



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN HIDROCIENCIAS

**ECTOMICORRIZAS, HUMEDAD Y DEPÓSITO DE NITRÓGENO EN
PINOS DE INVERNADERO Y EN BOSQUES ALEDAÑOS A LA
CIUDAD DE MÉXICO**

VICTOR MANUEL PEREA ESTRADA

T E S I S

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

DOCTOR EN CIENCIAS

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO
2009**

La presente tesis, titulada: **ECTOMICORRIZAS, HUMEDAD Y DEPÓSITO DE NITRÓGENO EN PINOS DE INVERNADERO Y EN BOSQUES ALEDAÑOS A LA CIUDAD DE MÉXICO**, realizada por el alumno: **Víctor Manuel Perea Estrada**, 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
HIDROCIENCIAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:

DRA. MA. DE LOURDES DE LA I. DE BAUER

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESOR:

DR. LUIS VILLARREAL RUIZ

ASESOR:

DR. ANTONIO TRINIDAD SANTOS

ASESOR:

DR. LEONARDO TEJIRINA CHÁVEZ

ASESOR:

DR. VICTOR MANUEL CETINA ALCALÁ

Montecillo, Texcoco, México, julio de 2009

ECTOMICORRIZAS, HUMEDAD Y DEPÓSITO DE NITRÓGENO EN PINOS DE INVERNADERO Y EN BOSQUES ALEDAÑOS A LA CIUDAD DE MÉXICO

Victor Manuel Perea Estrada, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2009

Resumen

El trabajo consistió en dos fases, la primera fue en invernadero y la segunda en campo. En invernadero se evaluó la influencia de dos regímenes de humedad del suelo [80 a 100 y 40 a 60 % de la capacidad máxima de retención de agua del sustrato (CMRAS)] y la inoculación con tres hongos ectomicorrízicos comestibles, *Hebeloma* spp., *Laccaria* spp. y *Clavulina* aff. *cinerea*, así como sus interacciones, en el desarrollo de dos especies de pinos: *Pinus patula* Schl. et Cham y *Pinus hartwegii* Lindl. En las plantas de *Pinus patula* inoculadas con *Hebeloma* spp., el régimen de humedad de 80 a 100 % de la CMRAS produjo mayor peso seco total (46 %) y altura (25 %) en comparación con el régimen de humedad de 40 a 60 % de la CMRAS. En *Pinus patula* inoculado con *Hebeloma* spp., al aplicar altas dosis de fertilizante nitrogenado (140 kg N ha⁻¹), se apreció un aumento en el peso seco del follaje (29 %), comparado con el tratamiento sin fertilizante nitrogenado. En condiciones de campo se realizó un análisis de la riqueza, diversidad y estructura de comunidades de hongos ectomicorrízicos asociadas a las raíces de *Pinus hartwegii* en dos bosques con niveles contrastantes de contaminación ambiental: El Parque Nacional El Desierto de los Leones (DL) con altos niveles de depósito de N y S y el Parque Nacional Zoquiapan (ZOQ) con bajos niveles de depósito de N y S. Se encontró que la riqueza de especies en ZOQ fue de 32 anatotipos (posibles taxa) mientras que el DL se encontró una riqueza menor con solo 17 anatotipos. En este estudio se encontró una reducción en la riqueza de especies de DL con alrededor de 50% comparado con ZOQ.

Palabras clave: *Ectomicorrízicos, hongos, humedad, nitrógeno, diversidad*

**ECTOMYCORRHIZAE, HUMIDITY AND NITROGEN DEPOSITION IN
PINES UNDER GREENHOUSE CONDITIONS AT FORESTS NEARBY
MEXICO CITY**

Victor Manuel Perea Estrada, Dr.

Colegio de Postgraduados

Abstract

The work had of two phases, the first one was carried out under greenhouse conditions and the second one under field conditions. Greenhouse experiments assessed the influence of two soil moisture regimes (80 to 100 and 40 to 60% of the maximum capacity of water retention of the substrate), inoculation of three ectomycorrhizal edible fungi (*Hebeloma* spp. *Laccaria* spp. and *Clavulina* aff. *Cinerea*), and their interactions, in the development of two species of pine (*Pinus patula* Schl. et Cham and *Pinus hartwegii* Lindl). In *Pinus patula* inoculated with *Hebeloma* spp., moisture regime from 80 to 100% of the CMRAS produced more total dry weight (46%) and height (25%) compared with the regime of humidity from 40 to 60 % of CMRAS. In *Pinus patula* inoculated with *Hebeloma* spp. the application of high doses of nitrogen fertilizer (140 kg N ha⁻¹), showed an increase in foliage dry weight (29%), compared with the treatment without nitrogen fertilizer. Under field conditions an analysis of the richness, diversity and community structure of ECM fungi associated with the roots of *Pinus hartwegii* in two forests with contrasting levels of air pollution was carried out. The studied areas were: The Cultural and Recreational Park El Desierto de los Leones (DL) with high deposition of N and S, and the Zoquiapan National Park (ZOQ) with low levels of N and S deposition We found that species richness in ZOQ was 32 anatotypes (possible taxa), while the DL was a less rich site with only 17 anatotypes. The study found a reduction in species richness in DL, of about 50%, compared with ZOQ.

Keywords: *Ectomycorrhizal, fungi, humidity, nitrogen and diversity*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); por el financiamiento de mis estudios y por ser una institución comprometida con la investigación en México.

Al colegio de Postgraduados; por permitirme alcanzar mi grado máximo de estudios.

Al proyecto SEMARNAT-CONACyT-2004-01-45: “Los hongos silvestres comestibles del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos”, por el financiamiento otorgado.

A los profesores integrantes de mi consejo particular:

A la Dra. Ma. De Lourdes de la I. de Bauer, por su invaluable apoyo, orientación y paciencia en mi formación académica y en la investigación, así como la confianza que tuvo en mi persona.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno por su excelente orientación, amistad y apoyo en la dirección de la presente investigación.

Al Dr. Luis Villarreal Ruíz, por su valiosa dirección, sugerencias y apoyo otorgado en el desarrollo de la tesis doctoral.

Al Dr. Antonio Trinidad Santos, por su importante apoyo y precisas recomendaciones en el desarrollo de este trabajo

Al Dr. Leonardo Tijerina Chávez, por los conocimientos aportados y sugerencias realizadas a este trabajo.

Al Dr. Víctor Manuel Cetina Alcalá por las observaciones hechas con el fin de mejorar el presente trabajo.

A mis padres y hermanos, por todo su apoyo cuando más lo necesite.

A mis amigos y compañeros, con quien he contado y espero contar hoy y siempre.

A todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron para mi formación como profesionista.

DEDICATORIAS:

Mis padres

Rodolfo y Amparo

Mi esposa

Silvia

Mis hermanos

Mis sobrinos

A todos mis amigos

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
CAPÍTULO I	
1.1. Introducción.....	1
1.2. Literatura citada.....	5
CAPÍTULO II	
2.1. Objetivos.....	9
2.2. Objetivo general.....	9
2.3. Objetivos específicos.....	9
CAPÍTULO III	
Humedad, adición de nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de dos especies de pinos.....	10
3.1. Resumen.....	10
3.2. Abstract.....	12
3.3. Introducción.....	13
3.4. Materiales y métodos.....	14
3.5. Resultados.....	19
3.5.1. Crecimiento vegetal.....	19

3.5.2. Colonización ectomicorrízica.....	27
3.5.3. Esterilización del suelo.....	27
3.5.4. Diagnóstico fitosanitario de las plantas de pino y de los inóculos empleados.....	27
3.6. Discusión.....	31
3.7. Conclusiones.....	37
3.8. Recomendaciones.....	37
3.9. Literatura citada.....	38

CAPÍTULO IV

Cambios en la composición y estructura de comunidades subterráneas de hongos ectomicorrízicos en bosques de <i>Pinus hartwegii</i> Lindl. cercanos a la Ciudad de México por el posible efecto del depósito de contaminantes atmosféricos.....	44
4.1. Resumen.....	44
4.2. Abstract.....	46
4.3. Introducción.....	48
4.4. Área de estudio.....	53
4.4.1. Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones.....	55
4.4.2. Parque Nacional Zoquiapan.....	55
4.5. Materiales y métodos.....	57

4.5.1. Métodos para estimar la diversidad	
organísmica en ectomicorrizas.....	61
4.5.1.1. Índice de Shannon-Wiener (H').....	62
4.5.1.2. Índice de equitabilidad.....	62
4.5.1.3. Índice de Sørensen.....	63
4.6. Resultados.....	65
4.6.1. Riqueza y diversidad de morfo-anatotipos.....	65
4.6.1.1. Gama diversidad (γ).....	65
4.6.1.2. Alfa diversidad (α).....	71
4.6.1.3. Beta diversidad (β).....	81
4.6.2. Coeficiente de comunidad.....	86
4.6.3. Características edáficas de los sitios de estudio.	86
4.7. Discusión.....	89
4.7.1. Depósito de nitrógeno atmosférico.....	94
4.7.2. Fijación de fósforo.....	95
4.7.3. Materia orgánica.....	96
4.7.4. Conductividad eléctrica.....	98
4.7.5. Otros factores a considerar.....	98
4.7.5.1. Temperatura.....	98
4.7.5.2. Metales pesados.....	99
4.8. Conclusiones.....	100
4.9. Recomendaciones.....	100
4.10. Literatura citada.....	101

CAPÍTULO V	5.1. Discusión general.....	113
	5.2. Literatura citada.....	115
CAPÍTULO VI	Conclusiones generales.....	118
ANEXOS	120

ÍNDICE DE CUADROS POR CAPÍTULO

Cuadro	Titulo	Página
3.1	Significancia F en variables del crecimiento de <i>Pinus patula</i> y <i>Pinus hartwegii</i> en diversos tratamientos de humedad, nitrógeno e inoculación ectomicorrízica en condiciones de invernadero.....	20
3.2	Peso seco, altura, diámetro y producción de raíces cortas en plantas de <i>Pinus patula</i> y <i>Pinus hartwegii</i> inoculadas o no con tres especies de hongos ectomicorrízicos en dos niveles de humedad de suelo.....	22
3.3	Peso seco, altura, diámetro y producción de raíces cortas en plantas de <i>P. patula</i> y <i>P. hartwegii</i> crecidas con tres niveles de fertilización e inoculadas o no con tres especies de hongos ectomicorrízicos comestibles	24
3.4	Peso seco de la planta, altura, diámetro del tallo y producción de raíces cortas en plantas de <i>P. patula</i> y <i>P. hartwegii</i> inoculadas o no con tres especies de hongos ectomicorrízicos en suelos esterilizados o no.....	30
3.5	Diagnostico fitosanitario en las plantas de <i>P. patula</i> y <i>P. hartwegii</i> e inoculo de hongos ectomicorrízicos comestibles.....	32
4.1	Datos climáticos y edáficos en el Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones y el Parque Nacional Zoquiapan.....	57
4.2	Características morfo-anatómicas y su porcentaje de abundancia relativa de los taxa ectomicorrízicos del Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones y el Parque Nacional Zoquiapan.....	73

4.3	Distribución de taxa ECM y el % de su abundancia relativa en las muestras de suelo tomadas a lo largo de los transectos.....	82
4.4	Distribución de taxa ECM y el % de su abundancia relativa en las muestras de suelo tomadas a lo largo de los transectos de 100m en otoño 2006/verano 2007 en el Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones.....	83
4.5	Índice de similaridad de Sorensen en los dos sitios y dos años de muestreo.....	86
4.6	Valores y promedio de características edáficas y número de raíces cortas vivas micorrizadas y muertas del Parque Nacional Zoquiapan. Y del Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS POR CAPITULO

Figura	Titulo	Página
3.1	(a) Panorámica del sitio donde se muestreó el suelo en el bosque de <i>Pinus hartwegii</i> del Parque Nacional Zoquiapan, (b) Venta de hongos silvestres comestibles ectomicorrízicos en el Parque Nacional Zoquiapan (c) Esporomas deshidratados de <i>Laccaria</i> spp., (d) Vista general del experimento en invernadero, (e) Aplicación del inóculo molido, (f) Fertilización con NH_4NO_3 en el agua de riego.....	17
3.2	Peso seco total, número de raíces cortas, peso seco del follaje, peso seco de la raíz, altura y diámetro del tallo de <i>Pinus patula</i> (A, C, E) y <i>P. hartwegii</i> (B, D, F) crecidos en dos regímenes de humedad. Las barras negras corresponden al régimen de humedad que varió de 80 a 100 % de la capacidad máxima de retención de agua del sustrato y las barras blancas corresponden al régimen de humedad de 40 a 60 % de la capacidad máxima de retención de agua del sustrato. Valores con la misma letra dentro de cada variable para cada especie de pino son iguales de acuerdo con la prueba de comparación de medias de T-Student ($P < 0.05$), $n=72$	21
3.3	Plantas de <i>Pinus patula</i> (a) y <i>Pinus hartwegii</i> (b) inoculadas con tres hongos ectomicorrízicos comestibles (L = <i>Laccaria</i> spp., H= <i>Hebeloma</i> spp., C = <i>Clavulina</i> aff. <i>cinerea</i>) y plantas sin inocular (T = testigo). Los valores son promedios de 36 plantas. Un cambio de letra sobre una barra	

	entre tratamientos, para cada parte de las plantas, indica diferencias estadísticas significativas, según la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$). Las líneas sobre las barras representan el error estándar de la media.....	25
3.4	Cambios secuenciales en la altura de las plantas de <i>Pinus patula</i> (a) y <i>Pinus hartwegii</i> (b) respectivamente inoculadas con tres especies de hongos ectomicorrízicos (L= <i>Laccaria</i> spp., H= <i>Hebeloma</i> spp., C= <i>Clavulina</i> aff. <i>cinerea</i>) y plantas sin inocular (T=Testigo). Los valores son promedios de 36 observaciones. Un cambio de letra sobre una barra en tratamientos, indica diferencias estadísticas significativas, según la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$). Las líneas sobre los indicadores representan el error estándar de la media de la altura.....	26
3.5	Número de raíces cortas ECM en plantas de <i>Pinus patula</i> (a) y <i>Pinus hartwegii</i> (b) inoculadas con tres hongos ectomicorrízicos (L = <i>Laccaria</i> spp., H = <i>Hebeloma</i> spp., C = <i>Clavulina</i> aff. <i>cinerea</i>) y plantas sin inocular (T = testigo). SE = suelo estéril, SNE = suelo no estéril, Otr = Otros hongos ectomicorrízicos distintos a los inoculados. Las barras llenas, con patrón inclinado y huecas corresponden al número de raíces cortas ECM con la morfología característica de <i>Laccaria</i> spp., <i>Hebeloma</i> spp. y hongos ECM distintos de los inoculados, respectivamente. n = 18.....	28

3.6	(a) Raíces cortas colonizadas con <i>Laccaria</i> spp; (b) Manto de <i>Laccaria</i> spp. plectenquimatoso del tipo de hifas irregulares y sin ningún patrón discernible en especial; (c) Raíces cortas colonizadas con <i>Hebeloma</i> spp.; (d) Manto de <i>Hebeloma</i> spp. plectenquimatoso del tipo de hifas irregulares y sin ningún patrón discernible en especial. Líneas en (a) y en (c) equivalen a 1 mm y en (b) y (d) equivalen a 20 μ m.....	29
4.1	Mapa de localización de los sitios de estudio: (1) Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones y (2) Parque Nacional Zoquiapan.....	54
4.2	Diagrama de flujo del estudio realizado en campo y laboratorio. Fotos: Dr. Luis Villarreal Ruiz.....	60
4.3	Morfortipos ectomicorrízicos en raíces de <i>Pinus hartwegii</i> del Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones y el Parque Nacional Zoquiapan; (a) sp. 1, (b) sp. 2, (c) sp. 3, (d) sp. 4, (e) sp. 5, (f) sp. 6 = <i>Cenococcum geophilum</i> , (g) sp.7, (h) sp.8 = <i>Cadophora finlandica</i> , (i) sp.9, (j) sp.10, (k) sp.11, (l) sp.12, (m) sp.13, (n) sp. 14, (ñ) sp. 15, (o) sp. 16, (p) sp. 17, (q) sp. 18, (r) sp. 19, (s) sp. 20, (t) sp. 21, (u) sp. 22, (v) sp. 23, (w) sp. 24, (x) sp. 25, (y) sp. 26, (z) sp. 27, (a') sp. 28, (b') sp. 29, (c') sp. 30, (d') sp. 31, (e') sp. 32, (f') sp. 33, (g') sp. 34, (h') sp. 35, (i') sp. 36, (j') sp. 37, (k') sp. 38, (l') sp. 39, (m') sp. 40, (n') sp. 41, (ñ') sp. 42, (o') sp. 43, (p') sp. 44, (q') sp. 45, (r') sp. 46, (s') sp. 47, (t') sp. 48, (u') sp. 49, (v') sp.	

	50, (w') sp. 51, (x') sp. 52; he= hifas externas, rm= rizomorfos, pa= partículas de suelo adheridas al micelio externo.....	66
4.4	Anatotipos ectomicorrízicos basados en el manto externo de las raíces micorrizadas de <i>Pinus hartwegii</i> del parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones y Parque Nacional Zoquiapan. (a) sp. 1, (b) sp. 2, (c) sp. 3, (d) sp. 4, (e) sp. 5, (f) sp. 6 = <i>Cenococcum geophilum</i> , (g) sp. 7, (h) sp. 8 = <i>Cadophora finlandica</i> , (i) sp. 9, (j) sp. 10, (k) sp. 11, (l) sp. 12, (m) sp. 13, (n) sp. 14, (ñ) sp. 15, (o) sp. 16, (p) sp. 17, (q) sp. 18, (r) sp. 19, (s) sp. 20, (t) sp. 21, (u) sp. 22, (v) sp. 23, (w) sp. 24, (x) sp. 25, (y) sp. 26, (z) sp. 27, (a') sp. 28, (b') sp. 29, (c') sp. 30, (d') sp. 31, (e') sp. 32, (f') sp. 33, (g') sp. 34, (h') sp. 35, (i') sp. 36, (j') sp. 37, (k') sp. 38, (l') sp. 39, (m') sp. 40, (n') sp. 41, (ñ') sp. 42, (o') sp. 43, (p') sp. 44, (q') sp. 45, (r') sp. 46, (s') sp. 47, (t') sp. 48, (u') sp. 49, (v') sp. 50, (w') sp. 51, (x') sp. 52.....	68
4.5	Composición y estructura de comunidades de morfo-anatotipos ectomicorrízicos de <i>P. hartwegii</i> , basados en el porcentaje de la abundancia relativa de los datos obtenidos del Parque Nacional Zoquiapan y el Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones durante 2006 y 2007.....	70
4.6	Cambios en la composición y estructura de comunidades de morfo-anatotipos ectomicorrízicos tomando en cuenta la suma de datos de los años (2006 y 2007) en el Parque Nacional Zoquiapan (a) y el Parque	

	Cultural Desierto de los Leones (b).....	71
4.7	Curvas de esfuerzo de muestreo Parque Nacional Zoquiapan. (a) Otoño 2006 con 21 muestras de suelo. (b) Verano 2007 con 21 muestras de suelo. (c) Otoño 2007 con 31 muestras de suelo.....	74
4.8	Curvas de esfuerzo de muestreo en el Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones con 21 muestras de suelo. (a) Otoño, 2006. (b) Verano 2007.....	75
4.9	Cambios en la composición de morfo-anatotipos ectomicorrízicos encontradas por sitio y año de muestreo, ordenados en base a la abundancia relativa de cada taxa del Parque Nacional Zoquiapan, (a) muestreo otoño 2006, (b) muestreo verano 2007.....	76
4.10	Porcentajes de los tres morfo-anatotipos ectomicorrízicos más sobresalientes que representaron (a) 42 % del total en el muestreo otoño 2006 y (b) 59 % del total en el Parque Nacional Zoquiapan; sp. 6 = <i>Cenococcum geophilum</i>	77
4.11.	Cambios en la composición de morfo-anatotipos ectomicorrízicos encontradas por sitio y año de muestreo y ordenados en base a la abundancia relativa de taxas del Parque Recreativo y Cultural Desierto de	

los Leones, (a) muestreo otoño 2006, (b) muestreo verano 2007.....	79
4.12. Porcentajes de los morfo-anatotipos ectomicorrízicos más sobresalientes que representaron (a) 69 % del total en el muestreo otoño 2006 y (b) 72 % del total en el Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones; sp.6 = <i>Cenococcum geophilum</i>	80
4.13. Distribución del número de raíces y taxa ECM a intervalos de 5m, lo largo del transecto de 100m (2006/2007) en el Parque Nacional Zoquiapan. (a) No promedio de raíces ECM por muestra de suelo. (b) No. total de la riqueza de taxa ECM. Un cambio de letra sobre una barra indica diferencias estadísticas, según la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$). Las líneas sobre las barras representan el error estándar de la media.....	84
4.14. Distribución del número de raíces y taxa ECM a intervalos de 5m, lo largo del transecto de 100m (2006/2007) en el Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones. (a) No promedio de raíces ECM por muestra de suelo. (b) No. total de la riqueza de taxa ECM. Un cambio de letra sobre una barra indica diferencias estadísticas, según la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$). Las líneas sobre las barras representan el error estándar de la media.....	85

CAPÍTULO I

1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En México existe una seria preocupación por la reducción de masas boscosas tanto de zonas templadas como tropicales, afectadas ambas por la deforestación. Debido a esta práctica destructiva, se ha estimado una disminución de 192,500 ha de bosques en áreas templadas y de 477,330 ha de bosques tropicales por año, respectivamente (Rincón *et al.*, 1999). Existe entonces la necesidad de reconsiderar los diversos factores involucrados, para prevenir la pérdida de los recursos forestales de gran valía. La problemática de los bosques implica la atención a través de la investigación, de todos los aspectos que apoyen (1) la preservación de los remanentes del bosque nativo y (2) el establecimiento de plantaciones en zonas deforestadas considerando también tanto (3) la selección de las especies más adecuadas como (4) el estudio de las condiciones climáticas y edáficas de los sitios donde se desarrollan. Por otra parte, el ecosistema forestal es extraordinariamente complejo al reunir una gran diversidad biológica de flora, fauna y microbiota tanto aérea como subterránea que interactúan entre sí como elementos bióticos y con el entorno abiótico del medio circundante, lo que genera una interdependencia para el mantenimiento de la vida planetaria.

En la mayoría de los países como México que presentan altas concentraciones de población en sus áreas urbanas se ha notado una considerable reducción en los recursos naturales, en particular los ecosistemas forestales que son fuertemente impactados por la presión causada por nuevos asentamientos humanos, la expansión de la agricultura, las actividades ganaderas, el aumento de la infraestructura urbana, la extracción no controlada de

diferentes productos maderables y no maderables, así como el estrés hídrico a causa de la sobreexplotación del recurso agua y los cambios en el clima. Además, bajo estas condiciones las elevadas concentraciones de contaminantes del aire impactan en las zonas altas con áreas boscosas como las regiones sur y suroeste de la Ciudad de México, por su cercanía a las fuentes emisoras y por los vientos dominantes de la región norte y noroeste (Krupa y Bauer, 1976; Bauer, 1991; Rodríguez, 2002).

