components (encapsulating or linking) and the porous space distribution. In addition, this process could be further stimulated depending on the phytobiont. The general conclusion is that fungi interact and impact differently in the aggregation process by linking, encapsulating and threading organic and inorganic particles of different nature and forming different sizes of aggregates, but the aggregation hierarchy is manifested mainly in macroaggregates.

Key words: *Endo and Ecto mycorrhizae, stability, size of soil, Andosols.*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Doctorado.

Al Colegio de Postgraduados y especialmente al área de Edafología, por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Agradezco profundamente el apoyo que se me brinda de manera incondicional por parte de los miembros de mi Consejo Particular en mi formación doctoral:

Dra. Ma. del Carmen Gutiérrez Castorena, por su apoyo incondicional durante mis estudios de maestría y doctorado, por su amistad y compartir conmigo sus conocimientos así como por mostrarnos a cada uno de sus estudiantes que “no importa qué tan adverso sea lo que la vida te presente, siempre hay una sonrisa para mostrarle al mundo.”

Dr. Edgar Vladimir Gutiérrez Castorena por su amistad y apoyo incondicional durante mi formación académica y por permitirme descubrir junto con la Dra. Carmen que existe todo un mundo de procesos por descubrir a través del análisis de imágenes.

Dr. Alejandro Alarcón por su amistad y apoyo para la realización del experimento y revisión de los manuscritos.

Dra. Mayra Elena Gavito Pardo, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo en el entonces CIEco durante (2006-2009) e inculcarme el interés por el estudio de los microorganismos del suelo, por su confianza y su apoyo en la revisión de los manuscritos en esta parte de mi formación académica.

Dr. Noé Manuel Montaña Arias, por su amistad y su apoyo incondicional durante mi formación académica y humana.

A los M. C. Patricio Sánchez, Alejandro Ruíz, Tania González, Eduardo Chimal, Enrique Suástegui y Dres. Lucía Y. Varela, Jesús Pérez, Ariadna Sánchez y Alma Cuellar así como los Biól. Sandra Marín y Ricardo Valencia por su amistad y apoyo en diferentes momentos de mi formación doctoral.

Al personal administrativo y Laboratorio del área de Génesis, Morfología y Clasificación de Suelos (Sres. Carmelita Bojorques, Pedro Torres, Lino Espinosa, Moises Andrade, Francisco Lobato y Juan Zaragoza) y Física de Suelos (Dr. Victor Ordaz y Sr. Oscar Ayala) por su apoyo, amistad, por compartir conmigo el sagrado alimento y buenos momentos.

A mis compañeros y Amigos: Juan Carlos Sandoval, Rosa Villafuerte, Ricardo y Alfredo González, Iris Morales, Monserrat Barragán, Gabriel Hernández, Rosalba Monroy, Nefertiti de la Vega, Virginia Ortíz, Anaitzi Carrera, Carito Guerrero, Vianey Mendoza, Sigríð Cazares, Jorge Sambrano, Alfonso Villegas, Deisy Pineda, Araceli López, Edgar Barrales y Martin Aquino por su incondicional amistad, por estar conmigo en los instantes precisos. A todos y cada uno de ustedes muchísimas gracias hermanitos, por su cariño.

DEDICATORIA

Con gratitud y amor a la memoria de mis padres:

Dr. Epifanio Jiménez Ávila

Biól. Aurora Martínez Vara.

A mi hermano Leonardo, compañero guerrero de múltiples batallas; poeta y amigo. Por permitirme siempre estar en tu corazón, palabra, mente y espíritu.

A Alejandra Juarez Mondragón

Por su amor y luchar a mi lado y mostrarme el aspecto social, cultural y humano del quehacer científico.

A mis primos y sobrinos quienes me inspiran y motivan día con día

A los miembros, directivos, compañeros académicos y alumnos del Centro de Estudios para el Desarrollo Rural, por abrirme sus puertas y poder inculcar a estos últimos el interés por el estudio de los microorganismos del suelo.

A la memoria de mis profesores y amigos caídos:

Dres. Antonio Trinidad y Roberto Quintero, M.C. Regulo León y Rafael Muñoz, Biól. Enrique Maciel y Sres. Bibiano Ramírez, Carlos Jiménez y Manuel Coronado.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	viii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE CUADROS	xvi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Interacciones bióticas en la formación de agregados del suelo	3
Efecto de las plantas (raíces) en la agregación del suelo.....	5
Modelos de formación de agregados	9
Bacterias y agregación de suelo.....	14
Plantas.....	15
Técnicas de estudio (muestras alteradas).....	17
Micromorfología para análisis de interacciones bióticas en el suelo	18
Análisis de imágenes	18
Conclusión de la revisión bibliográfica	20
Literatura citada.....	21
CAPÍTULO I. EL PAPEL DE LOS HONGOS EN LA CONSERVACIÓN DE ANDOSOLS	25
1.1 INTRODUCCIÓN	27
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	28
1.2.1 Área de estudio	28
1.2.2 Fase de campo	29
1.2.3 Análisis de laboratorio.....	29
1.2.4 Aislamiento, cuantificación, identificación y abundancia de esporas de HMA..	30
1.2.5 Análisis micromorfológico	31
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31

1.3.1	Propiedades edáficas.....	31
1.3.2	Riqueza y abundancia de esporas de hongos micorrízico arbusculares	37
1.3.3	Relación hongos/ componentes del suelo.....	38
1.3.3.1	Análisis micromorfológico	38
1.4	CONCLUSIONES	40
1.5	REFERENCIAS.....	41
CAPÍTULO II. FORMACIÓN DE AGREGADOS EN LA INTERACCIÓN SUELO–HONGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR		44
RESUMEN.....		45
2.1	INTRODUCCIÓN	46
2.2	MATERIALES Y MÉTODOS	49
2.2.1	Localización del sitio de muestreo	49
2.2.2	Propagación de inóculo micorrízico.....	50
2.2.3	Construcción de la unidad experimental	50
2.2.4	Diseño experimental.....	51
2.2.5	Determinación de la estabilidad de agregados	53
2.2.6	Análisis micromorfológico.....	53
2.2.7	Construcción de mosaicos	54
2.2.8	Análisis de imágenes	54
2.2.9	Análisis de datos.....	56
2.3	RESULTADOS	56
2.3.1	Estabilidad de agregados	56
2.3.2	Análisis micromorfológico de la interacción HMA-Agregados de suelo	59
2.4	DISCUSIÓN	67
2.5	CONCLUSIONES	71
2.6	REFERENCIAS.....	72
CAPÍTULO III. FORMACIÓN DE AGREGADOS DE SUELO EN LA INTERACCIÓN SUELO- <i>Pinus</i> - y HONGOS ECTOMICORRÍZICOS.....		75
RESUMEN.....		76
3.1	INTRODUCCIÓN.....	77

3.2	MATERIALES Y MÉTODOS	80
3.2.1	Material biológico	80
3.2.2	Características de la mezcla de sustratos	80
3.2.3	Diseño experimental	80
3.2.4	Análisis micromorfológico	81
3.2.5	Adquisición de imágenes y construcción del mosaico	83
3.2.6	Clases de tamaños de agregados	84
3.2.7	Evaluación de la precisión	85
3.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
3.3.1	Formación y distribución de macro y microagregados	86
3.3.2	Clases de tamaño de partículas asociadas con micelio ecto micorrízico.....	90
3.3.3	Mapas temáticos	97
3.3.4	Evaluación de la precisión	98
3.4	CONCLUSIONES	103
3.5	REFERENCIAS.....	104
	CONCLUSIONES GENERALES	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Interacciones inter e intraespecíficas que contribuyen a la formación y estabilidad de agregados	4
Figura 2. Modelo jerárquico de formación de micro y macroagregados Tisdall y Oades (1982) complementado por Oades (1984)	10
Figura 3. Factores bióticos y abióticos que interactúan e influyen en la formación y estabilidad de agregados. Six <i>et al.</i> (2004).....	11
Figura 4. a) Modelo de formación de agregados propuesto por Miller y Jastrow (1992) y Lehmann y Rillin (2015).	13
Figura 5. Formación de macroagregados después de un disturbio.....	13
Figura 6. Visión general de las bacterias y hongos micorrízico arbusculares en la formación de agregados del suelo. Rashid <i>et al.</i> (2016).....	15
Figura 7. Representación del crecimiento radical y micelial para la formación de agregados de suelo. Mecanismos radical, fúngico micorrízico y bacteriano en la interacción con partículas de suelo para la formación de macro y microagregados. Rillig y Mummey (2016)	16

CAPÍTULO I

Figura 1.1. a) Zona de estudio; b) suelo agrícola; c) bloques de <i>Pinus patula</i> Schl. et cham/pastizal; d) bloque de pino en San Felipe, Calpulalpan Tlaxcala, México.	30
Figura 1.2. Perfiles de suelos de acuerdo con su posición geomorgológica y material parental. a) pendiente alta b) pendiente media y c) pendiente baja de un Vitric Andosols de Calpulalpan, Tlaxcala. * Ceniza volcánica, **lapillis.	33
Figura 1.3 Interacción radical con agregados en horizontes de diferentes perfiles a) horizonte O en bosque de pino (pendiente baja), b) horizonte A en bosque de pino (pendiente alta), c) horizonte 2C (pendiente media) y d) acercamiento donde aprecian las hifas y raíces formando cuentas de partículas de pomez.	34

Figura 1.4. Especies de hongos micorrízico arbusculares del suelo en el horizonte A de un Vitric Andisol en Calpulalpan, Tlaxcala. México.	37
Figura 1.5. Micelio de hongos micorrizicos arbusculares asociados con diferentes componentes del suelo. a) con residuos orgánicos; b) con macroagregados; c) con imogolita, flecha azul (fíbulas); y d) con piedra pómez (flecha azul) y espacio poroso. Luz Polarizada Plana. Victric Andosols de un bosque de Calpulalpan Tlaxcala México.	38

CAPÍTULO II

Figura 2.1. A. Diagrama del sistema experimental A). 1. Extensión 2. Contenedor para planta hospedera; 3 malla de organza (0.5 μm^2); 4. Rejilla plástica (0.250 cm^2); 5. Malla 34 μm^2 ; 6. Abrazadera; 7. Unidad experimental (tubo PVC 10 cm) con tres orificios; 8. Malla de organza; 9. Sujetador. B). Contenedor para crecimiento de la planta hospedera <i>Trifolium subterraneum</i> L. (compartimento central) y unidades experimentales.	52
Figura 2.2. Diseño experimental completamente al azar de los tratamientos de inoculación bajo condiciones de invernadero.	52
Figura 2.3. Esquema general para el análisis micromorfológico de la interacción entre macro/ microagregados de suelo y los hongos micorrízico arbuscular mediante secciones delgadas y análisis de imágenes usando operadores espaciales.	55
Figura 2.4. Dinámica de formación de macro y microagregados estables en agua en los tratamientos de inoculación.	59
Figura 2.5. Desarrollo de agregados de diferentes tamaños generados por <i>Rhizophagus intraradices</i> durante un año experimental. La microestructura inicia como apedal (compacta), microagregados entre granos (60-150 días) y termina en una estructura .migajosos y una porosidad de empaquetamiento complejo (225 y 365 días).	62
Figura 2.6. Micelio de HMA (flechas verdes) asociado con agregados y minerales. A) <i>Gigaspora gigantea</i> ; B) <i>Rhizophagus intraradices</i> , C) <i>Funneliformis mosseae</i> y D) Mayor detalle de C. Luz Polarizada Plana.	64

Figura 2.7. Mapas temáticos de agregados de mosaicos de cuatro imágenes (22.03×14.80 mm) mostrando distribución de macro y microagregados de suelo in situ, de los cuatro tratamientos de inoculación 30 y 365 días después de la siembra. Estructuras apedales (a, b, c, d, e, g). Estructura migajosa (f y h). Poros cavidad (b y c) fisuras (d) y de empaquetamiento compuesto (f y h).....	65
Figura 2.8 Mapas temáticos de los tratamientos inoculados. Micelio micorrízico (flechas) asociado con micro y macroagregados formando una estructura migajosa, poros de empaquetamiento compuesto y micro-porosidad interna. Mosaicos de cuatro imágenes; objetivo 10×.....	66

CAPÍTULO III

Figura 3.1. Cortes de los tubetes (horizontal y vertical) y elaboración de secciones delgadas (corte, pegado y pulido con diferentes abrasivos).	82
Figura 3.2. Representación esquemática de la elaboración de mosaicos, análisis de imágenes y generación de mapas temáticos para analizar y cuantificar la interacción ectomicorrízica-suelo-planta en secciones delgadas. Metodología propuesta por Gutiérrez-Castorena <i>et al.</i> (2016; 2018).	85
Figura 3.3. Mapas temáticos de la distribución de macro y microagregados de los tratamientos de inoculación con <i>Pinus greggii</i> como planta hospedera. Mosaicos 2.5 × 5 cm; luz polarizada plana; objetivo 2×.....	89
Figura 3.4. Mapas temáticos de la distribución de macro y microagregados de los tratamientos de inoculación con <i>Pinus patula</i> como planta hospedera. Mosaicos 2.5 × 5 cm; luz polarizada plana; objetivo 2×.....	90
Figura 3.5. Macro y microagregados unidos por micelio de <i>Suillus</i> sp. con raíces de <i>Pinus greggii</i> (mosaico 9 imágenes) y <i>Pinus patula</i> . Mosaico de 42 imágenes y sus respectivos acercamientos (10× y 20×) con luz polariza cruzada.	92
Figura 3.6. Macroagregado enlazado con micelio de <i>Laccaria proxima</i> con raíces de <i>Pinus greggii</i> . y <i>Pinus patula</i> . Mosaico de nueve imágenes en luz polarizada plana, objetivo 10×.....	93

Figura 3.7. Macroagregado enlazado con micelio de <i>Hebeloma leucosarx</i> . Tratamiento con raíces de <i>Pinus greggii</i> y <i>Pinus patula</i> . Mosaico de nueve imágenes. Luz polarizada plana y luz ultravioleta; Objetivo 10×.	94
Figura 3.8. Microagregado enlazado con micelio de a) <i>Laccaria proxima</i> b) <i>Hebeloma leucosarx</i> y c) <i>Suillus</i> sp. Mosaico de 9 imágenes en LPP, LUV y LPC; objetivo 10×.	95
Figura 3.9. Mapa temático de la distribución micelial de tres especies de hongos ectomicorrízicos en la interacción con macro, microagregados y clusters con <i>Pinus greggii</i> . Mosaico integrado por nueve imágenes; luz polarizada cruzada, objetivo 10×.	100
Figura 3.10. Mapas temáticos de la distribución micelial de tres especies de hongos ectomicorrízicos en la interacción con macro, microagregados y clusters con <i>Pinus patula</i> . Mosaico 9 imágenes en luz polarizada plana, objetivo 10 ×.	101

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO I

Cuadro 1.1. Propiedades químicas de los suelos estudiados en Calpulalpan, Tlaxcala, México.	35
Cuadro 1.2. Propiedades físicas de los suelos estudiados de Calpulalpan, Tlaxcala. México.	36

CAPÍTULO II

Cuadro 2.1. Análisis de regresión entre la formación de agregados estables en agua y los diferentes los tratamientos de inoculación de HMA a través de un año.	57
Cuadro 2.2. Prueba de comparación de medias Tukey de agregados estables entre tratamientos de inoculación ($\alpha \leq 0.05$) a través del tiempo.	58
Cuadro 2.3. Porcentaje promedio de clases de agregados de suelo <i>in situ</i> en los diferentes tratamientos de inoculación por imagen individuales a $2\times$ ($n=5$).	60
Cuadro 2.4. Número y porcentaje de agregados de suelo <i>in situ</i> por clase de tamaño en los tratamientos de inoculación obtenidos en mosaicos de 4 imágenes ($2\times$).	63

CAPÍTULO III

Cuadro 3.1. Características morfológicas de los hongos ectomicorrízicos utilizados como micobiontes.	82
Cuadro 3.2. Características morfológicas de las especies de pino en los tratamientos de inoculación dos años después de la siembra.	83
Cuadro 3.3. Porcentaje de la formación de macro y microagregados de los tratamientos de inoculación con ambas especies de pino.	87
Cuadro 3.4. Porcentaje de formación de racimos, macro y microagregados y micelio en los tratamientos inoculados con ambas especies de pino en mosaicos de nueve imágenes y objetivo $10\times$	98
Cuadro 3.5. Matriz de confusión producto de selección de agregados y poros. Mosaicos construidos a $2\times$ (LPP).	102

Cuadro 3.6. Matriz de confusión producto de selección de agregados, poros y minerales. Mosaicos contruidos a 10×. Luz polarizada cruzada más compensador.	102
Cuadro 3.7. Matriz de confusión producto de micelio de <i>Suillus</i> sp. y poros. Mosaicos contruidos a 10×. Luz polarizada cruzada.....	102
Cuadro 3.8. Matriz de confusión producto de selección de micelio de <i>Hebeloma leucosarx</i> y poros. Mosaicos contruidos a 10×. Luz ultravioleta.	103
Cuadro 3.9. Matriz de confusión producto de selección de micelio de <i>Laccaria proxima</i> y poros. Mosaicos contruidos a 10×. Luz polarizada cruzada mas comensador.	103

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los agregados de suelo son unidades estructurales producto de diversas interacciones tanto físicas y químicas como biológicas, en un conjunto de condiciones ambientales. Existe un sin número de publicaciones relacionadas con el papel de la biota en la formación de agregados desde la función de las raíces con diferente arquitectura para formar y enlazar agregados de diferente tamaño, el papel de la mesofauna encargada de fragmentar el mantillo, las lombrices y su capacidad para formar agregados estables a través de su tracto digestivo hasta las termitas y hormigas que con el uso de saliva contribuyen en la formación de agregados estables. Particularmente, los hongos enlazan racimos, macro y microagregados en conjunto con las comunidades bacterianas, las cuales a través de biofilms estabilizan los agregados y degradan a la materia orgánica. Se ha generalizado en el proceso de formación de agregados, los hongos atrapan partículas orgánicas e inorgánicas para formar agregados de diferente tamaño. No obstante, los hongos tienen diferente morfología y capacidad para explorar grandes áreas de suelo a través de su micelio formando redes tridimensionales. Además, se ha reportado que las especies fúngicas micorrízicas tienen diferente capacidad para transportar nutrimentos a su planta hospedera, por lo que también deben tener diferente habilidad para formar agregados estables de diferentes tamaños. El presente trabajo abarca el estudio de las comunidades fúngicas y su papel en la formación de agregados y conservación de Andosols, así como su interacción con la materia orgánica, las partículas minerales, y los nichos ecológicos a través del estudio de las propiedades del suelo (Capítulo I). Asimismo, se estableció un experimento donde se reporta el papel de tres especies de hongos micorrízico arbusculares en la formación de agregados estables en agua y las interacciones del micelio con las partículas de suelo, para la

formación de unidades estructurales a través del análisis de imágenes en secciones delgadas (Capítulo II). Finalmente, se estudió el papel de las especies de plantas y hongos en la interacción con partículas de suelo y formación de racimos, micro y macroagregados, utilizando mapas temáticos construidos con mosaicos de alta resolución y análisis de imágenes en un estudio realizado con tres especies de hongos ectomicorrízicos asociados con dos especies de pino (Capítulo III).

REVISIÓN DE LITERATURA

ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN LA FORMACIÓN Y ESTABILIDAD DE AGREGADOS DE SUELO

Los agregados de suelo son unidades estructurales entre partículas minerales elementales (arcillas, limos y arenas), que se constituyen como producto de la acción de procesos físicos, químicos y biológicos, así como con las prácticas utilizadas cuando existe manejo (Misra *et al.*, 1988; Bronick y Lal, 2005; Kasper *et al.*, 2009). Los agregados del suelo se agrupan por su tamaño en macro ($250 < 2000 \mu\text{m}$) y microagregados ($< 250 \mu\text{m}$) (Tisdall y Oades, 1982).

En la presente revisión se aborda el papel de algunos grupos biológicos como plantas (raíces) y hongos en la formación de agregados, y algunos modelos que se han planteado para este propósito. Además, se mencionan algunas técnicas que se emplean para abordarlos (principalmente a los hongos micorrízicos) así como, los estudios micromorfológicos y de análisis de imágenes de sistemas inalterados, que son herramientas complementarias para comprender quienes participan en la agregación y cómo se lleva a cabo la formación de agregados a través del micelio, así el cómo es la participación las partículas orgánicas e inorgánicas del suelo en este proceso.

Interacciones bióticas en la formación de agregados del suelo

Bedini *et al.* (2009) encontraron que las especies asociadas con los agregados del suelo y con la porosidad, así como con las propiedades microclimáticas (temperatura, humedad y aireación) del suelo, determinan la funcionalidad en la agregación como consecuencia del aporte continuo de materia orgánica (MO) y su descomposición. Esto demuestra que en la formación de agregados del suelo se establecen escenarios importantes a través de diferentes interacciones

entre diversas poblaciones y comunidades bióticas (Figura 1) o condiciones ambientales (Dangerfield *et al.*, 1998; Chivenge *et al.*, 2011).

Nie *et al.* (2010) indicaron que desentrañar las interacciones entre los microorganismos y los agregados es un reto, por lo que existe una clara necesidad de mejorar nuestra comprensión de los procesos involucrados, en diversos escenarios. Asimismo, es preciso entender el papel de los microorganismos en el proceso de agregación, abarcando sus interacciones con otras especies.

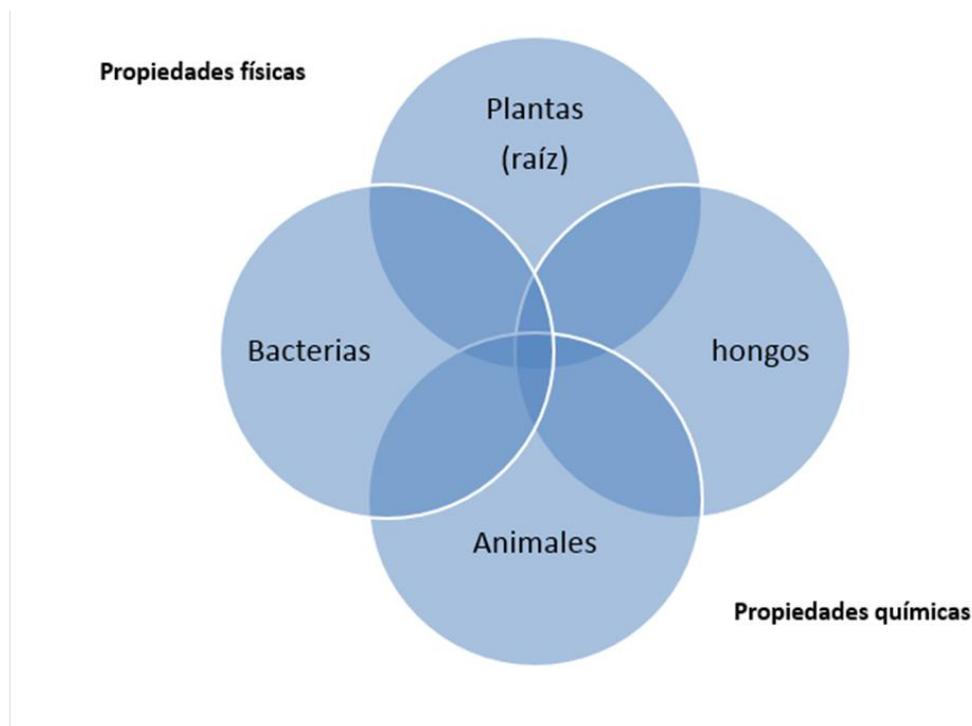


Figura 1. Interacciones inter e intraespecíficas que contribuyen a la formación y estabilidad de agregados del suelo.

Efecto de las plantas (raíces) en la agregación del suelo

Las plantas desarrollan raíces de sostén, exploración y absorción, las cuales, conforme a su diámetro, forma de crecimiento, etapa fenológica y arquitectura, modifican la estructura del suelo a través de su crecimiento vertical y horizontal en la búsqueda continua de nutrientes. Esto influye en la formación de diferentes tipos de poros, el tamaño de los agregados, el aporte de MO así como, la liberación de exudados radicales que impactan en el crecimiento de los microorganismos circundantes a la rizósfera (Miller y Jastrow, 1990; Eviner y Chapin, 2003; Postma y Lynch 2012).

Como consecuencia del paso de las raíces a través del suelo se propicia la formación de macroporos, así como el enlace y atrapamiento de macroagregados (con mayor espacio poroso y concentración de nutrientes). Asimismo, las raíces excretan mucílago rico en azúcares que favorece la formación de microambientes fértiles que son colonizados por los microorganismos, logrando que el agregado sea más estable (Angers y Caron, 1998). Este mucílago está compuesto de diferentes polisacáridos que se adsorbe a la arcilla, lo que facilita la retención de las partículas orgánicas y minerales propiciando una fuente de carbono para los microorganismos (Morel *et al.*, 1991).

Rillig *et al.* (2014) reportaron que la formación de agregados del suelo es el resultado de múltiples procesos estimulados por la comunidad de hongos y por las raíces, con lo que se puede predecir cuáles suelos están bajo mayor riesgo de degradación así como proponer algunas estrategias de manejo adecuadas para su recuperación (Gregory, 2006).

Miller y Jastrow (1990) mencionaron que el proceso de formación de agregados estables en el suelo depende del tipo de las raíces asociadas con el micelio micorrízico (MM), que en conjunto contribuyen mayoritariamente a este proceso, en comparación con las raíces no

colonizadas. Además, indicaron que el MM por sí solo también contribuye significativamente a la formación de agregados estables. Burry *et al.* (2013) reportaron que *Glomus etunicatum*, *R. intraradices* y *G. claroidesum*, en asociación con raíces de *Lolium perenne* y *Anthyllis vulneraria*, disminuyeron la erosión causada por el viento como consecuencia de un mayor desarrollo de raíces colonizadas por estos hongos y del micelio externo, que retuvo partículas orgánicas y minerales del suelo con mayor eficiencia, en comparación con las raíces no inoculadas. Por su parte, Miller y Mummey (2006) sugirieron que además de las interacciones con la raíz hospedera y los diversos microorganismos como bacterias, la morfología micelial micorrízica en diferentes especies de hongos es un aspecto a considerar en el proceso de formación y estabilidad de los agregados.

Finalmente, Piotrowski *et al.* (2004) encontraron que el tamaño de agregados asociados con MM no sólo se relaciona con la especie fúngica, sino también con el fitobionte. En ese sentido, la capacidad para formar agregados está supeditada a la calidad de exudados radicales (carbohidratos, aminoácidos [orgánicos y grasos], compuestos fenólicos, vitaminas y volátiles) que la raíz proporciona y los cuales varían tanto en calidad como en cantidad entre especies. Esto se refleja en la capacidad del micobionte para colonizar a la planta, desarrollar micelio extraradical y formar esporas (Graystone *et al.* 1997; Rai y Varma, 2011).

Los hongos tienen dos formas principales de desarrollo: colonial, en el caso los hongos levaduriformes y filamentoso, típico de la mayoría de hongos y actinomicetos. Ambas formas influyen en la incorporación, transformación y descomposición de la MO, permitiendo la estabilización de la unión de las partículas orgánicas y minerales para la formación los agregados en el suelo (Anderson, 1988; Pohjanen *et al.*, 2014).

En la escala de los microagregados, la biota involucrada en este proceso incluye a los microorganismos saprótrofos, encargados de la unión adhesiva entre partículas (Daynes *et al.*, 2012), HMA y HEcM (Ambriz *et al.*, 2010; Rillig *et al.*, 2010) y los exudados radicales (Morel *et al.* 1991). Los microagregados persistentes y los desechos orgánicos se unen en macroagregados menos estables a través de factores más transitorios, como el enmarañamiento por hifas y raíces finas en primera instancia (Six *et al.*, 2004). Las bacterias, por su parte, participan en la interfase sólido-líquido, exploran poros y forman microagregados uniendo partículas a través de biofilms conformados por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Los biofilms proporcionan estabilidad mecánica y ayudan a la adhesión entre partículas formando una red de polímeros cohesivos de manera tridimensional dentro de la matriz del suelo (Cuadro 1) (Flemming y Wingender, 2010; Totsche *et al.*, 2017).

Nie *et al.* (2014) encontraron que el tamaño de los agregados del suelo ejerce un fuerte impacto en la dinámica del C y la actividad enzimática de los microorganismos que se relaciona con su disponibilidad, producto de la descomposición y la disminución del tamaño de agregados. Lo anterior se debe a una concentración de C en los microagregados en comparación con los macroagregados; por lo tanto, la distribución de los agregados se afecta tanto por la acción de los procesos físicos como por factores ambientales y biológicos. Por su parte, Leifheit *et al.* (2014) reportaron que los efectos de los HMA son más pronunciados en suelos pobres en nutrientes y con bajo contenido de materia orgánica. De esta manera, los efectos de HMA en la agregación del suelo son más fuertemente influenciados por la textura que por la materia orgánica.

Cuadro 1. Raíces y microorganismos en la formación de agregados (Totsche *et al.*, 2017)

Clase	Tipo	Ejemplos	Papel en la formación	Estabilidad y mecanismos de interacción
Biota	Raíces finas	Árboles, arbustos, hierba	Exudados radicales	Enmarañamiento por interacción mecánica (EIM)
	Hifas	HMA, HecM, saprofitos	Segregación de mucílagos	EIM y fisicoquímicas (IFQ), hidrofobicidad
	Bacterias, arqueas, hongos	Comunidades bacterianas y fúngicas	Formación de biofilms y otras sustancias	Cohesión por IFQ
Materia orgánica (MO)	MO particulada	Restos de raíces y distintos tejidos	Núcleos de formación	Cohesión por IFQ
	MO humificada	Ácidos húmicos	Agentes cementantes	Sorción y cohesión por IFQ y químicas
	MO carbonizada	Ollín, carbón orgánico	Precipitación	Sorción y cohesión por IFQ y químicas
Moléculas orgánicas	Proteínas	Glomalina, hidrofobinas	Agentes cementantes, superficie de alteración	Sorción y cohesión (CoE) por IFQ y químicas
	Polisacáridos	Lignina celulosa, hemicelulosa	Agentes cementantes, superficie de alteración	Sorción y cohesión por IFQ y químicas
	Lípidos	Ácido láurico y oleico	Agente cementante, humectabilidad, superficie de alteración	Sorción y cohesión por IFQ y químicas
	Sustancias extracelulares poliméricas	Mezcla de proteínas, polisacáridos, lípidos, ácidos nucleicos	Agente cementante, humectabilidad, biofilm y revestimiento de superficies	Aglutinación y cohesión por IFQ y químicas e incrustación y atrapamiento
	Mucílago	Glicoproteínas, polisacáridos	Agente cementante	Aglutinación y CoE por IFQ

Wilson *et al.* (2009) encontraron una correlación entre la degradación de macroagregados y la disminución de actividad micelial micorrízica, con lo que se demostró el papel de los HMA en la recuperación y mantenimiento del suelo en los agroecosistemas. Sin embargo, aunque no soslayaron la importancia de otros microorganismos asociados con las hifas en el proceso de agregación, las bacterias, por ejemplo, no se consideraron. Graf y Frei (2013) propusieron además, que el micelio micorrízico podría actuar como una red flexible de hifas debido a su resistencia a la tracción y la liberación de glomalina en el suelo. En ese sentido, la estabilidad de los agregados, depende no sólo de la longitud sino también del arreglo micelial, en función de la planta hospedera y la especie fúngica asociada.

Duchicela *et al.* (2013) reportaron que se necesitan estudios donde se considere la estabilidad de agregados después de una perturbación, ya que sin estos, es difícil predecir su recuperación tras el abandono.

Modelos de formación de agregados

La teoría jerárquica de la agregación, propuesta por Tisdall y Oades (1982) plantea que los microagregados se unen para formar macroagregados, donde los enlaces químicos de los aluminosilicatos en microagregados (por la presencia de arcillas unidas a la materia orgánica y cationes polivalentes) se enlazan entre sí.

Dos años más tarde, Oades (1984) postuló que las raíces y las hifas que mantienen unido el macroagregado forman un núcleo basal a partir de microagregados; las raíces y las hifas son agentes de unión temporal, ya que no persisten y se descomponen en fragmentos. Estos, recubiertos con mucílagos producidos durante la descomposición se enlazan con arcillas que dan como resultado el inicio de un microagregado dentro de un macroagregado (Figura 2).

Asimismo, los procesos de agregación también obedecen a una jerarquía sucesiva de organización biológica interactuando con factores físicos y químicos del suelo a diferentes escalas (Six *et al.*, 2004) (Figura 3).

Shipitalo y Protz (1989) presentaron un modelo para la formación de microagregados por lombrices, donde estos anélidos promueven directamente la formación de microagregados con materia orgánica. La ingestión de suelo y arena mezclado con materia orgánica destruye por completo la microestructura preexistente de un suelo. Durante el tránsito intestinal, sin embargo, los minerales de arcilla y los materiales orgánicos se mezclan e incrustan para crear un nuevo núcleo para la formación de microagregados. Dentro de los moldes excretados, el secado y el envejecimiento, es decir, el endurecimiento, facilitan el fortalecimiento de los enlaces entre los materiales orgánicos, la mucosidad y los minerales para estabilizar los microagregados recién formados.