Una asociación simbiótica mutualista importante, por el papel estructural y funcional que desempeña en los ecosistemas forestales, es la ectomicorriza (Smith y Read, 1997). Dicha simbiosis mutualista se establece entre las raíces de las plantas gimnospermas y angiospermas y una amplia gama de basidiomicetos y ascomicetos estimada en más de 7,000 especies de hongos especializados del suelo (Taylor y Alexander, 2005). El hongo simbionte o micobionte cubre las raíces cortas (con una longitud de menos de 2 mm) de la planta hospedera, formando un manto o vaina donde las hifas crecen hacia dentro de la raíz entre los espacios intersticiales de las células corticales y hacia afuera como micelio externo y rizomorfos que constituyen una estructura de enorme relevancia ecológica en los ecosistemas forestales (Pérez-Moreno y Read 2004). Se ha considerado que una cantidad importante (10 a 20%) de fotoasimilados pueden ser transferidos de la planta al micelio ectomicorrízico (ECM¹) (Leake *et al.*, 2004; Hoobie, 2006). Los hongos ECM, por sus efectos benéficos, se utilizan para inocular plantas en invernadero y en plantaciones forestales (Castellano y Molina, 1989). Existen, algunas experiencias de los efectos favorables de la micorrización asistida en pinos, por ejemplo Sudhakara-Reddy y Natarajan

¹ECM= Se utiliza para abreviar los vocablos “ectomicorrízico” y “ectomicorrízicos”.

(1997), Chu-Chou y Grace (1985) y Parladé y Álvarez (1993). Sin embargo se ha documentado la existencia de factores que afectan a las ectomicorrizas en los bosques como por ejemplo el estrés hídrico (Nilsen *et al.*, 1998; Swaty *et al.*, 1998; Meier *et al.*, 1990) y el depósito de N y otros contaminantes atmosférico relacionados con la declinación de hongos ECM y la diversidad de esporomas (Wallenda y Kottke 1998; Lilleskov *et al.*, 2001; Serita *et al.*, 2004; Carfrae *et al.*, 2006). Piter *et al.*(2001). En esta misma línea de investigación Edwards *et al.* (2004) han reportado el deterioro de las comunidades de hongos micorrízicos en general por la contaminación ambiental, observándose en el caso de especies ectomicorrizas, decrementos en la producción de esporomas, riqueza de especies, composición y estructura de comunidades.

Los conocimientos disponibles acerca de la gran relevancia de la asociación ectomicorrízica, específicamente en el género *Pinus* spp., hace necesario la investigación científica para obtener las evidencias del posible papel de estos hongos en los bosques circundantes del Valle de México, por ejemplo: se ha demostrado que el micelio o masas de hifas, conectan a muchas plantas entre sí; bajo el suelo (Pérez-Moreno y Read 2004). Por todo ello, las ectomicorrizas aumentan la productividad forestal, aseguran la germinación y la conexión con el árbol, además de ayudar al establecimiento y sobrevivencia de la planta (Xoconostle y Ruíz, 2002). La simbiosis micorrízica juega un papel crucial en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas naturales y de regiones tropicales, templadas y boreales del planeta (Pérez-Moreno y Read 2004). De particular importancia resulta el hecho de que México posee la mayor diversidad de pinos en el mundo, con 72 taxa (Perry, 1991). Las especies del género *Pinus* tienen una gran importancia ecológica y económica en el país por ejemplo: i) la distribución de especies de dicho género en México va desde el

nivel del mar hasta cerca de los 4,200 m de altitud (Perry, 1991) y *ii*) poco más del 76% de la producción nacional maderable extraída en el país y que corresponde a 6,718,508 m³ proviene de los pinos nativos mexicanos (SEMARNAT, 2004). Las especies del género *Pinus* tienen una gran importancia ecológica y económica en el país. Por tal motivo resulta relevante estudiar las relaciones que existen entre las micorrizas, el contenido de humedad, la planta huésped y los factores abióticos que las afectan. Sin embargo es difícil reproducir todos los factores incidentes en campo a un invernadero, pero es de importancia su estudio para tratar de entender estos fenómenos.

Por tal motivo la presente investigación se dividió en dos partes: la primera consistió en la etapa de invernadero donde se probó el efecto de dos regímenes de humedad en el suelo, tres dosis de N mineral, inoculación con tres hongos ECM comestibles (*Hebeloma* spp., *Laccaria* spp. y *Clavulina* aff. *cinerea*) en el crecimiento de dos especies de pinos: *Pinus patula* y *Pinus hartwegii*. Las especies de pino seleccionadas para este estudio fueron: *i*) *Pinus patula* la cual es originaria de México y ha sido introducida con éxito en diversos países en donde, por sus características maderables es muy apreciada, y *ii*) *P. hartwegii*, llamado “pino de las alturas” por distribuirse en el límite de la vegetación arbórea en México hasta 3,800 m s.n.m. (Musalem y Solís, 2000). Además, dado que este pino es muy sensible al ozono (Krupa y de Bauer, 1976), ha sido utilizada como una especie indicadora perenne para identificar el impacto de dicho gas fitotóxico en diversos lugares de México (Hernández-Tejeda *et al.*, 2001).

En la segunda etapa se hicieron muestreos de suelo en dos bosques cercanos a la Ciudad de México con diferentes niveles de depósito de (nitrógeno) N y otros contaminantes

atmosféricos: (1) El Parque Recreativo y Cultural El Desierto de los Leones (DL) con altos niveles de depósito de N y (2) el Parque Nacional Zoquiapan (ZOQ) con bajos niveles de depósito de N y S (Fenn *et al.*, 1999). Los muestreos se realizaron durante dos años en diferentes estaciones (otoño del 2006 y verano del 2007), para detectar posibles cambios en la estructura de comunidades debido al efecto estacional evaluándose en dichos sitios cambios en la composición y estructura de comunidades de hongos ectomicorrizicos en las raíces de *P. hartwegii*

1.2 LITERATURA CITADA

- Allen, M. F. 1991. *The Ecology of Mycorrhizae*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Carfrae, J. A., Skene, K. R., Sheppard, L. J., Ingleby, K., Crossley, A. 2006. Effects of nitrogen with and without acidified sulphur on an ectomycorrhizal community in a Sitka spruce (*Picea sitchensis* Bong. Carr) forest. *Environ Pollut.* 196: 159-171.
- Castellano, M. A. and Molina, R. 1989. Mycorrhizae. P. 101-167 in the container tree nursery manual, Volume 5. *Agric. Handb.* 674, Landis, T.D., *et al.* (eds.). USDA For. Serv., Washington, DC.
- Chu-Chou, M. and Grace, L. J. 1985. Comparative efficiency of the mycorrhizal fungi *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme* and *Rhizopogon* species on growth of radiate pine seedlings. *New Zealand J. Bot.* 23: 417-424.
- de Bauer, L. I. 1991. La influencia urbana en el área del Ajusco. *In: proceedings of the Firts National Symposium, "Agricultura Sostenible: Una opción para el desarrollo sin deterioro ambiental"*. pp. 174-183. Montecillo, México: Comisión de estudios ambientales,. Colegio de Postgraduados and M.O.A Internacional.

- Edwards, I. P., Criplier, J. I., Gillespie, A. R., Johnsen, K. H., Scholler, M. and Turco, R. F. 2004. Nitrogen availability alters macrofungal basidiomycete community structure in optimally fertilized loblolly pine forest. *New Phytol.* 162: 755-770.
- Fenn, M. E., de Bauer L. I., Zeller. K., Quevedo N. A., Rodríguez C. and Hernández-Tejeda T.. 2002. Nitrogen and Sulfur Deposition in the Mexico City air Basin: Impacts on Forest Nutrient Status and Nitrate levels in Drainage Water. *In*: M.E. Fenn, L.I de Bauer and T. Hernandez-Tejeda. (eds.). *Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin.* pp. 298-319. *Ecological Studies* 156. Springer-Verlag. New York.
- Fenn, M. E., De Bauer, L. I., Quevedo, N. A., Rodríguez C., F. 1999. Nitrogen and sulfur deposition and forest nutrient status in the Valley of Mexico. *Water, Air, and Soil Pollut.* 112: 155-174.
- Hernández-Tejeda, T., Cox, R.M., Malcolm, J., de Bauer, L. I., Vargas, H. J., Velázquez, M. A. y Alvarado, R. D. 2001. Impacto del ozono sobre el polen de *Pinus hartwegii* Lindl. *Rev. Ciencia Forestal en México.* 26: 5-18.
- Hobbie, E. A. 2006. Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. *Ecology* 87: 653-569.
- Krupa, S. V and de Bauer L. I. 1976. La ciudad daña los pinos del Ajusco. *Panagfa.* 4(31): 5-7.
- Leake, J., David, J., Damian, D., Gemma, M. and Lynne, B. 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* 82: 1016-1045.

- Lilleskov, E.A., Fahe, T. J.. and Lovett, G. M.,. 2001. Ectomycorrhizal fungal aboveground community change over an atmospheric nitrogen deposition gradient. *Ecol. Appli.* 11: 397-410.
- Meier, S., L. Grand F.,, Schoeneberger, M. M., Reinert, R. A.. and Bruck, R. I.. 1990. Growth, ectomycorrhizae and nonstructural carbohydrates of loblolly pine seedlings exposed to ozone and soil water deficit. *Environ. Pollut.* 64:11–17.
- Musalem, S. M. A y Solís, M. A.,. 2000. Monografía de *Pinus hartwegii*. SAGAR, INIFAP y CIRCE Campo Experimental Valle de México. Libro Técnico No. 3, Chapingo, Estado de México. 96 p.
- Nilsen, P. I., Børja, H., Knutsen and Brean, R.. 1998. Nitrogen and drought effects on ectomycorrhizae of Norway spruce [*Picea abies* L.(Karst.)]. *Plant and Soil* 198: 79–184.
- Parladé, J. and Álvarez, I. F. 1993. Coinoculation of aseptically grown Douglas fir with pairs of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 3: 93-96.
- Pérez-Moreno, J. y Read, D. J. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247.
- Perry, J. P. 1991. *The pines of Mexico and Central America*, Timber Press. Oregon. EUA.
- Piter, M., Ayer, F., and Simon, E. 2001. Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species. *New Phytol.* 149:311-325.
- Rincón, E., Huarte, E. y Álvarez, M. 1999. Respuesta de plantas al cambio climático: un enfoque ecofisiológico. *Ciencia* 5: 5-15
- Rodríguez, F. C. 2002. Forests in the Basin of Mexico: Types, Geographic distribution, and Condition pp. 68-85 *In*: M.E. Fenn, L.I de Bauer and T. Hernandez-Tejeda. (eds.).

- Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin. Pp. 68-85. Ecological Studies 156. Springer-Verlag. New York.
- SEMARNAT. 2004. Anuario Forestal. México. 158 p.
- Serita, D. F., Melissa, K., Parrent, L. J. and Rodney T. S.,. 2004. Chronic nitrogen enrichment affects the structure and function of the soil microbial community in temperate hardwood and pine forests. *Forest Ecology and Management* 196: 159-171.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Second edition. Academic Press, London. 605 pp.
- Sudhakara-Reddy, M. and Natarajan, K. 1997. Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza* 7: 133-138.
- Swaty, R. L., Gehring, C. A., Van Ert, M., Theimer, T. C., P. Keim, P., and Whitham, T. G., 1998. Temporal variation in temperature and rainfall differentially affects ectomycorrhizal colonization at two contrasting sites. *New Phytol.* 139: 733–739.
- Taylor, A. F. S. and Alexander, I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19: 102-112.
- Wallenda, T. and Kottke, I. 1998. Nitrogen deposition and ectomycorrhizal. *New Phytol.* 139: 169-187.

CAPÍTULO II

2.1. OBJETIVOS

2.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del depósito de Nitrógeno (N) atmosférico y la humedad en el desarrollo de hongos ectomicorrízicos, incluyendo especies comestibles, del Parque Nacional Zoquiapan y del Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar, en invernadero, la influencia de dos regímenes de humedad en el suelo y tres dosis de N mineral en el crecimiento de dos especies de pinos inoculados con tres hongos comestibles potencialmente ectomicorrízicos (*Hebeloma* spp., *Laccaria* spp., y *Clavulina* aff. *cinerea*).
2. Evaluar en dos estaciones (otoño del 2006 y verano del 2007), los cambios en la riqueza de especies, composición y estructura de comunidades de hongos ectomicorrízicos en las raíces de *Pinus hartwegii* en dos áreas con diferentes niveles de depósito de N atmosférico, azufre atmosférico y otros posibles contaminantes, en especial el grupo de oxidantes.

CAPÍTULO III

HUMEDAD, ADICIÓN DE NITRÓGENO Y HONGOS ECTOMICORRÍZICOS COMESTIBLES EN EL CRECIMIENTO DE DOS ESPECIES DE PINOS

3.1. RESUMEN

El efecto de la humedad del sustrato y la fertilización nitrogenada en plantas inoculadas con hongos ectomicorrízicos (ECM) ha recibido escasa atención, a pesar del reconocimiento de la importancia de este grupo de hongos en los últimos años, por su gran relevancia ecológica y su sensibilidad a factores ambientales. El objetivo del presente estudio fue evaluar en invernadero la influencia de dos regímenes de humedad del sustrato [80 a 100 y 40 a 60 % de la capacidad máxima de retención de agua del sustrato (CMRAS)], la adición de tres dosis de nitrógeno (N) mineral (140,70 y 0 kg de N ha⁻¹) y la inoculación con tres hongos ECM comestibles (*Hebeloma* spp., *Laccaria* spp. y *Clavulina* aff. *cinerea*), en el desarrollo de dos especies de pinos (*Pinus patula* Schl. et Cham y *Pinus hartwegii* Lindl). Se midió la altura y el diámetro del tallo 90, 180 y 310 días después de la siembra, el número de raíces cortas, el peso seco de la parte aérea y la raíz, y la colonización ectomicorrízica. Se encontró que los efectos más relevantes ($P \leq 0.05$) en las variables evaluadas en las plantas fueron originados por la humedad del sustrato y la inoculación con hongos ECM. Las interacciones más sobresalientes ($P \leq 0.05$) fueron las de la humedad del sustrato, la especie de pino, la inoculación con hongos ECM, la especie de pino y la inoculación con hongos ECM. Se incrementaron la altura y el peso seco, como consecuencia de la inoculación con *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. En las plantas de *P. patula* inoculadas con *Hebeloma* spp., el régimen de humedad de 80 a 100 % de la

CMRAS produjo mayor peso seco total (46 %) y altura (25 %) en comparación con el régimen de humedad de 40 a 60 % de la CMRAS. En *P. patula* inoculado con *Hebeloma* spp., al aplicar altas dosis de fertilizante nitrogenado (140 kg N ha⁻¹), se apreció un aumento en el peso seco del follaje (29 %), comparado con el tratamiento sin fertilizante nitrogenado. El crecimiento de *P. patula* y *P. hartwegii* fue afectado diferencialmente en los regímenes de humedad evaluadas, en función de los hongos ECM inoculados.

Palabras clave: *Pinus patula*, *Pinus hartwegii*, hongos ectomicorrízicos, humedad, nitrógeno.

3.2. ABSTRACT

The effect of soil moisture and nitrogen fertilization in plants inoculated with ectomycorrhizal fungi has received limited attention, although the importance of this group of fungi in recent years due to its great ecological significance and sensitivity to environmental factors has been recognized. The objective of this study was to evaluate the influence of two regimes of soil moisture [80 to 100 and 40 to 60 percent of the maximum capacity of water retention of the substrate (MCWRS)], the addition of three doses of mineral nitrogen (140, 70 and 0 kg of N ha⁻¹) and the inoculation with three edible ectomycorrhizal fungi: *Hebeloma* spp. *Laccaria* spp. and *Clavulina* aff. *cinerea* and the interactions of these factors in the growth of two species of pine: *Pinus patula* Schl. et Cham and *Pinus hartwegii* Lindl. Total height and diameter of the shoot at 90, 180 and 310 days after sowing, number of short roots, dry weight of shoot and root, and ectomycorrhizal colonization were evaluated. Most relevant effects ($P \leq 0.05$) on the assessed variables were originated by soil moisture and inoculation with ectomycorrhizal fungi. The most significant interactions ($P \leq 0.05$) were established between soil moisture and species of pine, soil moisture and inoculation with ECM fungi and species of pine and inoculation with ECM fungi. There was an increase in height and dry weight as a result of inoculation with *Hebeloma* spp. and *Laccaria* spp. In *P. patula* inoculated with *Hebeloma* spp. the soil moisture regime from 80 to 100 percent of the MCWRS produced more total dry weight (46 %) and height (25 %), compared to the soil moisture regime from 40 to 60 percent of the MCWRS. In *P. patula* inoculated with *Hebeloma* spp. the application of high doses of nitrogen (140 kg N ha⁻¹) produced an increase in dry weight of the foliage (29 %) compared with the control treatment without nitrogen fertilizer. The growth of *P. patula* y *P.*

hartwegii was differentially affected in the evaluated humidity regimes, depending on the inoculated ECM fungi.

Keywords: *Pinus patula*, *Pinus hartwegii*, ectomycorrhizal fungi, humidity, nitrogen.

3.3. INTRODUCCIÓN

Los hongos ectomicorrízicos (ECM) forman una interface entre el suelo y la planta huésped en la que las hifas extrarradicales sirven como extensiones de la raíz y funcionan como estructuras de absorción de agua y minerales (Leake *et al.*, 2004). El micelio externo de las ectomicorrizas puede ampliar la superficie de exploración de las raíces de las plantas varios metros, explorar en forma más eficiente el suelo y adicionalmente formar agregados que ayudan a mantener la estructura y la aireación en el suelo (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2004). Las micorrizas, además de participar en la absorción de agua y nutrimentos, generan cambios fisiológicos y morfológicos favorables para el crecimiento y desarrollo de la planta huésped. Estos cambios de la planta causados por la micorrización aminoran condiciones de estrés ambiental, tales como la limitación de agua y nutrimentos (Davies *et al.*, 1996). Actualmente, en diversas partes del mundo existe una declinación de los bosques la que se atribuye a la contaminación ambiental y al cambio climático (Alvarado-Rosales y Hernández-Tejeda, 2002; Paoletti *et al.*, 2007).

Dos factores que afectan conspicuamente a los hongos ECM asociados con los árboles, son el estrés hídrico y el depósito de N. Se ha demostrado que el estrés hídrico reduce la colonización ectomicorrízica (Nilsen *et al.*, 1998). Existen especies de hongos ECM tolerantes al depósito de N denominadas nitrofilicas y otras especies son susceptibles, denominadas nitrofóbicas, en las cuales se ha registrado una declinación en la producción

de sus esporomas (Carfrae *et al.*, 2006). En México, el estudio de la influencia del estrés hídrico y el efecto del depósito de N en las especies ectomicorrízicas hasta donde se conoce, no se ha estudiado. Esto a pesar de que se ha documentado que en los últimos años ha existido un incremento del depósito de N atmosférico en las áreas boscosas del centro de México (Fenn *et al.*, 2003). De acuerdo con estos antecedentes, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar, en condiciones de invernadero, la influencia de dos regímenes de humedad en el sustrato y tres dosis de N mineral en la inoculación de tres hongos ECM comestibles (*Hebeloma* spp., *Laccaria* spp. y *Clavulina* aff. *cinerea*) y su efecto en el crecimiento de dos especies de pinos nativos mexicanos (*Pinus patula* y *P. hartwegii*) de gran importancia económica y ecológica.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó, en Montecillo, Texcoco, Estado de México, durante los años 2006 y 2007. Para esta investigación se seleccionaron dos especies endémicas de pinos mexicanos de importancia forestal: *P. patula* Schl. *et* Cham. y *P. hartwegii* Lindl. *P. patula* se distribuye en la Sierra Madre Oriental, desde Tamaulipas hasta Oaxaca y se extiende también en la Sierra Madre del Sur, hasta Guerrero. En la actualidad, más de un millón de hectáreas de *P. patula* se han plantado en el mundo, principalmente en África y Sudamérica (Dvorak *et al.*, 2000). *P. hartwegii*, conocido como el pino de las alturas, se localiza en México, en el límite de la vegetación arbórea, a altitudes de 2,800 a 4,200 m (Campos, 1993). Las semillas de *P. patula* y *P. hartwegii* utilizadas en el presente experimento proceden de los municipios de Villa Victoria y Zinacantepec, Estado de México, respectivamente. En el ensayo se utilizó una mezcla de suelo, arena y aserrín, en una proporción 1:2:2 en relación a v/v.

El suelo empleado se obtuvo del Parque Nacional Zoquiapan (Figura 3.1a), localizado a una altitud de 3,350 m, una latitud de 19° 20' 00'' y una longitud de 98° 42' 00''. Las semillas se sometieron a una escarificación y esterilización superficial con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), a 30 %, durante 20 min y luego se lavaron con 1 L de agua destilada estéril, tres veces. El inóculo de hongos ECM utilizado se obtuvo a partir de esporomas adquiridos en mercados de la zona de influencia, en Ozumba y Chalco, Estado de México (Figura 3.1b); estas estructuras reproductoras se deshidrataron en una estufa (FELI Aut. DGE 11524) a 36 °C, durante 48 h, para mantener la viabilidad de los propágulos (Figura 3.1c). Después los esporomas deshidratados se molieron con un molino eléctrico, se pasaron a través de un tamiz de 1 mm (para homogeneizar el tamaño de las partículas), se depositaron en botes de plástico de 400 mL y se almacenaron en un refrigerador, a 5 °C, hasta su aplicación. La siembra se efectuó en recipientes de plástico (APB[®]) con un volumen de 140 cm³ a los cuales se les agregó 150 g de la mezcla del sustrato, y de inmediato se sembraron tres semillas de cada especie de pino por recipiente (Figura 3.1d), 35 días después se inocularon los hongos ECM. La segunda inoculación (Figura 3.1 e) se efectuó 90 días después de la siembra. Cada planta se inoculó en total, con tres cm³ de esporomas molidos, los cuales contenían de 10⁶ a 10⁸ esporas, de acuerdo con evaluaciones efectuadas con un hematocitómetro (Neubauer[®]). Durante el experimento se evaluaron dos intervalos de humedad: 80 a 100 y 40 a 60 % de la capacidad máxima de retención de agua del sustrato (CMRAS). Para mantener dicha humedad se utilizó el método gravimétrico: se pesó el recipiente con el sustrato y la planta, según los tratamientos de humedad. Cada 24 h se comprobó el peso del recipiente, utilizando una balanza granataria (OHAUS de 2,610 g y una resolución de 0.1g), y se procedió a reponer el peso del agua perdida, para volver al peso original.

Se aplicaron tres dosis de fertilización con el equivalente de 140, 70 y 0 kg de N ha⁻¹, al usar como fuente NH₄NO₃ (Meyer[®]) con 35.5 % de N (Fenn et al., 2003). La fertilización se dividió en cuatro aplicaciones en agua de riego: la primera parte se suministró 94 días después de la siembra y las demás fueron escalonadas cada 15 días (Figura 3.1f). Las plantas se regaron con agua destilada durante 310 días y se les aplicó Captán diluido, 2 g de ingrediente activo L⁻¹, en el agua de riego para controlar algunos patógenos, sin dañar a los inóculos.

Durante el desarrollo del experimento existió una mortalidad alrededor de 20% para ambas especies de pinos. Por esta razón se realizó el diagnóstico fitosanitario en, *i*) plantas muertas de *Pinus patula* y *Pinus hartwegii*, y *ii*) en los inóculos de los hongos empleados en el experimento. Este diagnóstico fue efectuado en el laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, mediante siembra en Papa Dextrosa Agar (PDA), cámara húmeda, incubación de las plantas afectadas y posteriormente montaje y observación al microscopio.



Figura 3.1. (a) Panorámica del sitio donde se muestreó el suelo en el bosque de *Pinus hartwegii* del Parque Nacional Zoquiapan, (b) Venta de hongos silvestres comestibles ectomicorrízicos en el Parque Nacional Zoquiapan (c) Esporomas deshidratados de *Laccaria* spp., (d) Vista general del experimento en invernadero, (e) Aplicación del inóculo molido, (f) Fertilización con NH_4NO_3 en el agua de riego.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con un arreglo de tratamientos factorial completo $2 \times 2 \times 2 \times 3 \times 4$, para analizar dos tipos de sustrato (estéril y no estéril), dos especies de pino (*P. patula* y *P. hartwegii*), dos niveles de CMRAS (80 a 100 y 40 a 60 %), tres dosis de N (140, 70 y 0 kg ha⁻¹) y cuatro tratamientos de hongos ECM (sin inoculación, *Laccaria* spp., *Hebeloma* spp. y *Clavulina* aff. *cinerea*), lo cual generó un total de 96 tratamientos, con tres repeticiones, para un total de 288 unidades experimentales, cada una constituida por una planta de pino. Se midió la altura y el diámetro en la base de cada planta a 90, 180 y 310 días después de la siembra. En esta última fecha, las plantas se extrajeron de los recipientes y se colocaron en un recipiente con agua corriente, para remover las partículas del sustrato. Después se contaron las raíces cortas utilizando un microscopio estereoscópico (Zeiss®) para las 288 plántulas de pino que constituyeron el experimento. Estas se separaron en raíces cortas: *i*) micorrizadas, *ii*) no micorrizadas, y *iii*) muertas. En el caso de las raíces micorrizadas se contabilizaron aquéllas que morfológicamente eran similares a las descritas para *Laccaria* spp. y *Hebeloma* spp., siguiendo los criterios de Deemy (2008). Después se separó la raíz y la parte aérea de la planta y se llevaron a una estufa (Napco mod. 620) con circulación de aire forzado a 70 °C durante 48 h. para obtener el peso seco.

Con los datos de las diferentes variables dependientes evaluadas se realizó un análisis de varianza, descomponiendo en sus grados de libertad los tratamientos y sus interacciones. También se hizo una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$ %) utilizando el paquete estadístico SAS, ver. 9.0 (SAS Institute, 1999).

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Crecimiento vegetal

Las variables de crecimiento de *P. patula* y *P. hartwegii* que resultaron más afectadas ($P \leq 0.05$) por efecto de los tratamientos fueron el peso seco del follaje, el peso seco total y el número de raíces cortas. También fueron afectadas ($P \leq 0.05$), con menor frecuencia, el peso seco de la raíz, la altura y el diámetro de la planta (Cuadro 3.1).

Cuando sólo se analizó la humedad en las variables evaluadas para ambas especies de pino, se observó que el régimen de 80 a 100 % de la CMRAS originó un mayor crecimiento, en términos de peso seco de la planta, peso seco del follaje, peso seco de la raíz, altura de la planta, diámetro y producción de raíces cortas, en comparación con el régimen de 40 a 60% de la CMRAS, en ambas especies de pinos (Figura 3.2).

En la interacción entre humedad y especie de pino se presentaron diferencias significativas para todas las variables, excepto en el diámetro del tallo (Cuadro 3.1). En *P. patula* existió mayor peso seco total, peso seco del follaje y raíz, y altura y diámetro del tallo en el régimen de 80 a 100 % de la CMRAS, en comparación con el régimen de 40 a 60 % de la CMRAS, en plantas inoculadas con *Hebeloma* spp (Cuadro 3.2). En contraste, en el caso de plantas de *P. patula* inoculadas con *Laccaria* spp., con *Clavulina* aff. *cinerea* y las plantas no inoculadas no se observaron diferencias de crecimiento en los dos regímenes de humedad. La producción de raíces cortas se incrementó en plantas inoculadas con *Hebeloma* spp. y en plantas inoculadas con *Laccaria* spp., pero no en plantas sin inocular o inoculadas con *Clavulina* aff. *cinerea*. En el caso de *P. hartwegii*, sólo se observaron diferencias en el peso seco total y el peso seco de la raíz en el régimen de 80 a 100 % de la

CMRAS, en comparación con el régimen de 40 a 60 % de la CMRAS, en plantas inoculadas con *Hebeloma* spp. (Cuadro 3.2)

Cuadro 3.1. Significancia F en variables del crecimiento de *Pinus patula* y *Pinus hartwegii* en diversos tratamientos de humedad, nitrógeno e inoculación ectomicorrizica en condiciones de invernadero.

Tratamientos	gl	PSF	PSR	PST	ALT	DIAM	NRC
				Pr > F			
E	1	0.2071	0.5429	0.6575	0.7251	0.2866	< 0.0001**
H	1	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**
P	1	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**
I	3	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**
N	2	0.0315*	0.9334	0.195	0.4987	0.779	0.7516
E x H	1	0.2058	0.5481	0.2742	0.3486	0.0971	0.5631
E x P	1	0.7079	0.6948	0.6499	0.2746	0.8795	0.6887
E x I	3	0.3082	0.0031**	0.0979	0.214	0.9909	0.1466
E x N	2	0.6992	0.8344	0.7308	0.6473	0.371	0.0451*
H x P	1	0.0005**	0.0174*	0.0015**	< 0.0001**	0.1774	< 0.0001**
H x I	3	< 0.0001**	< 0.0001**	< 0.0001**	0.0006**	0.1684	< 0.0001**
H x N	2	0.3081	0.5471	0.3571	0.3098	0.4533	0.1954
P x I	3	< 0.0001**	0.0006**	< 0.0001**	< 0.0001**	0.3957	0.0025**
P x N	2	0.0675	0.4042	0.1411	0.6172	0.3392	0.268
I x N	6	0.0048**	0.2673	0.053*	0.3037	0.3442	0.009**
E x H x P	1	0.7497	0.124	0.386	0.6375	0.8861	0.3087
E x H x I	3	0.6359	0.3005	0.4154	0.7071	0.2233	0.0014**
E x H x N	2	0.2656	0.7412	0.3834	0.0591	0.0104*	0.4989
E x P x I	3	0.1846	0.0656	0.1762	0.1486	0.6633	0.3042
E x P x N	2	0.2552	0.9503	0.5081	0.7895	0.6767	0.9373
E x I x N	6	0.0073**	0.0125*	0.0085**	0.0175*	0.0364*	0.9878
H x P x I	3	0.0038**	0.0616	0.0068**	0.0023**	0.5354	< 0.0001**
H x P x N	2	0.6485	0.7663	0.6575	0.2246	0.0005**	0.0332
H x I x N	6	0.0679	0.1809	0.1102	0.1817	0.3823	0.5557
P x I x N	6	0.1766	0.7326	0.6543	0.6516	0.2007	0.5002
E x H x P x I	3	0.6564	0.6511	0.9924	0.8091	0.6611	0.0018**
E x H x P x N	2	0.1411	0.2475	0.1613	0.0628	0.3912	0.61
H x P x I x N	6	0.14	0.7345	0.3545	0.3004	0.2807	0.7511
E x P x I x N	6	0.0196**	0.0061**	0.0061**	0.1555	0.1752	0.7886
E x H x I x N	6	0.5578	0.3821	0.5725	0.3983	0.3394	0.7198
E x H x P x I x N	6	0.3237	0.6559	0.425	0.0546*	0.7048	0.1556

E = esterilización del suelo, H = humedad, P = especie de pino, I = inoculación con hongos ectomicorrizicos, N = fertilización nitrogenada. PSF = peso seco del follaje, PSR = peso seco de la raíz, PST = peso seco total, ALT = altura de las plantas, DIA = diámetro del tallo y NRC = número de raíces cortas.

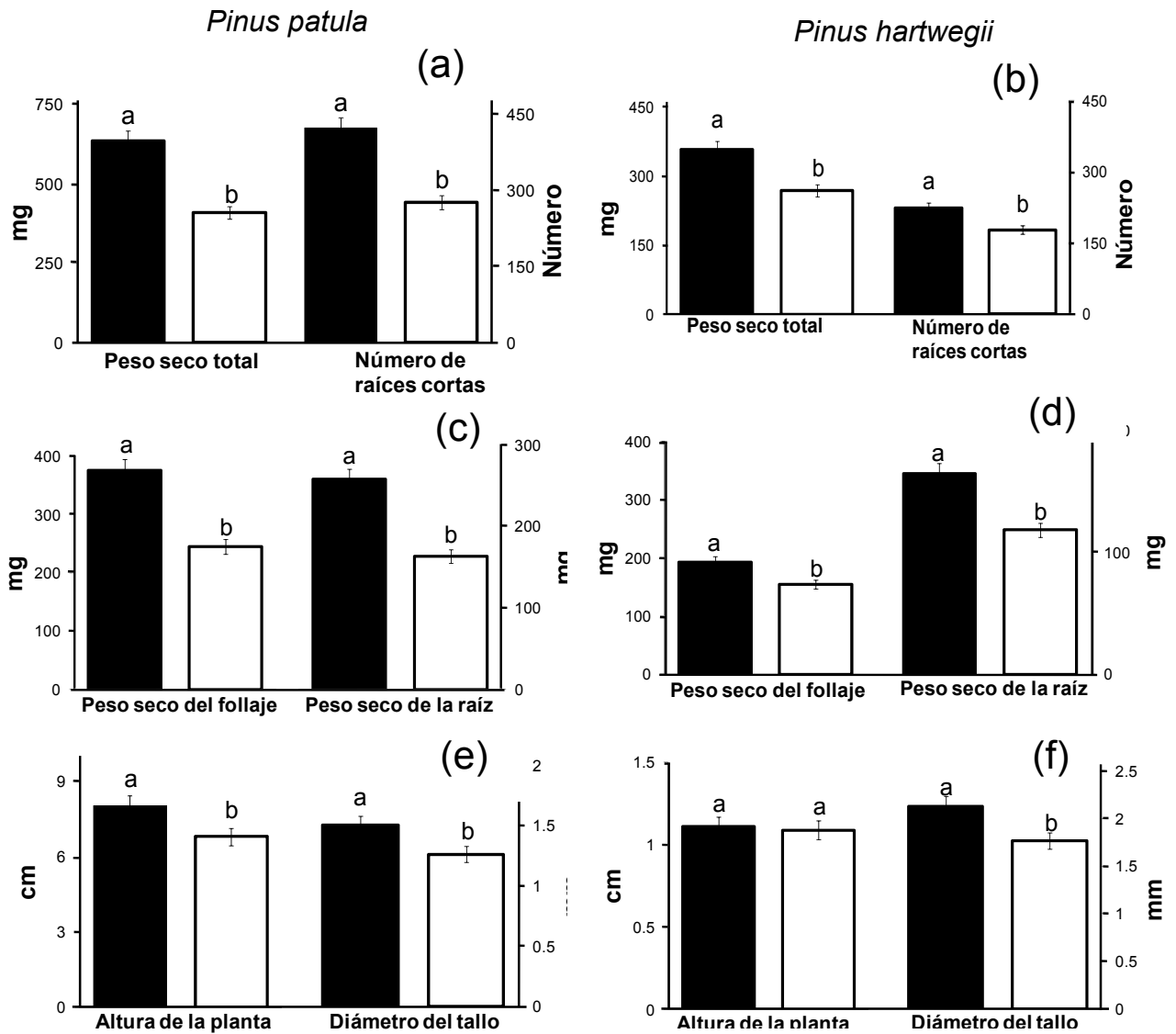


Figura 3.2. Peso seco total, número de raíces cortas, peso seco del follaje, peso seco de la raíz, altura y diámetro del tallo de *Pinus patula* (A, C, E) y *P. hartwegii* (B, D, F) crecidos en dos regímenes de humedad. Las barras negras corresponden al régimen de humedad que varió de 80 a 100 % de la capacidad máxima de retención de agua del sustrato y las barras blancas corresponden al régimen de humedad de 40 a 60 % de la capacidad máxima de retención de agua del sustrato. Valores con la misma letra dentro de cada variable para cada especie de pino son iguales de acuerdo con la prueba de comparación de medias de T-Student ($P < 0.05$), $n=72$.

Cuadro 3.2. Peso seco, altura, diámetro y producción de raíces cortas en plantas de *Pinus patula* y *Pinus hartwegii* inoculadas o no con tres especies de hongos ectomicorrizicos en dos niveles de humedad de suelo.

Variables	Tratamientos											
	T			L			H			C		
	H1	H2	H1	H1	H2	H1	H1	H2	H1	H1	H2	
<i>Pinus patula</i>												
Peso seco total (mg)	292 cd	245 d	774 b	553 bc	1218 a	652 b	81 cd	211 d				
Peso seco del follaje (mg)	162 cd	138 d	481 b	355 bc	760 a	442 b	120 d	73 d				
Peso seco de la raíz (mg)	129 c	107 c	292 b	197 bc	458 a	209 bc	161 bc	145 c				
Altura de la planta (mm)	63.85 dc	54.96 d	84.41 b	79.13 bc	108.85 a	82.18 bc	64.66 cd	66.08 bcd				
Diámetro del tallo (mm)	1.39 bc	1.13 c	1.53 ab	1.34 bc	1.81 a	1.38 bc	1.28 bc	1.17 bc				
Número de raíces cortas	259.78 b	251.77 b	519.11 a	233.61 b	607.30 a	263.05 b	241.00 b	258.61 b				
<i>Pinus hartwegii</i>												
Peso seco total (mg)	193 c	173 c	312 c	247 c	658 a	461 b	265 c	190 c				
Peso seco del follaje (mg)	116 bc	106 bc	185 b	146 bc	350 a	279 a	117 bc	82 c				
Peso seco de la raíz (mg)	76 cd	66 d	126 bcd	100 cd	308 a	181 b	147 bc	115 bcd				
Altura de la planta (mm)	8.99 a	9.03 a	11.29 a	10.8 a	10 a	10.4 a	8.96 a	10.13 a				
Diámetro del tallo (mm)	1.98 abc	1.45c	2.09 ab	1.86 abc	2.37 a	1.99 abc	2.04 ab	1.73 abc				
Número de raíces cortas	178.16 b	151.78 b	199.55 ab	161.55 b	308.39 a	218 ab	175.44 b	143.94 b				

T = plantas testigo sin inocular, L = plantas inoculadas con *Laccaria* spp., H = plantas inoculadas con *Hebeloma* spp., C = plantas inoculadas con *Clavulina* aff. *cinerea*, H1 = régimen de 80 a 100 % de la capacidad máxima de retención de agua del sustrato, H2 = régimen de 40 a 60 % de la capacidad máxima de retención de agua del sustrato. Valores con la misma letra dentro de cada variable horizontalmente son iguales de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$), $n = 18$.

En cuanto a los niveles de fertilización, se observó que en la mayoría de las variables evaluadas no existieron diferencias entre los tratamientos de 0, 70 y 140 kg de N ha⁻¹. Una excepción se registró en el caso de las plantas de *P. patula* inoculadas con *Hebeloma* spp., las cuales tuvieron un aumento en el peso seco del follaje conforme se incrementó la aplicación de N de 0 a 70 y 140 kg de N ha⁻¹ (Cuadro 3.3). En la interacción entre humedad y N no se detectaron variaciones significativas en todas las variables evaluadas (Cuadro 1), lo que indica que posiblemente los dos tratamientos de humedad fueron adecuados para la utilización del N por la planta.

Los pesos secos de la raíz y la parte aérea de *P. patula* (Figura 3.3a) y *P. hartwegii* (Figura 3.3b) fueron mayores en las plantas inoculadas con *Hebeloma* spp., seguidas por aquéllas inoculadas con *Laccaria* spp., en comparación con las plantas sin inocular y las inoculadas con *Clavulina* aff. *cinerea*, que no formaron ectomicorrizas con ninguna de las dos especies de pino.

En *P. patula*, desde 90 días después de la inoculación se observó una mayor altura ($P \leq 0.05$) en las plantas inoculadas con *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp., en relación con las plantas no inoculadas o aquéllas inoculadas con *Clavulina* aff. *cinerea*. Para *P. hartwegii* no hubo diferencias estadísticas en altura entre plantas inoculadas o sin inocular, 180 y 310 días después de la inoculación (Figura 3.4)

Cuadro 3.3 Peso seco, altura, diámetro y producción de raíces cortas en plantas de *P. patula* y *P. hartwegii* crecidas con tres niveles de fertilización e inoculadas o no con tres especies de hongos ectomicorrizicos comestibles.

Variables	T			L			H			C		
	0	70	140	0	70	140	0	70	140	0	70	140
<i>Pinus patula</i>												
Peso seco total (mg)	307 a	292 a	207 a	550 a	715 a	725 a	813 a	964 a	1028 a	226 a	206 a	306 a
Peso seco del follaje (mg)	175 a	154 a	121 a	322 a	466 a	467 a	487 b	631 ab	686 a	104 a	77 a	109 a
Peso seco de la raíz (mg)	131 a	137 a	86 a	228 a	249 a	257 a	326 a	334 a	341 a	121 a	141 a	197 a
Altura (cm)	6.28 a	5.74 a	5.78 a	7.49 a	9.08 a	7.95 a	9.16 a	10.16 a	9.33 a	6.08 a	6.66 a	6.66 a
Diámetro (mm)	1.20 a	1.259 a	1.320 a	1.442 a	1.390 a	1.499 a	1.598 a	1.681 a	1.519 a	1.181 a	1.188 a	1.318 a
Número de raíces cortas	260.3 a	268.9 a	238.1 a	356.7 a	420.2 a	337.2 a	452.6 a	383.3 a	469.6 a	182.8 a	257.2 a	309.3 a
<i>Pinus hartwegii</i>												
Peso seco total (mg)	207 a	207 a	136 a	305 a	282 a	252 a	520 a	545 a	614 a	228 a	215 a	239 a
Peso seco del follaje (mg)	120 a	128 a	86 a	176 a	167 a	154 a	284 a	316 a	344 a	98 a	94 a	107 a
Peso seco de la raíz (mg)	86 a	78 a	50 a	128 a	114 a	97 a	235 a	229 a	268 a	140 a	120 a	132 a
Altura (cm)	0.930 a	0.854 a	0.985 a	1.161 a	1.005 a	1.145 a	0.933 b	1.2917 a	1.1083 ab	0.985 a	0.922 a	1.005 a
Diámetro (mm)	1.832 a	1.608 a	1.727 a	2.140 a	2.042 a	1.765 a	2.036 a	2.302 a	2.207 a	1.827 a	2.004 a	1.842 a
Número de raíces cortas	174.08 a	193.16 a	127.66 a	233.3 a	151.41 a	156.92 a	299.33 a	210.17 a	280.08 a	134.25 b	208.33 a	136.50 ab

T = plantas sin inocular, L = plantas inoculadas con *Laccaria* spp., H = plantas inoculadas con *Hebeloma* spp., C = plantas inoculadas con *Clavulina* aff. *cinerea*. Valores con la misma letra, para cada variable, dentro de cada inóculo, son iguales de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$), $n = 12$.

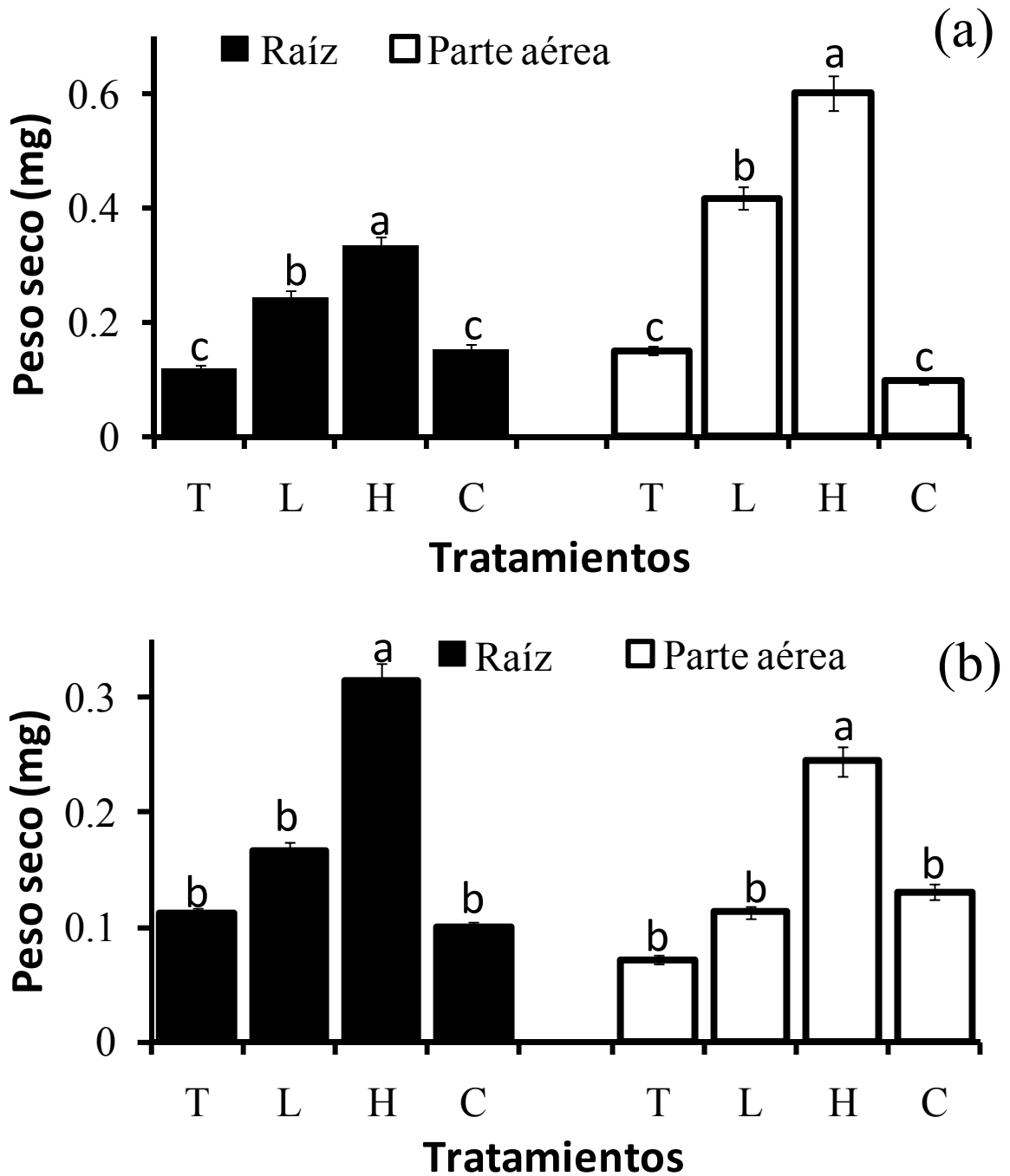


Figura 3.3. Plantas de *Pinus patula* (a) y *Pinus hartwegii* (b) inoculadas con tres hongos ectomicorrizicos comestibles (L = *Laccaria* spp., H=*Hebeloma* spp., C =*Clavulina* aff. *cinerea*) y plantas sin inocular (T = testigo). Los valores son promedios de 36 plantas. Un cambio de letra sobre una barra entre tratamientos, para cada parte de las plantas, indica diferencias estadísticas significativas, según la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$). Las líneas sobre las barras representan el error estándar de la media.