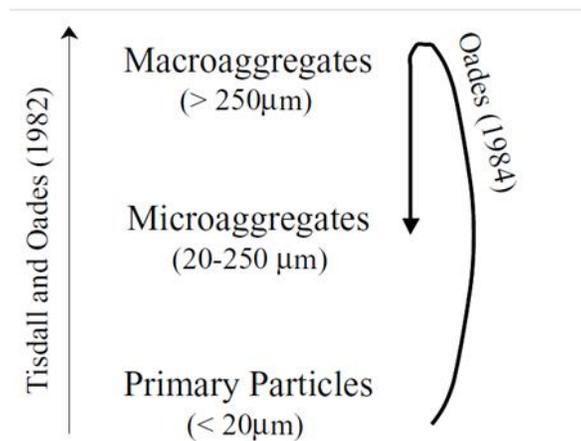


Figura 2. Modelo jerárquico de formación de micro y macroagregados Tisdall y Oades (1982) complementado por Oades (1984)

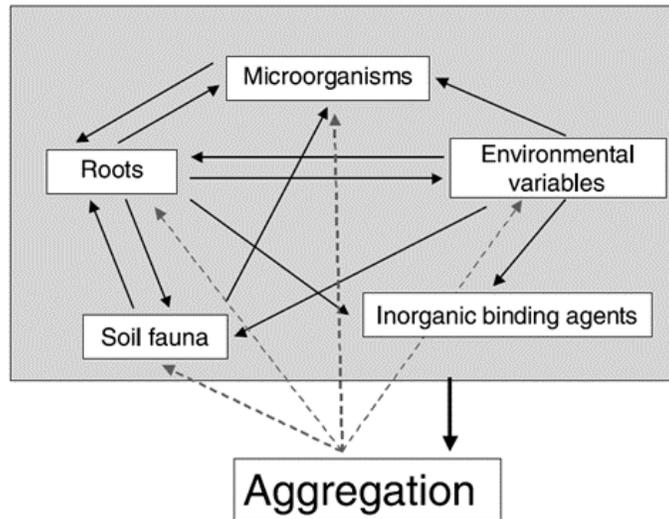


Figura 3. Factores bióticos y abióticos que interactúan e influyen en la formación y estabilidad de agregados en un suelo. Six *et al.* (2004).

De acuerdo con Blanchart *et al.* (1990) la velocidad de agregación del suelo por estos anélidos se incrementa principalmente por tres factores: el tipo de suelo (coloides presentes en el sistema), la especie de lombriz (capacidad para secreción de mucus) y sus interacciones con otros componentes bióticos de su entorno, así como por la capacidad de ingestión (tipo de material orgánico a ingerir, procesar, degradar, transformar y liberar en forma de agregados estables). Los macroagregados formados por lombrices se forman a partir de microagregados enriquecidos por materia orgánica, por lo que la calidad de estos componentes estructurales del suelo, depende del manejo, velocidad y el grado de descomposición de la MO presente (Pulleman *et al.*, 2005).

Muchos de los macroagregados son posteriormente estabilizados por hifas micorrízicas en donde ocurren tres procesos distintos y complementarios (Miller y Jastrow, 1992): 1. las hifas

envuelven a las partículas primarias del suelo; 2. Las raíces e hifas establecen condiciones para la formación de microagregados en el suelo; y 3. Las raíces e hifas enmarañan y unen microagregados y macroagregados pequeños para formar macroagregados más grandes (Figura 4a).

Lehmann y Rillin (2015) propusieron un modelo de formación de agregados con hongos saprótrofos basado en la forma, el enredado, el entrecruzamiento y la adhesión de partículas a través de su micelio. Los resultados reportados por estos autores indican la importancia de construir modelos de formación de agregados a través de bases de datos sustentados en rasgos iterativos característicos de diferentes hongos, entre ellos los micorrízicos, para poder entender más la relación entre crecimiento micelial, exudados, procesos enzimáticos, y su interacción con la MO para la formación de agregados. En el proceso de formación, la tracción micelial puede entenderse en función del diámetro de la hifa, grosor de la pared e intensidad de septación. De manera que la resistencia a la ruptura de las hifas podría variar dependiendo de la especie y de su desarrollo. Asimismo, la forma en que estas diferencias influyen en los procesos de agregación del suelo es casi completamente desconocida (Lehmann y Rillin, 2015; Lehmann *et al.*, 2017), (Figura 4b).

Por su parte, Six *et al.* (2004) desarrollaron un modelo conceptual (Figura 5) para explicar la influencia de la perturbación (por labranza) en las tasas de estabilización de C en el suelo. Éste relacionó la proporción de pérdida de C por perturbación con la mayor rotación de macroagregados, lo que inhibió la formación de microagregados dentro de los macroagregados y el secuestro de C a largo plazo dentro de los primeros. La velocidad de formación de macro y

microagregados, la estabilización y la degradación están directamente relacionadas con la dinámica de C de la materia orgánica particulada.

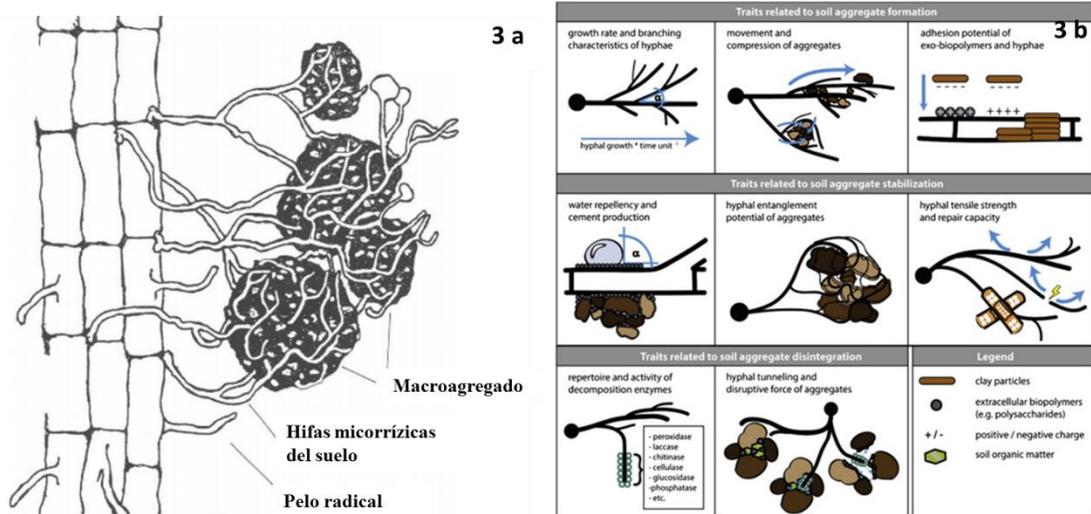


Figura 4. a) Modelo de formación de agregados propuesto por Miller y Jastrow (1992) y Lehmann y Rillin (2015).

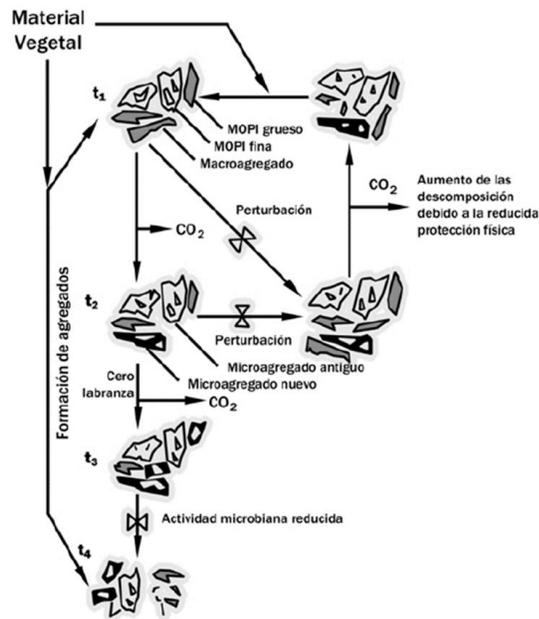


Figura 5. Formación de macroagregados después de un disturbio. A partir de Six *et al.* (2004).

Bacterias y agregación de suelo

Las bacterias son de particular relevancia para la formación y estabilización de los microagregados. Los productos microbianos (exopolisacáridos) y sus interacciones con partículas del suelo (minerales y arcillas, metales polivalentes) así como, diversos compuestos orgánicos o complejos organominerales, promueven el enlace entre unidades de construcción individuales, particularmente en microagregados en horizontes superficiales del suelo (Cuadro 1). Asimismo, los poros localizados en los microagregados cumplen la función de acumulación de la solución del suelo, la difusión de aire, así como un nicho para las comunidades bacterianas, protegiéndolas de la depredación y de fluctuaciones de pH. En condiciones naturales, la mayoría de las bacterias colonizan agregados formando biofilms, para los cuales los exopolisacáridos son importantes estructural y funcionalmente. Estas funciones están relacionadas con la protección de los microorganismos asociados al biofilm para tolerar condiciones ambientales adversas (temperatura, pH y salinidad) que pueden desencadenar la producción de estos polímeros como respuesta al estrés ambiental (Totsche *et al.* 2017; Costa *et al.*, 2018). Las bacterias exploran poros y forman microagregados uniendo partículas a través de biofilms, en la interfase sólido-líquido lo que proporciona estabilidad mecánica. Además, las bacterias median la adhesión a las superficies de las partículas para formar una red de polímero cohesivo tridimensional que interconecta transitoriamente dentro de la matriz del biofilm, y actúa como un sistema externo digestivo que mantiene enzimas extracelulares cerca de las bacterias, lo que les permite metabolizar biopolímeros en el suelo (Figura 6) (Degens, 1997; Flemming y Wingender, 2010; Totsche *et al.*, 2017).

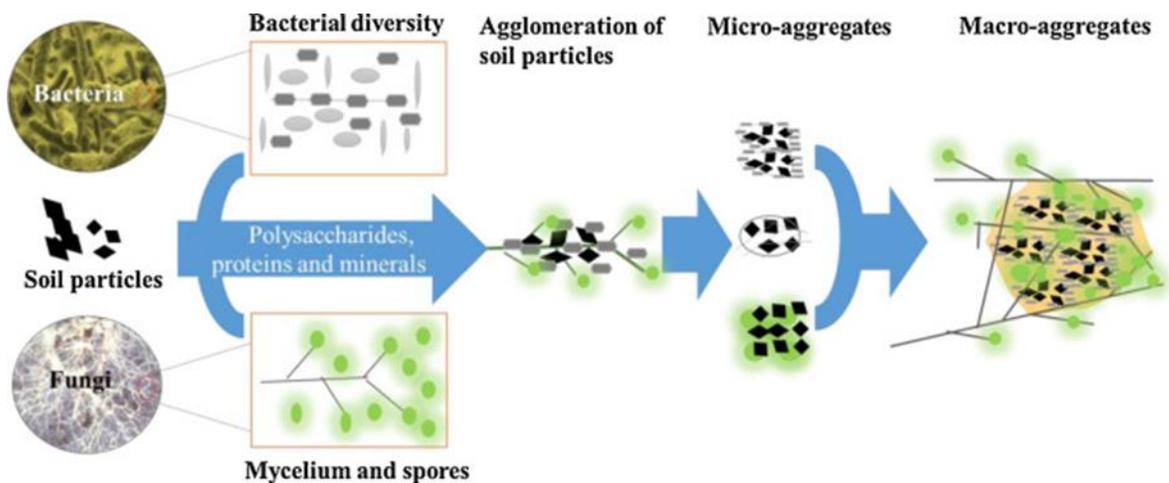


Figura 6. Visión general de la influencia de bacterias y hongos micorrízico arbusculares en la formación de agregados del suelo (Rashid *et al.*, 2016)

Plantas

Las plantas desarrollan raíces de sostén, exploración y absorción, las cuales, conforme a su diámetro, forma de crecimiento, etapa fenológica y arquitectura, modifican la estructura del suelo a través de su crecimiento vertical y horizontal, como consecuencia de la búsqueda continua de nutrientes. Este proceso influye en la formación de diferentes tipos de poros, el tamaño de los agregados y el aporte de materia orgánica, así como en la liberación de exudados radicales que impactan en el crecimiento de microorganismos circundantes a la rizósfera (Eviner y Chapin, 2003; Postma y Lynch, 2012).

De acuerdo con Rillig y Mummey (2016) la influencia de la raíz en el suelo para la formación de agregados se divide en cuatro etapas, en donde los hongos micorrízicos juegan un papel relevante: 1. La fuerza física o de penetración de la raíz al sistema suelo, donde influye su morfología y arquitectura, particularmente en los HEcM que modifican a las raíces como

consecuencia de la generación del manto; 2. La alteración del régimen hídrico del suelo donde su estructura influye fuertemente en su capacidad para retener o liberar el agua, dependiendo del porcentaje de partículas elementales y la materia orgánica del suelo, juegan un papel preponderante; 3. La rizodeposición, donde la liberación de exudados radicales puede estar fuertemente influenciada por los hongos micorrízicos como consecuencia en el metabolismo del carbono vegetal. Estos exudados proporcionan gran parte del carbono para estimular la formación de agregados proporcionando adicionalmente una fuente de carbono para otros microorganismos; y 4. El enredamiento de las raíces con las partículas de suelo. En virtud de su influencia sobre la biomasa de la planta, los hongos micorrízicos pueden impactar en cada uno de estos procesos a nivel de las raíces; además, de proporcionar nichos ecológicos para la mesofauna por ser una zona rica en nutrientes que estos aprovechan.

La micro y mesofauna, así como los hongos están mayormente involucrados en la formación de macroagregados como consecuencia del crecimiento micelial, que enreda físicamente partículas de suelo y los microagregados (Figura 7) (Siddiky *et al.* (2012; Ricci *et al.*, 2015).

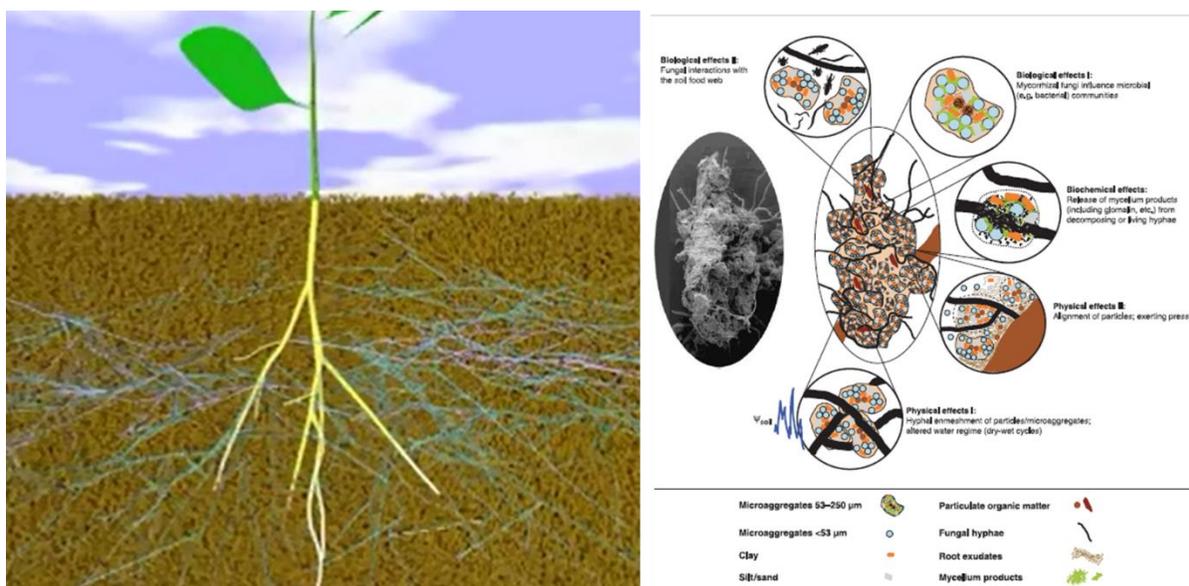


Figura 7. Representación del crecimiento radical y micelial para la formación de agregados de suelo. Mecanismos radical, fúngico micorrízico y bacteriano en la interacción con partículas de suelo para la formación de macro y microagregados. Rillig y Mummey (2016).

Técnicas de estudio (muestras alteradas)

Bedini *et al.* (2009) reportaron que se incrementó la cantidad de macroagregados estables como consecuencia de inocular con *R. intraradices* y *Funneliformis mosseae* y lo relacionaron con la densidad de micelio externo (longitud total de las hifas) y la concentración de glomalina presente, en comparación con el tratamiento no micorrizado. Sin embargo, las técnicas que se utilizan para cuantificar la biomasa de los hongos micorrízicos en el suelo son destructivas, como el micelio extrarradical asociado con las partículas (Vilariño *et al.*, 1993; Boddington *et al.*, 1999); la cuantificación de esporas por gramo de suelo seco (Gerdemann y Nicolson 1963): el aclareo y tinción de raíces para cuantificar colonización (Phillips y Hayman, 1970) y las herramientas moleculares o bajo condiciones controladas con la construcción de microcosmos (Anderson y

Cairney, 2007). Eso las hace no propicias para medir y relacionar *in situ* el desarrollo de la formación de agregados, en asociación con micelio micorrízico en el monitoreo de la formación y cuantificación de los agregados. Así, se evidencia la necesidad de investigar las posibles interacciones que pudieran establecerse entre los microorganismos en los diferentes tipos de suelo y especies de plantas en un tiempo determinado, incluso con el empleo de las técnicas destructivas, las cuales otorgan información complementaria para conocer los procesos de formación de agregados.

Micromorfología para análisis de interacciones bióticas en el suelo

La micromorfología es una disciplina de la Ciencia del Suelo que utiliza secciones delgadas de muestras inalteradas de suelo (*in situ*) (25-30 μm de espesor), observadas y analizadas con un microscopio petrográfico (Bullock *et al.*, 1985) u óptico (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2016) para caracterizar el sistema poroso así como, otros componentes en términos de su distribución y tipo de arreglo que presentan las partículas de suelo (Bui, 1991). Este tipo de estudios facilitan la comprensión de las interacciones, entre las partículas minerales y orgánicas del suelo y la biota; para monitorear y predecir cambios en la estructura, composición, interacción, función y el estado de conservación de los componentes del suelo (Peng *et al.*, 2006).

Análisis de imágenes

El análisis de imágenes es una herramienta auxiliar que ha permitido analizar la relación entre bacterias, raíces y componentes del suelo, a través de la elaboración de mosaicos de imágenes de alta resolución, lo que han observado, por ejemplo, diferencias en la distribución

de los “hotspots” bacterianos entre cultivos de maíz y alfalfa. Más aún, generar mapas temáticos y cuantificar cada uno de los componentes del suelo y sus interacciones con el componente biológico (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2016). Así como, establecer metodologías para el estudio de diferentes componentes del suelo que sólo pueden observarse y medirse utilizando diferentes tipos de luz, y elaborar mapas temáticos de los mosaicos obtenidos (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2018). Por otro lado, existen otras alternativas que se han utilizado en diversas investigaciones, como el uso de escaner de alta resolución para llevar a cabo análisis de imágenes a través de la construcción de mosaicos, para relacionar a algunos microorganismos con su distribución en el suelo.

Nunan *et al.* (2001) analizaron el número y la distribución espacial *in situ* de bacterias en escalas desde micrómetros hasta centímetros en suelos minerales. Los autores reportaron que las bacterias no se distribuyen de manera homogénea a medida que se incrementó la profundidad, ni el uso de suelo en diferentes escenarios. Cabe mencionar que las bacterias no se relacionaron con algún otro componente del suelo biótico (raíces, hongos, pellets, etc.) o abiótico (agregados y/o minerales), debido a que trabajaron sólo con imágenes fluorescentes.

Agerer *et al.* (2002) mapearon el micelio de diferentes HEcM, a través de rejillas elaboradas con hilos de nylon de 5 × 5 mm, y dibujaron las hifas utilizando un marcador indeleble bajo microscopio de disección. Los autores reportaron 17 morfotipos y encontraron que cada HEcM tiene una distribución particular en el suelo. Sin embargo, pese a la “poca” perturbación que se tuvo del escenario para mapear el componente fúngico, esto sólo pudo registrarse de manera superficial, y no a través de los horizontes. Por otro lado, a pesar de que introdujeron la idea de que el suelo es un escenario heterogéneo en cuanto a la distribución e

interacciones con otros componentes (bióticos y abióticos), nunca registraron estas interacciones, ni las implicaciones de estas con el fitobionte, partículas del suelo u otro componente biológico.

Conclusión de la revisión bibliográfica

En la naturaleza existen diferentes estrategias para formar agregados de suelo, los cuales se relacionan con las condiciones ambientales, el tipo de suelo, la calidad de la MO y su grado de descomposición así como con diversas poblaciones y comunidades biológicas asociadas a este proceso.

En cada proceso de formación de agregados de suelo las comunidades bacterianas están presentes, contribuyendo no sólo a la formación de macro y microagregados, sino en los procesos que ocurren tanto en el tracto digestivo de lombrices y diversos artrópodos, como en las secreciones salivales de termitas y hormigas que contribuyen como agentes cementantes, los cuales influyen en la estabilidad de estas unidades estructurales de suelo. En futuras investigaciones es relevante discernir el papel de cada comunidad bacteriana, dentro y fuera de su planta hospedera.

Algunas comunidades fúngicas contribuyen tanto a procesos de degradación de la MO en asociación con artrópodos que previamente la fragmentan, y otras con asociaciones simbióticas (micorrizas) que junto con las raíces entrelazan partículas minerales y orgánicas del suelo, formando macro y microagregados, además de formar diversos hábitats para un sinnúmero de microorganismos. La mayoría de estos estudios se llevan a cabo en condiciones alteradas, en donde se analiza cada componente biótico y abiótico por separado, por lo que aún existen diversas interrogantes, sobretodo con los mecanismos por los cuales las raíces y

microorganismos se relacionan con las partículas de suelo (orgánicas e inorgánicas) para la formación de agregados de diferente tamaño.

A pesar de la importancia de los hongos en la formación de agregados, no existen estudios que documenten a través del análisis de imágenes las diferencias entre los efectos de agregación que tienen los hongos saprófitos o micorrízicos de diferente especie, y los mecanismos de enlace micelial con las partículas.

Varios investigadores han elaborado esquemas (modelos), para mostrar cómo los componentes bióticos y abióticos pudieran asociarse para este propósito; por lo que es necesario abordar este tema de investigación, a diversas escalas (desde campo hasta microscópicas), con experimentos y análisis de laboratorio. Además, es necesario usar nuevas técnicas como los sistemas de información geográfica para elaborar mosaicos de imágenes de microscopio de alta resolución y elaborar mapas temáticos para determinar y cuantificar cada una de las relaciones entre hongos-raíces y agregados.

Literatura citada

- Ambriz, E., Báez-Pérez, A., Sánchez-Yáñez, J. M., Moutoglis, P., & Villegas, J. (2010). *Fraxinus–Glomus–Pisolithus* symbiosis: Plant growth and soil aggregation effects. *Pedobiologia*. 53(6), 369-373.
- Anderson, I. C., & Cairney, J. W. (2007). Ectomycorrhizal fungi: exploring the mycelial frontier. *FEMS Microbiol. Rev.* 31(4), 388-406
- Anderson, J. M. (1988). Spatiotemporal effects of invertebrates on soil processes. *Biol. Fertil. Soils*. 6(3), 216-227.
- Angers, D. A., & Caron, J. (1998). Plant-induced changes in soil structure: processes and feedbacks. In *Plant-induced soil changes: processes and feedbacks* (pp. 55-72). Springer Netherlands.
- Bedini, S., Pellegrino, E., Avio, L., Pellegrini, S., Bazzoffi, P., Argese, E., & Giovannetti, M. (2009). Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol. Biochem.* 41(7), 1491-1496.

- Blanchart, E., Lavelle, P., & Spain, A. V. (1990). Effects of biomass and size of *Millsonia anomala* (Oligochaeta: Acanthodrilidae) on particle aggregation in a tropical soil in the presence of *Panicum maximum* (Gramineae). *Biol. Fertil. Soils*. 10(2), 113-120.
- Boodington C.L. & J.C. Dood (1999). Comparison of techniques for the extraction and quantification of extra-radical mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in soils. *Soil Biol. Biochem.* 31: 479- 482.
- Bronick, C.J. y Lal, R., (2005). Soil structure & management: a review. *Geoderma* 124,3–22.
- Bui, E. N. (1991). Applications of image analysis to soil micromorphology. *Agric. Ecosyst. Environ.* 34. 305-313.
- Bullock, P., N. Federoff., A. Jongerius., G. Stoops y T. Tursina. (1985). Handbook for Soil Thin Section Description. Wayne Research Publications, England. 152 p.
- Burri, K., Gromke, C., & Graf, F. (2013). Mycorrhizal fungi protect the soil from wind erosion: a wind tunnel study. *Land Degrad. Dev.* 24(4), 385-392.
- Costa OYA, Raaijmakers JM & Kuramae EE (2018) Microbial Extracellular Polymeric Substances: Ecological Function and Impact on Soil Aggregation. *Front. Microbiol.* 9:1636
- Chivenge, P., Vanlauwe, B., Gentile, R. & Six, J. (2011). Organic resource quality influences short-term aggregate dynamics and soil organic carbon and nitrogen accumulation. *Soil Biol. Biochem.* 43, 657–666.
- Daynes, C. N., Zhang, N., Saleeba, J. A., & McGee, P. A. (2012). Soil aggregates formed *in vitro* by saprotrophic Trichocomaceae have transient water-stability. *Soil Biol. Biochem.* 48, 151-161.
- Duchicela, J., Sullivan, T. S., Bontti, E., & Bever, J. D. (2013). Soil aggregate stability increase is strongly related to fungal community succession along an abandoned agricultural field chronosequence in the Bolivian Altiplano. *J. Appl. Ecol.* 50(5), 1266-1273.
- Eviner, V. T., & Chapin III, F. S. (2003). Functional matrix: a conceptual framework for predicting multiple plant effects on ecosystem processes. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 455-485.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8(9), 623-633.
- Graf, F., & Frei, M. (2013). Soil aggregate stability related to soil density, root length, and mycorrhiza using site-specific *Alnus incana* and *Melanogaster variegatus* sl. *Ecol. Eng.* 57, 314-323.
- Grayston S.J., Vaughan D. & Jones D. (1997) Rhizosphere carbon flow in trees in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol.* 5, 29–56.
- Gregory P.J (2006) Roots, rhizosphere, and soil: the route to a better understanding of soil science? *Eur. J. Soil Sci.* 57:2– 12
- Gutiérrez-Castorena, E. V. G., del Carmen Gutiérrez-Castorena, M., Vargas, T. G., Bontemps, L. C., Martínez, J. D., Méndez, E. S., & Solorio, C. A. O. (2016). Micromapping of microbial hotspots and biofilms from different crops using digital image mosaics of soil thin sections. *Geoderma.* 279, 11-21.
- Gutiérrez-Castorena, M. C., Gutiérrez-Castorena, E.V., González-Vargas, T., Ortiz-Solorio, C. A., Suástegui-Méndez, E., Cajuste-Bontemps, L. & Rodríguez-Mendoza, M.N. (2018).

- Thematic micro-maps of soil components using high-resolution spatially referenced mosaics from whole soil thin sections and image analysis. *Eur. J. Soil Sci.* 1-15.
- Kasper, M., Buchan, G. D., Mentler, A., & Y Blum, W. E. H. (2009). Influence of soil tillage systems on aggregate stability and the distribution of C and N in different aggregate fractions. *Soil Till. Res.* 105(2), 192-199.
- Lehmann, A., & Rillig, M. C. (2015). Understanding mechanisms of soil biota. Involvement in soil aggregation: A way forward with saprobic fungi? *Soil Biol. Biochem.* 88, 298–302.
- Lehmann, A., Zheng, W., & Rillig, M. C. (2017). Soil biota contributions to soil aggregation. *Nat. Ecol. Evol.* 1, 1828–1835.
- Leifheit, E. F., Veresoglou, S. D., Lehmann, A., Morris, E. K., & Rillig, M. C. (2014). Multiple factors influence the role of arbuscular mycorrhizal fungi in soil aggregation—a meta-analysis. *Plant Soil.* 374(1-2), 523-537.
- Miller, R. M., & Jastrow, J. D. (1992). The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. In *'Mycorrhizae in Sustainable Agriculture'*. (Eds C. J. Bethlenfalvay and R. G. Linderman.) pp. 29-44. (American Society of America, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America: Madison, WI.)
- Miller, R. M., & Jastrow, J. D. (1990). Hierarchy of root and mycorrhizal fungal interactions with soil aggregation. *Soil Biol. Biochem.* 22(5), 579-584.
- Misra, R. K., Alston, A. M., & Dexter, A. R. (1988). Root growth and phosphorus uptake in relation to the size and strength of soil aggregates. I. Experimental studies. *Soil Till. Res.* 11(2), 103-116.
- Morel, J. L., Habib, L., Plantureux, S., & Guckert, A. (1991). Influence of maize root mucilage on soil aggregate stability. *Plant Soil.* 136(1), 111-119.
- Mummey, D. L., Rillig, M. C., & Six, J. (2006). Endogeic earthworms differentially influence bacterial communities associated with different soil aggregate size fractions. *Soil Biol. Biochem.* 38(7), 1608-1614.
- Peng, X., Horn, R., Peth, S. & Smucker, A. (2006). Quantification of soil shrinkage in 2D by digital image processing of soil surface. *Soil Till. Res.* 91(1), 173-180.
- Piotrowski, J. S., Denich, T., Klironomos, J. N., Graham, J. M., & Rillig, M. C. (2004). The effects of arbuscular mycorrhizas on soil aggregation depend on the interaction between plant and fungal species. *New phytol.* 164 (2), 365-373.
- Postma, J. A., & Lynch, J. P. (2012). Complementarity in root architecture for nutrient uptake in ancient maize/bean and maize/bean/squash polycultures. *Ann. Bot.* 110(2), 521-534.
- Pulleman, M. M., Six, J., Uyl, A., Marinissen, J. C. Y., & Jongmans, A. G. (2005). Earthworms and management affect organic matter incorporation and microaggregate formation in agricultural soils. *Appl. Soil Ecol.* 29(1), 1-15.
- Postma, J. A., & Lynch, J. P. (2012). Complementarity in root architecture for nutrient uptake in ancient maize/bean and maize/bean/squash polycultures. *Ann. Bot.* 110(2), 521-534.
- Ricci, F., Bentze, L., Montagne, D., Houot, S., Bertrand, M., & Pelosi, C. (2015). Positive effects of alternative cropping systems on terrestrial Oligochaeta (Clitellata, Annelida).
- Rillig, M. C., Aguilar-Trigueros, C. A., Bergmann, J., Verbruggen, E., Veresoglou, S. D. & Lehmann, A. (2015). Plant root and mycorrhizal fungal traits for understanding soil aggregation. *New Phytol.* 205, 1385-1388.

- Rillig, M. C., Mardatin, N. F., Leifheit, E. F. & Antunes, P. M. (2010). Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi increases soil water repellency and is sufficient to maintain water-stable soil aggregates. *Soil Biol. Biochem.* 42(7), 1189-1191.
- Rillig, M.C. & Mummey, D.L., (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171, 41-53.
- Rai M.K. and Varma A. *Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae*. Springer, (2011). 459 p.
- Shipitalo, M. J., & Le Bayon, R. C. (2004). 10 Quantifying the Effects of Earthworms on Soil Aggregation and Porosity. *Earthworm ecology*, 183.
- Siddiky, M. R. K., Kohler, J., Cosme, M., & Rillig, M. C. (2012). Soil biota effects on soil structure: interactions between arbuscular mycorrhizal fungal mycelium and collembola. *Soil Biol. Biochem.* 50, 33-39.
- Six, J., Bossuyt, H., Degryze, S. & Deneff, K., (2004). A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Till. Res.* 79, 7-31.
- Tisdall, J.M. & Oades, J.M., (1982). Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.* 62, 141–163.
- Totsche K.U, Amelung W., Gerzabek M.H., Guggenberger, G., Klumpp, E., Knief, C., Lehndorff, E., Mikutta, R., Peth, S., Prechtl, A, Ray, N., & Kögel-Knaber, I. (2017) Microaggregates in soils. *J Plant Nutr Soil Sci.* 1-33.
- Vilariño A., Arines, J. y Schuepp, H. (1993). Extraction of vesicular arbuscular mycorrhizal mycelium from sand samples. *Soil Biol. Biochem.* 25:99-100.
- Wilson, G. W., Rice, C. W., Rillig, M. C., Springer, A. & Hartnett, D. C. (2009). Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. *Ecol. Lett.* 12(5), 452-461.

**CAPÍTULO I. EL PAPEL DE LOS HONGOS EN LA CONSERVACIÓN DE
ANDOSOLS**

EL PAPEL DE LOS HONGOS EN LA CONSERVACIÓN DE ANDOSOLS

RESUMEN

Tlaxcala es el estado con el mayor problema ambiental relacionado con la erosión del suelo de nuestro país. Sin embargo, en algunas áreas conformadas por Andosols y bosque de pino e incluso en zonas agrícolas se ha observado que su degradación es mínima. La presencia de abundante micelio en horizontes subsuperficiales de suelos localizados en pendiente puede ser la causa de que los suelos se conserven a pesar del impacto de las actividades humanas. Los objetivos de la presente investigación fueron: caracterizar las propiedades edáficas de suelos en diferente posición geomorfológica, identificar las especies de hongos micorrízico arbusculares (HMA), y determinar la relación del micelio con los agregados y las partículas elementales en un Vitric Andosol de Calpulalpan, Tlaxcala México. Los suelos presentaron diferentes secuencias y espesores de cenizas y lapillis pomáceos y son de moderada a alta fertilidad. La estructura migajosa dominó en los horizontes superiores y granular simple en los subhorizontes. Los horizontes presentaron alta retención de humedad y permeabilidad lo que facilitó el desarrollo micelial y formación de esporas de HMA hasta 120 cm de profundidad. De 10 especies de HMA que fueron registradas, la más abundante fue *Funeliformis mosseae*. El análisis micromorfológico mostró diferentes relaciones entre el micelio, los horizontes y las partículas del suelo: con residuos orgánicos (horizonte O), macro y micro agregados (horizontes A y B), alófono e imogolita (horizonte B) y lapillis (horizonte C). El micelio de los hongos formó redes en todo el suelo, y en los lapillis inserta a las partículas de pómez (como cuentas) a través de los poros vesiculares tubulares lo que le da estabilidad a los Andosols y evita su degradación.