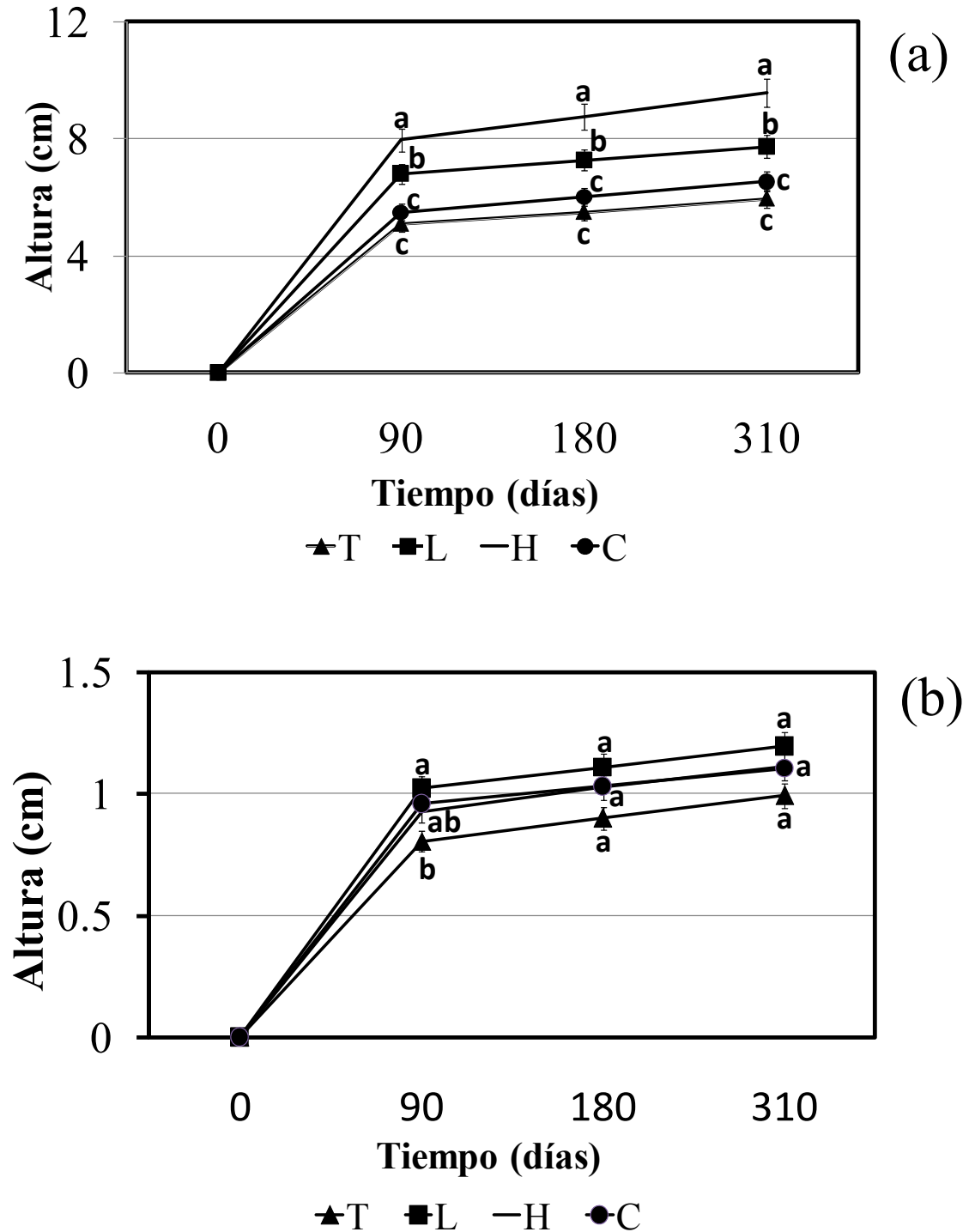


Figura 3.4. Cambios secuenciales en la altura de las plantas de *Pinus patula* (a) y *Pinus hartwegii* (b) respectivamente inoculadas con tres especies de hongos ectomicorrízicos (L= *Laccaria* spp., H=*Hebeloma* spp., C=*Clavulina* aff. *cinerea*) y plantas sin inocular (T=Testigo). Los valores son promedios de 36 observaciones. Un cambio de letra sobre una barra en tratamientos, indica diferencias estadísticas significativas, según la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$). Las líneas sobre los indicadores representan el error estándar de la media de la altura.

3.5.2. Colonización ectomicorrízica

En *P. patula*, el número total de raíces cortas colonizadas por *Laccaria* spp. fue más alto que el de *Hebeloma* spp. 310 días después de la siembra, independientemente de su condición de esterilización del suelo (Figura 3.5a), mientras que en *P. hartwegii* se observó un escaso o nulo número de raíces cortas colonizadas con *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. (Figura 3.5b). La morfo-anatomía encontrada para *Laccaria* spp. (Figura 3.6 a,b) y *Hebeloma* spp. (Figura 3.6 c,d) fue similar a la reportada por Deemy (2008) para dichos géneros.

3.5.3. Esterilización del suelo

En ambas especies de pinos, *P. patula* y *P. hartwegii*, no existieron diferencias estadísticas entre suelo estéril y no estéril, en la mayoría de las variables evaluadas. Sin embargo en términos generales, en ambas condiciones de esterilización las plantas inoculadas con *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. tuvieron mayor peso seco del follaje, peso seco de la raíz, peso seco total, altura de la planta, diámetro del tallo y producción de raíces cortas en comparación con las plantas no inoculadas (Cuadro 3.4).

3.5.4. Diagnóstico fitosanitario de las plantas de pino y de los inoculos empleados.

El diagnóstico fitosanitario registró la presencia de *Fusarium oxysporum* en plantas muertas de *P. patula* y *P. hartwegii*. Sin embargo, dicho hongo no se detectó en el inoculo, por lo que es probable que *F. oxysporum* estuviera presente dentro del invernadero o en las semillas de pino. En el inóculo aplicado se detectaron organismos fungosos contaminantes (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Alternaria* sp., *Cunninghamella* sp., *Rhizopus* sp. y *Mucor* sp). Ninguno de estos hongos fue aislado de las raíces de las plantas muertas.

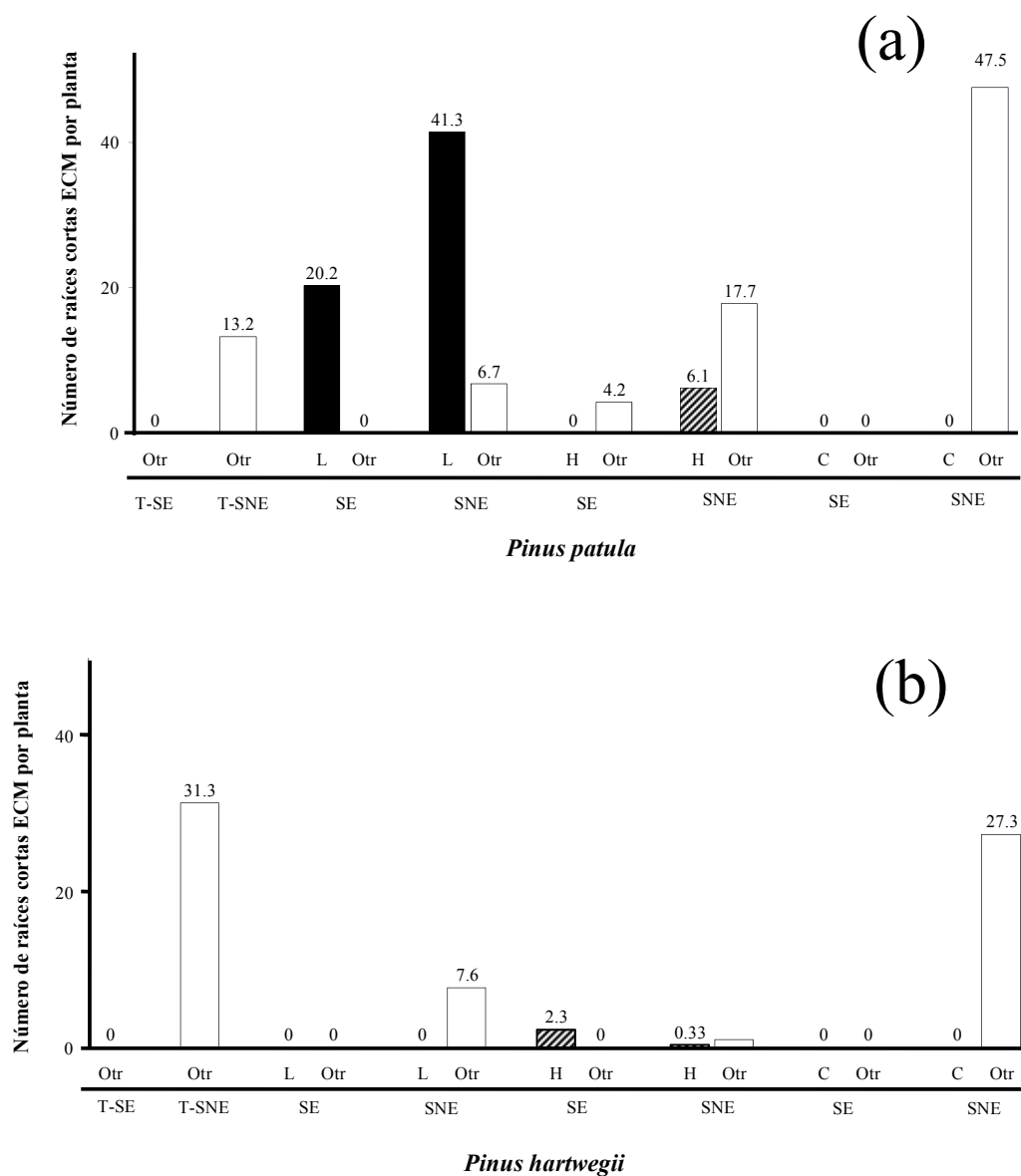


Figura 3.5. Número de raíces cortas ECM en plantas de *Pinus patula* (a) y *Pinus hartwegii* (b) inoculadas con tres hongos ectomicorrízicos (L = *Laccaria* spp., H = *Hebeloma* spp., C = *Clavulina* aff. *cinerea*) y plantas sin inocular (T = testigo). SE = suelo estéril, SNE = suelo no estéril, Otr = Otros hongos ectomicorrízicos distintos a los inoculados. Las barras llenas, con patrón inclinado y huecas corresponden al número de raíces cortas ECM con la morfología característica de *Laccaria* spp., *Hebeloma* spp. y hongos ECM distintos de los inoculados, respectivamente. n = 18.

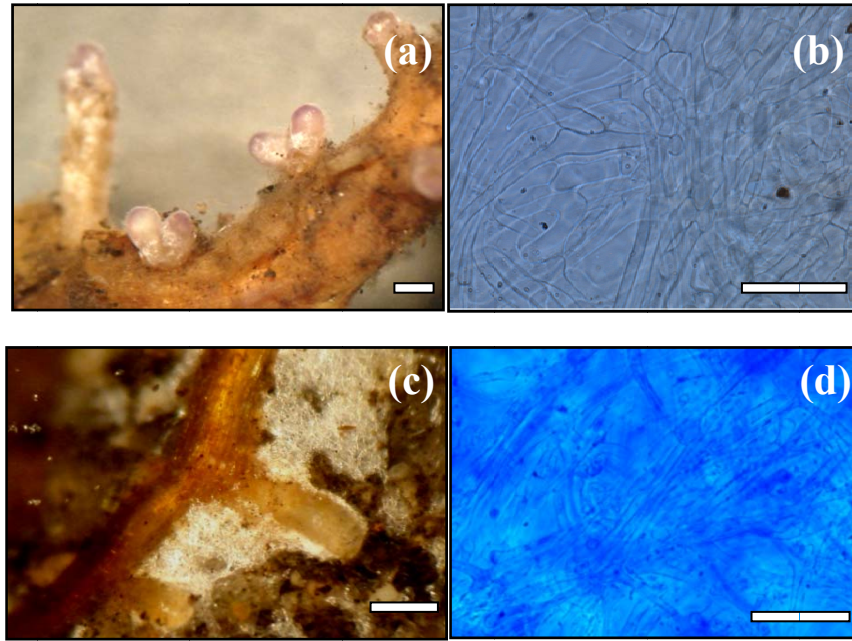


Figura 3.6. (a) Raíces cortas colonizadas con *Laccaria* spp.; (b) Manto de *Laccaria* spp. plectenquimatoso del tipo de hifas irregulares y sin ningún patrón discernible en especial; (c) Raíces cortas colonizadas con *Hebeloma* spp.; (d) Manto de *Hebeloma* spp. plectenquimatoso del tipo de hifas irregulares y sin ningún patrón discernible en especial. Líneas en (a) y en (c) equivalen a 1 mm y en (b) y (d) equivalen a 20 μ m.

Cuadro 3.4. Peso seco de la planta, altura, diámetro del tallo y producción de raíces cortas en plantas de *P. patula* y *P. hartwegii* inoculadas o no con tres especies de hongos ectomicorrízicos en suelos esterilizados o no.

Variables	Tratamientos			
	T	L	H	C
<i>Pinus patula</i>				
Peso seco total (mg)				
Suelo estéril	251 a	658 a	992 a	180 b
Suelo no estéril	286 a	669 a	878 a	312 a
Peso seco del follaje (mg)				
Suelo estéril	126 b	395 a	632 a	72 a
Suelo no estéril	174 a	441 a	570 a	121 a
Peso seco de la raíz (mg)				
Suelo estéril	125 a	263 a	359 a	107 b
Suelo no estéril	111 a	227 a	308 a	199 a
Altura (cm)				
Suelo estéril	5.85 a	8.58 a	9.16 a	6.88 a
Suelo no estéril	6.02 a	7.73 a	9.94 a	6.19 a
Diámetro (mm)				
Suelo estéril	1.25 a	1.46 a	1.60 a	1.29 a
Suelo no estéril	1.26 a	1.42 a	1.59 a	1.16 a
Número de raíces cortas				
Suelo estéril	293.11 a	373.89 a	504.44 a	256.27 a
Suelo no estéril	218.44 a	368.83 a	365.91 b	243.33 a
<i>Pinus hartwegii</i>				
Peso seco total (mg)				
Suelo estéril	194 a	242 a	579 a	235 a
Suelo no estéril	172 a	317 a	540 a	220 a
Peso seco del follaje (mg)				
Suelo estéril	118 a	142 a	306 a	107 a
Suelo no estéril	105 a	189 a	324 a	93 a
Peso seco de la raíz (mg)				
Suelo estéril	79 a	98 a	273 a	127 a
Suelo no estéril	63 a	127 a	215 a	134 a
Altura (cm)				
Suelo estéril	1.78 a	2.03 a	2.20 a	1.87 a
Suelo no estéril	1.65 a	1.95 a	2.16 a	1.90 a
Diámetro (mm)				
Suelo estéril	0.079 a	0.098 a	0.273 a	0.127 a
Suelo no estéril	0.063 a	0.127 a	0.215 a	0.134 a
Número de raíces cortas				
Suelo estéril	208 a	190 a	285 a	196 a
Suelo no estéril	122 b	171 a	242 a	123 b

T= Plantas sin inocular, L=Plantas inoculadas con *Laccaria* spp., H=Plantas inoculadas con *Hebeloma* spp., C=Plantas inoculadas con *Clavulina cinerea*, SE= Suelo estéril, SNE= Suelo no estéril. Valores con la misma letra dentro de cada variable son iguales de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey (P<0.05), n=18.

3.6. DISCUSIÓN

La micorrización con *Hebeloma* spp. en el régimen de 80 a 100 % de la CMRAS estimuló el crecimiento de *P. patula* e incrementó el número de raíces cortas, en comparación con las desarrolladas en el régimen de 40 a 60 % de la CMRAS. Según Muhsin y Zwiazek (2000) el micelio extrarradical y la red hifal apoplástica (transporte extracelular de los iones hasta la endodermis) de las raíces ectomicorrizadas juegan una función importante en la absorción y transporte de agua a la planta huésped. Estos mismos autores consideraron que las hifas de hongos están involucradas en el incremento de la conductancia de las raíces, al reducir la resistencia del flujo de agua del apoplasto. A este respecto Egerton-Warburton *et al.* (2007) mencionaron que el movimiento de agua por redes comunes micorrízicas es potencialmente importante para la supervivencia de las plantas durante la sequía. Runion *et al.* (1997) reportaron un alto porcentaje de raíces cortas colonizadas por ectomicorrizas en *Pinus palustris* Mill. con un adecuado suministro de agua, en comparación con el tratamiento en donde hubo falta de agua, donde estos autores registraron menor longitud de raíz y una baja micorrización.

En el presente trabajo se observó una reducción en el desarrollo de raíces cortas, en el régimen de 40 a 60 % de la CMRAS en ambas especies forestales estudiadas. Este fenómeno se ha registrado en campo, en Oaxaca, México, en *P. oaxacana* Mirov por Valdés *et al.* (2006). Dichos autores observaron una disminución de 60 % del total de raíces cortas y la biomasa de raíces ectomicorrizadas durante un año con sequía, en comparación con un año sin sequía.

En el presente experimento, el número de raíces cortas en las plantas inoculadas (*Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp.) en el régimen de 80 a 100 % de la CMRAS fue mayor que en las plantas no inoculadas. Esto puede estar relacionado con el hecho de que las plantas colonizadas con hongos ECM tienen una mayor tasa respiratoria en la raíz, en comparación con las plantas sin colonizar y, por lo tanto, tienen mayores requerimientos de carbono, lo cual origina un incremento en la fotosíntesis, como lo han reportado Domínguez-Núñez *et al.* (2004). También se ha señalado que las hifas de hongos ECM son transportadores eficientes de agua (Egerton-Warburton *et al.*, 2007) y de esta forma potencian la exploración del agua en el suelo, lo cual incrementa la asimilación de CO₂ (Wright *et al.*, 2000) y el crecimiento de las plantas (Wullschleger *et al.*, 2002).

Los mecanismos mediante los cuales los hongos ECM pueden mejorar la absorción de agua en las plantas son: *i*) a través de las redes hifales de micelio externo, las cuales incrementan el área de exploración de la raíz, transportando agua que de otra forma no estaría disponible para las raíces; y *ii*) mediante la modulación de los requerimientos hídricos de las plantas asociadas, al mejorar su nutrición y así reducir su demanda por transpiración (Marjanovic y Nehls, 2008). Las diferencias en la respuesta de las plantas para mejorar sus relaciones hídricas por efecto de las micorrizas, dependen de las especies de hongos ECM asociados con las raíces de las plantas (Park *et al.*, 1983). Esto debido a que diversas propiedades morfológicas y anatómicas particulares de cada especie de hongo ECM pueden afectar diferencialmente la absorción de agua en las plantas asociadas. Por ejemplo, la presencia de rizomorfos, observados en nuestro estudio en el caso de *Hebeloma* spp. pero no en *Laccaria* spp. Los rizomorfos son cordones miceliales macroscópicos, con hifas arregladas de forma paralela, que tienen con frecuencia hifas centrales huecas alargadas rodeadas de

hifas vivas más pequeñas (Agerer, 2001; Brownlee *et al.*, 1983). Se ha demostrado que estas estructuras facilitan el transporte de agua del suelo donde crecen las hifas hacia las raíces ECM y las plantas hospedantes. Adicionalmente, se ha propuesto que dicho transporte de agua se efectúa a través de las hifas alargadas huecas dentro de los rizomorfos (Duddridge *et al.*, 1980, Brownlee *et al.*, 1983) y que la hidrofobia e impermeabilidad de los rizomorfos puede reducir sustancialmente pérdidas cuando el agua es transportada a través de largas distancias (Agerer, 2006).

Se ha sugerido además que: *i*) el movimiento de agua por el micelio de redes micorrízicas que conectan raíces de plantas de la misma o distintas especies vegetales es potencialmente importante para la supervivencia de las plantas contra la sequía, y *ii*) las características específicas individuales de los diversas especies de hongos ECM puede ser un componente importante de este mecanismo (Egerton-Warburton *et al.*, 2007)

En *P. patula* inoculado con *Hebeloma* spp., al aplicar 140 kg N ha⁻¹, se incrementó el peso seco del follaje, en comparación con el tratamiento sin aplicación de N. En *P. hartwegii* inoculado con *Hebeloma* spp. se observó un aumento significativo en la altura de la planta y el número de raíces cortas, respectivamente, al aplicar 70 kg N ha⁻¹. Esto probablemente se debió a que la simbiosis micorrízica es capaz de mejorar la aportación de nutrimentos en la planta, al incrementar las formas disponibles de éstos, especialmente P y N (Sylvia *et al.*, 1999). Una explicación puede ser que el hongo, al formar hifas, aprovechó su capacidad ecofisiológica para absorber agua y adquirir N (Egerton-Warburton *et al.*, 2003).

Sin embargo, no se encontró efecto negativo al aplicar 140 kg N ha⁻¹ en ninguna de las variables estudiadas. Con relación al efecto del N atmosférico sobre las ectomicorrizas se

ha reportado una declinación en la abundancia de micorrizas con altas dosis de N (Carfrae *et al.*, 2006). Arnebrant (2004) reportó un efecto negativo en el crecimiento de micelio en las plántulas de pino fertilizadas con dos diferentes fuentes de N {sulfato de amonio [(NH₄)₂SO₄] y nitrato de amonio [NH₄NO₃]} e inoculadas con cinco cepas de hongos: dos aislamientos de *Paxillus involutus* (Batsch) Fr., uno de *Suillus bovinus* (Pers.) Roussel y dos ectomicorrizas no identificadas.

Diversas investigaciones han demostrado que los esporomas y las comunidades subterráneas de hongos ECM son afectados negativamente como consecuencia del depósito de N atmosférico (Lilleskov *et al.*, 2002; 2001; Peter y Ayer, 2001; Wallenda y Kottke, 1998). Sin embargo en la presente investigación la colonización ECM por *Laccaria* spp. y *Hebeloma* spp. no resultó afectada por la fertilización. Es importante señalar que: *i*) solo se evaluó la colonización ECM al final del experimento, y *ii*) en términos generales las colonizaciones micorrízicas encontradas fueron bajas en todos los tratamientos, como se señaló anteriormente.

Los efectos de la acumulación de biomasa en *P. patula* y *P. hartwegii* fueron muy evidentes cuando se utilizó *Hebeloma* spp. ó *Laccaria* spp. como inóculo. Sudhakara y Natarajan (1997) reportaron incrementos de 218% y 182% en el peso seco y la parte aérea y radical, como resultado de la inoculación con *Laccaria laccata* en relación con las plantas no inoculadas de *P. patula*. Un efecto similar ha sido reportado previamente por diversos autores. Daughtridge *et al.* (1986) observaron que al inocular *Quercus velutina* Lam. con *Suillus luteus* y *Pisolithus tinctorius* se produjo una cantidad mayor de biomasa total en las plantas inoculadas comparadas con plantas sin inocular. Estos incrementos en biomasa

variaron de 1.63 y 2.28 veces respectivamente en comparación con plantas sin inocular. Parladé *et al.* (2004) encontraron que 34 meses después de la siembra, la altura de *Pinus pinna* fue 23% mayor en plantas inoculadas con *Rhizopogon roseolus* en comparación con aquellas no inoculadas.

En relación con las características morfológicas y anatómicas, las raíces micorrizadas de las raíces exploradas correspondieron a los géneros de hongos ECM inoculados, en el caso de *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp., sin embargo, en *Clavulina* aff. *cinerea* no se encontraron evidencias de colonización ectomicorrízica en las raíces de las plantas evaluadas en esta investigación, a pesar de que esta especie se ha reportado como ectomicorrízica en bosques de *Abies* spp. (Ivanov, 2005). Una posible explicación a este respecto es la naturaleza de los esporomas utilizados para la preparación del inoculante, ya que *Clavulina* aff. *cinerea* tiene esporomas con numerosas ramas cilíndricas surcadas longitudinalmente y con las esporas expuestas, las cuales pueden perderse con facilidad durante la recolección y el secado. Al comparar las características morfológicas y anatómicas de las raíces micorrizadas de *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. encontradas en el presente trabajo y las reportadas por Deemy (2008), éstas resultaron ser similares para ambos casos.

A pesar de los conspicuos incrementos de biomasa registrados en *P. patula* y *P. hartwegii*, como consecuencia de la inoculación con hongos ECM, se registró una baja colonización ectomicorrízica. Un fenómeno similar lo encontró Cripps (2001), al inocular *Populus tremuloides* Michx. con diversos hongos ECM. Dicho autor señaló que este fenómeno puede deberse a una alta eficiencia en la transferencia de nutrimentos, a través de un bajo

número de raíces ectomicorrizadas, o a la liberación sustancial de fitohormonas, como el ácido indolacético, en el estadio inicial de la micorrización.

En el presente estudio, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre el crecimiento en plantas crecidas en sustrato estéril en comparación con plantas crecidas en sustrato no estéril, sin embargo en otros estudios se han registrado diferencias. Por ejemplo, Sudhakara-Reddy y Natarajan (1997) encontraron que el número total de ectomicorrizas y peso de las plantas de *Pinus patula* inoculadas con *Laccaria laccata* y *Thelephora terrestris* fue superior en el suelo esterilizado que en el suelo no esterilizado, esto podría ser causado por la eliminación de simbiontes nativos los cuales evitan la competencia, eliminación de hongos patógenos y de otros microorganismos nativos del suelo que ocasionan competencia, por lo tanto existe una mayor colonización y mejor crecimiento de la planta. Guerin-Laguette *et al.* (2003) reportaron que la altura y peso seco de plantas de *Pinus sylvestris* inoculadas con el hongo ECM *L. deliciosus*, produjeron mayor peso seco y altura cuando crecieron en sustrato esterilizado comparadas con aquellas plantas desarrolladas en sustrato no estéril.

En el presente experimento se encontró a *Fusarium oxysporum* en plantas muertas de las dos especies de pino. *Fusarium* infecta a un espectro amplio de plantas hortícolas, ornamentales y forestales (Soldevilla, 1995). Sin embargo dado que *F. oxysporum* no se detectó en el inóculo, es probable que estuviera presente en las semillas (Dick y Dobbie, 2002; Motta y Balmas, 1995) o como un contaminante en restos de suelo presentes en el invernadero en el cual se desarrollaron los experimentos. En relación a los hongos detectados en el inóculo es de interés mencionar que *i*) existe una cantidad limitada de

investigaciones acerca de la interacción directa de los hongos micorrízicos con hongos saprobios y patógenos del suelo (Baar y Stanton, 2000; Cairney y Meharg, 2002), y *ii*) resulta entonces complejo establecer el tipo de interacciones de estos organismos al ser aplicados junto con los hongos ECM en la inoculación de plantas bajo condiciones de invernadero.

3.7. CONCLUSIONES

El crecimiento vegetal de las especies de pino resultó afectado ($P \leq 0.05$) por los dos regímenes de humedad estudiados, en magnitud que varió entre las especies de los hongos ECM inoculados y entre las especies de plantas. Las plantas de *P. patula* inoculadas con *Hebeloma* spp. presentaron mayor peso seco total, peso seco del follaje, peso seco de la raíz, altura de planta y diámetro de tallo, en comparación con las plantas inoculadas con *Laccaria* spp., *Clavulina* aff. *cinerea* o sin inocular, cuando crecieron en el régimen de 80 a 100 % de la CMRAS comparado con el régimen de 40 a 60 % de la CMRAS. Las colonizaciones micorrízicas encontradas al final del experimento fueron bajas en todos los tratamientos y no resultaron afectadas por la fertilización.

3.8. RECOMENDACIONES

Sería conveniente en estudios posteriores evaluar la retención de agua en el tejido vegetal y medir el potencial de solutos y algunas características que pueden conferir resistencia a sequía a las plantas como el ajuste osmótico o ver si la elasticidad del tejido cambia en función del contenido relativo de agua del tejido vegetal. Hacer la caracterización granulométrica de los sustratos en tratamientos con plantas micorrizadas y no micorrizadas lo cual permitiría conocer la cantidad de agua almacenada en los poros.

3.9. LITERATURA CITADA

- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelia systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11:107-114.
- Agerer, R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol. Progress* 5: 67–107.
- Alvarado-Rosales, D. and Hernandez-Tejeda, T. 2002. Decline of Sacred Fir in the Desierto de los Leones National Park *In*: M.E. Fenn, L.I de Bauer and T. Hernandez T. (eds.), *Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin*. Pp. 234-260. *Ecological Studies* 156. Springer-Verlag. New York. pp. 243-260.
- Arnebrant, K. 2004. Nitrogen amendments reduce the growth of extramatrical ectomycorrhizal mycelium. *Mycorrhiza* 5:7-15.
- Baar, J. and Stanton, N.L. 2000. Ectomycorrhizal fungi challenged by saprotrophic basidiomycetes and microfungy under different ammonium regimes *in vitro*. *Mycol. Res.* 104: 691-697.
- Bogeat-Triboulot, M. B., F. Bartoli, J., Garbaye, R., Marmeisse, D. Tagu. 2004. Fungal ectomycorrhizal community and drought affect root hydraulic properties and soil adherence to roots of *Pinus pinaster* seedlings. *Plant and Soil* 267:213-223.
- Brownlee, C., Duddridge, J. A., Malibari, A. and Read, D. J. 1983. The structure and function of mycelia systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. *Plant and Soil* 71: 433-443.

- Cairney, J. W. G., Meharg, A. A. 2002. Interactions between ectomycorrhizal fungi and soil saprotrophs saprotrophs. *Can. J. Bot.* 80: 803-809.
- Campos, J. L. 1993. Claves para la determinación de los pinos mexicanos. Universidad Autónoma Chapingo. Serie de Apoyos Académicos 23. Chapingo, México. 70 p.
- Carfrae, J. A., Skene, K. R., Sheppard, L. J., Ingleby, K. and Crossley, A.. 2006. Effects of nitrogen with and without acidified sulphur on an ectomycorrhizal community in a Sitka spruce (*Picea sitchensis* Bong. Carr) Forest. *Environ. Poll.* 196:159-171.
- Chu-Chou, M. and Grace, L. J. 1985. Comparative efficiency of the mycorrhizal fungi *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme* and *Rhizopogon* species on growth of radiata pine seedlings. *New Zealand J Bot* 23: 417-424.
- Cripps, C. L. 2001. Mycorrhizal Fungi of Aspen Forests: Natural Occurrence and Potential Applications. Sustaining aspen in western landscapes *In: Symposium Proceedings: june 13-15, 2000.* pp: 285-298. Grand Junction, Colorado. USDA Forest Service. Rocky Mountain Research Station Fort Collins, CO, USA.
- Daughtridge A N, Stephen G. P., Garrett, H. G. and Sander, I. L. 1986. Growth Analysis of Mycorrhizal and Nonmycorrhizal Black Oak (*Quercus velutina* Lam.) Seedlings. *New Phytol.* 103:473-480.
- Davies, F. T., Svenson, S. E., Cole, J. C., Phavaphutanon, L., Duray, S. A., Olalde-Portugal, V., Meier, C. E., Bo, S. H. 1996. Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiol.* 16: 985-993.
- Deemy. 2008. Characterization and determination of ectomycorrhizae. (www.deemy.de).
- Dick, M.A. and Dobbie, K. 2002. Species of *Fusarium* on *Pinus radiata* in New Zealand. *New Zealand Plant Prot.* 55: 58-62

- Domínguez-Núñez, J. A., Planelles, R., Rodríguez-Barreal, J. A., Saiz de Omeñaca, J. A. 2004. Influencia de la micorrización con trufa negra (*Tuber melanosporum*) en el crecimiento, intercambio gaseoso y nutrición mineral de plántulas de *Pinus halepensis*. Sist. y Rec. For. 13: 317-327.
- Duddridge, J. A., Malibari, A. and Read, D. J. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. Nature 283: 834-836.
- Dvorak, W. S., Hodge, G. R., Kietzka, J. E., Malan, F., Osorio, L. F., Stanger, T. K. 2000. *Pinus patula*. In: Conservation and Testing of Tropical and Subtropical Forest Tree Species by the CAMCORE Cooperative, College of Natural Resources. pp: 149-173. NCSU. Raleigh, NC, USA.
- Egerton-Warburton, L. M., Graham, R. C. and Hubbert, K. R. 2003. Spatial variability in mycorrhizal hyphae and nutrient and water availability in soil-weathered bedrock profile. Plant Soil 249: 331-342.
- Egerton-Warburton, L. M., J. I. Querejeta, M. F. Allen. 2007. Common mycorrhizal networks provide a potential pathway for the transfer of hydraulically lifted water between plants. J. Exp. Botany 6: 1473-1483.
- Fenn, M. E., Baron, J. S., Allen, E. B., Rueth, H. M., Nydick, K. R., Geiser, L., Bowman, W. D., Sickman, J. O., Meixner, T., Johnson, D. W. and Neitlich, P. 2003. Ecological effects of nitrogen deposition in the Western United States. Bio Science 53: 404-420.
- Guerin-Laguette, A., Confeti, S., Ruiz, G., Plassard, C. and Mousain, D. 2003. The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in

- forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of a RDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza* 13: 17-25.
- Ivanov, D. M. 2005. Mycobionts of ectomycorrhizal of *Picea abies* in blueberry spruce forest. *Mykologiya I Fitopatologiya*. 39: 41-47.
- Leake, J., David, J., Damian, D., Gemma, M. and Lynne, B. 2004. Networks of power and influence: The role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* 82:1016-1045.
- Lilleskov E A, Fahey, T. J., Lovett, G. M., 2001. Ectomycorrhizal, fungal aboveground community change over an atmospheric nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecological Applications* 11:397-410.
- Lilleskov, E.A., Fahey, T. J., Horton, T. R., and Lovett, G. M.. 2002. Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology* 83: 104-115.
- Marjanovic, Z.and Nehls, U. 2008 Ectomycorrhiza and Water Transport. *In: A. Varna Heidelberg (ed.), Mycorrhiza pp: 149-159. Springer-Verlag Berlin.*
- Motta, E., Annesi, T., and Balmas, V. 1996. Seedborne fungi in Norway spruce: testing methods and pathogen control by seed dressing. *Eur. J. For. Path.* 26: 307- 314.
- Muhsin, T. M., and Zwiazek, J. J.2000. Ectomycorrhizas increase apoplastic water transport and root hydraulic conductivity in *Ulmus americana* seedlings. *New Phytol.* 153: 153-158.
- Nilsen, P., Børja, I., Knutsen, H. and Brean R. 1998. Nitrogen and drought effects on ectomycorrhizae of Norway spruce [*Picea abies* L.(Karst.)]. *Plant and Soil* 198: 79–184.

- Paoletti, E., Andrzej, B., Chris, A., Algirdas, A., Marco, F., Nancy, G., Madeleine, G. G., John, I., Dale, J., Dave, K., Jesada, L., Rainer, M., Steven, M., Gerhard, M. S., Robert, M., and Kevin, P. 2007. Impacts of Air Pollution and Climate Change on Forest Ecosystems—Emerging Research Needs. *The Scientific World Journal* 7: 1–8.
- Park, J. L., Linderman, R. G. and Black, C. H. 1983. The role of ectomycorrhizas in drought tolerance of Douglas fir seedlings. *New Phytol.* 95: 83-95.
- Parladé, J., Pera, J. and Luque, J. 2004. Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza* 14: 171-176
- Peter, M. and Ayer, S. E. 2001. Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species composition. *New Phytologist* 149:311-325.
- Rui-quin, Song, Ju Hong-bo, Qi Jinyu and Zhou Bo-ru. 2007. Effect of ectomycorrhizal fungi on seedling growth of Mongol Scotch Pine. *J. of Fungal Research* 5: 142-145.
- Runion, G. B., Mitchell, R. J., Rogers, H. H. and Prior, S. A. 1997. Effects of nitrogen and water limitation and elevated atmospheric CO₂ on ectomycorrhiza of longleaf pine. *New Phytol.* 137:681-689.
- SAS, Institute. 1999. SAS User's Guide, ver. 9.0. SAS Institute. Cary, NC, USA. 921 p.
- Soldevilla, C. 1995. Marras de origen fúngico (Damping-off) en plantas del género *Pinus* sp. cultivadas en invernadero. *Bol. San. Veg. Plagas.* 21: 87-109.
- Sudhakara, R.M. and Natarajan, K.. 1997. Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza* 7: 133-138

- Sylvia, D., Fuhrmann, J., Hartel, P. and Zuberer, D. 1999. Principles and Applications of soil Microbiology. Prentice Hall. N J, USA. 550 p.
- Valdés, M., Asbjornsen, H., Gómez, M. C., Juárez, M. and . Vogt, K. A 2006. Drought effects on fine-root and ectomycorrhizal-root biomass in managed *Pinus oaxacana* Mirov stands in Oaxaca, Mexico. Mycorrhiza 16: 117-124.
- Wallenda, T. J. and Kottke, I. 1998. Nitrogen deposition and ectomycorrhizal. New Phytol. 139:169-187.
- Wright, D. P., Scholes, J. D., Read, D. J. and Rolfe, S. A. 2000. Changes in carbon allocation and expression of carbon transporter genes in *Betula pendula* Roth. colonized by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. Plant Cell Environ. 23:39-49.
- Wullschleger, S. D., Tschaplinski, T. J. and Norby, R. J. 2002. Plant water relations at elevated CO₂ implications for water-limited environments. Plant Cell Environ. 25: 319-331.

CAPÍTULO IV

CAMBIOS EN LA COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE COMUNIDADES SUBTERRÁNEAS DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS EN BOSQUES DE *PINUS HARTWEGII* LINDL. CERCANOS A LA CIUDAD DE MÉXICO POR EL POSIBLE EFECTO DEL DEPÓSITO DE CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS*

***El trabajo de investigación presentado en este capítulo fue desarrollado en el Laboratorio de Recursos Genéticos en Hongos del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Genética, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, bajo la dirección del Dr. Luis Villarreal-Ruiz.**

4.1. RESUMEN

Se presenta un análisis de la riqueza de taxa, diversidad (α, β, γ), composición y estructura de comunidades de hongos ectomicorrízicos (ECM) asociados a las raíces de *Pinus hartwegii* en dos bosques con niveles contrastantes de contaminación ambiental: (1) El Parque Recreativo y Cultural El Desierto de los Leones (DL) con altos niveles de depósito de N ($18.5 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) y S ($20.4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) así como otros contaminantes atmosféricos y (2) el Parque Nacional Zoquiapan (ZOQ) con bajos niveles de depósito de N y S con 5.5 y $8.8 \text{ kg}^{-1} \text{ año}^{-1}$ respectivamente. El muestreo se realizó durante dos años en diferentes estaciones (otoño del 2006 y verano del 2007), para detectar posibles cambios en la composición y estructura de comunidades debido al efecto estacional. En cada sitio se estableció un transecto de 100 m de longitud y se recolectaron muestras de suelo cada cinco metros, empleando tubos de PVC (polyvinyl chloride) de 3 cm diámetro x 30 cm de largo. Posteriormente las raíces cortas de *P. hartwegii* fueron extraídas de las muestras de suelo

mediante tamizado húmedo y observadas en un microscopio estereoscópico para su caracterización morfológica y la separación de morfotipos ECM y los fragmentos del manto externo de cada morfotipo fueron estudiados en un microscopio de contraste interferencial según Nomarsky para su estudio anatómico y la separación de anatotipos que pudieran representar posibles taxa de hongos ECM. El análisis de la composición y estructura de comunidades de los hongos presentes en las raíces micorrizadas se basó en calcular la abundancia relativa cuantificando el número de raíces colonizadas por un taxa ECM en las raíces de *P. hartwegii* analizadas. Los valores de la riqueza, diversidad (α , β , γ) y el coeficiente de similitud entre especies se calcularon en cada sitio, punto de muestreo a lo largo del transecto por época de muestreo y entre sitios. Los resultados muestran que la composición y estructura de comunidades fue dominada por pocas especies, de las cuales solo tres morfo-anatotipos representaron más del 50 % de la abundancia relativa en cada sitio. La riqueza de especies en ZOQ fue de 32 morfo-anatotipos, mientras que el DL se encontró una riqueza menor con solo 17. El índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') fue mayor en ZOQ ($H' = 2.723$) que en DL ($H' = 1.752$). La baja riqueza de especies de hongos ECM presente en el sitio DL probablemente está determinada por las elevadas concentraciones de nitrógeno (N) atmosférico previamente reportadas, oxidantes fotoquímicos, metales pesados y baja disponibilidad de fósforo (P), aunque las diferencias ambientales entre sitios puede ser un factor adicional a considerar.

Palabras clave: Bosques, contaminación ambiental, diversidad, ectomicorrizas.

4.2. ABSTRACT

An analysis of the species richness, diversity (α , β , γ), composition and community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus hartwegii* roots in two forests with contrasting levels of air pollution was study in : (1) The Cultural and Recreational Park El Desierto de los Leones (DL) with high levels of Deposit N ($18.5 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) and S ($20.4 \text{ kg ha}^{-1} \text{ yr}^{-1}$) and other air pollutants and (2) the National Park Zoquiapan (ZOQ) with low levels of N and S deposition with 5.5 and $8.8 \text{ kg}^{-1} \text{ year}^{-1}$ respectively. The sampling was conducted over two years in different seasons (autumn 2006 and summer 2007), in order to detect changes in composition and community structure of ECM fungi due to seasonal effects. In each site a transect of 100 m in length was setup and soil samples were collected every five meters by using PVC (polyvinyl chloride) cylinders 3cm diameter x 30 cm length. Subsequently *P. hartwegii* fine roots were extracted from the soil samples by wet sieving and observed in a stereo microscope for morphological characterization. Anatomical characterization was performed on outer mantle fragments of each morphotype by using Nomarsky microscopy, in order to obtain homogeneous morpho-anatotypes representing possible taxa of ECM fungi. The analysis of composition and community structure in ECM fungi on *P. hartwegii* roots was based in the relative abundance of each morpho-anatotype detected, by quantifying the total number of fine roots colonized. The values of taxa richness, diversity (α , β , γ), and similarity coefficient were calculated at each site, sampling points along the transect per year-season and between sites. The results show that taxa composition and community structure of ECM fungi at each site was dominated by few species, representing over 50% of the relative abundance in each site. Species richness in ZOQ was 32 morpho-anatotypes that may represent potential ECM taxa, while

the DL was represented by 17. The Shannon-Wiener (H') diversity index was higher in ZOQ ($H' = 2,723$) than in DL ($H' = 1,752$). The low species richness and contrasting changes in composition of ECM fungi on the DL site is probably due to a higher concentrations of atmospheric nitrogen previously reported, heavy metals and low availability of phosphorus, however the environmental differences between sites may be an additional factor to be considered.

Keywords: Forest, environmental pollution, diversity, ectomycorrhizal

4.3. INTRODUCCIÓN

Los bosques cercanos a las grandes urbes en el mundo, como es el caso de la zona sur y suroeste de la Ciudad de México están expuestos a elevados niveles de óxidos de N, ozono (O_3), azufre (S) y otros contaminantes aéreos que ocasionan efectos negativos en la sanidad de las plantas y los microorganismos del suelo, ya que estos generalmente son más sensibles a los cambios ambientales en relación a los animales y los humanos (Fenn *et al.*, 2002; 2007; Hernández-Tejeda y de Bauer 1989). Los dióxidos de N (NO_2) son directamente emitidos por los vehículos de combustión interna, y juegan un importante papel en la producción del O_3 . Dentro de dichos compuestos el más frecuente es el óxido nítrico (NO). Las mayores fuentes de emisiones de NO son los vehículos que consumen gasolina y diesel, así como la quema de combustibles en la industria así como el gas de uso doméstico (Bravo-Álvarez y Torres-Jardón, 2002). El depósito del N puede provocar lixiviación de NO_3^- en las aguas subterráneas y ríos, pérdida de nutrientes catiónicos en los suelos forestales, incremento en las emisiones de óxido nitroso (N_2O) a la atmósfera por nitrificación y desnitrificación, desbalance nutricional que reduce el crecimiento y vigor arbóreo que consecuentemente aumenta su sensibilidad al ataque de agentes patógenos (Aber *et al.*, 1998; Fenn *et al.*, 1998).

El ozono es un contaminante secundario, formado por reacciones fotoquímicas complejas de contaminantes primarios (NO) emitidos directamente a la atmósfera que reaccionan con componentes volátiles orgánicos en presencia de la luz solar (Bravo-Álvarez y Torres-Jardón, 2002). El O_3 es tomado por los estomas de las plantas y puede afectar directamente varios procesos fisiológicos incluyendo aquellos que están relacionados directamente con la

productividad, por ejemplo la actividad fotosintética en las hojas (Ortíz-García *et al.*, 2002). El ozono causa síntomas típicos de daño en bosques de *Pinus hartwegii* Lindl. (Krupa y de Bauer, 1976; Miller *et al.*, 2002) y *Abies religiosa* Schl. mismos que fueron reportados por primera vez en los años 80's en el Parque Nacional Desierto de los Leones de la Ciudad de México (Alvarado y Hernández, 2002; de Bauer *et al.*, 1985).

La mayoría de las plantas vasculares (Gimnospermas y Angiospermas) son hospederos obligados de simbiontes mutualistas como los hongos ectomicorrízicos, los cuales sirven como un vehículo para transferir minerales y formas orgánicas principalmente de P y N del suelo a la planta (Smith y Read, 2008). Dichos hongos facilitan el crecimiento y desarrollo de la planta hospedera al mejorar su tolerancia al estrés hídrico y a los agentes patógenos del suelo; favoreciendo su adaptación a suelos salinos y contribuyendo en la disminución de la erosión del suelo al modificar su estructura, mediante la formación de agregados y estabilizando las partículas del suelo (Sylvia *et al.* 1999; Bogeat-Triboulot *et al.*, 2004; Piotrowski *et al.*, 2008). Además, las hifas de los hongos ECM capturan y transfieren elementos nutritivos hacia las plantas desde sitios que no alcanzan a ser explorados por la raíz, lo que incrementa su supervivencia al ser transferidas de invernaderos al campo, favoreciendo la recuperación de suelos degradados (Molina *et al.* 2005; Parladé *et al.* 2004; Rincón *et al.* 2001). Sin embargo, algunos autores han reportado el deterioro de las comunidades de hongos micorrízicos en general por la contaminación ambiental; observándose en el caso de especies ECM, decrementos en la producción de esporomas, riqueza de especies, composición y estructura de comunidades, debido al depósito de N atmosférico (Piter *et al.*, 2001; Edwards *et al.* 2004; Carfrae *et al.*, 2006). Algunos autores

han documentado que los hongos ECM, pueden ser inhibidos por altos niveles de N, denominándolos “nitrofóbicos” (Arnolds, 1991, Brandrud, 1995 y Lilleskov *et al.* 2002). Entre los géneros de hongos ECM más sensibles que se han reportado a la fecha y que se han registrado por la presencia de sus esporomas tenemos a *Tricholoma*, *Lactarius* y *Hebeloma* (Lilleskov *et al.*, 2001). En tanto *Amphinema byssoides*, *Cortinarius* spp., *Piloderma* spp. y *Tomentella* spp., que fueron detectados en sus raíces cortas y mediante el registro de sus esporomas (Lilleskov *et al.*, 2002). Por otra parte, los taxa micorrízicos que son más tolerantes al N son llamados “nitrofilicos” y entre los que se incluyen a especies que producen esporomas en el género *Cantharellus*, así como en *Lactarius theiogalus*, *Lactarius rufus*, *Laccaria* spp., *Paxillus involutus*, *Hygrophorus olivaceoalbus* y *Tylospora fibrillosa*, (Brandrud 1995; Lilleskov *et al.*, 2001) y *Tomentella sublilacina* y *Thelephora terrestris* (Lilleskov *et al.*, 2002) que micorrizaron las raíces cortas.