Palabras clave: Vitric Andosols, lapillis pomáceos, micromorfología, hongos micorrízicos.

1.1 INTRODUCCIÓN

Los Andosols son suelos que poseen alta capacidad de retención de agua, buen drenaje, friables, forman agregados estables de forma natural, además de tener una baja densidad aparente y una alta porosidad (IUSS Grupo de trabajo de la WRB, 2014). Sin embargo, la remoción de la vegetación conduce a escorrentía y erosión severa (McDaniel *et al.*, 2012), que permite el afloramiento de los materiales parentales (Krasilnikov *et al.*, 2013).

En Tlaxcala, uno de los principales problemas ambientales se relaciona con la degradación de suelo, la cual representa hasta 76.8% de su superficie (SEMARNT-CP, 2002). Sin embargo, en el municipio de Calpulalpan, Gutiérrez-del Valle (2014) detectó zonas estables de Andosols con bosque de pino/encino (8058 ha), a pesar de que se desarrollaron a partir de cenizas y lapillis pomáceos e impacto humano a través de la construcción de caminos. Un rasgo común de estos suelos es la presencia de abundantes hifas y esclerocios que contribuyen en la agregación del suelo (Sedov *et al.*, 2010), pero no se ha reportado cuál es el papel que pueden tener estas estructuras fúngicas en materiales pomáceos y en la estabilidad del sistema para evita la degradación de los Andosols.

Los agregados de suelo son unidades estructurales entre partículas elementales (arcillas, limos y arenas), que se constituyen como producto de la interacción entre procesos físicos, químicos y biológicos (Kasper *et al.*, 2009) y éstos se agrupan por su tamaño en macro >250 y microagregados < 250 μm (Borie *et al.*, 2008). La teoría jerárquica de la agregación, propuesta por Tisdall y Oades (1982) plantea que los microagregados se unen para formar macroagregados, donde los enlaces químicos de aluminosilicatos se enlazan entre sí para formar microagregados. Este proceso, también obedece a una jerarquía sucesiva de organización biológica donde las comunidades fúngicas, en particular las que forman ecto o endo micorrizas

y las raíces, juegan un papel importante en el enlace entre partículas (Six *et al.*, 2004). Además, las propiedades microclimáticas (humedad y aireación), así como el continuo aporte de materia orgánica son también importantes en estas interacciones (Bedini *et al.*, 2009). No obstante, todavía es un reto desentrañar las interacciones entre los microorganismos y agregados (Nie *et al.*, 2010). En Andosols existe una clara necesidad de mejorar la comprensión de los procesos que controlan la dinámica de su formación y el papel del micelio (Sedov *et al.*, 2010).

Los objetivos de la presente investigación fueron: 1. Caracterizar las propiedades edáficas que favorecen la habilidad radical y el crecimiento de los hongos; 2. Identificar las especies de hongos micorrízico arbusculares y 3. Determinar la relación de los hongos con diferentes componentes del suelo a nivel de sección delgada en Andosols de Calpulalpan, Tlaxcala, México.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Área de estudio

El área de estudio se localiza en San Felipe en un área de bosque de pino en Calpulalpan Tlaxcala, México, entre las coordenadas 19 ° 32' 11.9" N, 98° 39' 12.3" O, y una altitud de 2664 msnm (Figura 1.1). El clima es templado subhúmedo, la temperatura promedio es de 23.3°C y la mínima 4.6°C y precipitación anual de 655 mm (CONAGUA, programa ERICIII, 2009). El material parental son cenizas volcánicas y lapillis pomáceos con diferentes secuencias y espesores. La vegetación corresponde a un bosque de pino Ocoté (*Pinus patula* Schl. *et* Cham), asociados con pastizales o con cultivos principalmente de maíz (*Zea mays* L.). Los suelos se clasifican como Vitric Andosols de acuerdo con el IUSS Grupo de Trabajo de la WRB (2014).

1.2.2 Fase de campo

Después de recorridos de campo se seleccionaron tres sitios los cuales varían en geomorfología, material parental (cenizas volcánicas Cv y lapillis La) y pinos con diferentes asociaciones: Sitio 1 (pendiente alta, con cultivo de maíz y Cv); Sitio 2 (pendiente media; con pastizales y Cv/La); y Sitio 3 (pendiente baja, pino natural y Cv/La). En cada sitio se excavó un pozo pedológico y se describieron los perfiles de suelos con base en el Manual de Cuanalo (1982). La abundancia de micelio se determinó cuantificando el número de hifas por dm^2 en cada horizonte y usando la misma escala para las raíces: 0-5 raras, 5 a 10 pocas, 10-50 comunes, 50-100 abundantes; y >500 muy abundantes. La habilidad radical se evaluó con base en las propiedades edáficas (textura y estructura) según la propuesta de Pape y Lager (1995).

Posteriormente, se colectaron muestras alteradas (análisis de laboratorio) e inalteradas (análisis micromorfológico) una por cada horizonte identificado en campo, dando un total de 15 muestras de suelo. En la identificación de esporas de HMA se utilizó una muestra compuesta, integrada por cinco submuestras, las cuales fueron colectadas de manera aleatoria en el horizonte superficial de los suelos estudiados a una profundidad de 0-20 cm. Todo el muestreo de campo se realizó durante el verano de 2014.

1.2.3 Análisis de laboratorio

Los análisis físicos y químicos realizados en las muestras alteradas del suelo fueron: densidad aparente (terrón parafinado), pH (relación agua-suelo 2:1), capacidad de intercambio catiónico (acetato de amonio), cationes intercambiables [Na^+ , K^+ (flamometría), Ca^{++} , Mg^{++} (absorción atómica)], fósforo soluble (Olsen *et al.*), N_{Tot} (Kjeldahl) y materia orgánica (Walkley y Black, 1934). Todas estas metodologías fueron extraídas del Manual de Van Reeuwijk (2002).

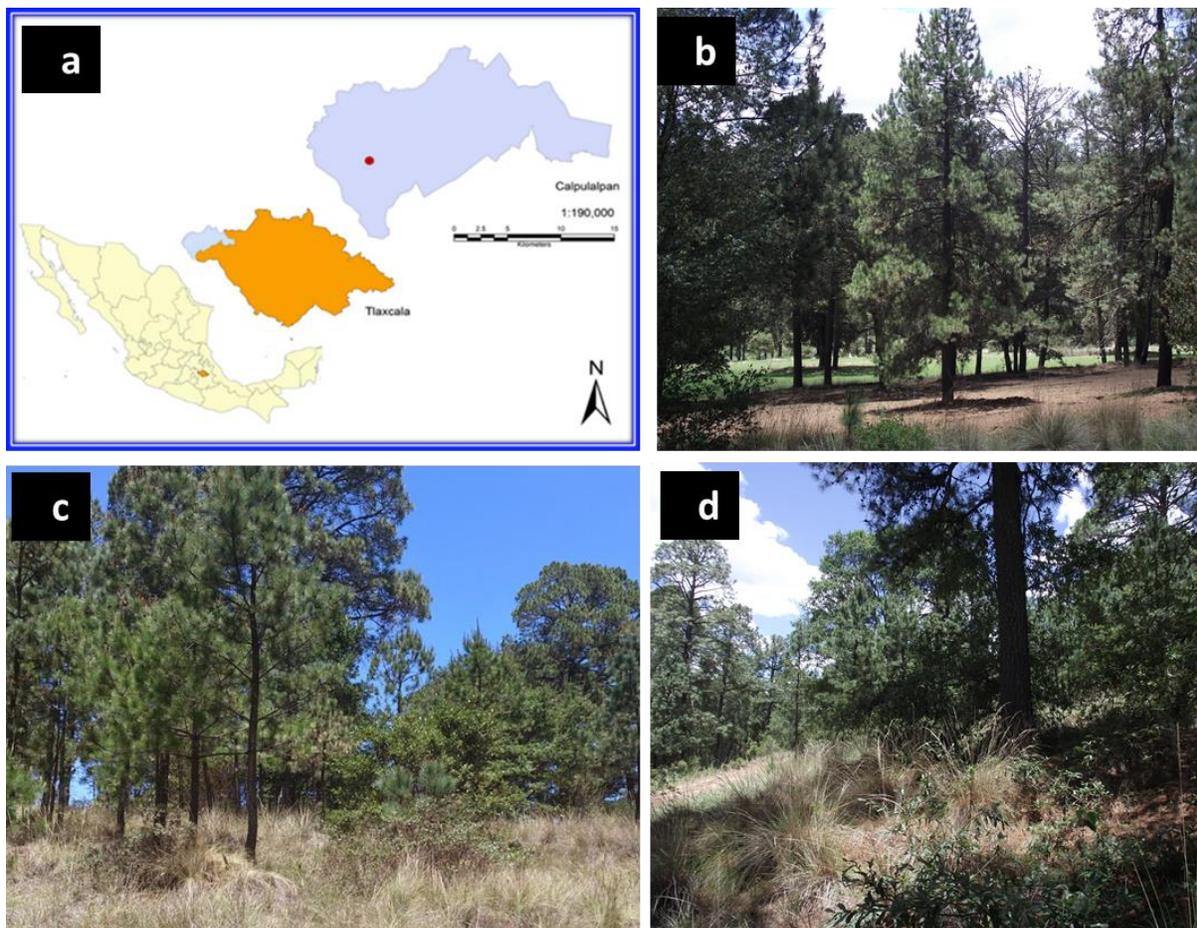


Figura 1.1. a) Zona de estudio; b) suelo agrícola; c) bloque de *Pinus patula* Schl. et cham/pastizal; y d) bosque de pino. San Felipe, Calpulalpan, Tlaxcala, México.

1.2.4 Aislamiento, cuantificación, identificación y abundancia de esporas de HMA

Para la extracción de las esporas de HMA, se utilizó la metodología de tamizado y decantación propuesta por Gerdenann y Nicolson (1963), seguida de la separación en un gradiente de sacarosa al 60%. La determinación taxonómica de las especies de HMA se realizó mediante características morfológicas observadas/reportadas a nivel mundial en: <http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/> y <http://invam.caf.wvu.edu/>. Asimismo, se calculó

el índice de dominancia de especies (Índice de Simpson), lo que indicó la riqueza y variación de especies del sitio estudiado.

1.2.5 Análisis micromorfológico

Las muestras inalteradas se secaron a intemperie bajo sombra y se impregnaron con una mezcla de resina poliéster insaturada y monómero de estireno en una relación 70:30. Cada bloque inalterado se cortó de manera vertical y se elaboró una sección delgada ($5 \times 7.5 \text{ cm} \times 30 \mu\text{m}$), con base en la metodología propuesta por Murphy (1986). Los diferentes componentes del suelo (materia orgánica gruesa, fina e inorgánicos), así como su agregación y porosidad se describieron utilizando un microscopio petrográfico y la terminología de Bullock *et al.* (1985) y Stoops (2003). Dentro de la fracción fina de la materia orgánica se describió el micelio y las esporas, su patrón de distribución y relación con los componentes del suelo.

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 Propiedades edáficas

En la Figura 1.2 se reportan los perfiles estudiados y las diferentes secuencias de Cv y La. Asimismo, en la Figura 1.3, se puede apreciar la distribución de las raíces entre horizontes de los diferentes perfiles y con abundante micelio, sobre todo en los suelos que se ubican en pendientes media y baja, en donde las hifas fueron uniéndose a las partículas pomáceas (Figura 1.3 d).

En el Sitio 1, donde se cultiva maíz, los contenidos de MO fueron medios (2.5%) para Andosols (Ortiz-Solorio, 2010) y bajos para N_{Tot} ; con un pH que fluctuó de 6.2 en el horizonte superficial a 7.5 en el más profundo. De acuerdo con la clasificación de Young (1976), los suelos estudiados tienen alta fertilidad debido a su alta concentración de cationes

intercambiables, principalmente de Ca^+ con un comportamiento regular con la profundidad (de 26 hasta 56 cmol kg^{-1}), y K^+ con valores arriba de 0.4, alta saturación de bases (100%) y con concentración $\text{P}_{\text{soluble}}$ de 66 mg kg^{-1} . Esta alta concentración de nutrientes está relacionada con la aplicación de fertilizantes que los productores agregan anualmente. En los suelos no agrícolas (Sitio 2 y 3), el contenido de MO es bajo en las pendientes medias (2.5%), pero se incrementa drásticamente hasta 14% (horizonte O) en pendientes bajas; son ligeramente ácidos, bajo contenido de cationes intercambiables (2.1 cmol kg^{-1} de Ca^{++}), baja saturación de bases (<50%), y de bajos a medianos contenidos de K^{++} y N_{Tot} .

La estructura en general fue migajosa en la superficie, con bloques subangulares en los subhorizontes y granular simple en los Lp; sus texturas varían en la superficie de francas en CV y Fraco arcillo arenoso en los La. Las densidades aparentes oscilan entre 1.1 en el suelo y 1.6 g cm^{-3} en el horizonte subsuperficial del suelo agrícola; aunque los valores tienen un comportamiento irregular a lo largo de los perfiles debido a las diferentes discontinuidades litológicas.

Pape y Lager (1995) indicaron que las estructuras pedales (migajosas) generan condiciones para un alto desarrollo radical, no así para las apedales (granulares simples), sobre todo las de textura franco arenosa o más gruesas que ocurren en los suelos. No obstante, en campo se observó la presencia de micelio abundante no sólo en los horizontes superficiales sino también en los lapillis (Figura 1.3). De acuerdo con Segura-Castruita *et al.* (2005), los lapillis pomáceos tienen alta capacidad de retención de humedad (hasta 70%) como consecuencia de su tamaño (partículas de 2 y 3 mm) y forma tubular de los poros vesícula los cuales además están interconectados, lo que permite mayor acumulación de humedad y menor pérdida por evaporación, generando una ventaja para los hongos que se relacionaron con estas partículas.

Esta puede ser una explicación del porqué las hifas fueron ensartando a las partículas pomáceas y dando estabilidad de materiales que pueden ser susceptibles a la erosión hídrica.

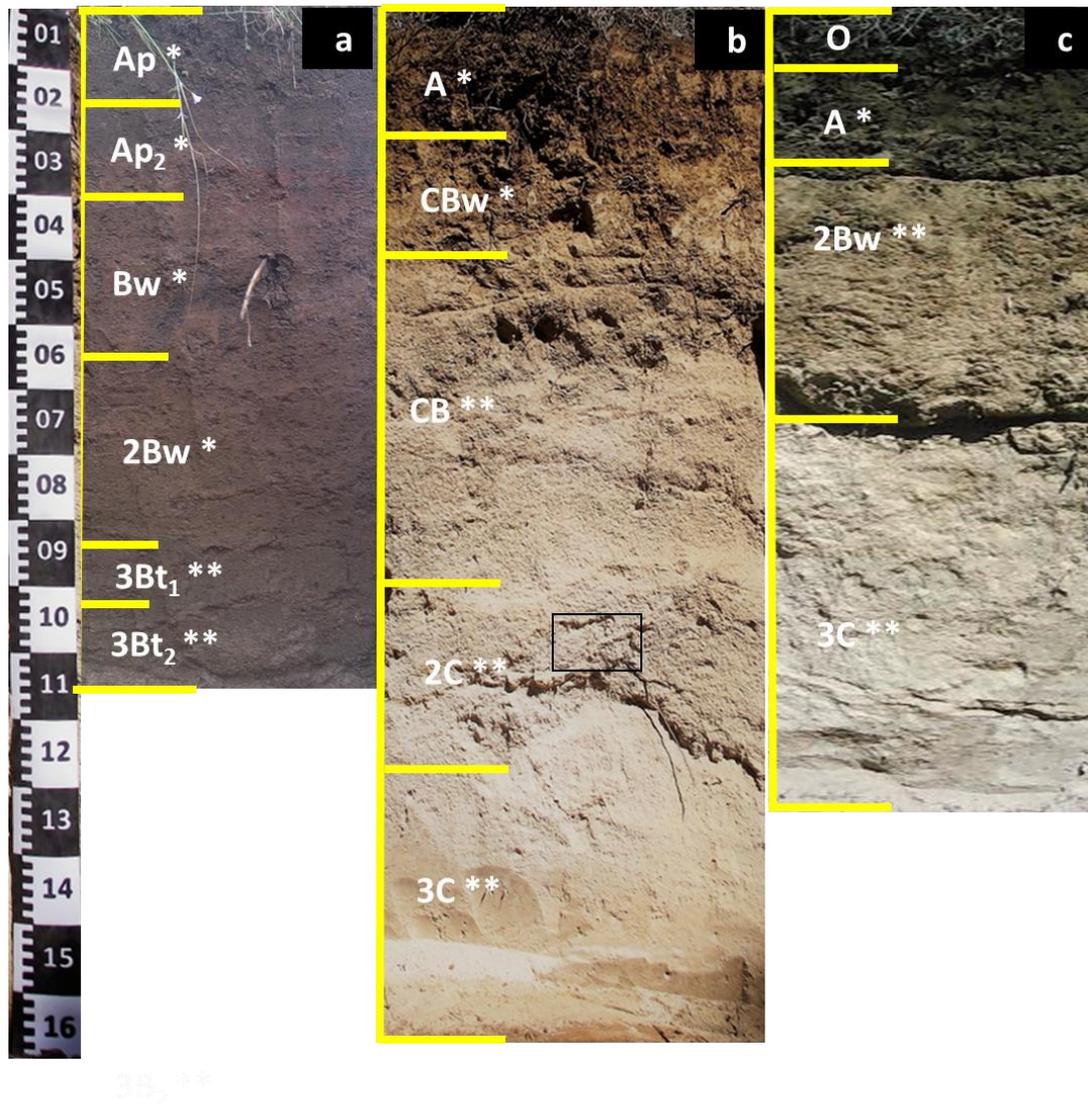


Figura 1.2. Perfiles de suelos de acuerdo con su posición geomorgológica y material parental. a) pendiente alta b) pendiente media y c) pendiente baja. Vitric Andosol de Calpulalpan, Tlaxcala. * Ceniza volcánica, **lapillis.

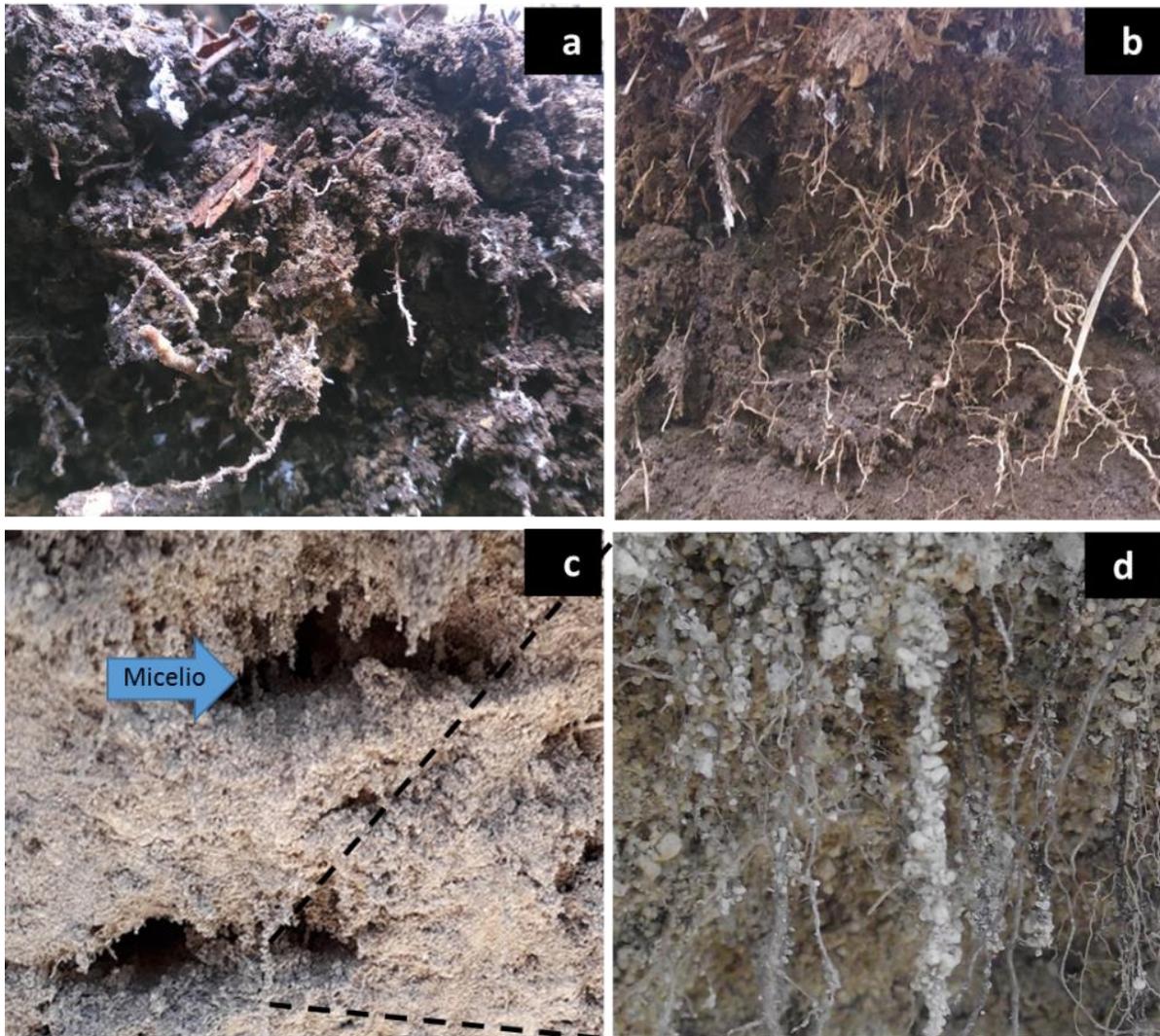


Figura 1.3. Interacción de las raíces con agregados en horizontes de diferentes perfiles. a) horizonte O, en bosque de pino (pendiente baja), b) horizonte A, en bosque de pino (pendiente alta), c) horizonte 2C (pendiente media) y d) acercamiento donde se aprecian las hifas y raíces formando cuentas de partículas de pomez.

Cuadro 1.1. Propiedades químicas de los suelos estudiados en Calpulalpan, Tlaxcala, México.

Horizonte	Prof. Cm	pH 1:1 H ₂ O	MO %	Cationes intercambiables				CIC	PSB %	P mg kg ⁻¹	N _{Tt} %
				Cmol kg ⁻¹							
				Ca	Mg	Na	K				
<i>Sitio 1 Pendiente alta (pino y suelo agrícola)</i>											
Ap	0-12	6.2	2.57	26.2	7.8	0.65	0.64	23.5	100	66.4	0.11
Ap ₂	12-26	7.1	2.57	33.1	11.4	0.74	0.65	12.5	100	66.4	0.11
Bw	26-45	7.4	-	38.6	0.9	0.87	0.73	22.6	100	-	-
2Bw	45-62	7.3	-	46.4	1.9	0.95	1.02	27.3	100	-	-
3Bt ₁	62-81	7.4	-	45.1	1.9	1.06	1.34	29.2	100	-	-
3B ₂	81-89	7.5	-	46.3	1.8	1.02	1.65	27.9	100	-	-
3B ₃	89-105	7.5	-	51.6	2.2	1.06	2.02	30.4	100	-	-
<i>Sitio 2 Pendiente media (pino y pasto)</i>											
A	0-20	6.1	2.5	2.1	1.1	0.9	3.4	6.0	100	6.56	0.09
CBw	20-40	6.0	0.5	2.1	1.1	1.1	2.6	15.5	27.9	7.59	0.03
CB	40-90	6.7	0.1	2.1	1.1	0.9	1.7	12.3	47.1	7.59	0.02
2C	90-120	6.5	0	2.1	1.0	1.2	1.2	9.7	56.7	4.51	0.01
3C	120-160	6.5	0	2.0	0.9	1.4	1.8	4.6	100	5.03	0.01
<i>Sitio 3 Pendiente baja (pino)</i>											
O	0-3.0	5.5	14.3	2.16	1.04	0.61	0.93	14.3	33.0	23.1	0.26
A	3-15	6.0	5.45	2.08	1.05	0.63	1.12	12.9	37.7	26.7	0.14
2Bw	15-52	6.6	1.33	2.05	1.05	0.65	2.02	12.9	44.6	9.98	0.04
3C	52-120	7.2	0.1	1.99	0.89	0.65	1.28	6.8	70.0	4.00	0.00

Cuadro 1.2. Propiedades físicas de los suelos estudiados de Calpulalpan, Tlaxcala. México.

Hori- zonte	Dap. g.cm ⁻¹	Arenas	Limos %	Arcillas	Clase textural	Estruc- tura	Permea- bilidad	Habilidad radical	Micelio
<i>Sitio 1 Pendiente alta</i>									
Ap	1.3	44.0	34.5	21.5	Franco	Mi	***	***	+++++
Ap ₂	1.3	41.2	32.7	26.1	Franco	Mi, Bs	***	***	+++++
Bw	1.6	51.5	19.8	28.6	FArA	Bs	***	***	++++
2Bw	1.4	58.8	15.5	25.7	FArA	Bs	***	***	+++
3Bt ₁	1.4	65.3	8.2	26.5	FArA	Bs	***	***	+++
3Bt ₂	1.3	61.1	12.1	26.7	FArA	Bs	**	**	+++
3Bt ₃	1.4	54.9	19.2	25.8	FArA	Bs,Gs	**	**	+++
<i>Sitio 2 Pendiente media</i>									
A	1.3	25.4	37.9	36.8	FAr	Mi	***	***	++++
Bw	1.5	25.9	36.5	37.6	FAr	BS	***	***	++++
CB	1.4	53.8	21.2	25.0	FAA	Bs	**	**	++++
2C	1.4	68.8	17.1	14.0	FA	Bs, Gs	**	**	++++
3C	1.6	72.1	15.6	12.3	FA	Gs	**	**	++++
<i>Sitio 3 Pendiente baja</i>									
O	1.1	-	-	-	-	-	-	-	+++++
A	1.2	49.7	36.5	13.8	Franco	Mi	***	***	++++
2Bw	1.5	54.5	26.9	18.6	FA	Bs	**	**	++++
3C	1.2	78.3	11.4	10.3	FA	Gs	**	**	++++

Dap. Densidad Aparente; FArA: Franco arcillo arenoso, FAL: Franco Arenoso Limoso, ArL: Arcillo Limoso, FArL: Franco Arcillo limoso, FA: Franco arenoso, FAr: Franco arcilloso. Mi: migajosa; Bs, Bloques subangulares; Gr, Granular simple. Clasificación: Alta ***, media **, baja *. Comunes +++, abundantes +++++, muy abundantes +++++

1.3.2 Riqueza y abundancia de esporas de hongos micorrízico arbusculares

En el horizonte superficial del sitio intermedio (área para cultivo) se encontraron esporas de 10 especies de HMA con una riqueza de especies promedio de 5.8 ± 1.6 y una dominancia variando de 0.27 a 8.4, que demuestra que existe variación de número de esporas de las especies identificadas. En la Figura 4 se muestra el promedio y error estándar del número de esporas registradas, donde *Funneliformis mosseae* fue el más abundante, seguido de *Acaulospora* *morrowiae* y *Scutellospora pellucida*.

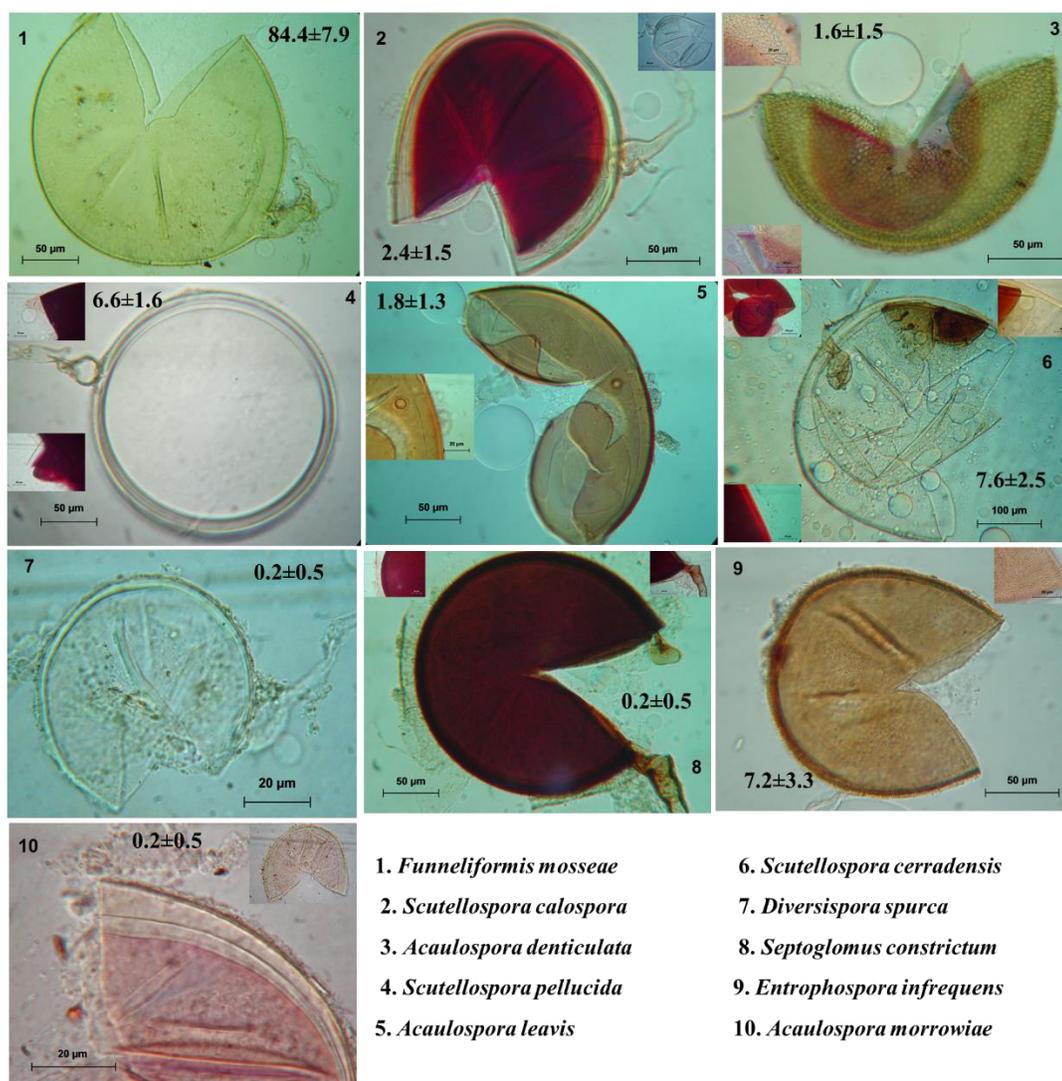


Figura 1.4. Especies de hongos micorrízico arbusculares del suelo en el horizonte A (área de cultivo) de un Vitric Andosol en Calpulalpan, Tlaxcala, México.

1.3.3 Relación hongos/ componentes del suelo

1.3.3.1 Análisis micromorfológico

Los hongos se asociaron con diferentes componentes del suelo de acuerdo con el material parental, tipo de horizonte y minerales amorfos. En el horizonte O (Sitio 3), el micelio fue abundante y se distribuyó por toda la capa de mantillo (Figura 1.5 a). Esta relación cambió en el horizonte A de los tres sitios, donde los hongos y raíces entrelazaron microagregados y formaron macroagregados (Figura 1.5 b); las esporas de diferentes hongos se concentraron predominantemente en el espacio poroso, lo que sugiere que éste es un nicho propicio para su formación. El patrón de crecimiento fúngico y su relación con partículas orgánicas e inorgánicas se observó por toda la sección delgada correspondiente a cada horizonte.

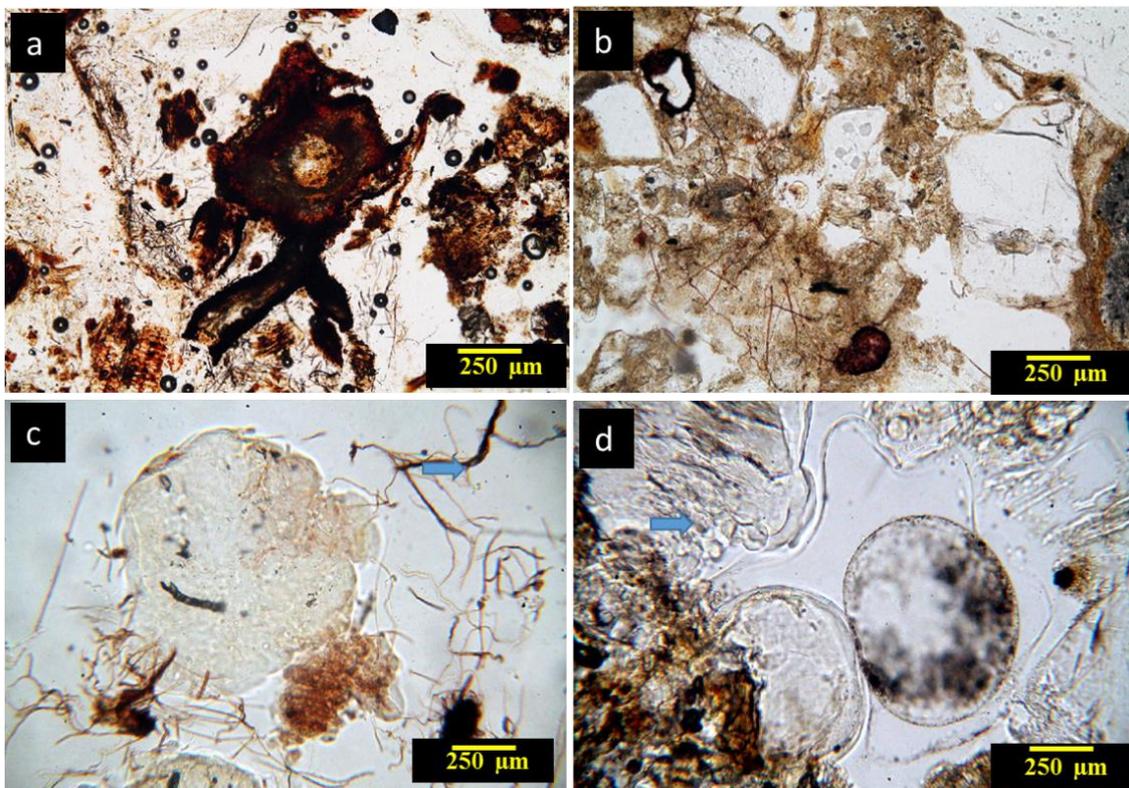


Figura 1.5. Micelio de hongos micorrízico arbusculares asociados con diferentes componentes del suelo. a) con residuos orgánicos; b) con macroagregados; c) con imogolita, flecha azul (fíbulas); y d) con piedra pómez (flecha azul) y espacio poroso. Luz Polarizada Plana. Victric Andosols de un bosque de Calpulalpan, Tlaxcala, México.