Por otra parte, Grebenc *et al.* (2006) reportan que la exposición a altos niveles de ozono puede inducir cambios en la estructura de las comunidades de hongos ECM, afectando la composición de especies y su abundancia relativa. Roth y Fahey (1998) observaron que la composición de las comunidades ECM fueron afectadas por la lluvia ácida; mientras que Kim *et al.* (2003) mencionan que los metales pesados también podrían dañar el desarrollo de las ectomicorrizas.

Por otro lado, Rygiewicz y Andersen (1994) observaron que al elevar el nivel de CO₂ atmosférico bajo condiciones experimentales, se alteraba la micorrización. García *et al.* (2008) examinaron la respuesta de la micorrización en un bosque con sitios experimentales

de 30 m en diámetro y mantenidos bajo una concentración de $200 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2 , observándose incrementos del 14% en la micorrización, bajo elevados niveles de CO_2 . De igual manera, Treseder (2004) observó que la abundancia de micorrizas aumentó en un promedio del 47% bajo enriquecimiento de CO_2 . En forma contrastante Parrent *et al.* (2006) señalan que la riqueza y diversidad de especies no se vieron afectadas con elevados niveles de CO_2 , por lo que estos investigadores predicen que en el año 2050, la composición y la estructura de comunidades ectomicorrízicas podrían cambiar si se siguen incrementando los niveles de CO_2 , aunque la riqueza y diversidad no se vería afectada.

El decremento en la diversidad y abundancia de esporomas de macromicetos en Europa ha sido reportada desde la segunda mitad del siglo XX (Arnolds, 1991). Desafortunadamente la abundancia de los esporomas podría no tener mucha relación con la abundancia relativa de otros componentes colonizados por hongos ECM como las raíces cortas de los árboles (Gehring *et al.*, 1998; Jonsson *et al.*, 1999). Kraiger y Al Sayegh (2007) reportan que la aparición de esporomas depende en su mayoría de factores climáticos presentes a lo largo del año y entre años; sin embargo, las raíces ectomicorizadas en el suelo están presentes en cualquier época del año. Además, estos autores señalan que algunas ectomicorrizas son formadas por hongos ascomicetos mitospóricos incapaces de formar estructuras reproductoras sexuales o esporomas.

Lilleskov *et al.* (2002) encontraron que el depósito de N puede reducir la abundancia de las raíces cortas micorrizadas. En un experimento de fertilización con N en un bosque de Suiza, Peter *et al.*, 2001 observaron que la adición de N afectó la diversidad basada en los

esporomas formados, en comparación con la diversidad de las raíces cortas ECM y la composición de especies fue afectada al adicionar N.

En México se han realizado algunas investigaciones preliminares al respecto, tal es el caso de Bastian *et al.* (1998) quienes compararon las poblaciones de hongos potencialmente saprobios y ECM de tres sitios con diferente grado de declinación forestal en un bosque de *Abies religiosa* del Desierto de los Leones. Estos investigadores encontraron que en los sitios con menor daño predominaban las especies potencialmente ECM, mientras que en los sitios más dañados la mayoría de las especies encontradas fueron saprobias. Lamentablemente en dicho estudio no se evaluaron los micobiontes presentes en las raíces cortas del oyamel, con lo cual se confirmaría plenamente la reducción de especies ECM por efecto de contaminantes atmosféricos.

Por tal motivo, en el presente trabajo se planteó como objetivo evaluar comparativamente durante dos estaciones (otoño y verano) en diferentes años (2006 y 2007), los cambios en la riqueza de especies, diversidad, composición y estructura de comunidades de hongos ectomicorrizicos en las raíces de *Pinus hartwegii* en dos bosques cercanos a la Ciudad de México (Parque Recreativo y Cultural El Desierto de los Leones y Parque Nacional Zoquiapan) con reportes previos de presentar diferentes niveles de depósito de N atmosférico y otros contaminantes para conocer su posible impacto sobre las poblaciones de hongos ECM que crecen en las raíces de *P. hartwegii* .

4.4. ÁREA DE ESTUDIO

Los dos sitios estudiados se encuentran ubicados en la Cuenca del Valle de México (Figura 4.1) y tienen diferentes niveles de depósito de N atmosférico (Fenn *et al.* 1999).

(1) El Parque Recreativo y Cultural El Desierto de los Leones (DL) tiene altos niveles de contaminación atmosférica y se localiza en dirección de los vientos dominantes de la Ciudad de México (Jáuregui, 2002), a una altitud de 3,325 m s.n.m., y geográficamente está ubicado a 19° 42' 00'' de latitud Norte y 99° 25' 00'' de longitud Oeste (Datos tomados con un GPS, GARMIN®). En un estudio realizado en 1996, Fenn *et al.*, (1999) reportaron niveles de depósito de 18.5 kg N ha⁻¹ año⁻¹ y 20.4 kg S ha⁻¹ año⁻¹.

(2) El Parque Nacional Zoquiapan (ZOQ) se localiza a una altitud de 3,350 m s.n.m., y geográficamente está ubicado a 19° 20' 00'' de latitud Norte y de 98° 42' 00'' longitud Oeste (Datos tomados con un GPS, GARMIN®). Este sitio tiene bajos niveles de depósito de contaminantes atmosféricos, reportándose 5.5 kg N ha⁻¹ año⁻¹ y 8.8 kg S ha⁻¹ año⁻¹ (Fenn *et al.*, 1999).

La especie dominante en ambos sitios es *Pinus hartwegii* Lindl., conocido como “pino de las alturas”, ya que se ha reportado desde los 3,000 a los 3,700 m s.n.m. (Perry, 1991). El área de distribución natural de este pino corresponde a los estados de Colima, Chiapas, Distrito Federal, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz, aunque también existen reportes en Guatemala y Honduras (Perry, 1991).

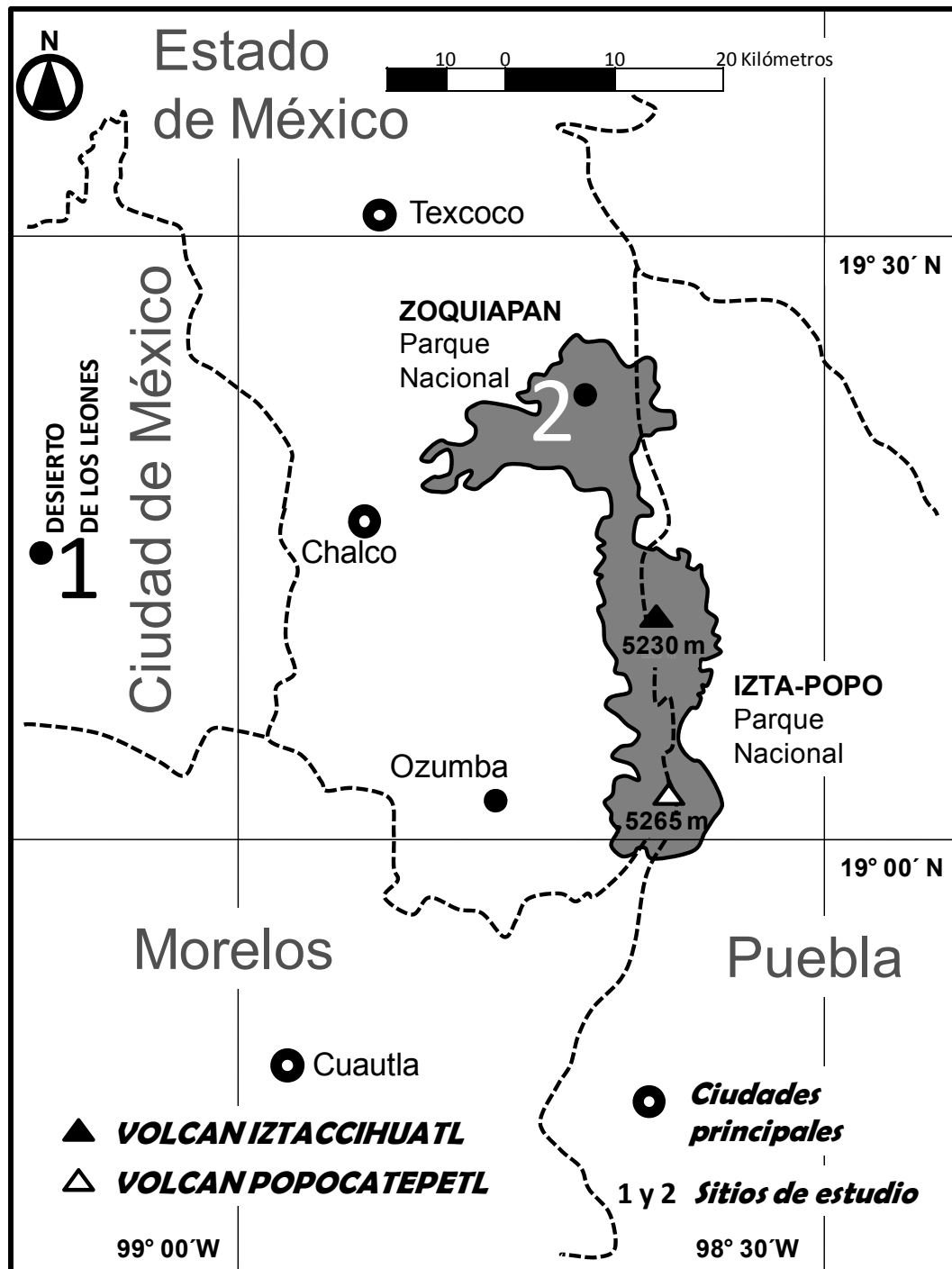


Figura 4.1. Mapa de localización de los sitios de estudio: (1) Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones y (2) Parque Nacional Zoquiapan.

4.4.1. Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones

El origen geológico del área donde se ubica el parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones se remonta al Cenozoico, en el periodo Terciario Superior (Mioceno – Plioceno), el cual se caracterizó por una extraordinaria actividad volcánica, misma que representa una estrecha relación con el movimiento de las placas tectónicas que convergen en la llamada Trinchera Mesoamericana, dando lugar a la formación del Eje Neovolcánico Transversal (Arce *et al.*, 1990; Schlapfer, 1968). Los suelos del Desierto de los Leones son de origen volcánico y la litología está dominada por las andesitas. Dichos suelos son profundos, bien drenados, fértiles y permanecen húmedos la mayor parte del año. Los valores de pH son por lo general de 5 a 6, lo que los hace ligeramente ácidos (SEMARNAT, 2004). De acuerdo con INEGI (2000) la mayor parte del DL el tipo de suelo se clasifica como podzólico y corresponde al tipo café vegetal con textura arcillo-arenosa. Con base en la clasificación de Köppen, modificada por García (1988), el clima del Desierto de los Leones corresponde al tipo C (W₂) (W) (b') ig, que equivale al: Templado, con lluvias en verano y con una precipitación invernal menor del 5% con respecto al total y forma parte del grupo más húmedo de los sub-húmedos.

4.4.2. Parque Nacional Zoquiapan

La geología de la región corresponde al Terciario Superior, caracterizándose por el afloramiento de rocas de tipo ígneo andesítico y el material que predomina en el área es el andesítico formado por tobas andesíticas, brecha volcánica andesítica y basalto. El área se encuentra en la porción centro-oriental del Eje Neovolcánico Transversal. El material

litológico está formado por andesitas, dacitas, arenas y cenizas volcánicas (Aguilar y Plateros, 2003).

Los suelos son andosoles mólicos formados de cenizas volcánicas y su evolución es diversa, dependiendo de lo accidentado del terreno y de su acumulación. Tienen buena aeración, buen drenaje, consistencia friable y son ligeramente pegajosos y plásticos. Su pH es cercano a la neutralidad y presenta una buena disponibilidad de nutrimentos y contenido de materia orgánica que disminuye con la profundidad. También tienen una buena retención de humedad, disponibilidad de N y baja concentración de P en forma asimilable, lo que constituye un ambiente favorable para el desarrollo de los microorganismos. Se pueden considerar como de desarrollo pedogenético incipiente, con un adecuado nivel de fertilidad y con susceptibilidad a la erosión. Predominan las rocas como basaltos y las andesitas (SARH, 1993).

De acuerdo con la clasificación de Köppen modificada por García (1998), el clima es el tipo C (w2) (w) (b') i g; el cual es el menos húmedo de los templados sub-húmedos. Presenta lluvias en verano y la estación más seca en invierno, con una temperatura media anual de 5 a 12°C, con el mes más frío de -3 a 10°C. En el Cuadro 4.1. se presentan algunos datos climáticos y edáficos de los dos sitios estudiados.

Cuadro 4.1. Datos climáticos y edáficos en el Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones y el Parque Nacional Zoquiapan.

	Unidad	Desierto de los Leones	Zoquiapan
Datos climatológicos			
Clima		Cw	Cw
Temperatura media anual	°C	12	12
Temperatura mínima promedio	°C	2	2
Temperatura máxima promedio	°C	20	25
Temperatura mínima extrema	°C	-5	-9
Temperatura máxima extrema	°C	26	34
Precipitación media anual	mm	1100	700
Días de lluvia al año		120	80
Intensidad media de precipitación en 24 horas	mm	80	60
Datos del suelo			
*Fase física		Lítico	Lítico
Clase textural		Andosol húmico-Mediano del tipo migajón	Andosol húmico-Mediano del tipo migajón
MO	%	7.8	13.43

Jáuregui (2002) menciona que el tipo de clima para estos sitios es Cw = clima templado sub-húmedo de acuerdo a la clasificación universal climática de Köppen (1923). La temperatura y la precipitación fueron tomadas de las Normales climatológicas del Servicio Meteorológico Nacional para el periodo de 1951 hasta 1980, *Carta edafológica 1:50,000 Secretaría de Programación y Presupuesto. La clase textural y la MO (materia orgánica) fueron tomadas de Perea-Estrada (2003).

4.5. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en campo y laboratorio (Figura 4.2) durante dos años en diferentes estaciones (otoño 2006 y verano 2007) para evaluar los cambios de estacionalidad en la riqueza de especies, composición y estructura de comunidades de hongos ECM que pudieran relacionar el posible efecto de contaminantes atmosféricos. En este estudio se utilizó el método de transectos, ya que es ampliamente utilizado por la rapidez con que se mide y por la mayor heterogeneidad con que se muestrea, siendo además útil para medir variaciones temporales de poblaciones, variaciones anuales de las poblaciones y tipos de hábitats; además de que se pierde menos tiempo en el desplazamiento de áreas de muestreo (Mostacedo y Fredericksen, 2000).

Las 21 muestras del suelo con raíces micorrizadas de *P. hartwegii* se recolectaron cada 5 metros a lo largo de un transecto de 100 m de longitud por sitio y por año, empleando tubos de PVC de 3 cm en diámetro por 30 cm de longitud. Cabe hacer notar que con fines comparativos no se varió la posición de los transectos en los muestreos realizados en 2006 y 2007. Cada muestra de suelo recolectada fue envuelta en papel aluminio y colocada en una bolsa de plástico sellada, debidamente etiquetada y posteriormente fue almacenada en un refrigerador a 4 °C hasta su procesamiento. Se tomaron 21 muestras de suelo en cada sitio para el primer año, sin embargo, después de analizar la curva de especie área y observar que en ZOQ no era asintótica, en el segundo año se realizó el ejercicio de aumentar el esfuerzo de recolección a 31 muestras para determinar si existía un incremento del número de especies en las raíces micorrizadas (ver sección 4.6. resultados), mientras que en el DL se tomaron 21 muestras, asumiendo que el análisis preliminar indicaba una curva con tendencia asintótica. Con fines comparativos, el análisis final de los datos se basó en 21 muestras tomadas por año y por sitio de muestreo.

Las raíces cortas fueron extraídas de los tubos de PVC humedeciendo cada muestra durante 24 horas antes de ser analizada, con la finalidad de hacer más sencilla la extracción del suelo y las raíces de *P. hartwegii* de los tubos de PVC. Posteriormente la muestra de suelo y raíces se colocaron sobre dos tamices de 2 mm y 1mm de abertura de malla respectivamente, disgregando el suelo con un chorro moderado de agua corriente, extrayendo todas las raíces cortas y colocándolas en un recipiente de plástico. Después se transfirieron las raíces de pino a cajas de petri con agua corriente, separándolas en tres categorías para su cuantificación: (1) Raíces de pino muertas (aquellas raíces secas y quebradizas y con el centro obscurecido). (2) Raíces de pino vivas sin micorrizar (sin la

presencia de un manto y red de Hartig) (3) Raíces de pino micorrizadas (aquellas que presentaron manto, raíces emanantes y/o rizomorfos y una red de Hartig). Es importante mencionar que dada la naturaleza ecológica del estudio, no se hicieron intentos por determinar taxonómicamente las micorrizas encontradas, sin embargo se estudiaron mediante una simplificación del método desarrollado por Villarreal-Ruiz (2006).

Las raíces de pino micorrizadas se separaron cuidadosamente mediante su caracterización morfológica (color, forma, textura), empleando un microscopio estereoscópico (Zeiss®) para obtener morfotipos homogéneos. Los grupos de morfotipos ECM previamente agrupados por su morfología externa (morfotipos) fueron caracterizados anatómicamente comparando los atributos del manto externo, con el fin de obtener anatotipos que permitieran discernir taxa potenciales y a los cuales le fue asignado un número progresivo (sp1, sp2...) (ver sección de resultados). La morfología externa de las ectomicorrizas extraídas de las muestras de suelo se fotodocumentó empleando un microscopio estereoscópico Olympus® modelo CX31. Los mantos externos de dichas ectomicorrizas fueron analizadas microscópicamente empleando Contraste Interferencial según Nomarski con un microscopio Olympus, modelo Bx51 y fotodocumentadas empleando una cámara digital Media Cybernetics 5.0 Mega-pixeles y procesadas con el programa de computo Image-Pro® Express ver. 4.1. Los morfo-anatotipos caracterizados que pudieran representar posibles taxa fueron colocados en recipientes de plástico, para su cuantificación. Una muestra de cada morfo-anatotipo fue preservada en FAA (Formaldehído 10%, Alcohol 50%, Acido acético 5% + 35% agua) y mantenida como material de referencia y una muestra en fresco fue transferida a un tubo Eppendorf de 1.5 ml con agua bidestilada estéril

y mantenida bajo congelación para su posterior análisis molecular. Las muestras están depositadas en el Laboratorio de Recursos Genéticos en Hongos del COLPOS, Campus Montecillo.

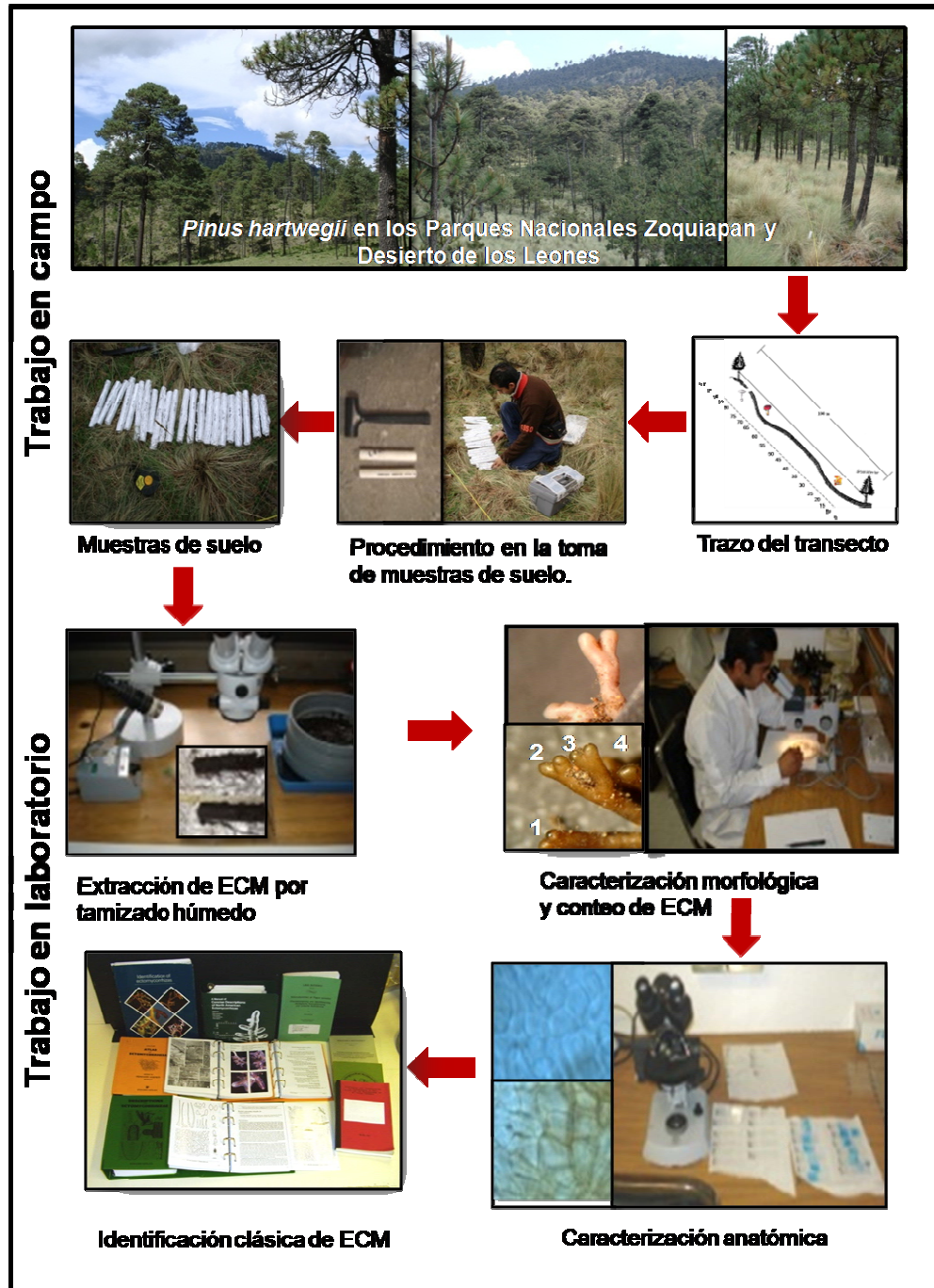


Figura 4.2. Diagrama de flujo del estudio realizado en campo y laboratorio. Fotos: Dr. Luis Villarreal Ruiz.

En el verano de 2007 durante los meses de junio y julio se tomó una muestra de suelo adyacente a cada punto de muestreo realizado en 2006, empleando un tubo de PVC de 30 cm en longitud x 3cm de diámetro y adicionalmente cada 20 metros se utilizó un tubo PVC de 100 cm x 3cm de diámetro, para medir la profundidad del horizonte orgánico y posteriormente se realizó el análisis químico del suelo, determinándose las siguientes características edáficas: (a) potencial de hidrógeno (pH) y la conductividad eléctrica (CE) fueron determinados por el método descrito en el manual 60 de la FAO (1988) y que a continuación se describe brevemente: se pesaron 20 g de suelo tamizado y se agregaron 40 ml de H₂O destilada, agitando la muestra durante 15 minutos, posteriormente se dejó reposar la muestra durante ½ hora, y finalmente se realizó la lectura del pH empleando un potenciómetro marca Hanna[®] modelo pH302. La solución se dejó reposar durante 24 horas y posteriormente se midió la conductividad eléctrica con el puente de conductividad marca Conductivity bridge[®] modelo 31yS1 en mS/cm. (b) El porcentaje de humedad (%) se determinó por el método gravimétrico de pérdida de peso secado a la estufa (FELI Aut. DGE 11524) a 105°C durante 24 horas y pesado con una balanza digital marca Sartorius[®]. (c) Los análisis de N y P se realizaron en el Laboratorio de Fertilidad de Suelos del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, empleándose el método de Microkjeldahl para la determinación del N (%) (Bremmer, 1965), mientras que el P (ppm) se determinó por el método de milibdato amarillo (Olsen *et al.*, 1954).