McDaniel *et al.* (2012) mencionaron que los Andosols pueden degradarse debido a la implementación de cultivos, que desplaza a la cobertura vegetal original y de hecho se consideran suelos frágiles (Krasilnikov *et al.*, 2013). Sin embargo, los autores no consideraron el papel de las comunidades microbianas en los suelos agrícolas en donde los hongos forman parte del fenómeno de resiliencia del sistema. Aunque se identificaron esporas de 10 especies de HMA en el horizonte superficial fue *F. mosseae* quien dominó, lo cual concuerda con los reportado por otros autores, quienes indican que esta especie contribuye en otros suelos a la formación y estabilidad de agregados de diferentes tamaños en la rizósfera (Wu *et al.*, 2014). Esto sugiere que sea probable que la alta actividad fúngica podría estar permitiendo en parte que los Andosols de Calpulalpan se conserven a pesar de la alta degradación de los suelos generada por las actividades humanas (SEMARNT-CP, 2002).

Los lapillis intemperizados (horizontes Bw) presentaron abundante micelio de basidiomicetos (por la presencia de fíbulas; Figura 5 c), principalmente asociados con macroagregados y minerales amorfos como imogolita y alofano (Figura 5 d). Finalmente, las hifas de estos hongos se insertan a las arenas pomáceas a través de las vesículas tubulares y van formando una especie de cadenas en forma de cuentas de partículas (Figura 5 d), lo que significa que son más afines a las partículas minerales que a la MO, ya que en el horizonte C prácticamente fue donde se observaron.

La mayoría de los HEcM (Ascomycota y Basidiomycota) tienden a presentarse generalmente en los horizontes superficiales (Jumpponen *et al.*, 2010), donde se concentran los nutrimentos del suelo entre ellos el fósforo. Las condiciones edáficas de los suelos estudiados generaron que las raíces hospederas se desarrollaran sin ninguna restricción a mayores

profundidades a través de todo el perfil junto con los hongos. Este crecimiento atípico del micelio está relacionado con los componentes del suelo con imogolita, partículas primarias (pómez), agregados, y con la MO en proceso de descomposición (Brady y Weil, 1999). Específicamente, con la imogolita, la cual es un mineral amorfo común en Andosols (Jongmans *et al.* 1994), y tiene la capacidad de retener fosfatos y agua (Ma *et al.*, 2012; Nurmili *et al.*, 2017; Guimarães *et al.*, 2012). Además, la imogolita junto con la materia orgánica contribuye a la construcción de microagregados (Totsche *et al.*, 2017), por lo que los hongos pueden estar asociados con estas partículas como una fuente de nutrimentos.

En estos suelos, también fue importante la presencia de raíces que formaron macroporos y se relacionaron con redes miceliarias que sujetaron a microagregados y a su vez formaron macroagregados lo que incrementó el número de microporos y por lo tanto el reservorio de humedad y de nutrimentos (Sedov *et al.*, 2010). Asimismo, con la liberación de mucílago se establecen microambientes que los microorganismos colonizan, logrando que el agregado sea más estable (Angers y Caron, 1998).

1.4 CONCLUSIONES

Las propiedades edáficas que permitieron tanto la distribución de raíces como de los hongos a través del perfil, fueron la textura (franca y franco arcillo arenosa) y la estructura (migajosa, granular y granular simple). La estructura compleja conformada por agregados migajosos (macro y microagregados) y de grano simple (compuesta por lapillis pomáceos), generaron buena aireación, retención de humedad y fertilidad alta en Ca^{++} , K^{++} y P, propiciando condiciones para una alta habilidad radical y abundancia de micelio.

En el Andosols bajo un uso agrícola se identificaron esporas de 10 especies de HMA en donde *F. mosseae* fue la más abundante. El micelio se asoció con diferentes componentes orgánicos e inorgánicos a lo largo de los suelos estudiados. Esto se detectó en la superficie con materia orgánica y con los agregados migajosos y granulares (horizonte O y A), y en los horizontes subsuperficiales (Bw o Bt) con arcillas amorfas (imogolita a alofano) y con granos de arena de pómez.

Las hifas se distribuyeron entre el espacio poroso de micro o macroagregados, rodeando a la imogolita y el alófano o bien entrelazando las partículas de lapillis como si fueran cuentas.

La presencia de abundante micelio atrapando a los agregados e inclusive a las partículas de pómez hasta más de un metro de profundidad, sugiere que los hongos son un componente biótico que pudiera estar contribuyendo a la estabilidad de los Andosols y evitando su degradación dentro del bosque de pino y áreas de cultivo en Calpulalpan Tlaxcala, México.

1.5 REFERENCIAS

- Angers, D. A., & Caron, J. (1998). Plant-induced changes in soil structure: processes and feedbacks. In *Plant-induced soil changes: processes and feedbacks* (pp. 55-72). Springer Netherlands.
- Base de datos del Servicio Meteorológico Nacional, CONAGUA, programa ERICIII versión 2.0 (2009).
- Bedini, S., Pellegrino, E., Avio, L., Pellegrini, S., Bazzoffi, P., Argese, E. & Giovannetti, M. (2009). Changes in soil aggregation and glomalin-related soil protein content as affected by the arbuscular mycorrhizal fungal species *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices*. *Soil Biol. Biochem.* 41: 1491-1496.
- Borie, F., R. Rubio & A. Morales (2008). Arbuscular mycorrhizal fungi and soil aggregation. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 8: 9–18
- Brady, N.C. & R. R. Weil. 1999. *The nature and properties of soil.* 3a Edition. Upper Saddle River. New Jersey. USA. Prentice Hall. 877 p.
- Bullock, P., N. Federoff., A. Jongerius, G. Stoops & T. Tursina. (1985). *Handbook for Soil Thin Section Description.* Wayne Research Publications, England. 152 p.

- Cuanalo de la Cerda, H. (1982). Manual para la descripción de perfiles de suelos en el campo. 3a ed. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Gerdenann, J.W. & N.Th. Nicolson. (1963). Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. British Mycol. Soc.* 46: 235-244.
- Guimarães, L., Pinto, Y. N.; Lourenço, M. P. & Duarte, H. A. (2013). Imogolite-like nanotubes: Structure, stability, electronic and mechanical properties of the phosphorous and arsenic...*Phys. Chem. Phys.* 15, 4303–9.
- Gutiérrez del Valle A. (2014). Erosión hídrica del estado de Tlaxcala. Tesis de Maestría. Programa de Edafología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 62 pp.
- IUSS Working Group WRB. (2015). Base referencial mundial del recurso suelo 2014, Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos 106. FAO, Roma.
- Jongmans, A.G. F. van Oort, P. Buurman, A. M. Jaunet, & J. D. J. van Doesburg. (1994). Morphology, Chemistry, and Mineralogy of Isotropic Aluminosilicate Coatings in a Guadeloupe Andisol. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 58: 501-507.
- Jumpponen A, Jones K.L & Blair J. (2010). Vertical distribution of fungal communities in tall grass prairie soil. *Mycologia.* 102, 1027–1041.
- Kasper, M., Buchan, G. D., Mentler, A., & Y Blum, W. E. H. (2009). Influence of soil tillage systems on aggregate stability and the distribution of C and N in different aggregate fractions. *Soil Till. Res.* 105(2), 192-199.
- Krasilnikov, P., Ma del C Gutiérrez-Castorena, J. Ahrens R., C.O. Cruz-Gaistardo, S. Sedov, & E. Solleiro-Rebolledo. (2013). *The Soils of Mexico.* Springer, Dordrecht.
- Ma, W., Yah, W.O., Otsuka, H., & Takahara, A. 2012. Application of imogolite clay nanotubes in organic–inorganic nanohybrid materials. *J. Mater. Chem.* 22, 11887–11892.
- McDaniel, P.A., J. Lowe, D., O. Arnalds, L. & Ping, C. (2012). Andisols. In: Huang, P.M., Li, Y., Sumner, M.E. (Eds.), *Handbook of Soil Science*, 2nd edition Vol. 1: Properties and Processes. CRC Press (Taylor & Francis), Boca Raton, FL, p. 33 29-33.48.
- Murphy, C.P. (1986). *Thin section preparation of soils and sediments* A.B. Academic Publishers, Berkshamsted, England 149 pp.
- Nie, M., Pendall, E., Bell, C. & D. Wallenstein, M. (2014). Soil aggregate size distribution mediates microbial climate change feedbacks. *Soil Biol. Biochem.* 68, 357-365.
- Nurmili Y., E. Hanudin & D. B. Heru Purwanto. (2017). Chemical Characteristics and Morphology of Amorphous Materials Derived from Different Parent Materials from Central Java, Indonesia. *Int J. Soil Sci.* 12:54-64
- Ortiz-Solorio C.A (2010). *Edafología.* Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Suelos. 8a Edición. 327 pp.
- Pape, T. & D. Lager, D. (1995). *Manual for soil description and classification.* Department of Soil Science and Geology. Wageningen, Netherlands. 164 pp.
- Sedov, S., G. Stoops, & S. Shoba. (2010). Regoliths and Soils on Volcanic Ash. In G. Stoops, V. Marcelino, and F. Mees, (eds.), *Interpretation of Micromorphological Features of Soils and Regoliths.* Elsevier, Amsterdam, pp. 275.
- Segura-Castruita, M.A., Ma del C. Gutiérrez-Castorena, C.A. Ortiz-Solorio, & P. Sánchez, G. (2005). Régimen de humedad y clasificación de suelos pomáceos del valle de Puebla-Tlaxcala. *Terra Latinoam.* 23,13–20.

- SEMARNAT-CP. (2002). Evaluación de la degradación de suelo causada por el hombre en la República Mexicana. Escala 1:50 000. Memoria Nacional. 68 pp.
- Six J, Bossuyt H, Degryze S & Denef K. (2004). A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Till. Res.* 79: 7–31.
- Stoops, G. (2003). Guidelines for the Analysis and Description of Soil and Regolith Thin Sections. SSSA, Madison, WI.
- Tisdall, J.M. & Oades, J.M. (1982). Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.* 62, 141–163.
- Totsche K.U, W. Amelung, H. Gerzabek M. G. Guggenberger, E. Klumpp, C. Knief, E. Lehdorff, R. Mikutta, S. Peth, A. Prechtl, N. Ray, I. & Kögel-Knaber. (2017). Microaggregates in soils. *J. Plant Nutrition Soil Sci.* 1-33.
- Van Reeuwijk, L.P. (2003). Procedures for Soil Analysis, 4th ed. Tech. Pap., vol. 9. ISRIC, Wageningen. The Netherlands.
- Young, A. (1976). *Tropical Soils and Soil Survey*. Cambridge University Press. Melbourne, Australia, 468 pp.
- Wu, Q.S., Cao, M.Q., Zou, Y.N. & He, X. (2014). Direct and indirect effects of glomalin, mycorrhizal hyphae and roots on aggregate stability in rhizosphere of trifoliate orange. *Sci. Rep.* 4, 5823.

CITAS ELECTRÓNICAS

<http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>

<http://invam.caf.wvu.edu/> ; última consulta: 15.10.2012

**CAPÍTULO II. FORMACIÓN DE AGREGADOS EN LA INTERACCIÓN SUELO-
HONGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR**

FORMACIÓN DE AGREGADOS EN LA INTERACCIÓN SUELO–HONGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR

RESUMEN

La influencia de los hongos micorrizico arbusculares (HMA) en la estructura del suelo ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, el papel que tiene el micelio de cada especie en el atrapamiento de partículas para la estabilidad y formación de micro y macro agregados ha sido poco documentado en Andosols. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el papel de tres especies de HMA: en la capacidad de agregación (macro y microagregados) y la estabilidad en un Vitric Andosol durante un año. Se construyó un contenedor especial para llevar a cabo el experimento, el cual consistió de un tubo de PVC con seis entradas, cuatro fueron cubiertas con tres mallas de diferente diámetro para permitir el paso del micelio sin la interacción de la raíz (0.5 mm, 0.25 cm y 34 μm) y después se colocaron extensiones de PVC con suelo para evaluar la agregación. El experimento fue completamente al azar con un factor, especies de HMA (*Funneliformis mosseae*, *Gigaspora gigantea*, *Rhizophagus intraradices* y un testigo sin HMA), cada uno con ocho repeticiones y 32 extensiones. Se realizaron ocho muestreos durante un año para evaluar la estabilidad en diferentes tamaños de agregados y elaborar secciones delgadas. En cada sección delgada se tomaron imágenes individuales y secuenciales para construir mosaicos de alta resolución (2.6 μm^2 y 0.51 μm^2) con diferentes objetivos (2 \times y 10 \times). El análisis de imágenes se llevó a cabo con operadores espaciales. Los resultados indicaron que en el Vitric Andosol no inoculado las diferentes clases de tamaño de agregados permanecieron casi sin cambio en todo el experimento; en tanto que, en los tratamientos inoculados, los microagregados (< 0.25 mm) se formaron desde los 30 y 150 días

y los macroagregados hasta después de 230 días ambos con diferencias significativas ($\alpha= 0.05$). Los HMA entrelazaron a las partículas órgano minerales, *R. intraradices* y *F. mosseae* tuvieron mayor impacto en la agregación en tanto que *Gi. gigantea* sólo tuvo influencia al principio del experimento y se asoció con partículas de pómez. Los HMA contribuyeron a la estabilidad de agregados en Andosols, pero de manera diferente y dependiendo del tamaño de agregado y componente del suelo.

Palabras clave: *Estabilidad de agregados, mosaicos de alta resolución, análisis de imágenes.*

2.1 INTRODUCCIÓN

Los hongos micorrízico arbusculares (HMA) son simbioses obligados al necesitar de una planta hospedera para completar su ciclo de vida (Smith y Read, 2010). En la interacción micorrízica, el micelio extrarradical explora más allá del alcance de la raíz para absorber agua y minerales poco solubles que después transfiere a su planta hospedera, mejorando la nutrición (Harley y Smith, 1983) y ayudando al reciclaje de los nutrientes del suelo (Barea y Jeffries, 1995).

Varios investigadores han reportado que la red micelial micorrízica tiene impacto en el proceso de agregación del suelo (Tisdall y Oades 1982; Six *et al.*, 2004), en la incorporación de carbono y nitrógeno (Govindarajulu *et al.*, 2005) y en la actividad de otros microorganismos (Rillig y Mummey, 2006). No obstante, los mecanismos a través de los cuales el micelio participa directamente en la formación de agregados no están claramente establecidos (González-Chávez *et al.*, 2004; Rillig y Mummey, 2006). En ese sentido, es relevante generar conocimiento para comprender mejor el papel que desempeña el micelio micorrízico en la

estructura (*in situ*) y en la inducción de la resistencia del suelo contra la erosión (Rillig *et al.*, 2002; Ettema, y Wardle, 2002; Rillig y Mummey, 2006).

Los HMA poseen diferente estrategia de colonización tanto en el suelo como dentro de su planta hospedera; por ejemplo, especies de los géneros *Rhizophagus* sp. y *Funneliformis* sp. desarrollan hifas finas y difusas, en tanto que *Gigaspora* sp., forma hifas gruesas y densamente agregadas (Hart *et al.*, 2005). Hart y Reader (2002) reportaron que *Gi. gigantea*, *R. intraradices* y *F. mosseae*, tienen diferente tipo de mecanismo de exploración en suelo y tipo de colonización; por ejemplo, *R. intraradices* y *F. mosseae*, colonizan a la planta entre la primera y segunda semana; en tanto que *Gi. gigantea* lo hace hasta la sexta semana. Además, los HMA también varían en cuanto a la formación y tamaños de estructuras internas y externas en la raíz hospedante (Dood *et al.*, 2000; Hart *et al.*, 2005), y en la longitud del micelio externo *Gi. gigantea* formó tres veces más micelio que *R. intraradices*, *F. mosseae*.

En un Vitric Andosols (Capítulo I de esta tesis) se encontraron 10 especies de hongos siendo *F. mosseae* el más abundante (de [28 a 227]·50g⁻¹) en el horizonte superficial, además también encontró que tanto HMA como HEcM están contribuyendo a la estabilidad de los suelos y a los lapillis pomáceos. No obstante, se desconoce cómo participa cada HMA en todo el proceso de agregación y en materiales donde domina la fracción mineral (vitric) y su relación con la estabilidad y tamaños de agregados. En otros Andosols de la República Mexicana varios autores han reportado la presencia de *Gigaspora* sp. y *Rhizophagus* sp. (Guadarrama y Álvarez-Sánchez, 1999; Carreón-Abud *et al.*, 2015), por lo que es importante también analizar la influencia de estas especies en este tipo de suelos volcánicos.

Hart y Read (2002) plantearon como hipótesis que el proceso de formación de agregados debe ser diferente de acuerdo con el crecimiento y exploración micelial que tiene cada especie

de HMA. El problema es que en todos los estudios donde se analiza la interacción entre hongos y agregados, utilizan técnicas destructivas y se limitan a una parte de la interacción; como por ejemplo, medir la longitud y volumen de las raíces (Ambriz *et al.*, 2010), o bien a cuantificar la producción de micelio extrarradical (Vilariño *et al.*, 1993; Boddington *et al.*, 1999), aislar esporas (Gerdemann y Nicolson 1963) o a determinar la colonización micorrízica en la raíz (Phillips y Hayman, 1970). En estos estudios se destruye el suelo lo que limita la comprensión de las interacciones que se pueden establecer entre microorganismos, plantas y tipos de suelo o sustratos, que sólo se pueden obtener a través de muestras que no han sido alteradas (*in situ*).

La micromorfología es una disciplina de la Ciencia del Suelo que utiliza secciones delgadas de muestras inalteradas de suelo (*in situ*) (25-30 µm de espesor). Los componentes del suelo se describen y analizan con un microscopio petrográfico (Bullock *et al.*, 1985), para caracterizar el sistema poroso en términos de la distribución y del tipo de arreglo de las partículas de suelo (Bui, 1991). Este tipo de estudios no sólo ayuda a entender la interacción entre los componentes del fenómeno a estudiar, sino también a monitorear y predecir algunos cambios en la estructura, composición, interacción, función y en el estado de conservación de los componentes del suelo; así como a comprender con claridad los cambios estructurales a escala de micras (Peng *et al.*, 2006). Además, la micromorfología es una herramienta útil para realizar análisis de imágenes con mosaicos de alta resolución de toda la sección delgada (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2016) en donde se pueden analizar los componentes del suelo a través de múltiples escalas. Por ejemplo, se puede analizar la relación entre las bacterias, las raíces y los componentes del suelo en cultivos de maíz y alfalfa. También es posible generar mapas temáticos y cuantificar cada uno de los componentes del suelo y sus interacciones con el componente biológico (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2018), además del tipo de agregado (forma).

La micromorfometría de los componentes del suelo apoyados con análisis físicos específicamente en agregados, pueden ser muy útiles para comprender el proceso de agregación del suelo (Stoops *et al.*, 2010), y se requieren buenas correlaciones utilizando herramientas de pedometría (Stoops, 2018), sobre todo si se considera toda la sección delgada en múltiples escalas de observación.

Las hipótesis que se plantearon en este estudio fueron: i) Las distintas especies de HMA participan de diferente manera en la estabilidad y formación de macro y microagregados en Andosols debido a su morfología y capacidad de exploración; y ii) que con la micromorfología y el análisis de imágenes es posible diferenciar y cuantificar el efecto entre los hongos micorrízicos en la formación de agregados.

Los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Determinar la formación y estabilidad de diferentes clases de agregados (macro y micros) a través de la interacción suelo-planta-HMA (con tres especies) en condiciones de invernadero y 2) Describir y cuantificar la relación de los HMA con las clases de tamaño de agregados utilizando mosaicos de alta resolución y análisis de imágenes.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Localización del sitio de muestreo

El suelo que fue utilizado para realizar el experimento se colectó del horizonte A de un suelo ubicado dentro de un bosque de Pino en San Felipe, Calpulalpan, estado de Tlaxcala, México; con localización geográfica 19° 32' 11.9" LN y 98° 39' 12.3" LW, y con una altitud de 2664 m. El suelo corresponde a un Vitric Andosols, de acuerdo con el IUSS Grupo de

Trabajo de la WRB (2014), cubierto por una vegetación de coníferas (*Pinus patula*), y tiene como material parental cenizas/ lapillis pomáceos (Capítulo I).

El suelo superficial colectado se caracteriza por presentar un color pardo 10YR (4/3) en seco y pardo oscuro 10YR (3/3) en húmedo; textura arena limosa con agregados migajosos y granulares, consistencia friable; presencia de poros canales y abundantes raíces gruesas; 1.4% de carbono orgánico y un pH ácido de 5.5. Además, tiene diferentes usos, los cuales pueden ser forestal y agrícola.

El muestreo consistió en coleccionar 100 kg de suelo del horizonte superficial (0-10 cm) de un suelo con uso agrícola (Sitio 1, Capítulo I). El material edáfico se secó bajo sombra y se tamizó a < 2 mm para obtener la fracción fina del suelo y partir de un sustarto homogéneo. Posteriormente, se esterilizó con autoclave durante 3 h a 120 °C y 15 Lb de presión, en dos ocasiones.

2.2.2 Propagación de inóculo micorrízico

Se propagaron los inóculos de *Funneliformis mosseae*, *Gigaspora gigantea*, *Rhizophagus intraradices* en contenedores de 2 kg utilizando cebolla (*Allum cepa* L.) y trigo (*Triticum aestivum*) como plantas hospederas. Las semillas se sembraron en arena estéril (partículas de pómez) como sustrato y se irrigaron cada tercer día con solución nutritiva Long Ashton baja en fósforo [20 µM]. El periodo de propagación del inoculante fue de tres meses, después se dejaron de regar por otros tres meses para estimular la esporulación de los HMA.

2.2.3 Construcción de la unidad experimental

Con el fin de evaluar la interacción del micelio con los agregados pero sin la influencia de la raíz se construyó un contenedor especial para llevar a cabo el experimento (Figura 3.1).

El contenedor consistió de un tubo (2 pulgadas) de PVC con seis entradas o extensiones. El contenedor se rellenó con suelo estéril de la fracción fina (≤ 2 mm de diámetro) mezclado con arena pomácea (partículas de 1-3 mm de diámetro) que contenía 350 g de inóculo con 40 esporas en 50 g de arena. Las extensiones horizontales fueron cubiertas con mallas de diferente diámetro, el cual fue disminuyendo progresivamente del compartimento central a las extensiones ($0.5 \mu\text{m}^2$, 0.25cm^2 , $34 \mu\text{m}^2$), para permitir solamente el paso y desarrollo micelial y estudiar la agregación sin mezclar el efecto de la interacción por la raíz. Posteriormente, se colocó la extensión de PVC unida con una abrazadera (unidad experimental), se volvió a rellenar de suelo esterilizado y se sellaron las salidas con tela de organza ($0.5 \mu\text{m}^2$). Las entradas verticales fueron para la planta hospedera y para permitir el flujo de agua y aire durante los riegos.

2.2.4 Diseño experimental

La planta que se utilizó como hospedero fue *Trifolium subterraneum* L. por ser una especie altamente micorrízica. Los tratamientos de inoculación incluyeron tres fuentes de inóculos propagados (*Funneliformis mosseae*, *Gigaspora gigantea* y *Rhizophagus intraradices*) y un testigo no inoculado (NI). El diseño experimental fue completamente al azar con ocho repeticiones de los cuatro tratamientos de inoculación, dando un total de 32 contenedores (Figura 2.1), cada contenedor tenía cuatro extensiones verticales. El experimento terminó después de transcurridos 365 días.

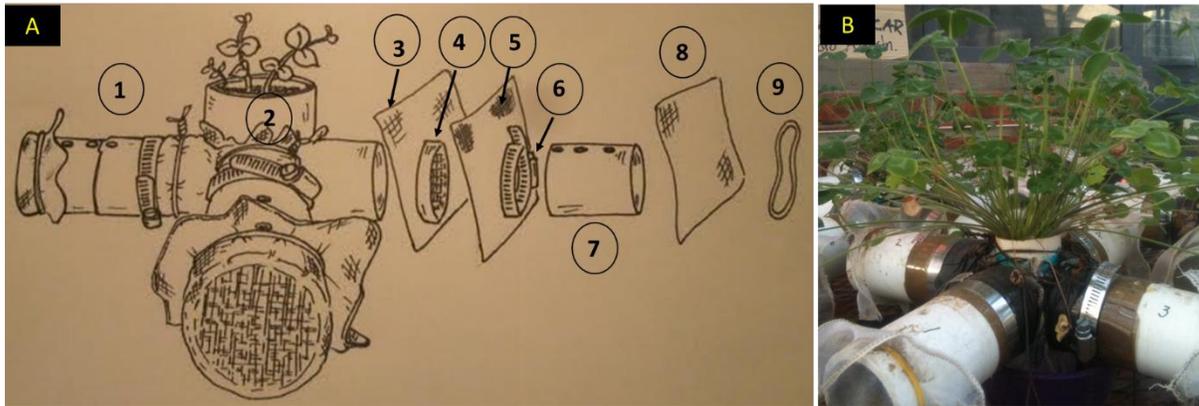


Figura 2.1. A. Diagrama del sistema experimental A). 1. Extensión 2. Contenedor para planta hospedera; 3 malla de organza ($0.5 \mu\text{m}^2$); 4. Rejilla plástica (0.250 cm^2); 5. Malla $34 \mu\text{m}^2$; 6. Abrazadera; 7. Unidad experimental (tubo PVC 10 cm) con tres orificios; 8. Malla de organza; 9. Sujetador. B). Contenedor para crecimiento de la planta hospedera *Trifolium subterraneum* L. (compartimento central) y unidades experimentales.

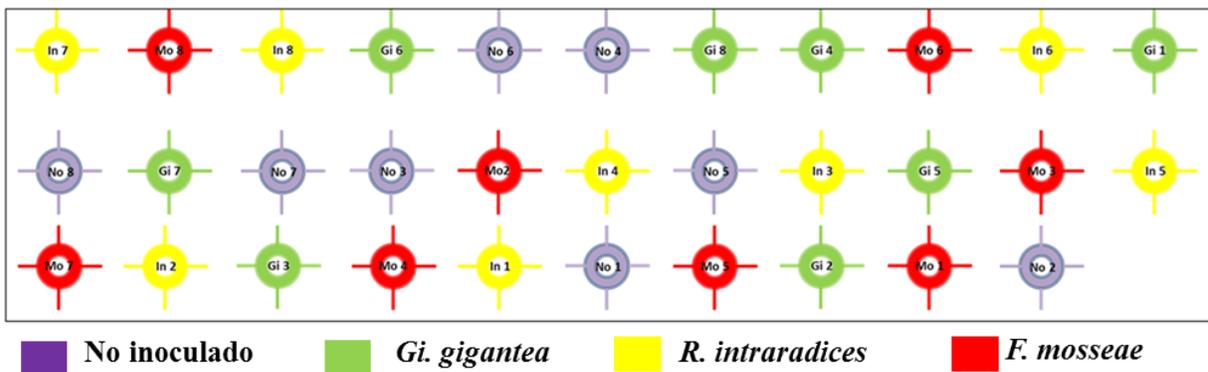


Figura 2.2. Diseño experimental completamente al azar para evaluar la formación de agregados estables en agua en los tratamientos bajo condiciones de invernadero.

Las cosechas se realizaron mensualmente hasta el 5to mes, para las cuales se colectaron de manera aleatoria cuatro unidades experimentales de cada tratamiento; tres de ellas para determinar agregados estables y una para elaborar secciones delgadas. Posteriormente, se muestreó cada 2.3 meses y se terminó de colectar todas las unidades experimentales en un año. En cada tiempo de cosecha, al retirar la extensión, se colocó un tapón de PVC para evitar

deshidratación. Los contenedores fueron regados cada tercer día tanto por la parte superior como por la parte inferior mediante un sistema de capilaridad con el propósito de evitar la compactación del compartimento central.

2.2.5 Determinación de la estabilidad de agregados

La estabilidad de agregados en húmedo se determinó utilizando la metodología de Kemper y Rosenau (1986). El método consiste en coleccionar 20 g de suelo, luego se pasan a través de una serie de tamices, que se colocan en forma de columna, con diferente apertura de malla de > 4.75 (muy gruesa), 2.0-4.7 (gruesa), 1.0-2.0 (media), 0.50-1.0 (fina), 0.25-0.50 (muy fina) y < 0.25 mm (microagregados). La columna de tamices se sumerge en agua destilada con movimientos verticales a 60 rpm durante un minuto y las fracciones retenidas en cada tamiz se coleccionan, se secan a 105⁰ C por 18 h y finalmente se pesan. Posteriormente, fue necesario hacer una corrección por presencia de partículas de arena, para ello se añadió 20 ml de una solución de hexametafosfato de sodio al 0.5%, a cada una de las clases de tamaño de agregados y se agitaron por 12 h. Los agregados se pasaron de nuevo por el tamiz correspondiente, se lavaron y pesaron. El peso de los agregados se le restó el peso de la fracción arena.

2.2.6 Análisis micromorfológico

Las unidades experimentales obtenidas para este tipo de análisis se secaron al aire libre y luego se les agregó resina poliéster insaturada y monómero estireno en una relación 70:30. Después, se dejaron en gelación a la sombra por 30 días y una semana directo al sol para su endurecimiento.

Los bloques se cortaron (horizontalmente) utilizando un disco de punta de diamante y las secciones se pulieron con abrasivos de diferente diámetro de carburo de silicio (carborodum)

y óxido de aluminio (aloxita) hasta tener un espesor de 30 μm . Las secciones delgadas fueron elaboradas utilizando la metodología propuesta por Murphy (1986). Los componentes del suelo se describieron de acuerdo con Bullock *et al.* (1985) y Stoops (2003) y su interpretación se basó en Stoops *et al.* (2010). En total se obtuvieron 32 secciones delgadas (área de 3850 mm^2 ; 5 \times 7.0 cm), que corresponden a los cuatro tratamientos con ocho repeticiones.

2.2.7 Construcción de mosaicos

Debido a un problema de escala entre agregados e hifas se utilizaron dos procedimientos para la cuantificación e identificación.

1. Los agregados y las diferentes clases de tamaño se cuantificaron a través de cinco imágenes individuales aisladas, capturadas de manera aleatoria en Luz Polarizada Plana (LPP), utilizando el objetivo 2 \times , de un microscopio petrográfico (Olimpus Bx51) y una cámara canon (EOS rebel 350D). Cada imagen tiene una resolución de 4272 x 2848 pixels, profundidad de color de 24 bites en las tres bandas RGB (Roja, Verde y Azul).
2. Las hifas y su relación con los agregados se identificaron y cuantificaron a través de mosaicos. Las cuatro imágenes secuenciales con presencia micelial fueron capturadas con el objetivo 10 \times (5 repeticiones) y Luz polarizada Plana. De las imágenes secuenciales se construyeron mosaicos de alta resolución (48 780 544 pixels^2 con 2.6 y 0.51 μm^2) utilizando la metodología propuesta por Gutiérrez-Castorena *et al.* (2016; 2018). El procedimiento de captura de las imágenes individuales y secuenciales en secciones delgadas se reporta en la Figura 2.3.

2.2.8 Análisis de imágenes

La interacción de los HMA con los componentes del suelo se analizó y cuantificó con los programas ERDAS 2014[®] y ArcMap 10.4[®] y la metodología propuesta por Gutiérrez-Castorena *et al.* (2018). La metodología consiste primero en segmentar la imagen y después

llevar a cabo una clasificación supervisada para obtener los valores de brillantez de cada componente. En la Figura 2.3 se reporta un diagrama del todo el procedimiento llevado a cabo.

Las diferentes clases de tamaño de agregados corresponden a los mismos tamaños que se calcularon en agregados estables en agua, los cuales se obtuvieron utilizando la metodología de Gutiérrez-Castorena *et al.* (2018). Esta metodología consiste en segmentar y clasificar la imagen de toda la sección delgada y en agrupar polígonos utilizando el área del círculo; por ejemplo, para agregados de un tamaño $< 250 \mu\text{m}$ se agruparon 48087 píxeles². La cuantificación de las diferentes clases de agregados se llevó a cabo utilizando el programa ArcMap 10.4[®].