4.5.1. Métodos para estimar la diversidad orgánica en ectomicorrizas

La diversidad orgánica fue estimada tomando como base los morfo-anatotipos caracterizados, asumiendo que corresponden a especies o taxa de diferentes hongos ECM.

Los valores de abundancia relativa en número de raíces micorrizadas por morfo-anatotipos por muestra de suelo fueron tabuladas en Excel y convertidos a porcentaje de micorrización para generar las gráficas de estructura de comunidades.

4.5.1.1. Índice de Shannon-Wiener (H')

El índice de Shannon-Wiener (H') es uno de los métodos más utilizados para determinar la diversidad de especies en un determinado hábitat (Mostacedo y Frederiksen, 2000). Este índice se calculó por el logaritmo natural (Ln) para la presente investigación y mediante la fórmula:

$$H' = - \sum Pi * \ln (Pi)$$

Donde:

H' = Índice de Shannon – Wiener

Pi = Abundancia relativa

Ln = Logaritmo natural

4.5.1.2. Índice de equitabilidad

$$E = \frac{H'}{\ln S} =$$

Donde:

H' = Índice de Shannon – Wiener

S = Número de especies

Ln = Logaritmo natural

4.5.1.3. Índice de Sørensen

El índice de Sørensen fue empleado para calcular la similaridad de especies en ZOQ y DL, ya que es un método ampliamente utilizado para el análisis de comunidades y permite su comparación mediante la presencia/ausencia de especies en cada sitio estudiado (Mostacedo y Frederiksen, 2000). Este método, también fue probado para calcular la similaridad de especies durante dos años y en diferentes estaciones (otoño 2006 y verano 2007). El cálculo se hizo mediante la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{2C}{A + B} * 100$$

Donde:

IS = Índice de Sørensen

A = Número de especies encontradas en la comunidad A

B = Número de especies encontradas en la comunidad B

C = Número de especies comunes en ambas localidades

4.5.1.4. Análisis de datos ecológicos

Los análisis ecológicos fueron realizados con el programa PC-ORD v. 4 (McCune y Mefford, 1999). La riqueza de especies “real” en los sitios de estudio fue estimada usando la curva de especies-área de Sorensen (Bray-Curtis) y los siguientes estimadores:

(a) jackknife de primer orden (Heltshe y Forrester, 1983; Palmer, 1990).

$$Jack1 = S + r1 (n-1)/n$$

Donde S = el número de especies observadas; $r1$ = el número de especies presentes por unidad muestral; n = el número de unidades muestrales.

(b) jackknife de segundo orden (Burnham and Overton, 1979; Palmer 1991):

$$Jack2 = S + r1 (2n-3)/n-r2(n-2)^2/(n(n-1))$$

Donde $r2$ = el número de especies presentes en exactamente dos unidades muestrales.

Con los datos del suelo y el número de raíces cortas ECM vivas y muertas se hizo una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$ %), empleando el paquete estadístico SAS, ver. 9.0 (SAS Institute, 1999).

4.6. RESULTADOS

4.6.1. Riqueza y diversidad de morfo-anatotipos

La caracterización morfológica de los atributos externos de cada ectomicorriza permitió reconocer los diferentes tipos morfológicos o morfotipos en las raíces de pino y la caracterización anatómica mediante el análisis microscópico de su manto externo, permitió separar grupos homogéneos a los que denominaremos como morfo-anatotipos y que pueden representar especies o taxa de hongos ECM diferentes. Ello permitió estimar su riqueza y diversidad a diferentes escalas.

4.6.1.1. Gama diversidad (γ)

Se reconocieron 52 morfo-anatotipos de hongos ECM (Figuras 4.3. y 4.4) de las 3,364 (40.05 promedio \pm 44.20 SD) raíces vivas micorrizadas y además se detectaron 3,391 (40.37 promedio \pm 40.27 SD) muertas micorrizadas; haciendo un total de 6,755 (40.20 promedio \pm 42.16 SD) raíces recuperadas y cuantificadas de las 84 muestras de suelo obtenidas en los transectos de los bosques de *Pinus hartwegii*. No se registraron raíces sin micorrizar en los dos sitios de estudio (ZOQ y DL), durante los muestreos estacionales de otoño 2006 y verano 2007.

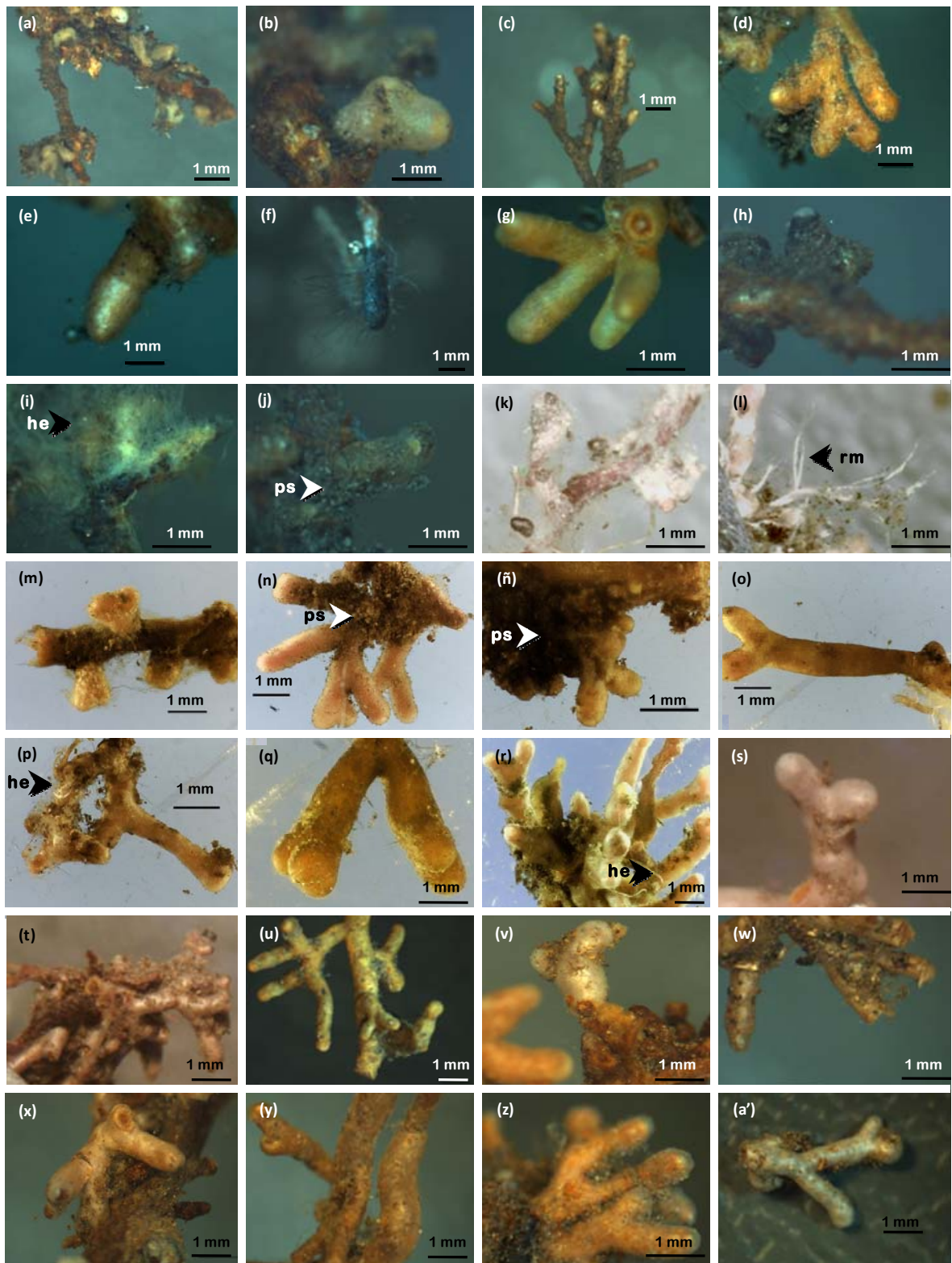


Figura 4.3. Ver pie de figura en la siguiente página.

Continuación



Figura 4.3. Morfotipos ectomicorrízicos en raíces de *Pinus hartwegii* del Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones y el Parque Nacional Zoquiapan; (a) sp. 1, (b) sp. 2, (c) sp. 3, (d) sp. 4, (e) sp. 5, (f) sp. 6 = *Cenococcum geophilum*, (g) sp.7, (h) sp.8 = *Cadophora finlandica*, (i) sp.9, (j) sp.10, (k) sp.11, (l) sp.12, (m) sp.13, (n) sp. 14, (ñ) sp. 15, (o) sp. 16, (p) sp. 17, (q) sp. 18, (r) sp. 19, (s) sp. 20, (t) sp. 21, (u) sp. 22, (v) sp. 23, (w) sp. 24, (x) sp. 25, (y) sp. 26, (z) sp. 27, (a') sp. 28, (b') sp. 29, (c') sp. 30, (d') sp. 31, (e') sp. 32, (f') sp. 33, (g') sp. 34, (h') sp. 35, (i') sp. 36, (j') sp. 37, (k') sp. 38, (l') sp. 39, (m') sp. 40, (n') sp. 41, (ñ') sp. 42, (o') sp. 43, (p') sp. 44, (q') sp. 45, (r') sp. 46, (s') sp. 47, (t') sp. 48, (u') sp. 49, (v') sp. 50, (w') sp. 51, (x') sp. 52; he= hifas externas, rm= rizomorfos, pa= partículas de suelo adheridas al micelio externo.

CAPÍTULO IV: COMUNIDADES ECTOMICORRIZICAS EN BOSQUES Y CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS.

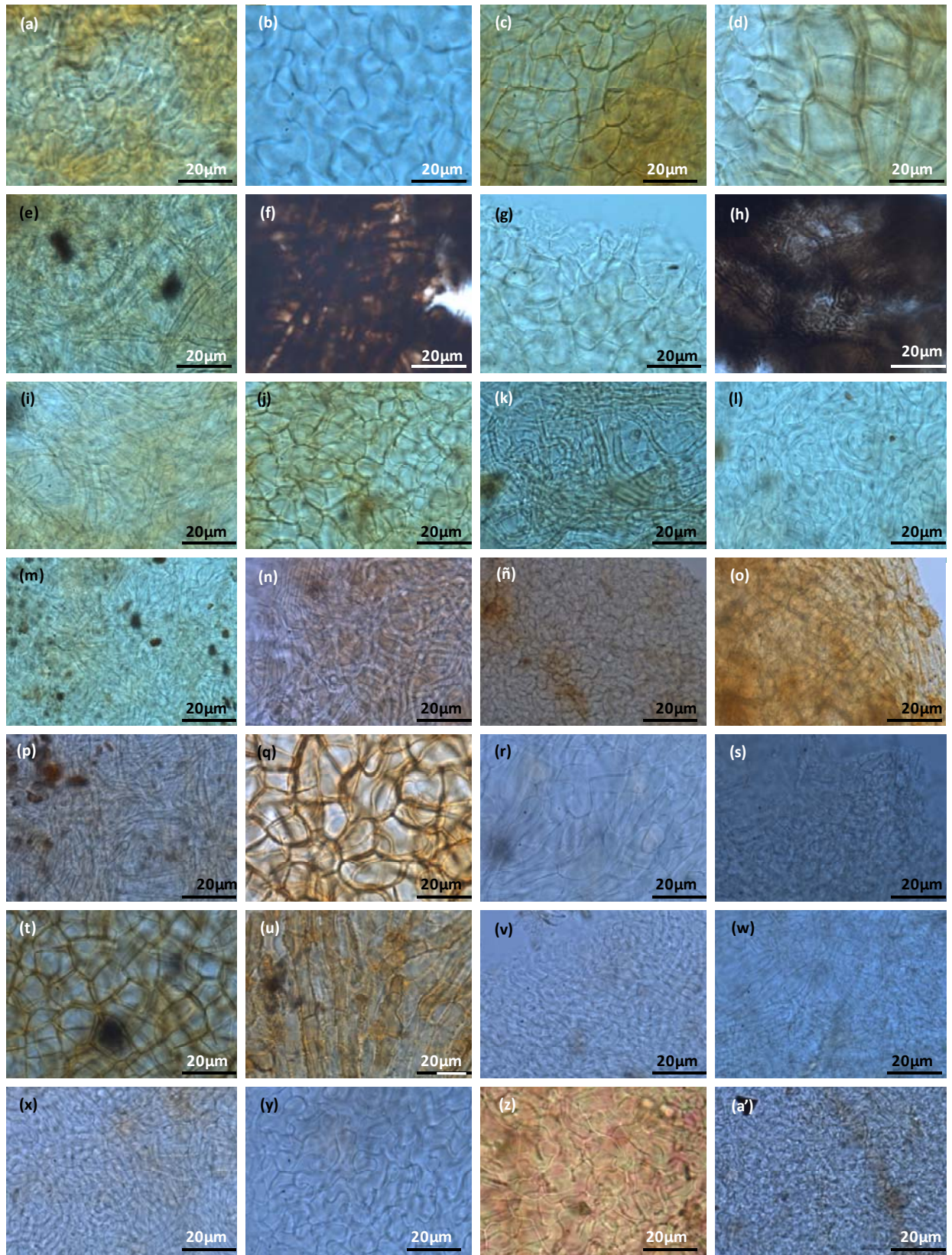


Figura 4.4. Ver pie de figura en la siguiente página.

Continuación

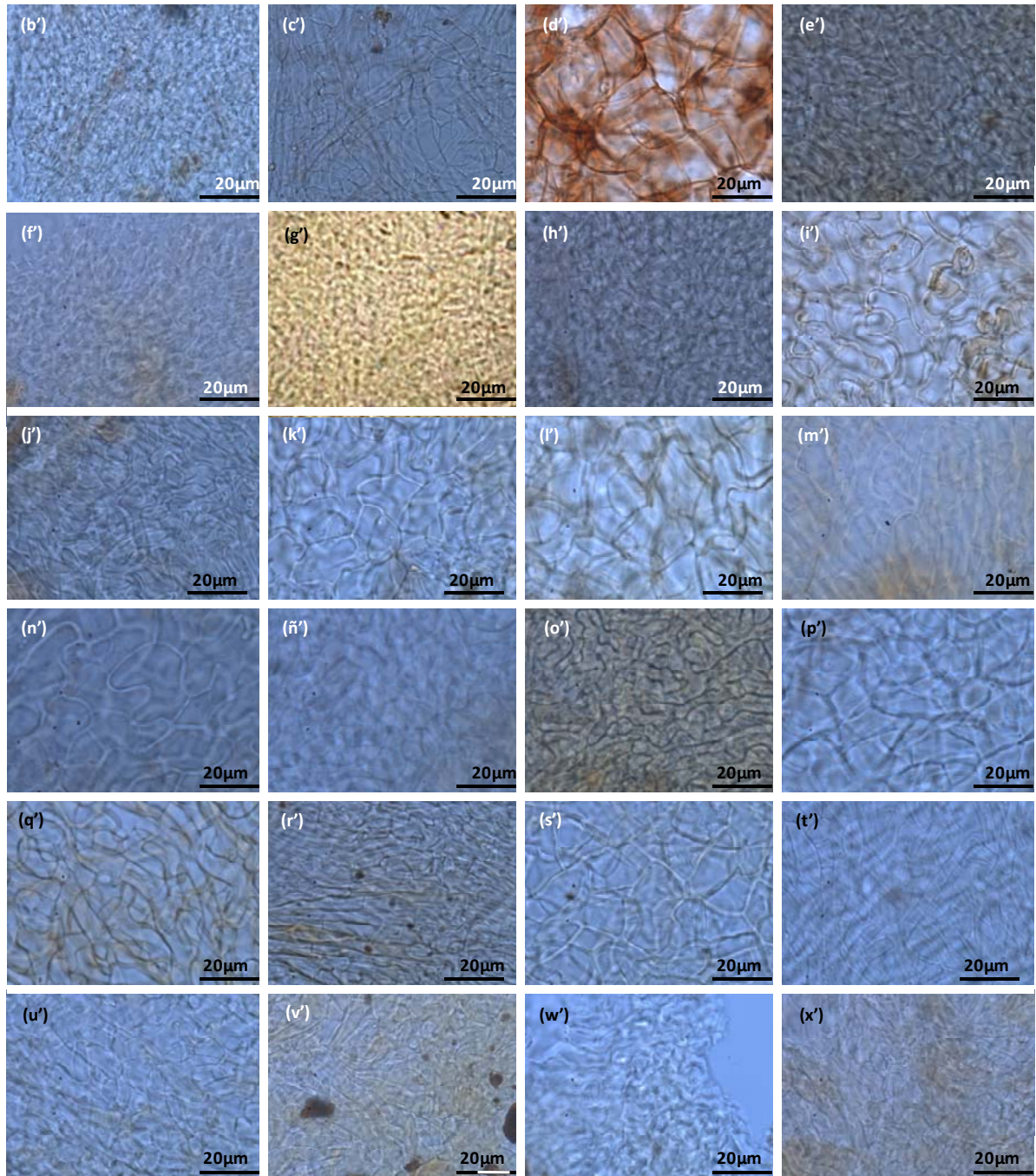


Figura 4.4. Anatotipos ectomicorrízicos basados en el manto externo de las raíces micorrizadas de *Pinus hartwegii* del parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones y Parque Nacional Zoquiapan. (a) sp. 1, (b) sp. 2, (c) sp. 3, (d) sp. 4, (e) sp. 5, (f) sp. 6 = *Cenococcum geophilum*, (g) sp. 7, (h) sp. 8 = *Cadophora finlandica*, (i) sp. 9, (j) sp. 10, (k) sp. 11, (l) sp. 12, (m) sp. 13, (n) sp. 14, (ñ) sp. 15, (o) sp. 16, (p) sp. 17, (q) sp. 18, (r) sp. 19, (s) sp. 20, (t) sp. 21, (u) sp. 22, (v) sp. 23, (w) sp. 24, (x) sp. 25, (y) sp. 26, (z) sp. 27, (a') sp. 28, (b') sp. 29, (c') sp. 30, (d') sp. 31, (e') sp. 32, (f') sp. 33, (g') sp. 34, (h') sp. 35, (i') sp. 36, (j') sp. 37, (k') sp. 38, (l') sp. 39, (m') sp. 40, (n') sp. 41, (ñ') sp. 42, (o') sp. 43, (p') sp. 44, (q') sp. 45, (r') sp. 46, (s') sp. 47, (t') sp. 48, (u') sp. 49, (v') sp. 50, (w') sp. 51, (x') sp. 52.

La estructura de comunidades ectomicorrízica en *P. hartwegii* a escala regional estuvo representada por tres morfo-anatotipos muy abundantes que constituyeron el 46% de la abundancia relativa total, seguido de una larga cola de taxa ECM menos abundantes y algunos raros. El morfo-anatotipo representado por sp.6 y que fue determinado taxonómicamente como *Cenococcum geophilum* constituyó el más abundante con el 25.79%, seguido por los morfo-anatotipos sin identificar sp.22 y sp.27 con 11.3 y 6.24% respectivamente (Figura 4.5).

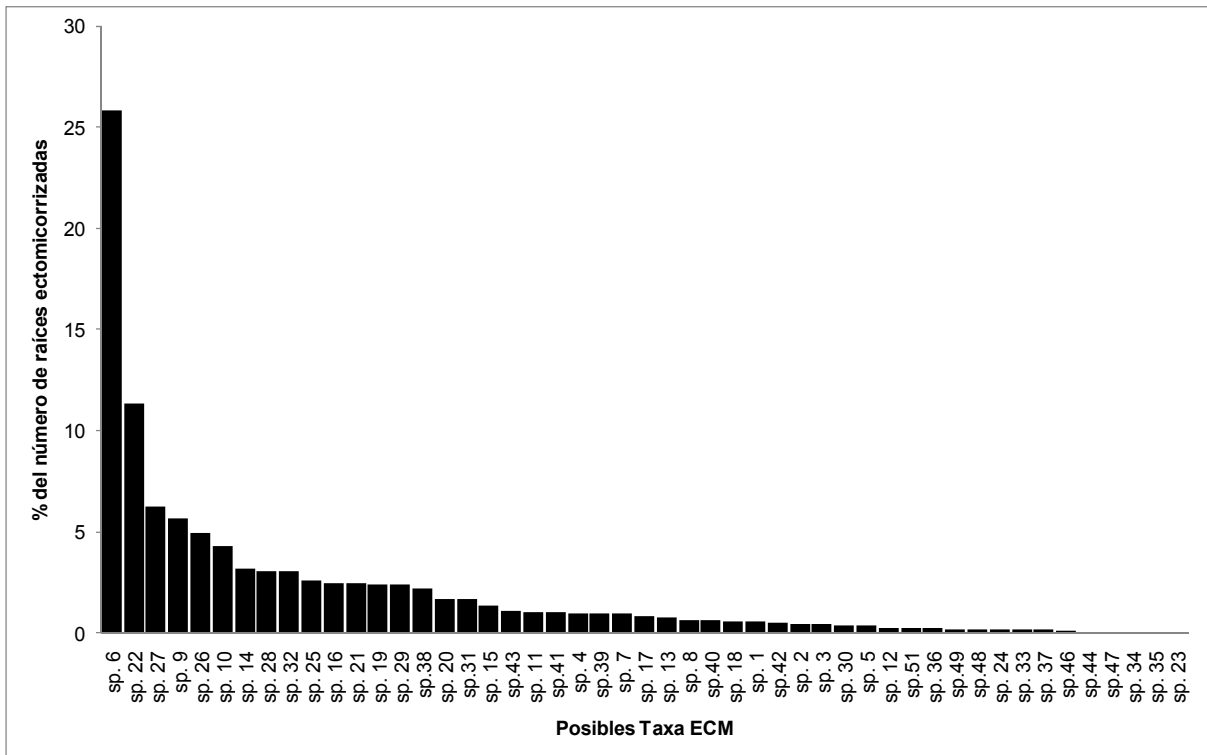


Figura 4.5. Composición y estructura de comunidades de morfo-anatotipos ectomicorrízicos de *P. hartwegii*, basados en el porcentaje de la abundancia relativa de los datos obtenidos del Parque Nacional Zoquiapan y el Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones durante 2006 y 2007.

4.6.1.2. Alfa diversidad (α)

La riqueza de especies y diversidad local, composición y estructura de comunidades fue contrastante en los sitios de estudio ZOQ y DL (Figura 4.6ab).