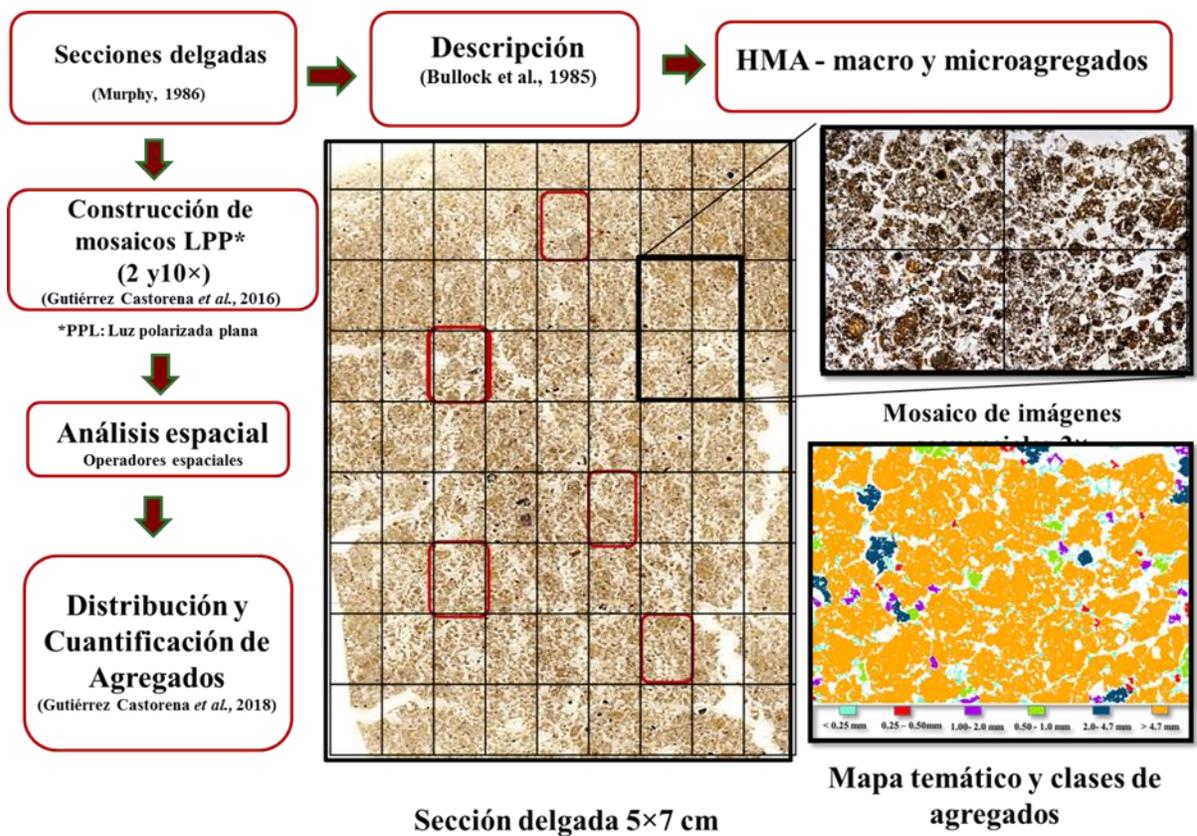


Figura 2.3. Esquema general para el análisis micromorfológico de la interacción entre macro y microagregados de suelo y los hongos micorrízico arbusculares mediante secciones delgadas y análisis de imágenes usando operadores espaciales.

2.2.9 Análisis de datos

La estabilidad de agregados en agua (sistema destructivo) entre tratamientos y su efecto a través del tiempo se determinó a través de un análisis de regresión ($P \leq 0.05$). También se realizó un análisis de comparación de medias Tukey ($\alpha= 0.05$) utilizando el programa estadístico STATISTICA[®], para evaluar el efecto entre los tratamientos y del tiempo de colecta.

El número de agregados de cada clase de tamaño se obtuvo a través del promedio de las cinco imágenes (repeticiones) obtenidas con el objetivo $2\times$ a 30 y 365 dds. Asimismo, se calculó el número de agregados (de los seis tamaños) en el mosaico de cuatro imágenes según la metodología propuesta por Gutiérrez-Castorena *et al.* (2018)

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Estabilidad de agregados

Los análisis de regresión indicaron que no hay diferencias estadísticas ($\alpha= 0.05$) en la cantidad de agregados estables de ningún tratamiento, ni en los microagregados, ni en los macroagregados finos (< 0.50 mm), a través del tiempo. Sin embargo, sí se presentaron diferencias estadísticas ($\alpha= 0.05$) en las fracciones de macroagregados $> 0.5-1.0$ mm en adelante en los tratamientos inoculados (Cuadro 2.1). Las diferencias se observaron con *F. mosseae* a partir de la fracción fina, con *Gi. gigantea* a partir de la fracción media y finalmente, con *R. intraradices* únicamente hasta la fracción muy gruesa.

Cuadro 2.1. Valores de P del análisis de regresión entre la formación de agregados estables en agua y los diferentes los tratamientos de inoculación de HMA a través de un año.

Tratamientos	Microagregados		Macroagregados (mm)			
	< 0.25	Muy finos 0.25-0.50	Finos 0.50-1.0	Medios 1.0-2.0	Gruesos 2.0-4.7	Muy gruesos < 4.7
Ni	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Gi	ns	ns	ns	0.047*	0.019*	0.009*
I	ns	ns	ns	ns	ns	0.001*
Mo	ns	ns	0.016*	0.0359*	ns	0.000*

Ni: No inoculado, Gi: *Gigaspora gigantea*, I: *Rhizophagus intraradices*, Mo: *Funneliformis mosseae*. Los valores en asterisco representan diferencias estadísticas altamente significativas ($P > 0.05$)

El análisis de comparación de medias Tukey mostró diferencias estadísticas ($\alpha \leq 0.05$) entre los tres inóculos con respecto al NI, en microagregados (entre 30 y 150 días), en agregados medios (en 60 días) y en agregados muy gruesos después de 225 días. En las demás fracciones no hubo diferencias estadísticas, o bien, se presentaron algunos traslapes entre inóculos a 30 días en las fracciones medias y gruesas y después de 150 días en las fracciones gruesas tal como se reporta en el Cuadro 2.2.

Cuadro 2.2 Prueba de comparación de medias Tukey ($\alpha \leq 0.05$) de agregados estables en agua entre tratamientos de inoculación a través del tiempo.

Dds	Tamaño de agregados estables en agua (mm)					
	< 0.25	0.25-0.50	0.50-1.0	1.0-2.0	2.0-4.7	> 4.7
0	ns	ns	ns	ns	ns	ns
30	Ni ^c , Gi ^b , I ^a , Mo ^d	ns	ns	Ni ^b , Gi ^a , I ^b , Mo ^b	Ni ^b , Gi ^b , I ^b , Mo ^a	ns
60	Ni ^c , Gi ^b , I ^a , Mo ^d	ns	ns	Ni ^a , Gi ^b , I ^b , Mo ^b	ns	ns
90	ns	ns	ns	ns	ns	ns
120	Ni ^c , Gi ^d , I ^a , Mo ^b	ns	ns	ns	ns	ns
150	Ni ^a , Gi ^b , I ^c , Mo ^c	ns	ns	ns	Ni ^c , Gi ^c , I ^b , Mo ^a	Ni ^b , Gi ^b , I ^b , Mo ^a
225	Ni ^c , Gi ^c , I ^a , Mo ^b	ns	ns	ns	ns	Ni ^c , Gi ^a , I ^a , Mo ^b
285	ns	ns	ns	ns	Ni ^c , Gi ^b , I ^a , Mo ^c	ns
365	ns	ns	ns	ns	ns	Ni ^c , Gi ^b , I ^a , Mo ^a

Dds: días después de la siembra, Ni: no inoculado, Gi: *Gigaspora gigantea*, I: *Rizophagus intraradices*, Mo: *Funneliformis mosseae*, ns: diferencia estadística no significativa. n=12 por tiempo de cosecha
Letras diferentes indican diferencias estadísticas.

En la Figura 2.4 se puede apreciar que en microagregados y agregados muy finos no hay diferencias entre los tratamientos; en contraste con los tratamientos inoculados donde las fracciones finas y medias presentaron un comportamiento inverso con respecto a los agregados muy gruesos (> 4.7mm). Al final de experimento, *F. mosseae* fue el que tuvo mayor impacto positivo en la formación de agregados muy gruesos (60%) con respecto al tratamiento testigo (10%) seguido por *R. intraradices*, mientras que, el que tuvo menor impacto fue *Gi. gigantea*.

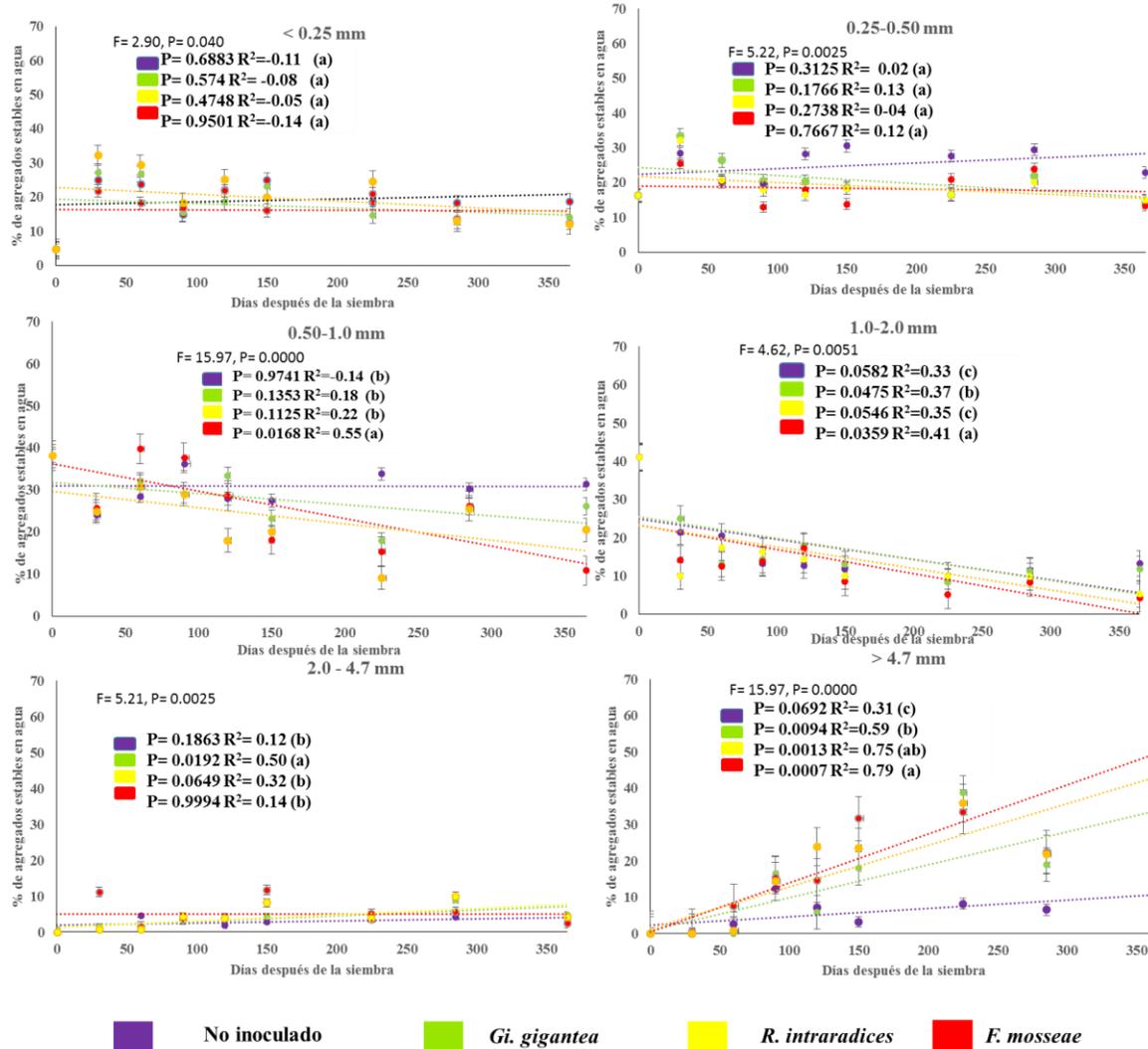


Figura 2.4 Dinámica de la formación temporal de macro y microagregados estables en agua en los tratamientos de inoculación. El número entre paréntesis representa diferencia estadística significativa)

2.3.2 Análisis micromorfológico de la interacción HMA-Agregados de suelo

Cuantificación de agregados con imágenes individuales

Todos los suelos iniciaron con una estructura apedal (microagregados entre granos compactos) porque se alteró el suelo en la elaboración del sustrato. El proceso de agregación inició después de un mes en todos los tratamientos y terminó con la formación de macroagregados muy gruesos a los 356 días. La mayor influencia en la agregación se presentó

en *R. intraradices* (53.2%), seguido de *F. mosseae* (35.2%) y *Gi. gigantea* (31.1%) (Cuadro 2.3). La cuantificación de las clases de tamaños de agregados utilizando imágenes individuales mostró que, la desviación estándar es muy alta en las fracciones ≥ 4.7 mm, ésta disminuyó en agregados muy gruesos debido a la heterogeneidad de los sistemas, sobre todo al final del experimento que fue cuando se formó una estructura migajosa y poros de empaquetamiento compuesto.

Cuadro 2.3 Porcentaje promedio de clases de agregados de suelo *in situ* en los diferentes tratamientos de inoculación por imágenes individuales a 2× (n=5).

Clases	No inoculado		<i>Gi. gigantea</i>		<i>F. mosseae</i>		<i>R. intraradices</i>	
	30	365	30	365	30	365	30	365
< 0.25	2.9±1.6	4.1±1.7	3.97±1.3	4.02±1.1	5.08±1.6	4.06±1.5	0.74±0.6	4.54±2.0
0.25-0.5	1.3±1.2	1.8±1.3	2.02±1.0	1.96±1.0	2.14±1.2	2.03±1.2	0.11±0.3	1.77±1.3
0.5-1.0	1.2±1.2	2.2±1.5	2.33±0.9	1.92±0.9	2.25±1.3	2.87±1.4	0.09±0.3	1.45±1.2
1.0-2.0	1.3±1.2	2.3±1.6	2.86±1.1	2.23±0.9	2.57±1.3	4.31±1.6	0.07±0.3	1.88±1.1
2.0-4.7	3.0±1.8	2.5±1.6	5.14±1.5	3.89±1.4	3.04±1.2	5.03±1.5	0	1.29±1.1
≥ 4.7	*45.7±4.5	39.1±4.7+	*27.8±3.7	31.1±3.7+	*62.5±4.4	35.2±4.3+	*64.3±1.8	53.2±1.35+
%Poros	44.2±3.1	47.7±3.9	55.7±2.8	49.1±2.3	53.8±3.1	39.1±2.8**	39.1.6±1.7	35.8±3.4**

*Estructuras apedales; + agregados migajosos; ** Poros de empaquetamiento compuesto

En la Figura 2.4 se reporta el desarrollo de agregados generado por *R. intraradices* a lo largo de un año de experimento. La agregación inició con una estructura apedal de microagregados entre granos con una distribución enaúlica gruesa y de doble espacio; es decir dos microagregados y una partícula inorgánica del mismo tamaño y muy compactados. Los macroagregados fueron menores 1 mm de diámetro.

En el transcurso del experimento, la agregación fue incrementando hasta formar macroagregados migajosos gruesos y muy gruesos, después de 225 días y el espacio de

empaquetamiento complejo (minerales y agregados) se transformó a uno de empaquetamiento compuesto donde se agregaron todas las partículas. El espacio poroso se redujo hasta 36%, pero se incrementaron los microporos dentro de los agregados. Además, también se pudo apreciar que no hubo cambio en la estructura entre los 90 y los 150 días. Con *F. mosseae* también se presentó un desarrollo estructural parecido, pero con menor impacto en la agregación. En la Figura 2.5 se muestra la interacción del micelio de los diferentes inóculos con los componentes del suelo (agregados, partículas minerales, órgano-minerales y espacio poroso) al final del experimento en diferentes tamaños de agregados.

Aunque se elaboraron todos los mapas temáticos de los diferentes tratamientos con los mosaicos construidos a 2×, sólo se reportan los mapas que corresponden a 30 y 365 días (Figura 2.6). Estas fueron las fechas donde se encontraron diferencias estadísticas significativas en (muestras alteradas e inalteradas) en agregados de micro y macroagregados en las diferentes especies de los hongos estudiados.

En el tratamiento no inoculado se presentaron todas las clases de agregados, pero dominaron las estructuras apedales con cavidades, por lo que, el operador espacial lo agrupó como agregados muy gruesos. En los tratamientos inoculados todas las microestructuras son apedales de microagregados entre granos muy compactos.

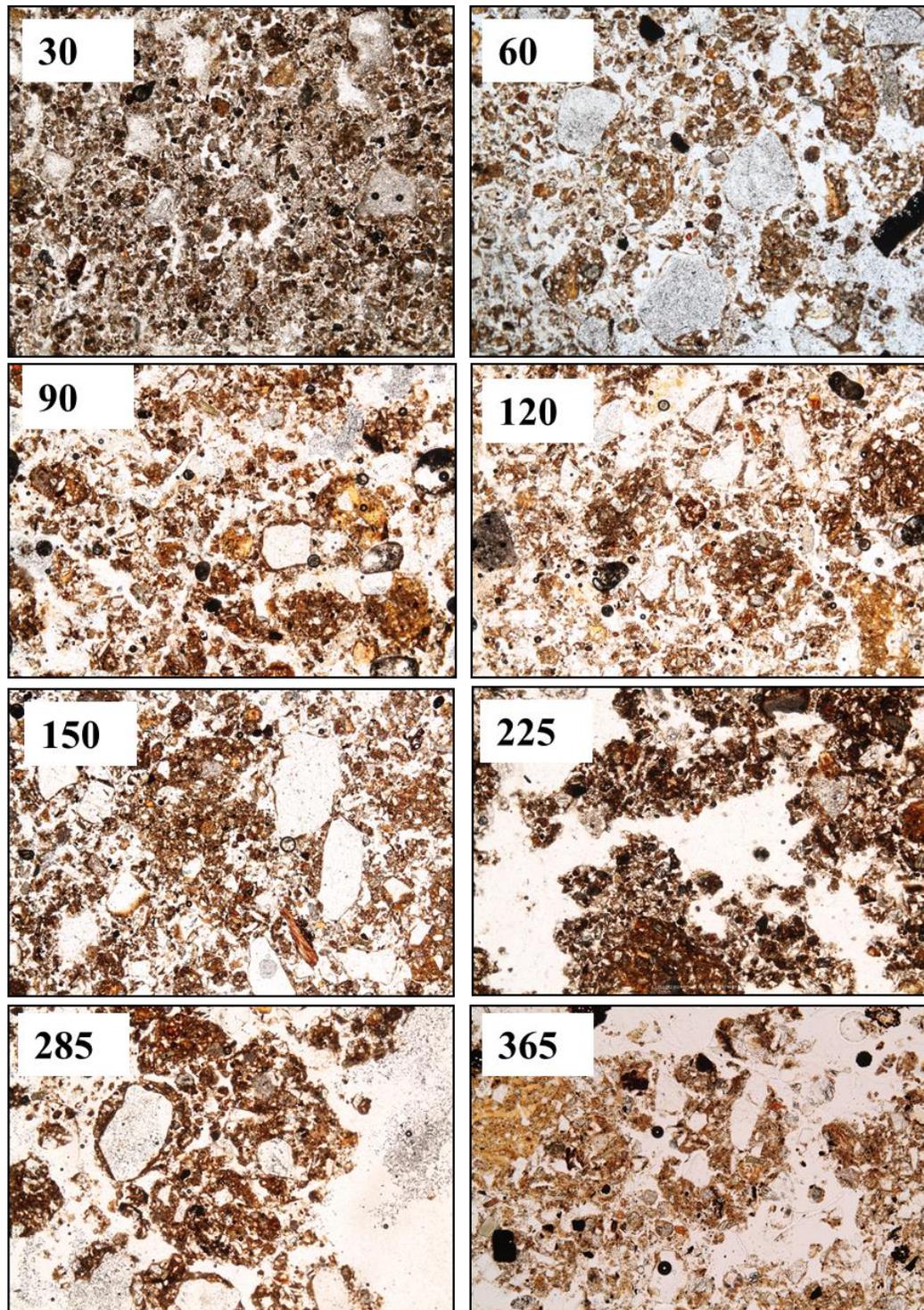


Figura 2.5. Desarrollo de agregados de diferentes tamaños generados por *Rhizophagus intraradices* durante 365 días. La microestructura inicia como apedal (compacta), microagregados entre granos (60-150 días) y termina en una estructura migajosos y una porosidad de empaquetamiento compuesto (225 y 365 días).

3.4.3 Imágenes compuestas

En el Cuadro 2.4 se reportan los diferentes porcentajes de tamaños de agregados representados en los mapas temáticos con el objetivo 2 ×. En este cuadro se puede observar que en el tratamiento NI hubo una reducción en la frecuencia en todos los tamaños de partículas sobre todo en microagregados de 826 a 334; mientras que en los tratamientos inoculados éstos se incrementaron *Gi. gigantea* < *F. mosseae* < *R. intraradices*. En *R. intraradices* el incremento fue más drástico en microagregados y en el cambio de estructuras de apedales a agregados migajosos (de 0 a 29 agregados).

Cuadro 2.4 Número y porcentaje (entre paréntesis) de agregados de suelo *in situ* por clase de tamaño en los tratamientos de inoculación obtenidos en mosaicos de 4 imágenes (2×).

Clases (mm)	No inoculado		<i>G. gigantea</i>		<i>F. mosseae</i>		<i>R. intraradices</i>	
	30	365	30	365	30	365	30	365
< 0.25	826 (2.93)	334 (1.34)	253 (0.88)	364 (1.25)	100 (0.29)	775 (3.16)	286 (0.84)	514 (2.04)
0.25-0.50	36 (0.76)	23 (0.49)	13 (0.06)	17 (0.34)	1 (0.02)	62 (1.29)	10 (0.19)	55 (1.21)
0.5-1.0	38 (1.65)	20 (0.90)	7 (0.31)	10 (0.46)	1 (0.03)	48 (2.09)	1 (0.04)	51 (2.31)
1.0-2.0	21 (1.87)	9 (0.85)	11 (1.02)	6 (0.48)	0	37 (3.53)	1 (0.11)	24 (2.05)
2.0-4.7	7 (1.48)	10 (1.90)	3 (0.74)	6 (0.95)	0	21 (4.26)	1 (0.13)	28 (5.42)
≥ 4.7	7 (39.7)	6 (46.6)	Apedal 8 (55.2)	14 (57.6)	Apedal (67.3)	29 (27.8)	Apedal (60.8)	23 (24.3)

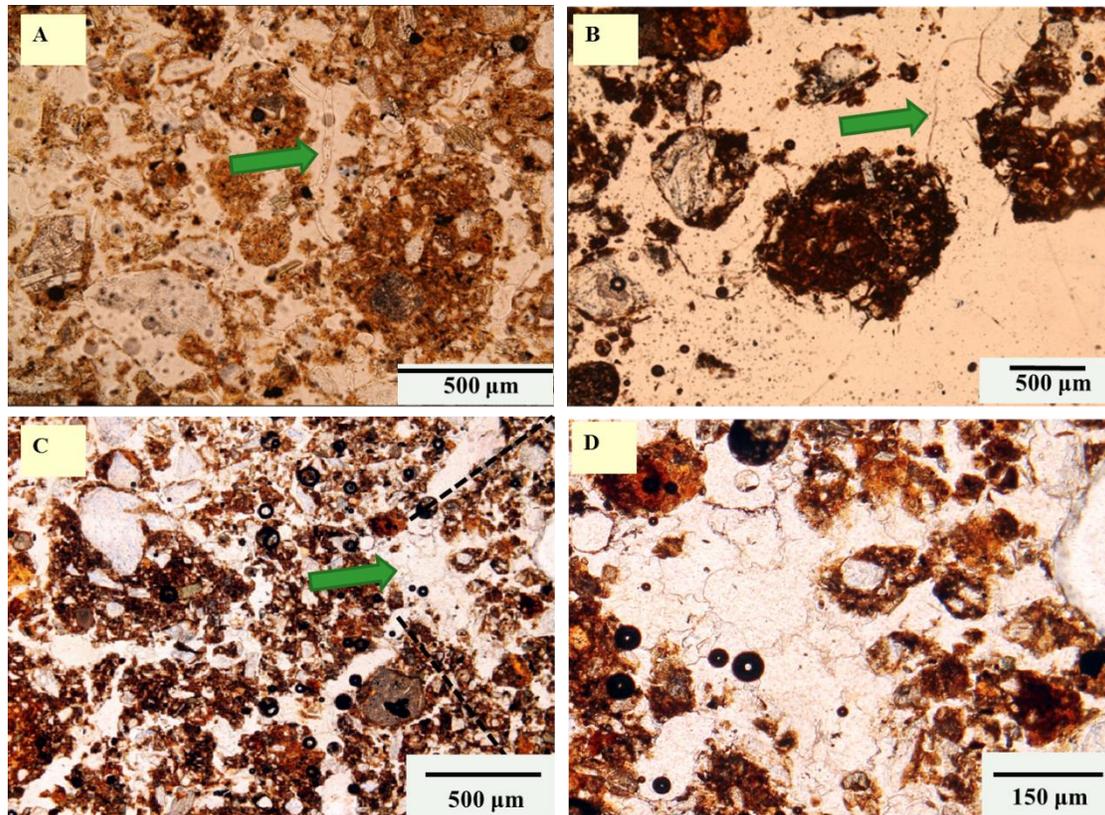


Figura 2.6. Micelio de HMA (flechas verdes) asociado con agregados y minerales. A) *Gigaspora gigantea*; B) *Rhizophagus intraradices*, C) *Funneliformis mosseae* y D) Mayor detalle de C. Luz Polarizada Plana.

La Figura 2.7 muestra mapas temáticos de los agregados en los diferentes tratamientos. A los 30 días donde la estructura fue principalmente apedal, con poros tipo cavidad, o de microagregados entre granos muy compactos en todos los tratamientos. Los cambios en la estructura fueron evidentes en los inóculos al final del experimento. En el tratamiento NI se preserva la estructura apedal y termina en cavidad por el acomodo de las partículas en sistemas alterados. Con *Gi. gigantea* la estructura continua siendo apedal pero de tipo fisurada con algunas cavidades, similar al tratamiento no inoculado. Con *R. intraradices* y *F. mosseae* en contraste, los agregados fueron migajosos de diferentes tamaños con poros de empaquetamiento compuesto y

abundantes microporos dentro de los agregados. Todos ellos son característicos de los sistemas biológicos que generan gran heterogeneidad en el suelo.

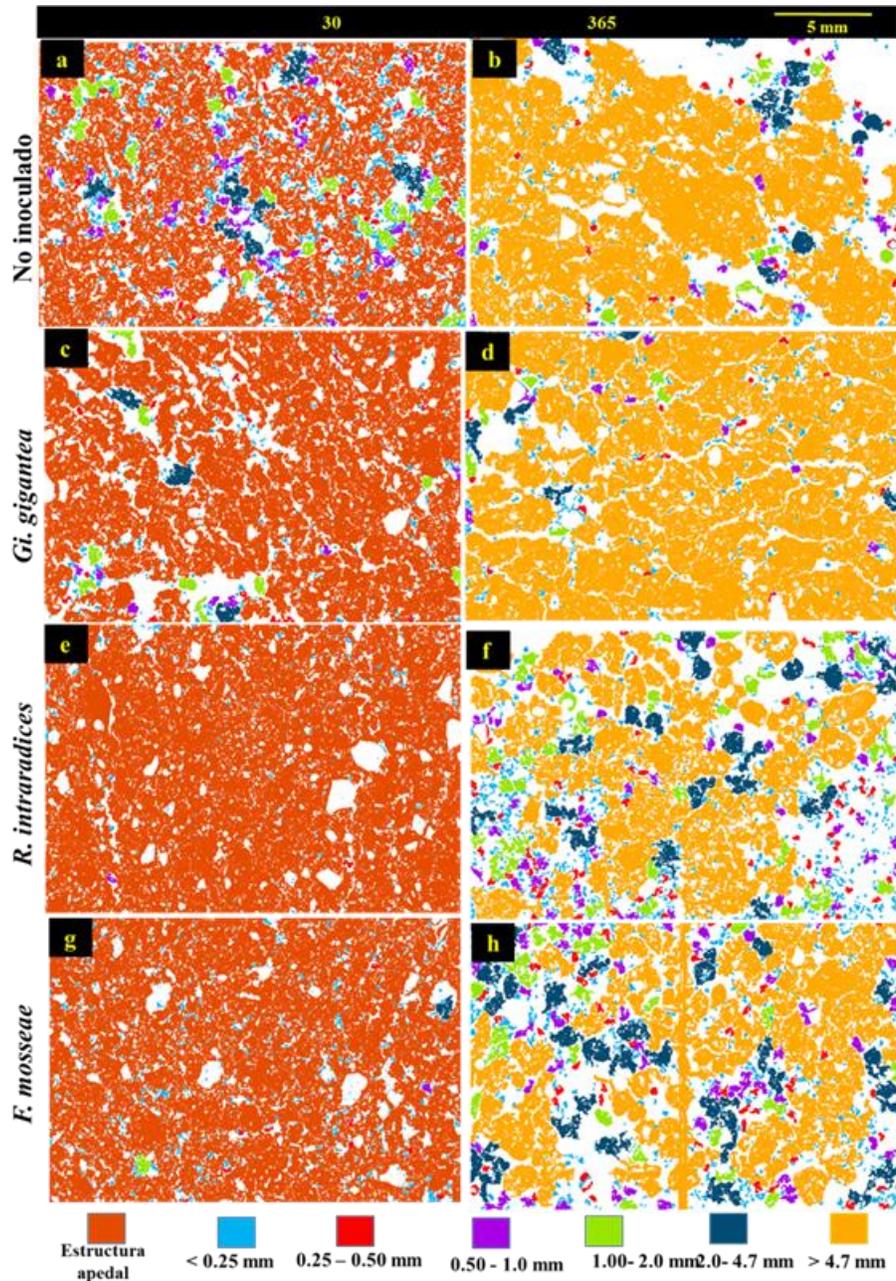


Figura 2.7. Mapas temáticos de tamaños de agregados de mosaicos de cuatro imágenes (22.03×14.80 mm) mostrando distribución de macro y microagregados de suelo in situ, de los cuatro tratamientos de inoculación 30 y 365 días después de la siembra. Estructuras apedales (a, b, c, d, e, g). Estructura migajosa (f y h). Poros cavidad (b y c) fisuras (d) y de empaquetamiento compuesto (f y h).

A través del análisis micromorfológico y de mapas temáticos se encontró que ocurren diferencias entre las relaciones de los HMA con los diferentes componentes del suelo, así como los tamaños de agregados. Asimismo, se pudo identificar la estructura promovida por el micelio de los hongos estudiados (Figura 2.8)

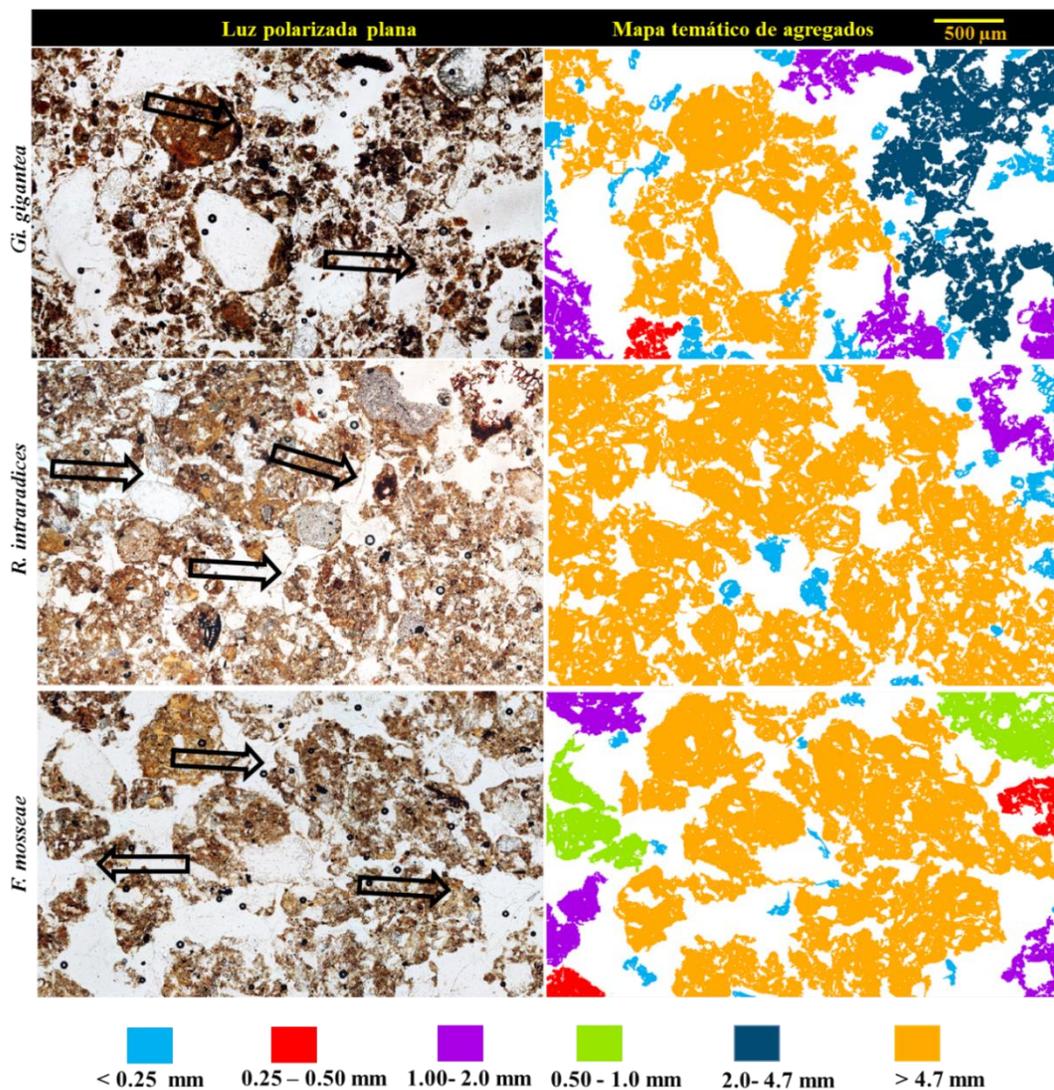


Figura 2.8 Mapas temáticos de tamaños de agregados de los tratamientos inoculados. Micelio micorrízico (flechas) asociado con micro y macroagregados formando una estructura migajosa, poros de empaquetamiento compuesto y micro-porosidad interna. Mosaicos de cuatro imágenes; objetivo 10×.

En resumen, el micelio de *R. intraradices* enlazó tanto agregados de diferente clase como a partículas minerales de tamaño similar incrementando con esto el tamaño de los agregados migajosos y que se localizó principalmente en el espacio poroso. *Gigaspora gigantea* por su parte, se asoció tanto con macroagregados débilmente desarrollados (> 4.7 mm) como con partículas inorgánicas (pómez). Finalmente, *F. mosseae* se relacionó con micro y macroagregados; además se observó, que su micelio envolvió partículas minerales a partir de las cuales las hifas se desarrollaron y atraparon microagregados.

2.4 DISCUSIÓN

Los resultados evidenciaron que la capacidad de los HMA estudiados para formar y estabilizar macro y microagregados de diferentes tamaños, dependió de la especie fúngica. La especie *F. mosseae* contribuyó en mayor porcentaje a la formación de agregados estables que *R. intraradices* en agregados de > 4.7 mm a los 365 días después de la siembra. Sin embargo, el análisis de imágenes mostró que *R. intraradices* tuvo mayor capacidad para formar agregados de diferentes clases, incluyendo microagregados. En ese sentido el uso de los métodos de cuantificación por masa en las diferentes fracciones y de análisis de imágenes en el presente estudio, permitieron complementar esta información que no habría sido posible sin la convergencia de los dos enfoques. De hecho, Stoops (2018) recientemente recomendó que son necesarias buenas correlaciones entre análisis físicos y micromorfológicos utilizando herramientas de pedometría en las ciencias aplicadas del suelo.

La presente investigación muestra que en el suelo no inoculado y sin raíces se presentaron agregados estables de diferentes tamaños (< 0.25, 0.25-0.50, 0.50-1.0, 1.0-2.0, 2.0-

4.7, > 4.7 mm) que no variaron su frecuencia a lo largo del experimento, debido a que no tuvieron un agente enlazante que modificara sus tamaños. En Andosols en condiciones naturales, la formación de agregados está relacionada principalmente con la actividad biológica (Nierop Buurman, 2007); sin embargo, hay otros factores que están participando y no están claramente estudiados (Sedov *et al.*, 2010). De acuerdo con Takahashi y Dahlgren (2016), la presencia de complejos órgano-minerales influye en la formación y estabilidad de agregados; aunque en Vitric Andosols (antes Vitrandepts) esto se debe tanto a procesos de humificación, (por diversos microorganismos), e intemperismo de las tefras así como, a la actividad de las raíces de diferentes especies de plantas (Piotrowski *et al.*, 2004; Sedov *et al.*, 2010).

La teoría jerárquica de la agregación, propuesta por Tisdall y Oades (1982) y modificada por Oades (1984) plantea que los microagregados se unen para formar macroagregados, donde los enlaces químicos de aluminosilicatos en microagregados se enlazan entre sí para formarlos. Los datos de este estudio muestran que esta estructura jerárquica inició desde los macroagregados medios hasta muy gruesos, lo cual se logró demostrar a través de análisis de masa distribuída en fracciones y la micromorfología.

Kohler *et al.* (2016) probaron con dos tipos de suelo (franco arenoso y franco limoso) la capacidad de agregación de tres HMA (*Septoglomus* sp., *Rhizophagus irregularis*, *Gigaspora gigantea*) y utilizando *Olea europea* como planta hospedera. Ellos encontraron que *R. irregularis* contribuyó mayoritariamente a la formación de agregados de 0.25-4.0 mm en ambos tipos de suelo; sin embargo, no se determinó que porcentaje de los agregados se formaron como resultado de la influencia del fitobionte y micobionte en forma aislada.

El efecto de los hongos en la agregación es alta en Andosols con elevado grado de humificación, por lo que se ha reportado que se encuentra abundante micelio (Tejedor Salguero

et al., 1975); no obstante, esto se reporta de manera general. En este estudio se pudo observar que la contribución de las tres especies de HMA, para formar y estabilizar agregados de diferentes tamaños, la cual no es homogénea. La especie *F. mosseae* tuvo influencia no sólo en el enlace de partículas elementales, sino también en el enlace de macroagregados medios para formar macroagregados muy gruesos. Esto se debió a la mayor cantidad de micelio y al grosor de las hifas que permiten mayor superficie de exploración y de contacto con los agregados y partículas minerales independientemente del tipo de suelo (Friese y Allen 1991). Por ejemplo, Wu *et al.* (2015) reportaron que en un Ferrasol *F. mosseae* en asociación con *Poncirus trifoliata*, favorecieron en 10% la formación de agregados estables de menos de 1.0 mm; mientras que Schreiner *et al.* (1997) indicaron que después de 135 días, con *Glycine max* L. como planta hospedera, en un suelo arenoso, este hongo favoreció la formación de agregados estables entre 2.0-4.0 mm. En la presente investigación en el tratamiento inoculado con *F. mosseae* para el tamaño (2.0-4.7 mm), se obtuvieron los porcentajes de 10% hasta los 285 días en comparación de lo reportado por Schreiner *et al.* (1997); en tanto que para agregados menores a 1.00 (0.5-1.00 mm) los tratamientos inoculados fueron mayores a 30%, en comparación con los no inoculados a los 60 días, en los que el porcentaje fue disminuyendo conforme transcurría el tiempo para formar agregados > 4.7 mm.

En la dinámica de agregación *F. mosseae* primero tendió a enlazar partículas de tamaño muy fino y medio, y posteriormente sólo atrapó agregados de tamaño medio y de manera exponencial agregados muy gruesos (hasta 60%). En los macroagregados granulares o migajosos, al estar conformados jerárquicamente por otros agregados, se incrementa la retención de humedad debido a la generación de microporos que se encuentran entre las partículas (Rillig y Mummey 2006; Bedini *et al.*, 2009; Augué *et al.*, 2001). Se ha observado que los HMA no

sólo atrapan partículas organo-minerales sino también, partículas inorgánicas como piedra pómez de tamaño de 3 mm, las cuales retienen humedad fácilmente disponible (Segura-Castruita *et al.*, 2005; de León *et al.*, 2007). En el caso de *R. intraradices* también fue selectivo en atrapar partículas, pero en menor proporción que *F. mosseae*.

Caso contrario ocurrió con *Gi. gigantea* donde las hifas atraparon microagregados para formar macroagregados con desarrollo débil a moderado (Figura 2.8), y de baja estabilidad (Figura 2.5). Este hongo desarrolla hifas (primarias y secundarias) gruesas (Watrud *et al.*, 1978) que se bifurcaron entre los microagregados y el espacio poroso, pero desarrolló menor cantidad de micelio que *R. intraradices* y *F. mosseae* y su capacidad de agregación sólo se observó en los primeros meses.

Piotrowski *et al.* (2004) reportaron que *Gi. gigantea* y *R. intraradices* pueden formar hasta el 90% de los agregados estables (1-2 mm) después de 330 días. Sin embargo, lo que se encontró en la presente investigación fue que los microagregados se formaron hasta los primeros 60 días en todos los tratamientos inoculados. En el caso de agregados de tamaño medio (1-2 mm), no se observó una tendencia clara.

Los estudios de formación y estabilidad de agregados se han llevado a cabo con metodologías que alteran la relación entre las partículas de suelo, el espacio poroso, la macro y la microbiota, lo que excluye información sobre la relación entre componentes, así como sus interacciones en los procesos de la formación de agregados. Con el análisis de imágenes y mapas temáticos de las muestras inalteradas (*in situ*), a través de secciones delgadas, se pudo observar que la formación de agregados por parte de los HMA estudiados, no sólo se llevó a cabo en las fracciones macros sino también en la microscópicas (< 0.25 mm) y *R. intraradices* favoreció más la agregación, seguida de *F. mosseae* y *Gi. gigantea* con respecto al testigo.

En este estudio se involucraron por primera vez las cuantificaciones en masa en muestras alteradas con análisis de imágenes *in situ* para medir la contribución de diferentes hongos micorrízico arbusculares en la formación de agregados. Sin embargo, se recomienda realizar estudios de micromorfología y micromorfometría en futuras investigaciones, con diferentes fuentes luz y tinciones, para que, se pueda observar y cuantificar mejor el micelio, así como, determinar cuantitativamente las interacciones con hongos micorrízicos y los diversos componentes del suelo.

2.5 CONCLUSIONES

Con los análisis físicos se encontró que los agregados del suelo sin HMA (tratamiento testigo) mantuvieron los mismos tamaños durante todo el año que duró el experimento, debido a que no tuvieron un agente enlazante que permitiera el crecimiento de macroagregados. Los HMA tuvieron el mismo impacto en la estabilidad de los agregados, pero no en el tamaño de éstos. Dependiendo de la especie algunos impactan en las fracciones finas y otros en las fracciones más gruesas.

Con el estudio micromorfológico se pudo observar que los HMA tienden a incrementar la formación agregados enlazando partículas, pero no de la misma naturaleza. En particular, *R. intraradices* y *F. moseae* unen agregados de tamaño medio hasta formar agregados muy gruesos y modifican la estructura a migajosa con poros de empaquetamiento compuesto; mientras *Gi. gigantea* se relaciona con agregados finos y partículas inorgánicas, pero su impacto es menor al final de un año, al mantener la estructural apedal.

Con base en lo anterior se aceptó la hipótesis de que las especies arbusculares enlazan partículas de diferente manera e impactan en el tamaño y estabilidad de los agregados, lo cual se logró probar utilizando análisis físicos, micromorfológicos y análisis de imágenes.

2.6 REFERENCIAS

- Ambriz, E., Báez-Pérez, A., Sánchez-Yáñez, J. M., Moutoglis, P., & Villegas, J. (2010). *Fraxinus–Glomus–Pisolithus* symbiosis: Plant growth and soil aggregation effects. *Pedobiologia*. 53(6), 369-373.
- Barthès B., Azontonde A., Boli B., Prat C. & Roose E. (2000). Field-scale run-off and erosion in relation to topsoil aggregate stability three tropical regions (benin, Cameroo, Mexico). *Eur. J. Soil Sci.* 51: 485-495.
- Bui, E. N. (1991). Applications of image analysis to soil micromorphology. *Agriculture, Ecosyst. & Environ.* 34. 305-313.
- Bullock, P., N. Federoff., A. Jongerius., G. Stoops & T. Tursina. (1985). *Handbook for Soil Thin Section Description*. Wayne Research Publications, England. 152 p.
- Carreón-Abud, Y., Vega-Fraga, M., & Gavito, M. E. (2015). Interaction of arbuscular mycorrhizal inoculants and chicken manure in avocado rootstock production. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 15 (4), 867- 881
- Davidson, D. A., Bruneau, P. M. C., Grieve, I. C., & Young, I. M. (2002). Impacts of fauna on an upland grassland soil as determined by micromorphological analysis. *Appl. Soil Ecol.*, 20(2), 133-143.
- De León-González F., Gutiérrez M.C., González-Chávez C.F. & Castillo-Juárez H. (2007). Root-aggregation in a pumiceous sandy soil. *Geoderma* 142: 308-317.
- Dodd, J. C., Boddington, C. L., Rodriguez, A., Gonzalez-Chavez, C., & Mansur, I. (2000). Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. *Plant Soil.* 226(2), 131-151
- Friese C.F & Allen M.F. (1991). The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia.* 83, 409–418.
- González-Chávez, M. C. A., Gutiérrez-Castorena, M. C., & Wright, S. (2004). Hongos micorrízicos arbusculares en la agregación del suelo y su estabilidad. *Terra Latinoam.* 22(4), 507-514.
- Govindarajulu, M., Pfeffer E.P., Jin H., Abubaker J., Douds D.D., Allen J.W., Bücking H., Lammers J.P. & Shachar-Hill Y. (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature.* 435, 819–823.
- Guadarrama P. & Alvarez-Sanchez F. (1999). Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, Mexico. *Mycorrhiza* 8: 267–270.
- Gutiérrez-Castorena, E. V. G., del Carmen Gutiérrez-Castorena, M., Vargas, T. G., Bontemps, L. C., Martínez, J. D., Méndez, E. S., & Solorio, C. A. O. (2016). Micromapping of

- microbial hotspots and biofilms from different crops using digital image mosaics of soil thin sections. *Geoderma*. 279, 11-21.
- Gutiérrez-Castorena, M. C., Gutiérrez-Castorena, E.V., González-Vargas, T., Ortiz-Solorio, C. A., Suástegui-Méndez, E., Cajuste-Bontemps, L. & Rodríguez-Mendoza, M.N. (2018). Thematic micro-maps of soil components using high-resolution spatially referenced mosaics from whole soil thin sections and image analysis. *Eur. J. Soil Sci.* 1-15.
- Hart, M. M., & Reader, R. J. (2002). Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New phytol.* 153(2), 335-344.
- Hart, M. M., & Reader, R. J. (2005). The role of the external mycelium in early colonization for three arbuscular mycorrhizal fungal species with different colonization strategies. *Pedobiologia*. 49(3), 269-279.
- IUSS Working Group WRB, (2015). Base referencial mundial del recurso suelo 2014, Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos 106. FAO, Roma.
- Kemper, W.D. & Rosenau, R.C., (1986). Methods of soil analysis. Part 1. In: Physical and Mineralogical Methods. Ame. Soc. Agro. Inc.
- Kohler, J., Caravaca, F., & Roldán, A. (2009). Effect of drought on the stability of rhizosphere soil aggregates of *Lactuca sativa* grown in a degraded soil inoculated with PGPR and AM fungi. *Appl. soil ecol.* 42(2), 160-165.
- Kohler, J., Roldán, A., Campoy, M., & Caravaca, F. (2017). Unraveling the role of hyphal networks from arbuscular mycorrhizal fungi in aggregate stabilization of semiarid soils with different textures and carbonate contents. *Plant Soil*. 410 (1-2), 273-281.
- Jiménez-Martínez, A., González-Chávez, M. C. A., García-Cue, J. L., Lara-Hernández, M. E., & Gutiérrez-Castorena, M. C. (2014). Producción de inóculo micorrízico de *Gigaspora gigantea* en mezclas de sustratos con diferente tamaño de partícula. *Agrociencia* 48:3, 239-254.
- Murphy, C.P. (1986). Thin section preparation of soils and sediments A.B. Academic Publishers, Berkshamsted, England 149 pp.
- Peng, X., Horn, R., Peth, S. & Smucker, A. (2006). Quantification of soil shrinkage in 2D by digital image processing of soil surface. *Soil Till.Res.* 91(1), 173-180.
- Piotrowski, J. S., Denich, T., Klironomos, J. N., Graham, J. M., & Rillig, M. C. (2004). The effects of arbuscular mycorrhizas on soil aggregation depend on the interaction between plant and fungal species. *New phytol.* 164 (2), 365-373.
- Rillig, M. C., Lutgen, E. R., Ramsey, P. W., Klironomos, J. N., & Gannon, J. E. (2005). Microbiota accompanying different arbuscular mycorrhizal fungal isolates influence soil aggregation. *Pedobiologia*. 49(3), 251-259.
- Rillig, M.C. & Mummey, D.L. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New phytol.* 171, 41-53.
- Schreiner, R. P., Mihara, K. L., McDaniel, H., & Bethlenfalvay, G. J. (1997). Mycorrhizal fungi influence plant and soil functions and interactions. *Plant Soil*. 188(2), 199-209.
- Segura-Castruita M.A. (2003) Escalas de observación de los estudios de génesis de suelos: caso de los suelos de humedad residual. Tesis Doctorado. Colegio de Postgraduados, Montecillos, edo. de México.
- Segura C.M.A., Gutiérrez C.M.C., Ortiz S.C. & Gómez D.J.D. (2000) Suelos arcillosos de la zona oriente del Estado de México. *Terra Latinoam.* 18: 35-44

- Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). Mycorrhizal symbiosis. Academic press.
- Six, J., & Paustian, K. (2014). Aggregate-associated soil organic matter as an ecosystem property and a measurement tool. *Soil Biol. Biochem.* 68, 4-9.
- Stoops, G., (2003). Guidelines for the Analysis and Description of Soil and Regolith Thin Sections. SSSA, Madison, WI.
- Stoops, G. (2010). Interpretation of micromorphological features of soils and regoliths. Elsevier.
- T. Takahashi. & R.A. Dahlgren. (2016). Nature, properties and function of aluminium–humus complexes in volcanic soils *Geoderma*. 263 pp. 110-121
- Stoops, G., Vera M., & Mees F., (2018). Interpretation of Micromorphological Soil and Regoliths. 2th Edition. Elsevier. 982 p.
- Wilson, G. W., Rice, C. W. & Rillig, M. C., Springer, A., & Hartnett, D. C. (2009). Soil aggregation and carbon sequestration are tightly correlated with the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi: results from long-term field experiments. *Ecol. Lett.* 12(5), 452-46
- Watrud, L. S., Meithaus III, J.J. & Jawouski, E.G. (1978). Geotropism in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Mycologia*. 70, 449–452.
- Wu, Q. S., Srivastava, A. K., Cao, M. Q., & Wang, J. (2015). Mycorrhizal function on soil aggregate stability in root zone and root-free hyphae zone of trifoliolate orange. *Archives of Agron. Soil Sciec.* 61(6), 813-825.

**CAPÍTULO III. FORMACIÓN DE AGREGADOS DE SUELO EN LA INTERACCIÓN
SUELO-*Pinus*- y HONGOS ECTOMICORRÍZICOS**

FORMACIÓN DE AGREGADOS DE SUELO EN LA INTERACCIÓN SUELO-*Pinus*- y HONGOS ECTOMICORRÍZICOS

RESUMEN

Se ha generalizado que a pesar de las diferencias en morfología y crecimiento del micelio de las especies de los hongos micorrízicos, estas actúan de la misma manera en el enlazamiento de las partículas para formar agregados de suelo. Asimismo, es frecuente, que el estudio de las interacciones entre micorrizas y partículas de suelo, se lleve a cabo alterando el sistema y analizando a cada componente por separado o bien a través de fotografías aisladas tomadas con microscopio. Estos procedimientos limitan el análisis de las interacciones del micelio con agregados de diferente tamaño racimos o clusters (0-20 μm), micro (20- < 250 μm) y macroagregados (>250 μm), del arreglo jerárquico de los agregados y de la relación con otros componentes del suelo. En el presente estudio se evaluó la participación de *Suillus* sp., *Laccaria proxima* y *Hebeloma leucosarx*, asociados con raíces de *Pinus patula* y *P. greggii* en la formación de agregados. Después de 24 meses de crecimiento de las plantas, los sustratos se impregnaron con resina poliéster y se elaboraron secciones delgadas con un área aproximada de 1315 mm². El estudio se llevó a cabo a través de la elaboración de mosaicos de alta resolución y operadores espaciales en las secciones delgadas. Imágenes secuenciales digitales de toda la sección delgada con un microscopio óptico (LUV) y petrográfico con diferentes fuentes de luz (LPP, LPC, LPC λ) con objetivos (2 \times y 10 \times) y se construyeron mosaicos de alta resolución (2.6 y 0.5 μm respectivamente). Los mosaicos fueron utilizados para elaborar mapas temáticos y cuantificar las clases (tamaños) de agregados y los componentes del suelo. Los resultados mostraron que *Suillus* sp. formó macroagregados al encapsular a las partículas; mientras que *L.*

proxima y *H. leucosarx* se relacionaron con racimos y microagregados y abrieron el espacio poroso con *Pinus greggii*. La conclusión en la presente investigación fue que todas las interacciones raíz, y micobionte actuaron de diferente manera en el proceso de agregación y con los diferentes tamaños de partícula. Las diferentes fuentes de luz, propiedades ópticas y morfología del micelio fueron importantes para generar mapas temáticos de agregados y sus interacciones con fito y micobiontes.

Palabras clave: *Ectomicorrizas, pinos, agregados, secciones delgadas, análisis de imágenes*

3.1 INTRODUCCIÓN

Los hongos ectomicorrízicos (HEcM) son un componente esencial en la biodiversidad y el mantenimiento de los ecosistemas templados, boreales y tropicales (Pérez-Moreno y Ferrera-Cerrato, 1997; O’Hanlon, 2012), ya que participan activamente en el reciclaje de nutrientes, en promover la estructura del suelo, así como en la protección de la planta hospedera. El 85% de especies de angiospermas y 90% de gimnospermas son colonizadas por estos hongos en diversas condiciones ambientales (Wang y Qiu, 2006).

Los HEcM desarrollan hifas diversamente estructuradas alrededor de las raíces (manto fúngico), de donde emana el micelio externo, el cual puede estar unido en rizomorfos para transportar eficientemente nutrientes y agua (Agerer, 2006). Además, esta estructura micelial presenta características distintivas en morfología y tipo de exploración en el suelo (Melville *et al.*, 1987; Agerer, *et al.* 2002; Arvieu *et al.*, 2003), por lo que pueden estar interactuando con otros componentes del suelo de manera diferencial en el atrapamiento de las partículas de suelo.

Existe amplia literatura que reporta la contribución de los HMA y HEcM en la formación de agregados, así como su participación en la nutrición vegetal (Tisdall y Oades, 1982; 1997; Smith y Read, 2010; Ambriz *et al.*, 2010; Zheng *et al.* 2014). Sin embargo, para analizar el impacto de las interacciones con relación a los microorganismos y el suelo o sustrato, comúnmente se estudia cada uno de los componentes de manera individual. Un ejemplo de esto, es una investigación realizada por Ambriz *et al.* (2010), quienes evaluaron el papel de la simbiosis ecto y endomicorrízica en la formación de macro y microagregados y reportaron que la formación de agregados de diferente tamaño es diferencial en ambos tipos de micorriza. Sin embargo, estos autores no determinaron el arreglo de las hifas de cada uno de los tipos de micobiontes como consecuencia de haber estudiado la formación de agregados estables en agua en un sistema alterado. Adicionalmente, en muestras alteradas se pierde información sobre la distribución de microorganismos *in situ* y su relación con otros componentes bióticos y abióticos del suelo (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2016).

Otros autores han propuesto esquemas o modelos para explicar cómo las hifas llevan a cabo el proceso de atrapamiento de las partículas durante la formación de agregados (Rillig y Mummey, 2006; Lehmann y Rillig, 2015). Con respecto al micelio de los HEcM, se ha considerado la distribución de los esporomas (bajo condiciones de campo), o bien, mediante el empleo de herramientas moleculares o bien experimentos bajo condiciones controladas con la construcción de microcosmos (Pérez-Moreno y Read, 2004; Anderson y Cairney, 2007). Con base en el conocimiento que se tiene de los distintos tipos y formas de crecimiento de los HEcM (www.deemy.de), es probable que el micelio ectomicorrízico tenga un papel diferente en la formación y clases de tamaños de agregados debido a su forma de crecimiento a través del suelo y a la exploración asociada con una determinada planta hospedera (McCormack *et al.*, 2015).

La micromorfología es una rama de la Ciencia del Suelo que estudia al sistema de manera inalterada a través de secciones delgadas (25-30 μm de espesor), (Bullock *et al.*, 1985). Esta se ha utilizado para estudiar el papel de la biota en la formación de diferentes tipos de poros que indican la persistencia y actividad de raíces, lombrices y hongos y su interacción con los componentes del suelo (Davidson *et al.*, 2002; Stoops *et al.*, 2010, 2018) y otros sustratos (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2011; Jiménez-Martínez *et al.*, 2014). El problema es que en los estudios de interacciones fúngicas se utilizan imágenes de microscopio aisladas que no permiten visualizar en múltiples microescalas el proceso de enlazamiento desde partículas elementales, clusters (racimos), micro y macro agregados (Pineda *et al.*, 2012; Ghezzehei, 2012).

Recientemente, se ha propuesto que la microcartografía permite estudiar la distribución del micelio ectomicorrízico de diferentes especies, a través de mallas de acero para coleccionar un monolito de suelo y a través de un lavado dejar sólo a las hifas, las cuales se registran manualmente cuadrante por cuadrante (Agerer *et al.*, 2002). Otro método propuesto son los mosaicos de imágenes secuenciales de alta resolución y micro-cartografía de secciones delgadas a través de sistemas de información geográfica, para analizar las interacciones entre bacterias y componentes del suelo (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2016) y la elaboración de mapas temáticos de componentes del suelos para determinar sus relaciones (Gutiérrez-Castorena *et al.*, 2018). Esta metodología se puede utilizar para evaluar y cuantificar las distintas clases de agregados y producto de la interacción con raíces y micelio micorrízico (*in situ*) a diferentes escalas de observación.

Los objetivos en la presente investigación fueron 1) Evaluar la formación de macro y micro agregados en la interacción raíz-hongo ectomicorrízico, 2) Determinar la relación de diferentes tipos de HEcM y las diferentes clases de agregados, 3) Elaborar mapas temáticos a

través de mosaicos de alta resolución y análisis de imágenes y 4) Cuantificar y determinar las relaciones entre los HEcM con los agregados y otros componentes edáficos mediante mapas temáticos de secciones delgadas.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material biológico

Las plantas que se emplearon en la presente investigación fueron *Pinus greggii* y *P. patula* y tres especies de HEcM comestibles *Laccaria proxima*, *Hebeloma leucosarx*, *Suillus* sp. además, se incluyó un tratamiento no inoculado como testigo. Estas plantas tienen amplia distribución en México así como alto valor económico por ser especies maderables y utilizadas en programas de reforestación y recuperación de suelo (Valdés, 1986; Ramírez-Herrera *et al.*, 2005; Mendizábal-Hernández *et al.*, 2009); mientras que los HEcM tienen diferentes características morfológicas (Cuadro 3.1).

3.2.2 Características de la mezcla de sustratos

Los pinos se sembraron en tubetes de plástico (20 cm de alto) y se inocularon con los HEcM. El sustrato que se utilizó en este experimento consistió en una mezcla de arena-corteza de pino-suelo de monte (Andosol), en proporción 2:2:1. Además, se utilizó tezontle con tamaño de partícula de 2-3 mm de diámetro, y se colocó al fondo del contenedor para evitar pérdida de la mezcla (Martínez-Reyes *et al.*, 2012).

3.2.3 Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con 20 repeticiones por tratamiento de inoculación en cada especie de pino mencionadas, y un total de 160 unidades experimentales.

Después de 24 meses se seleccionó una unidad experimental por cada especie de pino y su correspondiente tratamiento de inoculación, incluyendo al testigo (8 muestras en total). En esta selección se consideró a los pinos que presentaron mayor altura, diámetro del tallo y colonización ectomicorrízica (Carrasco-Hernández, 2013). En el Cuadro 3.2 se reporta altura y diámetro de las especies de pino a los dos años de edad.

3.2.4 Análisis micromorfológico

Los contenedores o macetas experimentales se secaron a la sombra durante un mes debido a su alto contenido de humedad y se impregnaron con una mezcla de resina poliéster insaturada (1 L), monómero de estireno (250 mL) en una relación 7:1. Los bloques se dejaron en una etapa de gelación durante un mes y después fueron expuestos al sol. A cada bloque se le hicieron dos cortes horizontales y tres cortes verticales para obtener seis secciones como se observa en el diagrama de la Figura 3.1. La elaboración de las secciones delgadas ($5 \times 2.5 \text{ cm} \times 25\text{-}30 \text{ }\mu\text{m}$, con 1315 mm^2) se basó en la metodología propuesta por Murphy (1986). La microestructura y los componentes básicos orgánicos e inorgánicos fueron descritos utilizando la terminología propuesta por Bullock *et al.* (1985) y Stoops (2003).

Cuadro 3.1 Características morfológicas de los hongos ectomicorrízicos utilizados como micobiontes.

Hongo ectomicorrízico	Características
<i>Laccaria</i> sp.	Ramificación dicotómica, ausencia de rizomórfos, exploración regular a media distancia, color pardo oscuro; hifas del manto irregulares sin patrón espacial discernible, grosor de hifa 2.5-4.0 μm de espesor.
<i>Hebeloma</i> sp.	Ramificación dicotómica, ausencia de rizomórfos, exploración a corta distancia, hialinos; grosor de hifa de 4.8 μm .
<i>Suillus</i> sp.	Ramificación coraloide, presencia de rizomorfos (pardos), hialinos a pardos; hifas de 90 μm de diámetro; células corticales del manto no visible; acumulación de oxalato de calcio ** exploración larga distancia

www.deemy.de (Determination of Ectomycorrhizae), **Arvieu *et al.* (2003).



Figura 3.1. Cortes de los tubetes (horizontal y vertical) y elaboración de secciones delgadas mediante (corte, pegado y pulido con diferentes abrasivos).

Cuadro 3.2. Características morfológicas de las especies de pino en los tratamientos de inoculación dos años después de la siembra.

Fitobionte	Micobionte	Altura (cm)	Diámetro del tallo (cm)
<i>Pinus greggii</i>	No inoculado	6.5	1.5
	<i>Suillus</i> sp.	41	3.73
	<i>L. proxima</i>	36	3.43
	<i>H. leucosarx</i>	34	3.37
<i>Pinus patula</i>	No inoculado	3.5	1.6
	<i>Suillus</i> sp.	17	2.54
	<i>L. proxima</i>	21	2.74
	<i>H. leucosarx</i>	19.5	2.95

3.2.5 Adquisición de imágenes y construcción del mosaico

Las imágenes secuenciales fueron tomadas barriendo todas las secciones delgadas utilizando una cámara CANNON Rabel T4[®] conectada a un microscopio petrográfico OLYMPUS Bx51[®] o a un microscopio óptico OLYMPUS BX51[®] con fluorescencia (LUV). En *Suillus* sp. y *L. proxima* dos aumentos de microscopio (objetivo 2× y 10×) y tres fuentes de luz: polarizada plana (LPP), Luz polarizada cruzada (LPX), y en *Hebeloma leucosarx* fue necesaria además luz ultravioleta (LUV).

Los mosaicos de alta resolución: 2.6 μm^2 (en 2×) y 0.5 μm^2 (en 10×), análisis de imágenes y elaboración de mapas temáticos se basaron en las metodologías propuestas por Gutiérrez-Castorena *et al.* (2016; 2018) utilizando los programas Arc Map 10.4[®] y ERDAS IMAGINE[®] 2014. No obstante, se hicieron algunas modificaciones a esta metodología durante la construcción de los mapas temáticos en 10×, debido a interferencias de la resina que mostraba cierto grado de birrefringencia en los poros. Para resolver este problema primero se obtuvieron las formas de los componentes (shape individual) de cada imagen y después se fusionaron para formar mosaicos (shape general) en cada una de las fuentes de luz. Finalmente, se llevaron a

cabo análisis cualitativos (descripción de la interacción de los componentes de interés a través de un espacio dado) y cuantitativos (expresados a través de porcentaje de micelio, macro y microagregados).

3.2.6 Clases de tamaños de agregados

Para la cuantificación de los macro y microagregados dentro de los mapas temáticos se empleó clasificación supervisada. Las diferentes clases de tamaños de agregados se obtuvieron a través del agrupamiento de píxeles y de la fórmula del área del círculo ($A=\pi r^2$); por ejemplo en partículas de 250 μm (diámetro): $A=\pi[(125 \mu\text{m})]^2 = 49087.385 \mu\text{m}^2$ (píxeles) a una resolución del mosaico de 2.6 μm . En áreas mayores o iguales a este valor se consideraron macro y micro agregados respectivamente. De esa manera se obtuvieron seis clases de tamaños de partículas: I. racimos (2 a 20 μm^2); II. microagregados (20 y 250 μm); III. finos (250- 500 μm); IV. medios (500-1000 μm); V. gruesos (1000-5000 μm); y VI. muy gruesos (>5000 μm). El agrupamiento de los píxeles se calculó a través de los softwares Arcmap 10.4[®] y ERDAS IMAGINE[®] 2014 (Figura 3.2)

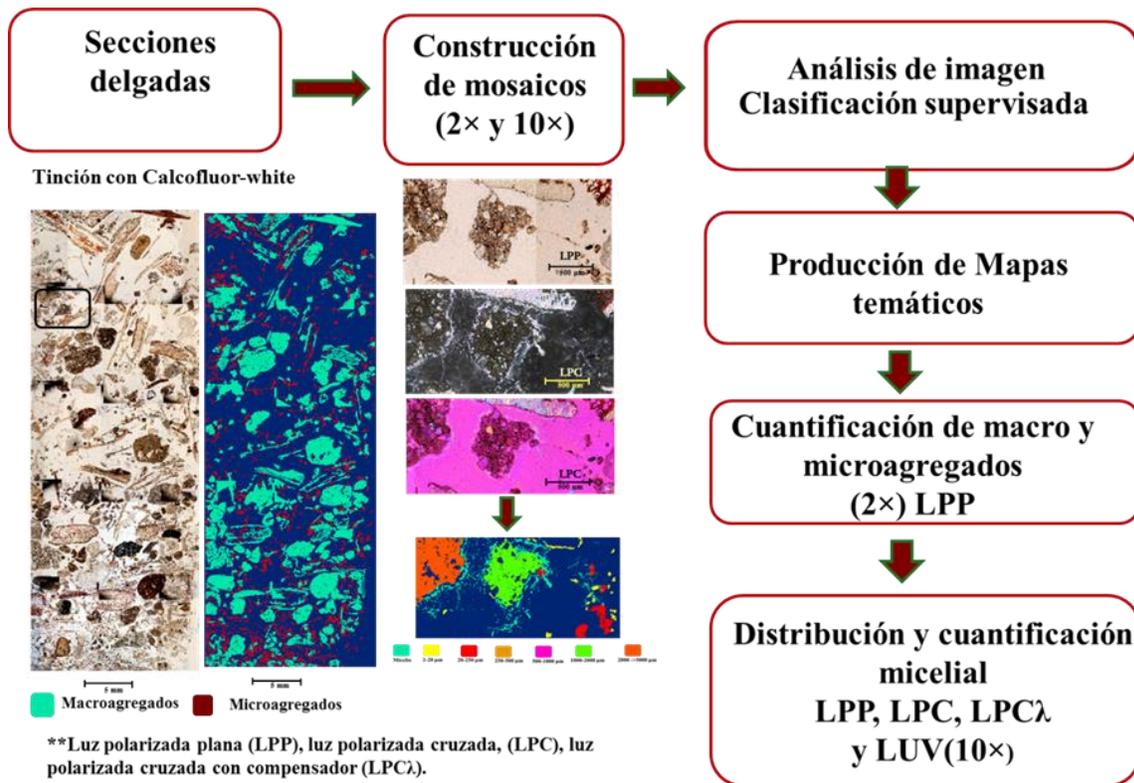


Figura 3.2 Representación esquemática de la elaboración de mosaicos, análisis de imágenes y generación de mapas temáticos para analizar y cuantificar la interacción ectomicorrízica-suelo-plantas en secciones delgadas. Metodología propuesta por Gutiérrez-Castorena *et al.* (2016; 2018).

3.2.7 Evaluación de la precisión

Las diferentes clases de agregados, los poros y el micelio fueron evaluados a través de los valores de brillantez (RGB) y con matrices de confusión utilizando ERDAS IMAGINE[®] 2014, además, se calculó su grado de separabilidad de acuerdo con Cohen (1960). Las matrices evalúan la concordancia (precisión) entre el micromorfológico y el productor (análisis de imagen) a través de intervalos de -1 a +1, donde +1 indica una perfecta concordancia y valores iguales a cero o menores indican que la relación es aleatoria (Bishop *et al.*, 1975; Sauzet *et al.*, 2017).

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Formación y distribución de macro y microagregados

Existieron diferencias en la formación de macro y microagregados entre los tratamientos de inoculación en ambas especies de pino (Cuadro 3.3), lo que demuestra que el fenómeno de agregación obedece a factores relacionados con la especie vegetal, los hongos involucrados y las características físicas y químicas del suelo o sustrato (Graf *et al.*, 2006).

Con *P. greggii*, los hongos influyeron drásticamente en la agregación y en el espacio poroso; por ejemplo, la especie *Suillus* sp. contribuyó más en la formación de macroagregados, siendo mayor que el tratamiento no inoculado hasta en 20% y en consecuencia reduciendo en el espacio poroso casi en la misma proporción. En contraste, *L. proxima* y *H. leucosarx* tuvieron mayor relación con los microagregados y hubo un incremento en el espacio poroso de 18% con respecto al tratamiento no inoculado, lo cual significa una porosidad total de casi 70%. En el caso de *P. patula*, los tratamientos de inoculación presentaron una tendencia positiva en la formación de macroagregados (Figura 3.4), aunque esta formación fue menor con relación al tratamiento no inoculado (entre 7 y 12%), así como en la disminución del espacio poroso (entre 3 y 11%) como se puede apreciar en el Cuadro 3.3.

Varios estudios han reportado el papel de los HMA y de las raíces finas en la formación de agregados estables (Tisdall y Ooades, 1982; 1997; Wright y Upadhyaya, 1998) y han descrito tres procesos que ocurren de manera simultánea: (1) el crecimiento de la hifa dentro de la matriz de suelo estableciendo la estructura que físicamente enreda a las partículas primarias del suelo; (2) las raíces y las hifas crean condiciones que favorecen la formación de microagregados, y (3) las raíces y las hifas enredan y unen a los microagregados y pequeños macroagregados en

agregados más grandes (Miller y Jastrow, 1992). A este proceso se le denominó como una organización jerárquica para la formación de agregados (Tisdall y Oades, 1982).

Cuadro 3.3. Porcentaje de macro y microagregados de los tratamientos de inoculación con ambas especies de pino, en secciones delgadas completas

	Macroagregados (%)	Microagregados (%)		Poros (%)		
<i>Pinus greggii</i>						
No inoculado	38.88	Dt	2.68	Dt	58.89	Dt
<i>Suillus</i> sp.	57.01	+18.13	1.32	-1.36	40.77	-18.12
<i>Laccaria proxima</i>	18.58	-20.3	2.948	+0.26	76.73	+17.84
<i>Hebeloma leucosarx</i>	19.06	-19.82	3.35	+0.67	77.66	+18.77
<i>Pinus patula</i>						
No inoculado	35.29		1.21		60.45	
<i>Suillus</i> sp.	47.85	+12.56	1.78	+0.57	49.27	-11.18
<i>Laccaria proxima</i>	44.62	+9.33	1.84	+0.63	52.54	-7.91
<i>Hebeloma leucosarx</i>	43.23	+7.24	1.75	+0.54	64.29	+3.84

Dt: Diferencia con respecto al tratamiento no inoculado

En el caso de *Suillus* sp., la capacidad para formar macroagregados puede estar relacionada con su morfología micelial, su abundancia y la especie de planta hospedera a la que el hongo se asocia. Este género tiene un tamaño de hifas de 90 micras de espesor y exploración micelial de largo alcance (Unestam, 1991; Zheng *et al.*, 2014), lo cual aumenta el área de exploración y por tanto su capacidad para formar agregados, tal como ha sido reportado por Tisdall *et al.* (1997), además de la secreción de polisacáridos (Wright y Upadhyaya, 1998). Con respecto al fitobionte, las diferentes formas de desarrollo (ramificación y longitud) micelial ectomicorrízica (McCormack, 2012) y la distribución y el arreglo espacial de las raíces finas (Pregitzer *et al.*, 2002) varían en su capacidad para establecer la simbiosis micorrízica (ecto o endo) y para el flujo de nutrimentos. En ese sentido, la simbiosis *Suillus* sp., y *Pinus greggii* tiene mucho más impacto en la macroagregación en comparación con las otras especies, con

menor exploración de corto alcance y mucho más delgadas como *L. proxima* y *H. leucosarx* como se puede observar en el Cuadro 3.3.

Otro resultado que es necesario resaltar es la relación de las hifas con la porosidad ya que incrementó hasta 18% el espacio poroso en el caso de *L. proxima* y *H. leucosarx*. De acuerdo con Unestam y Sun (1995), otras especies de *Hebeloma crusciforme* y *Laccaria laccata* raramente se asocian con los poros, pero cuando se presenta un disturbio puede incrementar su abundancia en el espacio poroso. En esta investigación, la principal alteración se pudo presentar durante el desecamiento de los sustratos, proceso que duró un mes antes de que las unidades experimentales se impregnaran con resina, en donde el micelio pudo haber continuado desarrollándose como una respuesta a deshidratación del sistema.

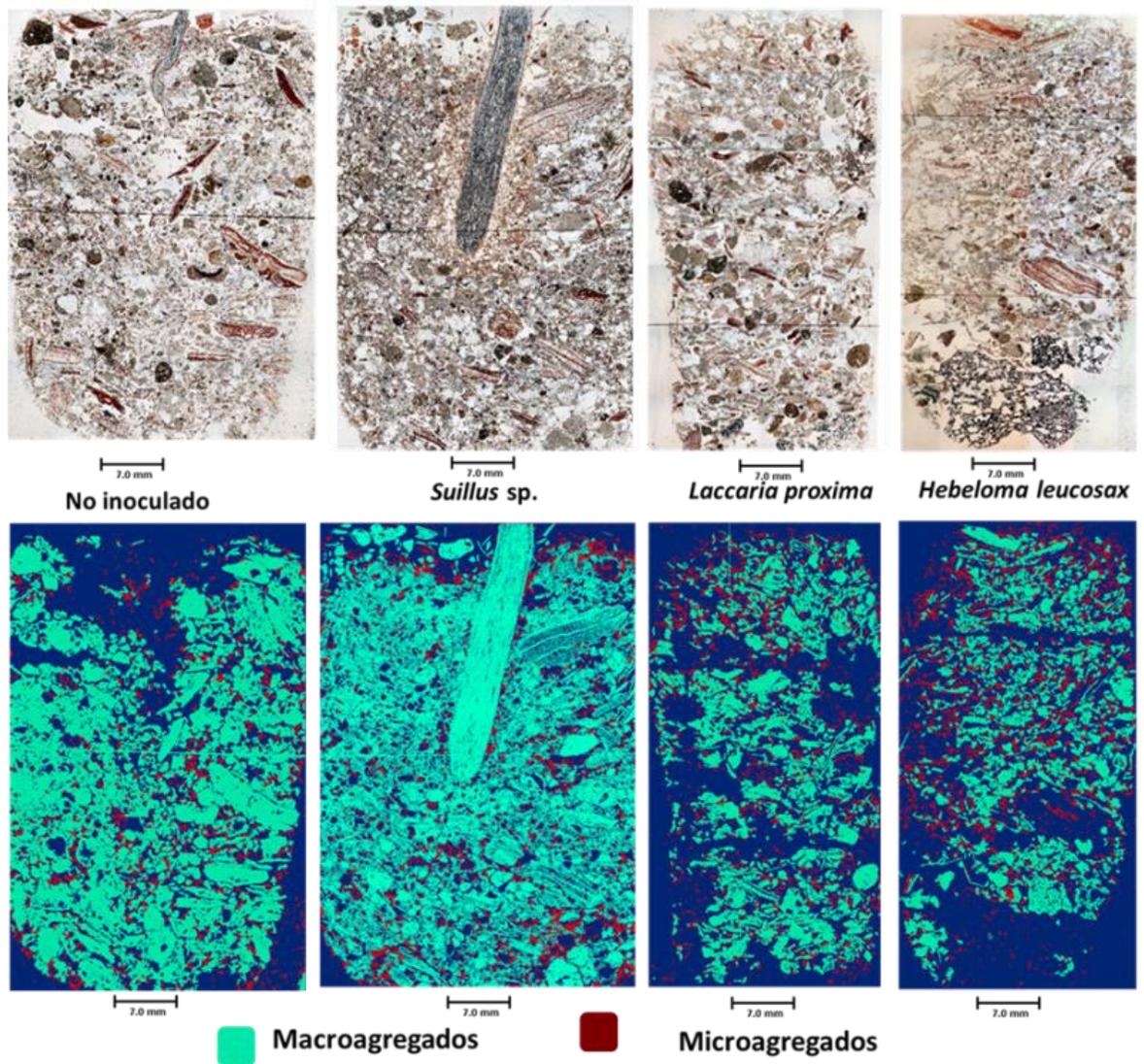


Figura 3.3. Mosaicos de la secciones delgadas completas y mapas temáticos de la distribución de macro y microagregados de los tratamientos de inoculación con *Pinus greggii* como planta hospedera. Mosaicos 2.5×5 cm; luz polarizada plana; objetivo $2\times$.

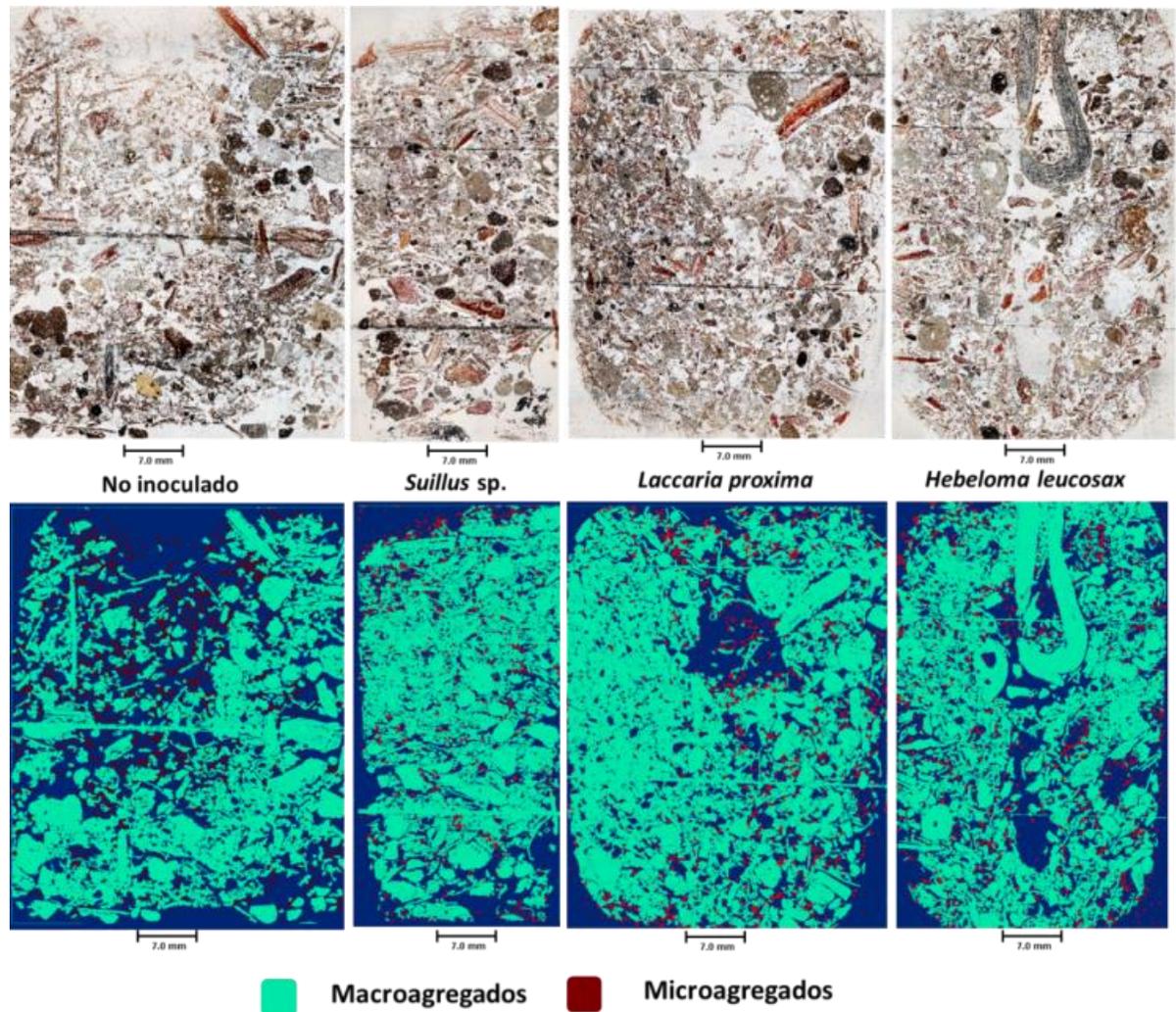


Figura 3.4. Mosaicos de las secciones delgadas completas y mapas temáticos de la distribución de macro y microagregados de los tratamientos de inoculación con *Pinus patula* como planta hospedera. Mosaicos 2.5×5 cm; luz polarizada plana; objetivo $2\times$.

3.3.2 Clases de tamaño de partículas asociadas con micelio ectomicorrízico

El micelio *Suillus* sp. asociado con los dos fitobiontes encapsuló partículas elementales, racimos y microagregados que formaron macroagregados (desde $250 \mu\text{m}$ hasta $> 5000 \mu\text{m}$) (Figura 3.4 y 3.5). Este proceso es más intenso cuando hace simbiosis con *Pinus greggii*. Por su parte, en *L. proxima* asociado con *P. greggii*, las hifas se asociaron con todos los tamaños de agregados pero mostraron dos formas de agregar; encapsulan sólo a racimos y entrelazan a

micro y macroagregados. En *L. proxima* asociado con *P. patula*, las hifas sólo entrelazan pero únicamente a racimos y microagregados y su impacto en la formación de macro agregados es mínimo (Figura 3.10). Finalmente, *H. leucosarx* con *P. greggii* se relacionó con agregados desde racimos y macroagregados menores de $< 2000 \mu\text{m}^2$ y con *P. patula* con partículas menores de $500 \mu\text{m}^2$, lo cual se debe al corto alcance de exploración que tienen sus hifas (Figura 3.9).

El mecanismo de formación de agregados y las clases de tamaños fueron diferentes dependiendo del HEcM y el fitobionte asociado. De acuerdo con Graystone *et al.* (1997) y Rai y Varma (2011) las especies de pino, exudan a través de su sistema radical diferentes tipos de compuestos como carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos y grasos, vitaminas, compuestos fenólicos y volátiles, los cuales varían tanto en calidad como en cantidad entre especies. Estos exudados pueden influir directamente en la germinación de las esporas de los hongos micorrízicos, la cantidad de micelio por volumen o área, el desarrollo en la raíz hospedera, el flujo de nutrimentos entre el fito y micobiontes asociados, así como en el crecimiento de HEcM en la rizosfera. Es probable que *P. greggii* proporcionara carbohidratos de mayor calidad al hongo que *P. patula*, lo que habría favorecido la exploración de los hongos y la formación de micro y macroagregados. Además, es necesario considerar la participación de las bacterias que también propician el proceso de agregación (Rashid *et al.*, 2016).

Zheng *et al.* (2014) reportaron que las especies *L. laccata* y *L. bicolor* se asocian con agregados $>53 \mu\text{m}$ así como con macroagregados de $212\text{-}500 \mu\text{m}^2$; no obstante, en el presente trabajo se encontró que *L. proxima* agrupó partículas aún más pequeñas como los racimos ($2\text{-}20 \mu\text{m}^2$). Los mismos autores, mencionaron que no se encontró relación entre la formación de agregados de diferente tamaño y las características hidrofóbicas e hidrofílicas de los HEcM que

estudiaron, ya que ambos tipos de hongo tienen capacidad para formar agregados estables en agua.

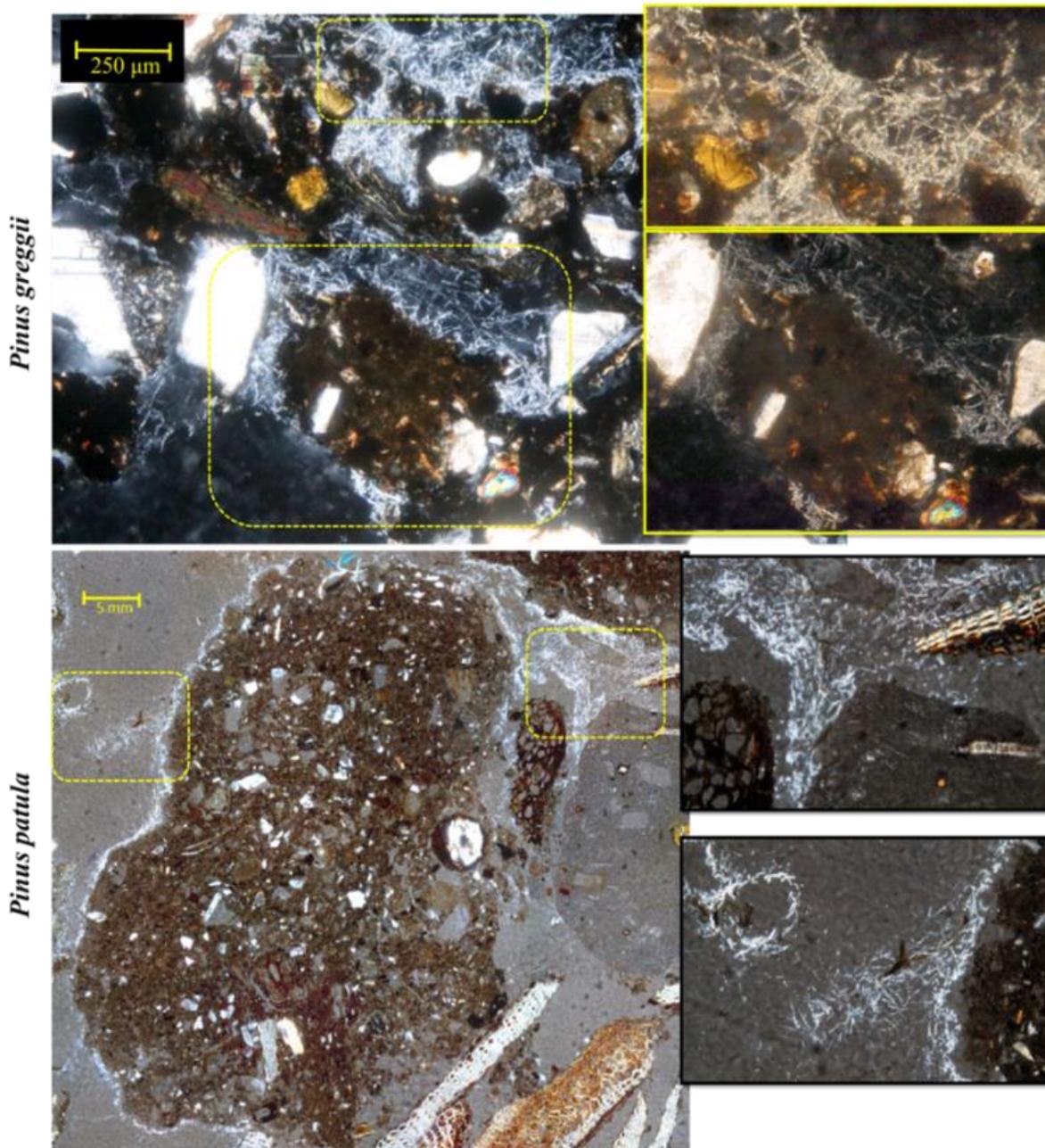


Figura 3.5. Macro y microagregados unidos por micelio de *Suillus* sp. con raíces de *Pinus greggii* (mosaico 9 imágenes) y *Pinus patula*. Mosaico de 42 imágenes y sus respectivos acercamientos (10× y 20×), y luz polariza cruzada.

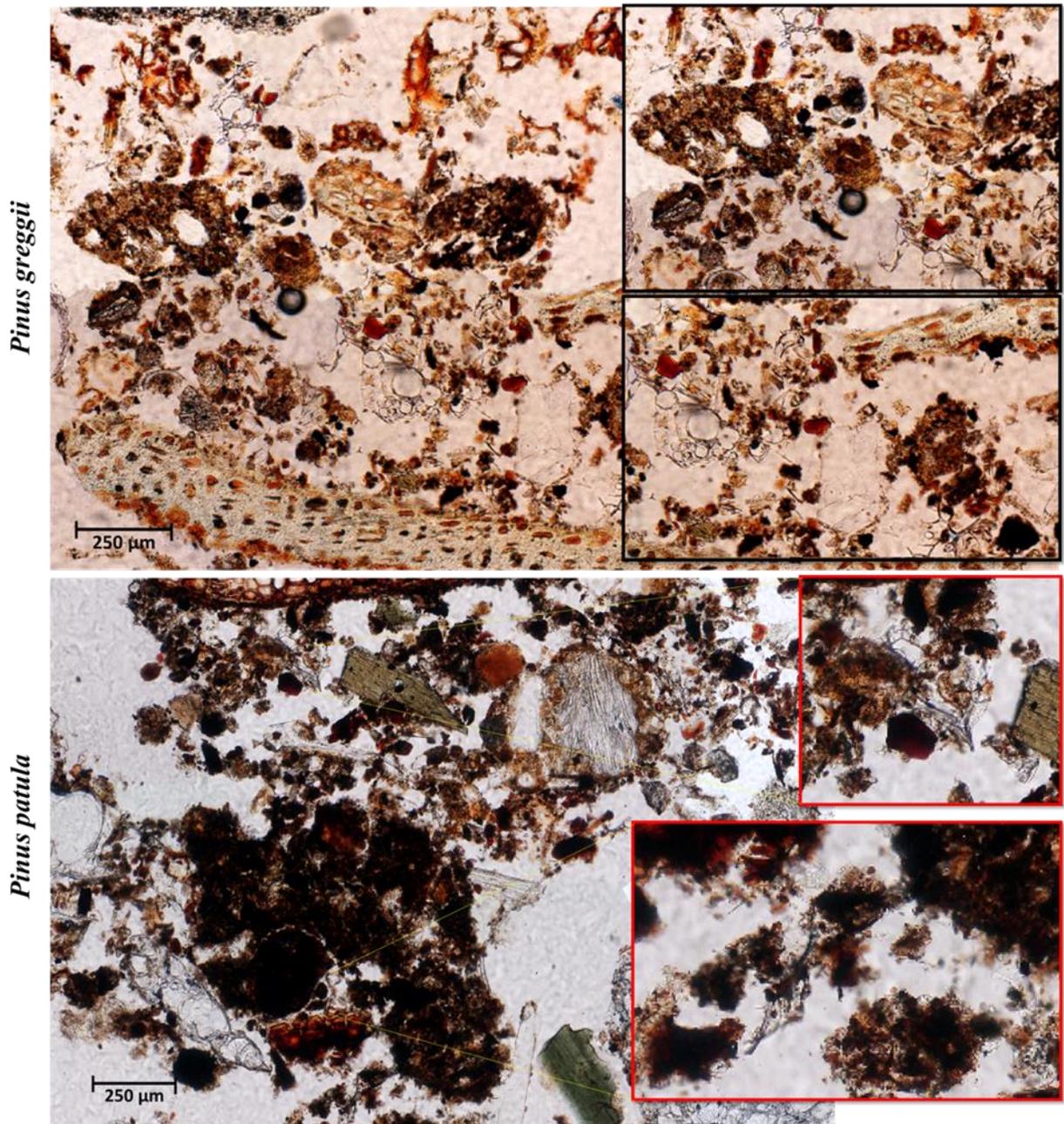


Figura 3.6. Macroagregado enlazado con micelio de *Laccaria proxima* con raíces de *Pinus greggii*. y *Pinus patula*. Mosaico de nueve imágenes, luz polarizada plana, objetivo 10×.

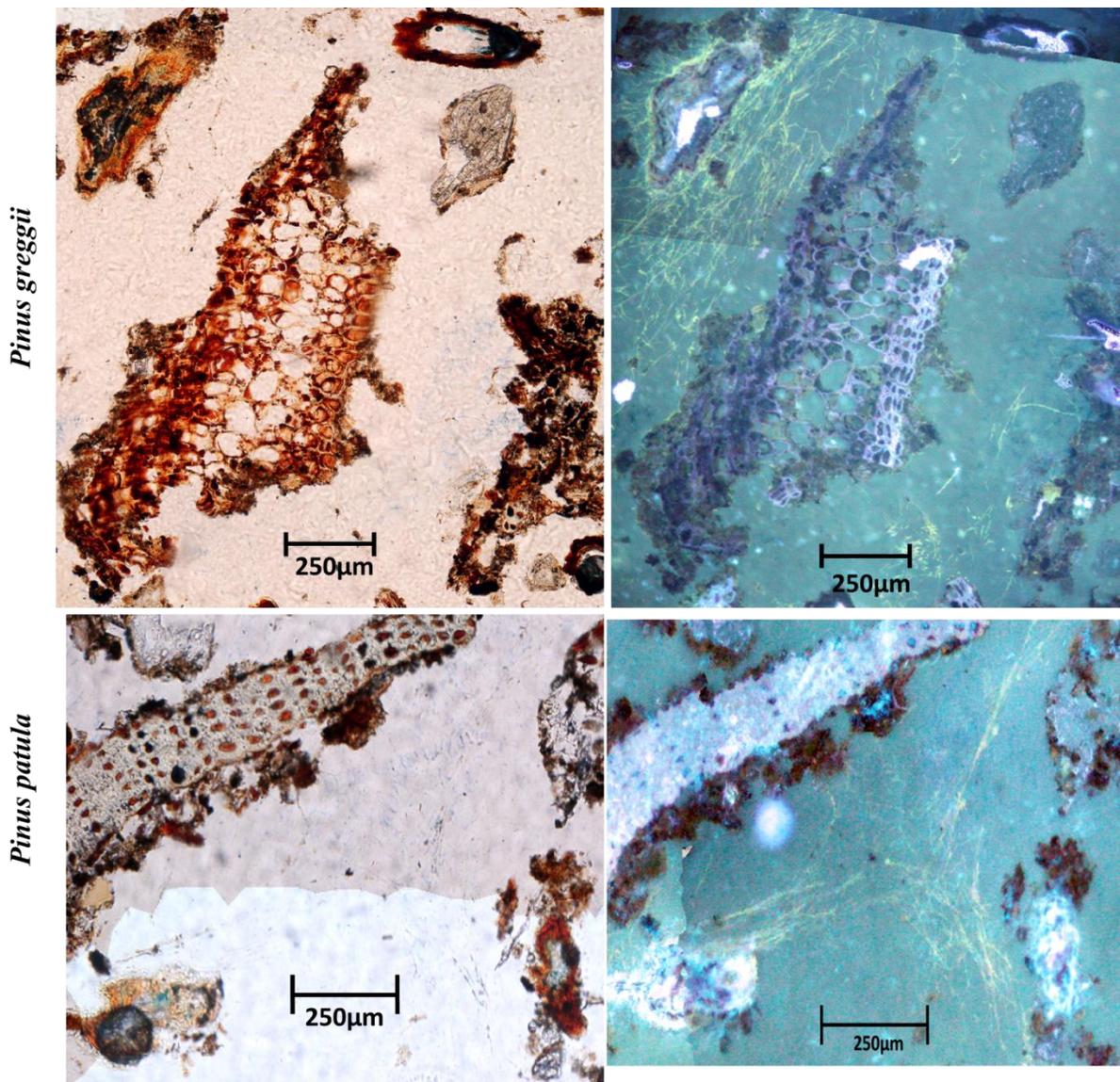


Figura 3.7. Macroagregado enlazado con micelio de *Hebeloma leucosarx*. Tratamiento con raíces de *Pinus greggii* y *Pinus patula*. Mosaico de nueve imágenes, luz polarizada plana y luz ultravioleta; Objetivo 10×.

Oades y Tisdale (1982) y Six (2004) mencionaron que las hifas participan principalmente en la formación de macroagregados enlazando a las partículas y no tanto en microagregados y racimos. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo con HMA y poca atención se ha dado al papel que tienen los HECM en la agregación (Zheng *et al.*, 2014). El presente estudio

es el primero en reportar que las hifas de los hongos pueden estar actuando desde los racimos y quedarse en este tamaño de partícula o bien ir agregando a las unidades elementales u otros componentes hasta alcanzar un tamaño macro lo que reportaron (Ambriz *et al.* 2010).

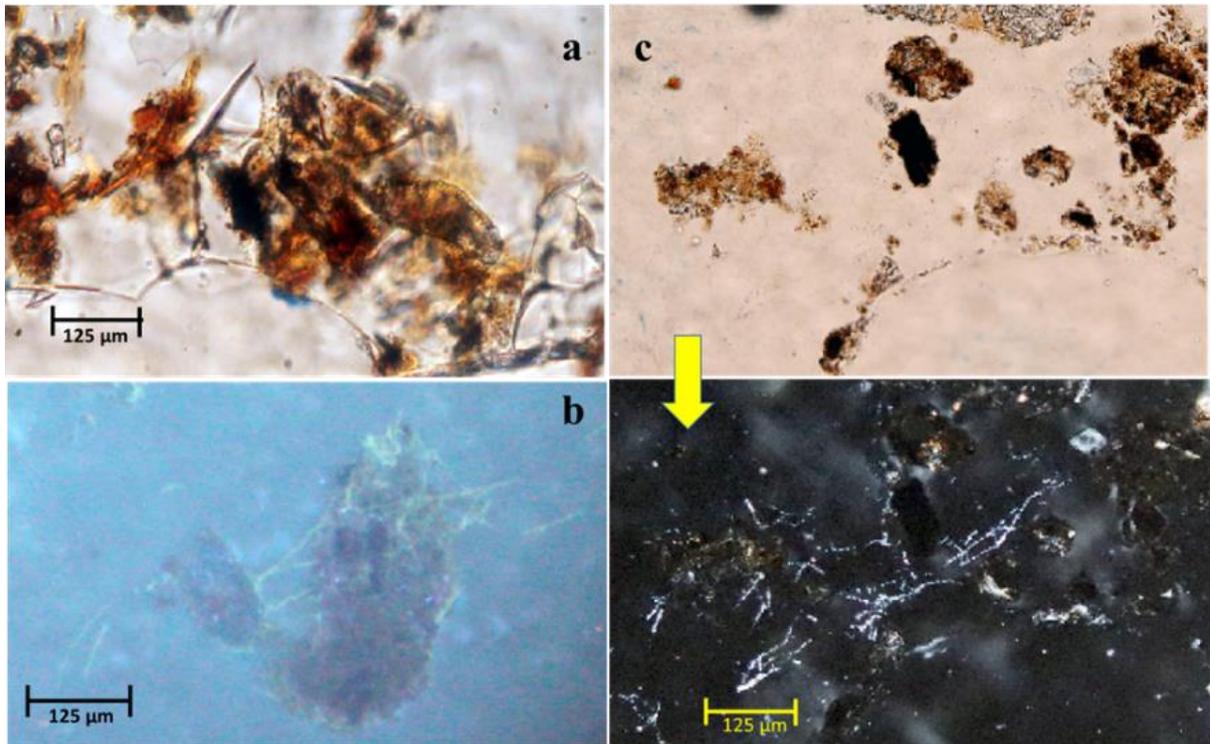


Figura 3.8. Microagregado enlazado con micelio de: a) *Laccaria proxima* b) *Hebeloma leucosarx* y c) *Suillus* sp. Mosaico de 9 imágenes en LPP (a y c), LUV (b) y LPC (d); objetivo 10×.

Pregitzer *et al.* (2002) a través de un sistema de digitalización reportaron que la distribución y el arreglo espacial de raíces finas varía dependiendo de la especie, y como consecuencia también su longitud, volumen y capacidad para establecer simbiosis micorrízica. Sin embargo, su investigación la realizaron bajo condiciones alteradas por lo que no reportaron el papel del micelio en el proceso de formación de agregados. Asimismo, McCormack *et al.* (2012) mencionaron que existen diferentes formas de desarrollo (ramificación y longitud) micelial ectomicorrízico que dependen del fitobionte asociado y sugieren que la variación

también depende de las condiciones ambientales. Sin embargo, el presente estudio recomienda realizarlo además con análisis de imágenes en sistemas inalterados que permitan analizar a los componentes de interés con cada una de sus interacciones.

Graf *et al.* (2006) reportaron que en sustratos con base en mezclas de suelo y arena inoculados con *Laccaria bicolor* y *L. montana* se formaron agregados estables 0.73-0.76 mm y 0.54-0.62 mm respectivamente, después de tres meses. Por su parte, Ambriz *et al.* (2010) evaluaron los efectos de *Rhizophagus intraradices* y *Pisolithus tinctorius* por separado o en combinación sobre la agregación y el crecimiento de *Fraxinus uhdei* en ceniza volcánica como sustrato en condiciones de invernadero. Después de tres meses el HMA contribuyó a la formación de macroagregados < 250 μm , el HEcM en la agregación de partículas en macroagregados de 1.0, 0.5 y 2.0 mm y la mezcla HMA + HEcM en la formación de agregados estables de 2.0 mm de diámetro. Sin embargo, en ambos trabajos no se reportó la cantidad de micelio (por volumen o área) involucrado en el proceso de agregación para los diferentes tamaños, para ambos tipos de micorriza, ni la relación fúngica entre las partículas constituyentes del sustrato, los poros y distribución de la raíz hospedera. De acuerdo con Zheng *et al.* (20014) no todo el micelio desarrollado por los HMA y HEcM contribuye activamente en la agregación de partículas.

Algunos hongos liberan ácidos orgánicos, como mecanismo de liberación de nutrientes del material orgánico (hojarasca). Por ejemplo, el ácido oxálico forma complejos con los minerales y forman cristales de oxalato de calcio que se depositan en la superficie de las hifas, lo que ayuda a incrementar la movilización y asimilación del fósforo (Wallander *et al.*, 1997; Arvieu *et al.*, 2002; González *et al.*, 2009). Es probable que *Suillus* sp. al presentar este tipo de cristales, haya propiciado una mayor adquisición de nutrientes fosforados que los otros

micobiontes. Asimismo, Dighton (1983) reportó que los HEcM en particular *Hebeloma crustuliniforme* y *Suillus luteus* tienen mayor capacidad para degradar y liberar P del componente orgánico suelo a través de sus enzimas fosfatasas. Por su parte, Buée *et al.* (2007) mencionaron que los HEcM pueden tener características saprotróficas, cuando se reduce la fuente de fotosintatos en periodos invernales. Esto podría explicar, en este trabajo la relación de los HEcM estudiados con la materia orgánica presente en el sustrato, para la formación de agregados.

3.3.3 Mapas temáticos

En las Figuras 3.9 y 3.10 se muestran los mapas temáticos de la relación hongo-raíz y agregados. En estos mapas se obtuvieron racimos ($2-20 \mu\text{m}^2$), micro ($20- < 250 \mu\text{m}^2$) y macroagregados ($250-500$, $500-1000$, $1000-2000$, $2000-5000$ y $> 5000 \mu\text{m}^2$) y la relación con micelio ectomicorrízico. Para ambos fitobiontes, la mayor cantidad de micelio del HEcM *Suillus* sp. se asoció principalmente con agregados muy gruesos $>5000 \mu\text{m}^2$ envolviendo tanto a sus partículas constitutivas (*P. greggii*) como al agregado con mayor área (*P. patula*). Sin embargo, pese a que con *P. greggii* - *L. proxima* y *H. leucosax* produjeron mayor porcentaje de micelio que *Suillus* sp. (Cuadro 3.4); *L. proxima* se asoció más con el espacio poroso que con los agregados, cuyos tamaños fueron de $2-20 \mu\text{m}^2$ - $> 5000 \mu\text{m}^2$ y para *H. leucosax* desde $2-20 \mu\text{m}^2$ a $1000-2000 \mu\text{m}^2$ (Figura 3.9). Asimismo, en *P. patula*, *L. proxima* se asoció más con racimos ($2-20 \mu\text{m}^2$), micro y macroagregados hasta un área de $500 \mu\text{m}^2$. En tanto que, en *H. leucosax* inició el proceso desde racimos hasta macroagregados, pero sólo en agregados menores de $2000 \mu\text{m}^2$, y en residuos orgánicos moderadamente descompuestos (Figura 3.10).

Cuadro 3.4. Porcentaje de formación de racimos, macro y microagregados y micelio en los mosaicos de imágenes de los tratamientos inoculados con ambas especies de pino en mosaicos de nueve imágenes y objetivo 10×.

Planta	Hospedera	HEcM	Agregados (%)		Racimos (%)	Micelio (%)
			Macro	Micro		
<i>P. greggii</i>		<i>Suillus</i> sp.	9.3960	2.8640	1.1366	1.9786
		<i>L. proxima</i>	12.6158	5.1080	2.0445	1.2364
		<i>H. leucosarx</i>	10.2306	3.6365	1.9999	1.5675
<i>P. patula</i>		<i>Suillus</i> sp.	27.9271	0.9157	0.8404	2.6520
		<i>L. proxima</i>	0.8286	2.5404	9.1048	1.8913
		<i>H. leucosarx</i>	7.3053	5.6292	1.9689	1.4523

3.3.4 Evaluación de la precisión

Para lograr una separabilidad efectiva de los agregados y el componente mineral asociado a micelio, a continuación, se presentan los escenarios para cada uno de ellos:

Clase 1 Pura: *Suillus* sp. presentan en sus hifas una acumulación de cristales de oxalato de calcio, los cuales tienen una birrefringencia de tercer orden. Los valores de brillantez de estos cristales tienen una firma espectral pura en RGB (255, 255, 255).

Clase 2. Distintiva y mutuamente exclusiva. El micelio de *H. leucosarx* tienen firmas espectrales no puras en LPP y LPC; sin embargo; tiene una firma espectral distintiva y mutuamente exclusiva con LUV con valores de RGB de 100,176, 200, respectivamente (Figura 3.10).

Clase 3. No pura. El micelio de *L. proxima*, tiene los mismos valores de brillantez (151,153, 122) que los agregados y el material orgánico (raíces y hojarasca: 107,117, 153) en las tres bandas RGB

De acuerdo con Aydemir *et al.* (2004) y Gutiérrez-Castorena *et al.* (2018), los minerales con birrefringencia de tercer orden tienen firmas espectrales puras, lo que facilita su separabilidad en el análisis de imágenes. En los Casos 2 y 3 se logró la separabilidad micelial

de los otros componentes del suelo a través de validación de clasificación supervisada. Gutiérrez-Castorena *et al.* (2018) recomendaron realizar mosaicos compuestos y álgebra de mapas para separar a los componentes básicos orgánicos. No obstante, en este estudio a los polígonos correspondientes al micelio se les modificaron los valores (GRIDCODE), para separarlos de los otros componentes con firmas espectrales similares y así, exportar y obtener a las hifas sin interferencia para su análisis cuantitativo.

Los Cuadros 3.5 (LPP) y 3.6 (LPC λ) muestran los valores de la matriz de confusión de correspondencia entre clases (precisión del producto) que se obtuvieron de la clasificación supervisada de los componentes estudiados y los que se adquirieron por comparación (precisión del usuario). Los resultados indican que con el análisis de imagen de los mapas temáticos se puede obtener una confiabilidad > 99%, para separar los agregados del espacio poroso (2 \times) y componente mineral (10 \times). Sin embargo, se presentaron particularidades con los HEcM estudiados. Por ejemplo, en *Suillus* sp. en LPC y *Hebeloma leucosarx* en LUV, hubo una precisión general de 0.98 y 0.99 respectivamente; mientras que en *L. proxima*, la concordancia fue muy baja (0.21) debido a que los valores de brillantez no son puros (Cuadro 4.9).

De acuerdo con Cohen (1966) los valores cercanos a 1.0 indican una alta concordancia entre lo que identifica el micromorfólogo y el análisis de imagen; en tanto que los valores cercanos a -1.0 muestran que la separación fue más debido al azar. La alta precisión general en agregados y espacio poroso concuerda con los resultados de Gutiérrez-Castorena *et al.* (2018), y con la pureza de los materiales fluorescentes reportada por Gutiérrez-Campos (2017) en bacterias fluorescentes.

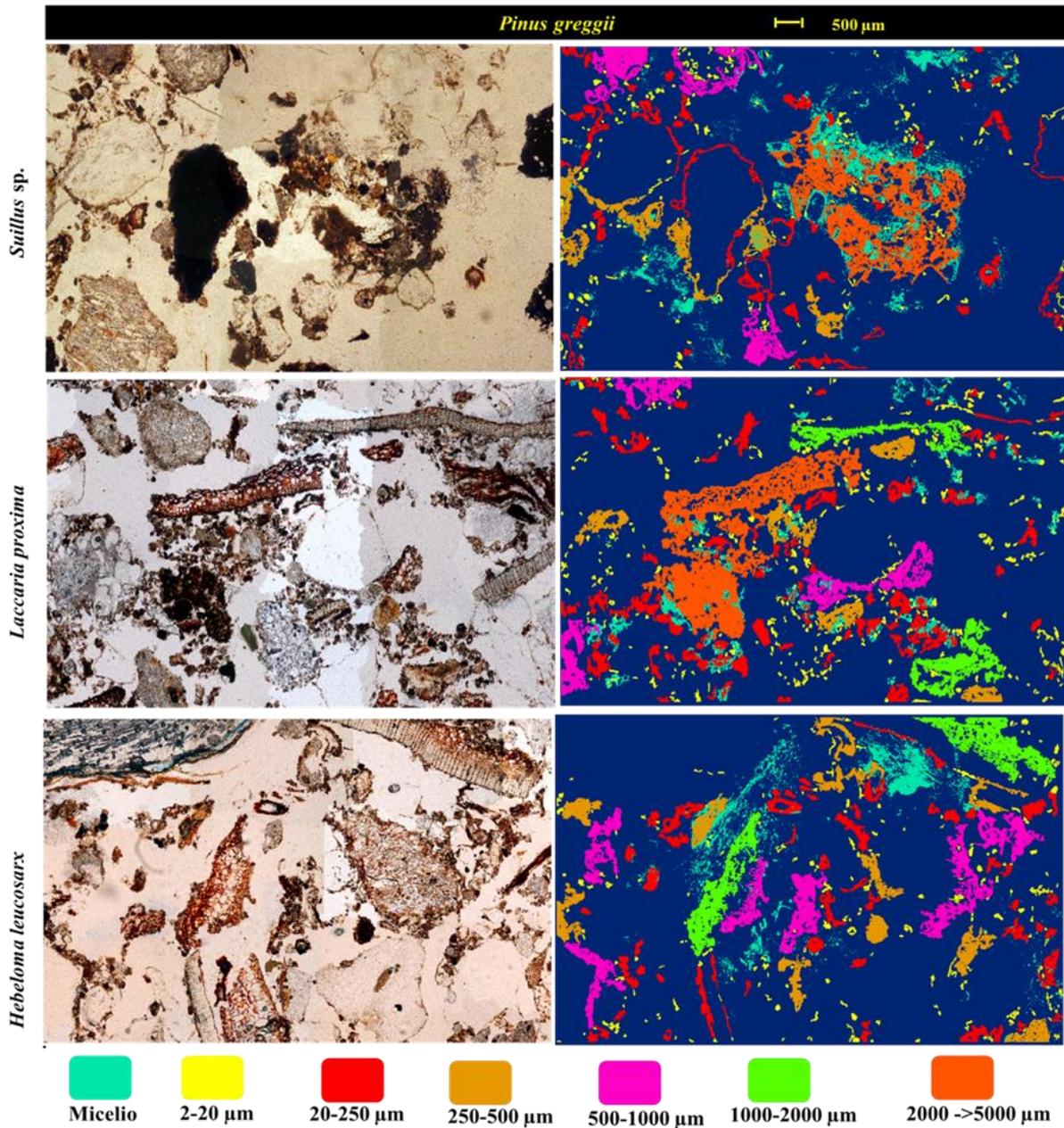


Figura 3.9. Mosaicos de fotografías secuenciales sus y mapas temáticos mostrando la distribución micelial de tres especies de hongos ectomicorrízicos en la interacción con macro, microagregados y racimos con *Pinus greggii*. Mosaico integrado por nueve imágenes; luz polarizada cruzada, objetivo 10×.

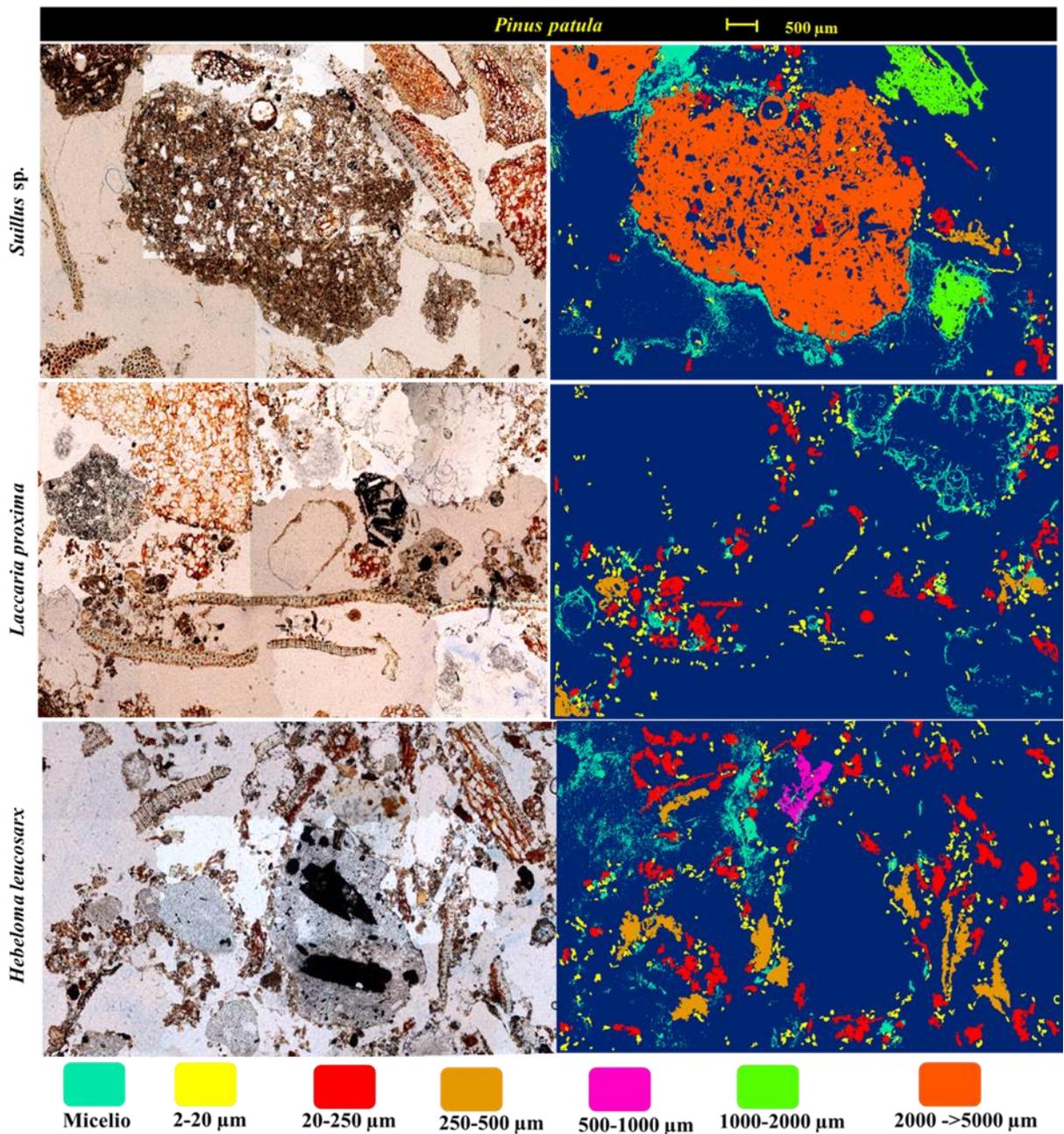


Figura 3.10. Mosaicos de fotografías secuenciales su y mapas temáticos mostrandola distribución micelial de tres especies de hongos ectomicorrízicos en la interacción con macro, microagregados y clusters con *Pinus patula*. Mosaico 9 imágenes, luz polarizada plana, objetivo10 ×.

En el caso de los hongos con los mismos valores de brillantez que la materia orgánica se recomienda el uso de tinciones tal como lo indica Stoops (2003), así como la participación tanto de micromorfólogos como expertos que identifiquen estructuras fúngicas y analicen adecuadamente sus relaciones con los demás componentes del suelo o sustrato.

Cuadro 3.5. Matriz de confusión producto de selección de agregados y poros. Mosaicos construidos a 2× (LPP).

				Precisión usuario	Precisión programa	Precisión General
	Agregados	Poros	Total			0.99
Agregados	6569	97	6666	0.98	0.99	
Poros	44	630389	630233	1.0	0.99	
Total	6613	630486	637099			

Cuadro 3.6. Matriz de confusión producto de selección de agregados, poros y minerales. Mosaicos construidos a 10×. Luz polarizada cruzada más compensador.

	Agregado	Poros	Min_1	Min_2	Total	Pu.	Pp.	Pg. 0.99
Agregado	20542	37	5	0	20584	0.99	0.98	
Poros	464	50761	0	3	51228	0.99	0.99	
Min_1	11	8	1249	0	1268	0.98	0.95	
Min_2	0	13	52	1291	1356	0.95	0.99	
Total	21017	50819	1306	1294	74436			

Pu: presión del usuario, Pg: presión general, Pp: presión del producto, Min 1: Minerales azules y min 2: Minerales amarillos

Cuadro 3.7. Matriz de confusión producto de micelio de *Suillus* sp. y poros. Mosaicos construidos con el objetivo 10×. Luz polarizada cruzada.

				Precisión usuario	Precisión programa	Precisión general
	Micelio	Poros	total			0.99
Micelio	1563	1	1564	0.99	1.0	
Poros	0	9721	9721	1.0	0.998	
Total	1563	9722	11285			

Cuadro 3.8. Matriz de confusión producto de selección de micelio de *Hebeloma leucosarx* y poros. Mosaicos construidos con el objetivo 10×. Luz ultravioleta.

				Precisión usuario	Precisión programa	Precisión general
	Micelio	Poros	Total			0.97
Micelio	333	11	344	0.97	0.89	
Poros	41	1216	1257	0.97	0.99	
Total	374	1227	1601			

Cuadro 3.9. Matriz de confusión producto de selección de micelio de *Laccaria proxima* y poros. Mosaicos construidos con el objetivo 10×. Luz polarizada cruzada más compensador.

	Agregados	Poros	Min_1	Min_2	Micelio	Total	Pu	Pp.	Pp 0.98
Agregados	6292	1	0	0	14	6307	0.99	0.96	
Poros	11	35770	29	0	10	35820	0.99	0.98	
Min_1	1	2	1028	6	0	1037	0.99	0.96	
Min_2	1	0	0	698	0	699	0.99	0.99	
Micelio	237	617	4	0	240	1098	0.21	0.90	
Total	6542	36390	1061	704	264	44961			

Pu: presión del usuario, Pg: presión general, Pp: presión del producto, Min 1: Minerales azules y min 2: Minerales amarillos

3.4 CONCLUSIONES

Existieron diferencias en la formación de macro y microagregados en ambos fitobiontes inoculados con *Laccaria proxima* y *Hebeloma leucosarx*. Además, *P. greggii* favoreció la formación de espacio poroso en comparación con *P. patula*. En los pinos inoculados con *Suillus* sp. la formación de macro y microagregados fue similar y en mayor porcentaje que con los otros HEcM debido a que esta especie fúngica tiende a encapsular los agregados hasta incrementar su tamaño mientras que *Laccaria proxima* y *Hebeloma leucosarx* sólo enlazan microagregados. El HEcM *Suillus* sp, se relacionó y contribuyó más a la formación de agregados (> 5 mm) que los otros micobiontes independientemente de la planta hospedera asociada. Asimismo, *L. proxima* y *H. leucorax* favorecieron más la formación de macroagregados menores a >5000 µm,

con excepción de *Laccaria proxima* con *P. greggii*. Ambas especies de hongo se relacionaron mayoritariamente con el espacio poroso y con racimos con ambas especies de *Pinus*.

Los HEcM estudiados independientemente del fitobionte contribuyeron de manera distinta en la distribución y el arreglo de las partículas orgánicas y minerales para la formación de agregados de diferentes tamaños en el sustrato de crecimiento vegetal.

La separabilidad de los componentes: fúngico, agregados, minerales y poros fue posible a través del uso de diferentes luces para estudiar sus interacciones. Sin embargo, se requieren más estudios que involucren el uso de la micromorfología y micromorfometría para construir diferentes modelos dependiendo de la interacción por género y/o especie ectomicorrízica (tipo de micelio y ramificación) en el proceso de formación de agregados en sistemas inalterados para evitar generalizaciones.

Los sistemas de información geográfica son necesarios para la elaboración de mapas temáticos que permitan estudiar las interacciones de los HEcM con agregados de suelo, poros, partículas orgánicas y minerales en sistemas inalterados. Sin embargo, también se requiere el trabajo de expertos que en conjunto, permitan identificar y separen componentes para la elaboración de mapas temáticos, que permitan entender estos procesos *in situ*.

3.5 REFERENCIAS

- Agerer, R. (2006). Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological progress*, 5(2), 67-107.
- Ambriz, E., Báez-Pérez, A., Sánchez-Yáñez, J. M., Moutoglis, P., & Villegas, J. (2010). *Fraxinus–Glomus–Pisolithus* symbiosis: Plant growth and soil aggregation effects. *Pedobiologia*. 53(6), 369-373.
- Anderson, I. C., & Cairney, J. W. (2007). Ectomycorrhizal fungi: exploring the mycelial frontier. *FEMS Microbiol. Rev.* 31(4), 388-406.
- Arvieu, J. C., Leprince, F., & Plassard, C. (2003). Release of oxalate and protons by ectomycorrhizal fungi in response to P-deficiency and calcium carbonate in nutrient solution. *Ann. Forest Sci.* 60(8), 815-821.

- Aydemir, S., Keskin, S. & Drees, L.R. (2004). Quantification of soil features using digital image processing (DIP) techniques. *Geoderma*. 119, 1–8.
- Bui, E. N. (1991). Applications of image analysis to soil micromorphology. *Agr. Ecos. Env.* 34. 305-313.
- Bullock, P., N. Federoff., A. Jongerius., G. Stoops & T. Tursina. (1985). *Handbook for Soil Thin Section Description*. Wayne Research Publications, England. 152 p.
- Carrasco-Hernández, V. Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J. J., Quintero-Lizaola, R. & Torres-Aquino, M. (2011). Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales *Rev. Chil. Hist. Nat.* 84(1), 83-96.
- Davidson, D. A., Bruneau, P. M. C., Grieve, I. C., & Young, I. M. (2002). Impacts of fauna on an upland grassland soil as determined by micromorphological analysis. *App. Soil Ecol.* 20(2), 133-143.
- Dighton, J. (1983). Phosphatase production by mycorrhizal fungi. *Plant soil*, 71(1), 455-462.
- Gonzalez, J., A. Zambrano, M. Dutra Costa, I. Ribeiro Silvia, J. C. Lima Neves, N. F. De Barros & A. Chaer Borges. (2009). Acúmulo de ácido oxálico e cristais de Cálcio em ectomicorizas de eucalipto. I - Produção de ácido oxálico e concentração de nutrientes em raízes laterais finas colonizadas por fungos ectomicorrízicos. *Rev. Bras. Cienc. Solo.* 33:541-553
- Graf, F., Frei, M., Schwarz, M., & Böll, A. (2006). Use and importance of mycorrhiza in site-specific restoration. In *Soil-bioengineering: ecological restoration with native plant and seed material*. Conference, HBLFA Raumberg-Gumpenstein, Austria, 5-9 September, 2006 (pp. 155-160). HBLFA Raumberg-Gumpenstein.
- Grayston S.J. Vaughan D. & Jones D. (1997) Rhizosphere carbon flow in trees in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Appl. Soil Ecol.* 5, 29–56.
- Gutiérrez-Castorena, E. V. G., del Carmen Gutiérrez-Castorena, M., Vargas, T. G., Bontemps, L. C., Martínez, J. D., Méndez, E. S., & Solorio, C. A. O. (2016). Micromapping of microbial hotspots and biofilms from different crops using digital image mosaics of soil thin sections. *Geoderma*. 279, 11-21.
- Gutiérrez-Castorena, M. C., Gutiérrez-Castorena, E.V., González-Vargas, T., Ortiz-Solorio, C. A., Suástegui-Méndez, E., Cajuste-Bontemps, L. & Rodríguez-Mendoza, M.N. (2018). Thematic micro-maps of soil components using high-resolution spatially referenced mosaics from whole soil thin sections and image analysis. *Eur. J. Soil Sci.* 1-15.
- Jiménez-Martínez, A., González-Chávez, M. C. A., García-Cue, J. L., Lara-Hernández, M. E., & Gutiérrez-Castorena, M. C. (2014) Producción de inóculo micorrízico de *Gigaspora gigantea* en mezclas de sustratos con diferente tamaño de partícula. *Agrociencia*. 48:3, 239-254.
- Jiménez Ruiz, M., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J. J., & Torres-Aquino, M. (2013). Hongos silvestres con potencial nutricional, medicinal y biotecnológico comercializados en Valles Centrales, Oaxaca. *Re. Mex. C.A.* 4(2), 199-213.
- Kooistra, M. J. (1991). A micromorphological approach to the interactions between soil structure and soil biota. *Agric. Ecosyst. Environ.* 34(1-4), 315-328.
- McCormack LM, Adams TS, Smithwick EAH, & Eissenstat DM. (2012). Predicting fine root lifespan from plant functional traits in temperate trees. *New Phytol.* 195: 823–831.

- McCormack ML, Dicke IA, Eissenstat DM, Fahey TJ, Fernandez CW, Guo D, Helmisaari H-S, Hobbie EA, Iversen CM, Jackson RB et al.(2015). Redefining fine roots improves understanding of below-ground contributions to terrestrial biosphere processes. *New Phytol.* 207: 505–518.
- Martínez-Reyes, M., Pérez-Moreno, J., Villarreal-Ruiz, L., Ferrera-Cerrato, R., Xoconostle-Cázares, B., Vargas-Hernández, J. J., & Honrubia-García, M. (2012). Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. *Rev. Chapingo. Ser. Cie.* 18(2), 183-192.
- Melville, L. H., Massicotte, H. B., & Peterson, R. L. (1987). Ontogeny of early stages of ectomycorrhizae synthesized between *Dryas integrifolia* and *Hebeloma cylindrosporum*. *Bot. Gaz.* 148(3), 332-341.
- Mendizábal-Hernández, L. D. C., Cruz-Jiménez, H., Ramírez, J. M., & Álvarez, Y. J. (2009). Potencial productivo de un huerto semillero de *Pinus patula* Schl. et Cham. En potrero de García, Veracruz, México. *Foresta Veracruzana.* 11(2), 21-26.
- Murphy C.P (1986). Thin Section Preparation of Soils and Sediments. *Academic Publishers*, Great Britain 149 Pp.
- O'Hanlon, R. (2012). Below-ground ectomycorrhizal communities: the effect of small scale spatial and short term temporal variation. *Symbiosis.* 57(2), 57-71.
- Pérez-Moreno, J. & Read, D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia.* 29: 239-247.
- Pregitzer KS, DeForest JL, Burton AJ, Allen MF, Ruess RW, & Hendrick RL. (2002). Fine root architecture of nine North American trees. *Ecol. Monograph.* 72: 293–309.
- Rai M.K. and Varma A. Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae. Springer, (2011). 459 p.
- Ramírez-Herrera, C., Vargas-Hernández, J. J., & López-Upton, J. (2005). Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. *Acta bot. Mexicana.* (72), 1-16.
- Rashid, M. I., Mujawar, L. H., Shahzad, T., Almeelbi, T., Ismail, I. M., & Oves, M. (2016). Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiol. Res.* 183, 26-41.
- Sandeepa C., Mohanb V. & Viswanatha S. (2014). Significance of ectomycorrhizae in forest ecosystems of India. *International J. Plant, Animal Environ. Sci.* (5), 23-31.
- Smith, S. E., & Read, D. J. (2010). Mycorrhizal symbiosis. Academic press.
- Unestam, T. 1991. Water repellency, mat formation, and leafstimulated growth of some ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 1: 13–20
- Unestam T & Sun Y-P (1995) Extramatrical structures of hydrophobic and hydrophilic ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 5:301– 311
- Valdés, M. (1986). Survival and growth of pines with specific ectomycorrhizae after 3 years on a highly eroded site. *Can. J. Bot.* 64(4), 885-888.
- Wallander, H., T. Wickman, & G. Jacks. (1997). Apatite as a P source in mycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant Soil.* 196:123–131.
- Zheng, W., Morris, E.K., & Rillig, M.C., (2014). Ectomycorrhizal fungi in association with *Pinus sylvestris* seedlings promote soil aggregation and soil water repellency. *Soil Biol. Biochem.* 78, 326e331.

Citas electrónicas
www.deemy.de

CONCLUSIONES GENERALES

Las propiedades edáficas que permitieron tanto la distribución de las raíces como de los hongos a través del perfil, fueron alta porosidad y permeabilidad como consecuencia de la textura franca y franco arcillo arenosa del suelo en todo el perfil. Además, una estructura compleja conformada por migajosa (macro y microagregados) y de grano simple (compuesta por lapillis pomáceos), buena aireación, retención de humedad y habilidad radical y una fertilidad alta.

En Andosols agrícolas se identificaron esporas de 10 especies de HMA en donde *F. mosseae* fue la especie más abundante. El micelio se asoció con diferentes componentes orgánicos e inorgánicos a lo largo de los suelos estudiados; en la superficie con materia orgánica y agregados de origen biológico, y en los horizontes subsuperficiales con arcillas amorfas (imogolita y alofano) y con granos de arena de pómez.

Las hifas se distribuyeron entre el espacio poroso de micro o macroagregados, rodeando a la imogolita y el alófano o bien entrelazando las partículas de lapillis como si fuera cuentas.

La presencia de abundante micelio atrapando a los agregados e inclusive a las partículas de pómez hasta más de un metro de profundidad sugiere que, los hongos son un componente biótico que pudiera estar contribuyendo a la estabilidad de los Andosols y evitando su degradación de dentro del bosque de pino y áreas de cultivo en Calpulalpan Tlaxcala, México.

El estudio microomorfológico, mostró que los HMA estudiados desarrollaron diferentes estrategias en la formación agregados, siendo el presente trabajo, uno de los primeros estudios que lo documenta *in situ*.

Aunque en la formación de agregados mostró que *R. intraradices* contribuyó sólo a la estabilización de macroagregados (> 4.7 mm), el análisis de imágenes indicó que este hongo no sólo tuvo mayor impacto en la formación de macroagregados de diferentes clases que los otros tratamientos de inoculación, sino que también contribuyó mayoritariamente a la formación de microagregados (0.25 mm).

Se requieren mayor cantidad de estudios micromorfológicos que documenten diferencias y/o similitudes con diferentes HMA en asociación con otros componentes bióticos y abióticos en la formación de agregados, para futuros programas de recuperación de suelos.

Existieron diferencias en la formación de macro y microagregados con *P. greggii* y *P. patula* inoculados en los tratamientos inoculados con *Laccaria proxima* y *Hebeloma leucosarx* en donde con *P. greggii* se favoreció la formación de espacio poroso en comparación con *P. patula*. En tanto que los Pinos inoculados con *Suillus* sp. la formación de macro y microagregados fue similar en ambas especies de *Pinus* y mayor que los inoculados con los otros hongos.

El HEcM *Suillus* sp, se relacionó y contribuyó más a la formación de agregados (> 5 mm) que los otros micobiontes independientemente de la planta hospedera asociada. Asimismo, *L. proxima* y *H. leucorax* favoreció más la formación de macroagregados menores a >5000 µm, con excepción de *Laccaria proxima* con *P. greggii*. Ambas especies de hongos se relacionaron mayoritariamente con el espacio poroso y con racimos con ambas especies de *Pinus*.

Los HEcM estudiados independientemente del fitobionte contribuyeron de manera distinta en la distribución y arreglo de las partículas orgánicas y minerales para la formación de agregados de diferentes tamaños en el sustrato de crecimiento vegetal

La separabilidad de los componentes fúngico, agregados, minerales y poros fue posible a través del uso de diferentes luces para estudiar sus interacciones. Sin embargo, se requieren más estudios que involucren el uso de la micromorfología y micromorfometría para construir diferentes modelos dependiendo de la interacción por género y/o especie ectomicorrízica (tipo de micelio y ramificación) en el proceso de formación de agregados, así como el de la raíz hospedera estudiados bajo sistemas inalterados para evitar generalizaciones.

Los sistemas de información geográfica son necesarios en la elaboración de mapas temáticos que permitan estudiar las interacciones de los HEcM con agregados de suelo, poros, partículas orgánicas y minerales en sistemas inalterados. Sin embargo, también se requiere el trabajo de expertos que en conjunto permitan identificar y separar componentes para la elaboración de mapas temáticos, que ayuden a entender estos procesos *in situ*.