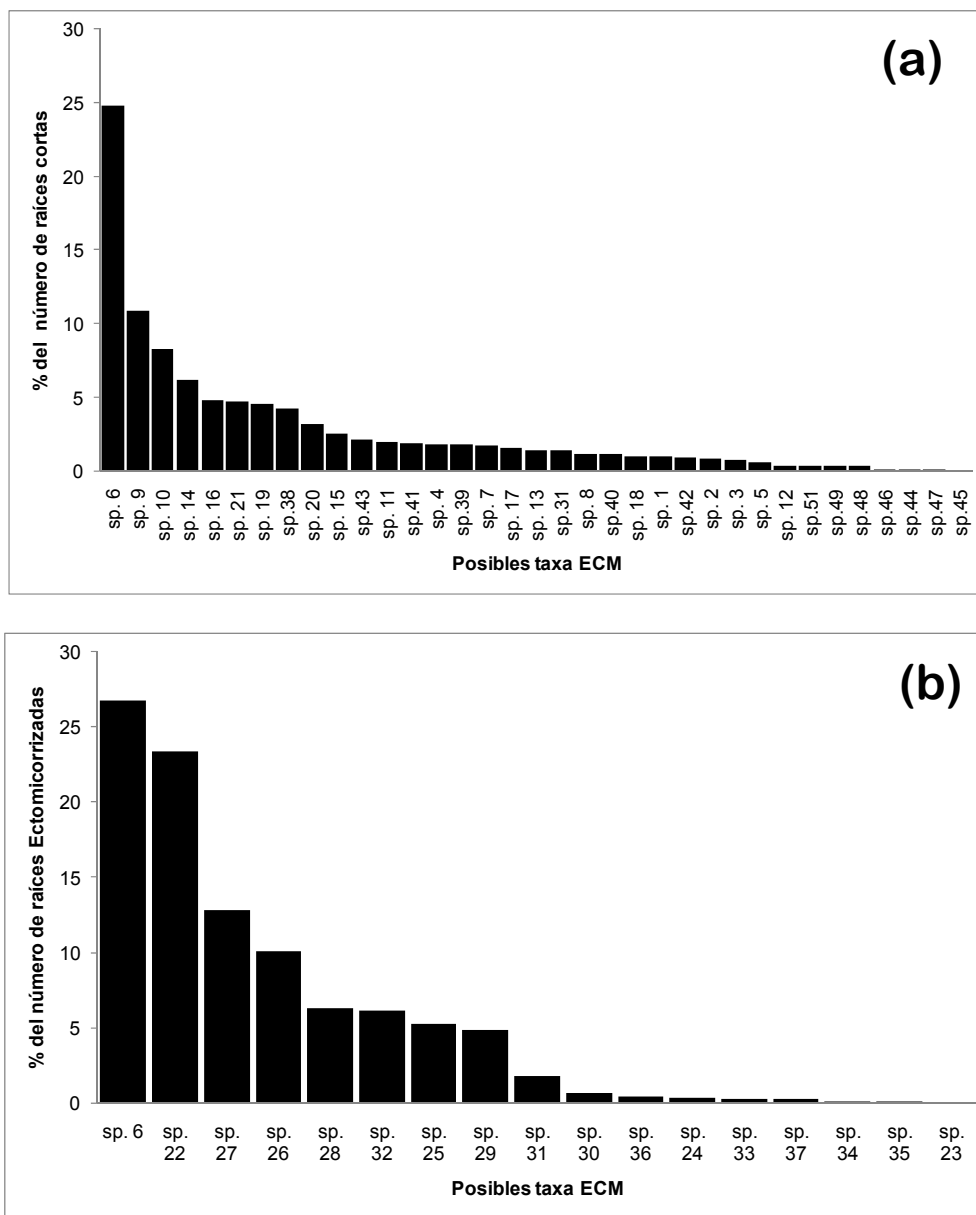


Figura 4.6. Cambios en la composición y estructura de comunidades de morfo-anatotipos ectomicorrízicos tomando en cuenta la suma de datos de los años (2006 y 2007) en el Parque Nacional Zoquiapan (a) y el Parque Cultural Desierto de los Leones (b).

En ZOQ se reconocieron 37 morfo-anatotipos de hongos ECM en 1,731 (41.21 promedio \pm 26.50 SD) raíces micorrizadas y 1,661 (39.55 promedio \pm 35.19 SD) raíces muertas. Por otra parte, en DL solamente se registraron 17 posibles taxa de 1,633 (39.00 promedio \pm 57.01 SD) raíces micorrizadas vivas y 1,661 (41.19 promedio \pm 45.21 SD) raíces muertas. El bosque de ZOQ menos contaminado mostró un 54.05% de mayor riqueza de taxa ECM con respecto al sitio DL en el que se ha reportado mayor contaminación. Del número total los 52 morfo-anatotipos registrados solamente sp. 6 (*C. geophilum*) y sp. 31 fueron comunes en ambos sitios (Figura 4.3 y Figura 4.4). Los morfo-anatotipos más abundantes en ZOQ fueron sp. 6, sp. 9 y sp.10 con 24.84, 10.91 y 8.31% respectivamente (Figura 4.6a). Para DL (Figura 4.6b) los morfo-anatotipos más abundantes fueron sp. 6, sp. 22 y sp. 27 con 26.78, 23.36 y 12.84% respectivamente.

Las curvas de esfuerzo de muestreo en ZOQ (Figura 4.7) mostraron un comportamiento no asintótico en otoño 2006 y verano 2007 considerando únicamente 21 muestras de suelo; lo que nos indica una gran riqueza de especies que puede favorecer la incorporación de nuevos taxa ECM en cada estación del año. El número de taxa observados en ZOQ fue de 29 y el número de especies estimadas por jackknife de primer y de segundo orden fueron de 40.4 y 41.8 respectivamente. Sin embargo en otoño 2007 se realizó el ejercicio de analizar 31 muestras de suelo en ZOQ y a pesar de que se observa que la curva de especie área tiende a estabilizarse con un total de 32 detectadas, el número de especies estimadas por jackknife de primer y segundo orden indica un total 43.6 y 44.3 respectivamente.

CAPÍTULO IV: COMUNIDADES ECTOMICORRIZICAS EN BOSQUES Y CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS.

Cuadro 4.2. Características morfo-anatómicas y su porcentaje de abundancia relativa de los taxa ectomicorrízicos del Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones y el Parque Nacional Zoquiapan.

Clave de identificación	Manto	Color	Forma	% AR	
				DL	ZOQ
sp.6¶	G	Negro	Monopodial	13.01	12.77
sp.22	E	Amarillo	Irregular-Pinada	11.35	-
sp.27	M	Anaranjado	Dicotómica	6.24	-
sp.9	B	Amarillo-claro	Dicotómica	-	5.61
sp.26	M	Café	Irregular-Pinada	4.90	-
sp.10	N	Café	Monopodial	-	4.28
sp.14	E	Rosa	Dicotómica	-	3.18
sp.28	I	Blanco	Dicotómica	3.06	-
sp.32	N	Anaranjado	Dicotómica	3.00	-
sp.25	H	Café-claro	Dicotómica	2.55	-
sp.16	H	Anaranjada	Dicotómica	-	2.47
sp.19	H	Anaranjado	Irregular-Pinada	-	2.38
sp.29	I	Rosa	Irregular-Pinada	2.38	-
sp.38	L	Café-claro	Dicotómica	-	2.20
sp.21	L	Café	Irregular-Pinada	-	2.44
sp.20	H	Rosa	Dicotómica	-	1.63
sp.15	N	Amarilla	Dicotómica	-	1.31
sp.43	H	Café	Dicotómica	-	1.10
sp.11	C	Rosa	Monopodial	-	1.01
sp.41	M	Café	Dicotómica	-	0.98
sp.39	L	Café	Dicotómica	-	0.95
sp.4	L	Anaranjado	Dicotómica	-	0.95
sp.7		Anaranjado	Dicotómica	-	0.92
sp.31	L	Café-oscuro	Irregular-Pinada	0.89	-
sp.17	E	amarilla	Irregular-Pinada	-	0.80
sp.13	E	Naranja	Dicotómica	-	0.74
sp.31	L	Café-oscuro	Irregular-Pinada	-	0.74
sp.8§	E	Negro	Monopodial	-	0.62
sp.40	H	Café	Irregular-Pinada	-	0.59
sp.18	L	Anaranjado	Dicotómica	-	0.53
sp.1	H	Amarillo	Monopodial	-	0.53
sp.42	H	Rosa	Dicotómica	-	0.48
sp.2	M	Amarillo	Dicotómica	-	0.45
sp.3	L	Café-claro	Pinada	-	0.42
sp.5	Q	Café-oscuro	Monopodial	-	0.33
sp.30	P	Café-claro	Coraloide	0.36	-
sp.36	M	Café-oscuro	Irregular-Pinada	0.21	-
sp.12	H	Rosa	Monopodial	-	0.21
sp.51	I	Café-oscuro	Dicotómica	-	0.21
sp.49	L	Café	Irregular-Pinada	-	0.18
sp.48	P	Café	Irregular-Pinada	-	0.18
sp.24	H	Café	Irregular-Pinada	0.18	-
sp.33	H	Blanco	Dicotómica	0.15	-
sp.37	H	Café	Irregular-Pinnada	0.15	-
sp.46	E	Blanco	Monopodial	-	0.09
sp.44	L	Café	Coraloide	-	0.06
sp.47	L	Anaranjado	Coraloide	-	0.06
sp.34	I	Blanco	Dicotómica	0.06	-
sp.35	I	Rosa	Dicotómica	0.06	-
sp.45	Q	Anaranjado	Dicotómica	-	0.03
sp.23	H	Rosa	Dicotómica	0.03	-
sp.50	P	Café	Irregular-pinada	-	-
sp.52	H	Café	Monopodial	-	-

¶ = *Cenococcum geophilum*, § = *Cadophora* aff. *finlandica*; Manto (A-Q referidos de acuerdo a Demmy, 2008); DL= Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones; ZOQ = Parque Nacional Zoquiapan; % AR= Porcentaje de la abundancia relativa basada en el número total de raíces cortas ECM.

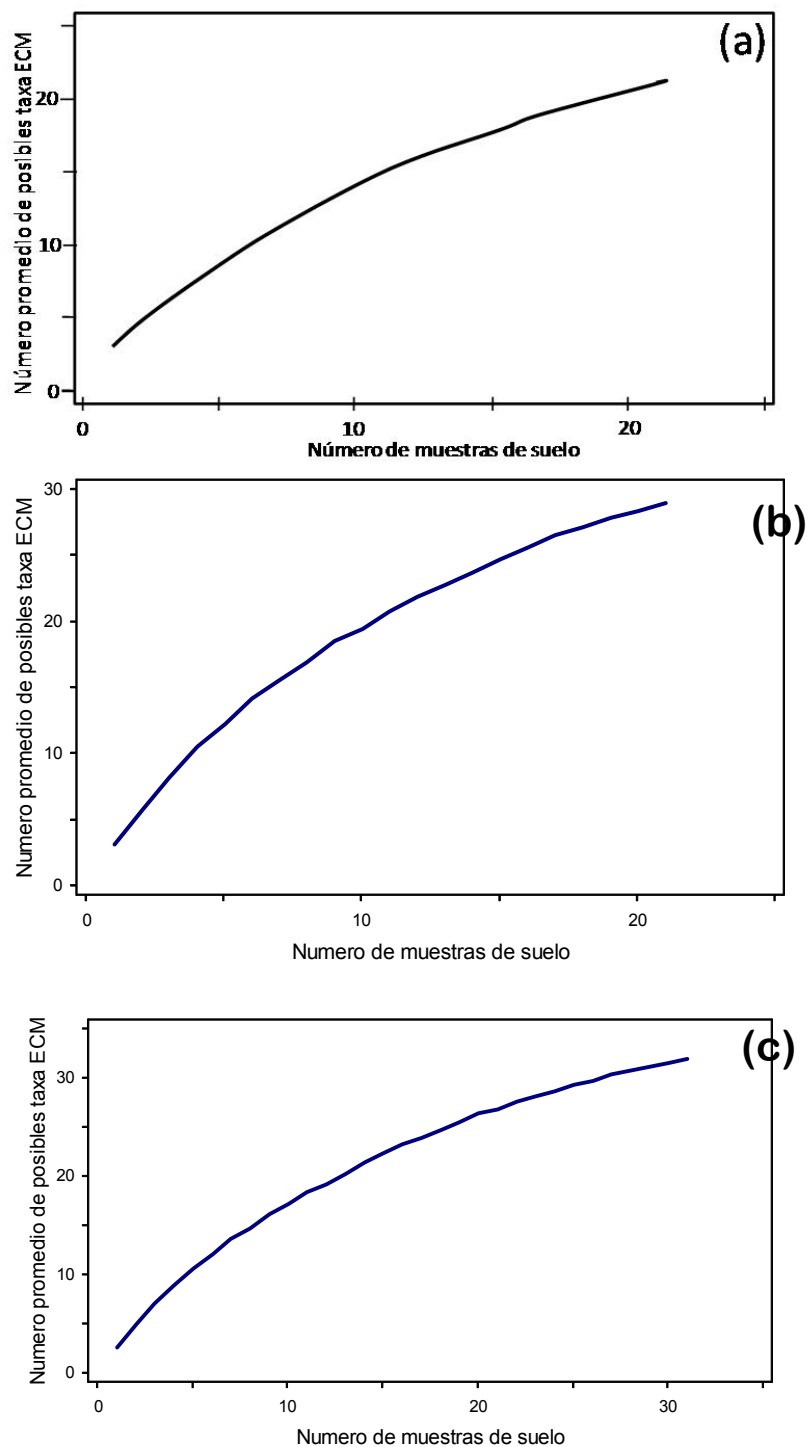


Figura 4.7. Curvas de esfuerzo de muestreo Parque Nacional Zoquiapan. (a) Otoño 2006 con 21 muestras de suelo. (b) Verano 2007 con 21 muestras de suelo. (c) Otoño 2007 con 31 muestras de suelo.

Para el caso del DL (Figura 4.8) las Curvas de esfuerzo de recolección de otoño 2006 basada en 21 muestras de suelo, presentó una curva con 10 taxa y con tendencia asintótica. Sin embargo, en el verano 2007 se detectó un cambio en esta tendencia al registrarse 14 taxa ECM, siendo las estimaciones de jackknife de primero y segundo orden 20.7 y 25.3 especies respectivamente. Como se pudo observar tanto en ZOQ como en DL solo fue posible captar dos terceras partes de los taxa presentes en dichas comunidades, independientemente del esfuerzo de recolección basado en el número de muestras de suelo (21/31). Sin embargo, es necesario puntualizar que en el DL la riqueza de especies es comparativamente menor a la observada en ZOQ.

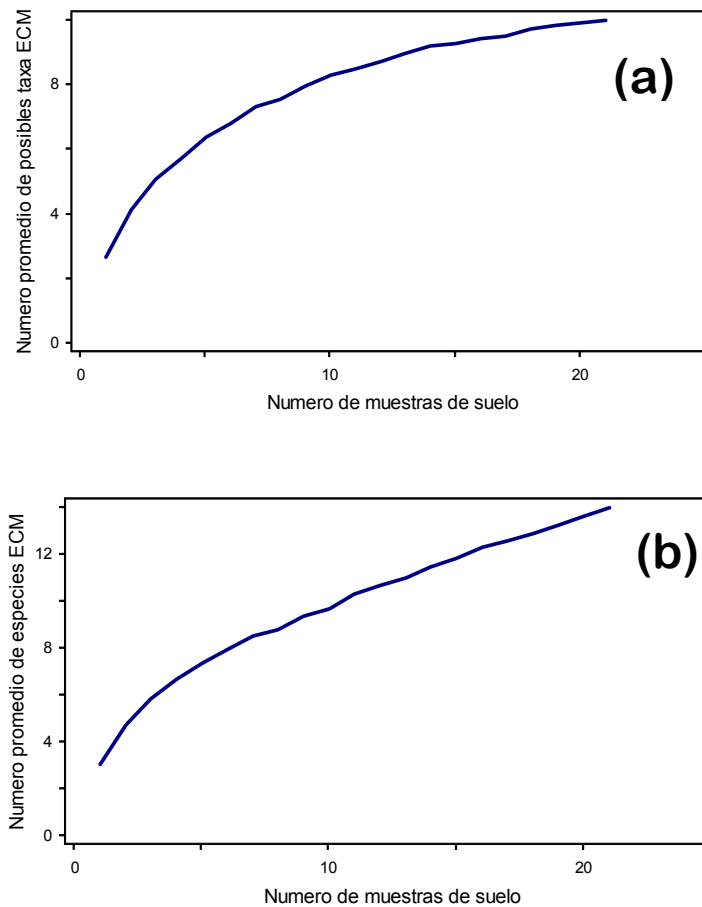


Figura 4.8. Curvas de esfuerzo de muestreo en el Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones con 21 muestras de suelo. (a) Otoño, 2006. (b) Verano 2007.

En ZOQ durante el primer año de muestreo (otoño de 2006) destacaron por su abundancia relativa sp.6 (*C. geophilum*) con 40 %, sp. 14 con 10 % y sp. 19 con 9 %, constituyendo estos tres taxa el 59 % del total (Figura 4.9 y Figura 4.10). En el segundo año de muestreo (verano de 2007) existió un cambio en la composición de morfo-anatotipos más abundantes. En ZOQ los morfo-anatotipos que destacaron por su mayor abundancia relativa fueron: sp. 9 con 17 %, sp.10 con 16 % y sp. 6 (*C. geophilum*) con 9 %, constituyendo el 42 % del total (Figura 4.9 y Figura 4.10). En el primer año de muestreo (otoño de 2006) el índice de diversidad de Shannon-Wiener (H') mostró que la localidad de ZOQ existió una alta riqueza de especies con 21 taxa de hongos ECM ($H' = 2.289$). En el segundo año de muestreo (verano de 2007) en la localidad de ZOQ se detectaron otras especies, y de igual forma que el primer año se apreció una alta riqueza con 34 morfo-anatotipos de hongos ECM ($H' = 2.723$) y una mayor equitabilidad (0.808).

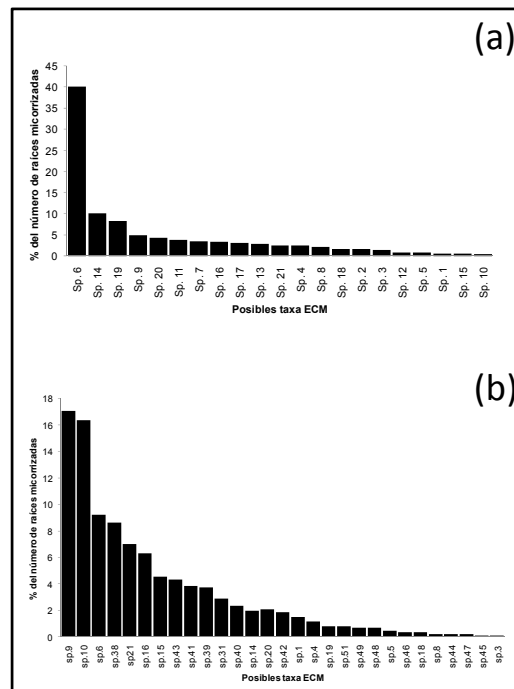


Figura 4.9. Cambios en la composición de morfo-anatotipos ectomicorrízicos encontradas por sitio y año de muestreo, ordenados en base a la abundancia relativa de cada taxa del Parque Nacional Zoquiapan, (a) muestreo otoño 2006, (b) muestreo verano 2007.

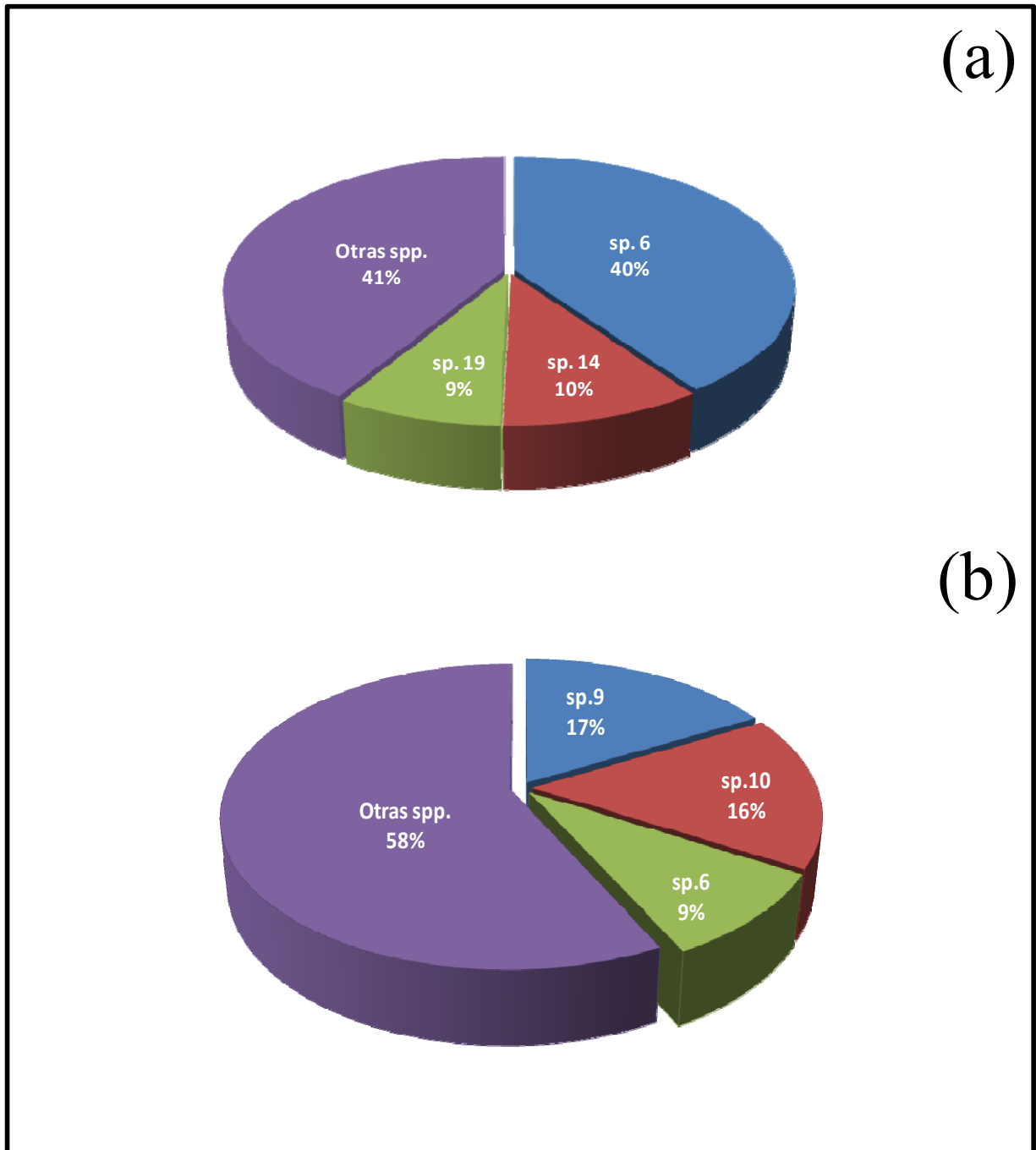


Figura 4.10. Porcentajes de los tres morfo-anatotipos ectomicorrízicos más sobresalientes que representaron (a) 42 % del total en el muestreo otoño 2006 y (b) 59 % del total en el Parque Nacional Zoquiapan; sp. 6 = *Cenococcum geophilum*.

En tanto que en DL los morfo-anatotipos de las ectomicorrizas predominantes fueron: sp. 22 con 40 %, sp. 6 (*C. geophilum*) con 19 % y sp.27 con 13 %, constituyendo el 72 % del

total (Figura 4.11 y Figura 4.12). En el sitio DL los morfo-anatotipos más abundantes fueron sp.6 (*C. geophilum*) con 36 %, sp. 26 con 20 % y sp. 27 con 13 % las cuales constituyeron el 69 % del total de los taxa recolectados para este sitio (Figura 4.11 y Figura 4.12). En el primer año en DL se observaron 10 taxa de hongos ECM ($H' = 1.775$) y en el segundo año (2007) se observaron 17 taxa de hongos ECM ($H' = 1.752$) y una equitabilidad menor de (0.664) ver anexo 1

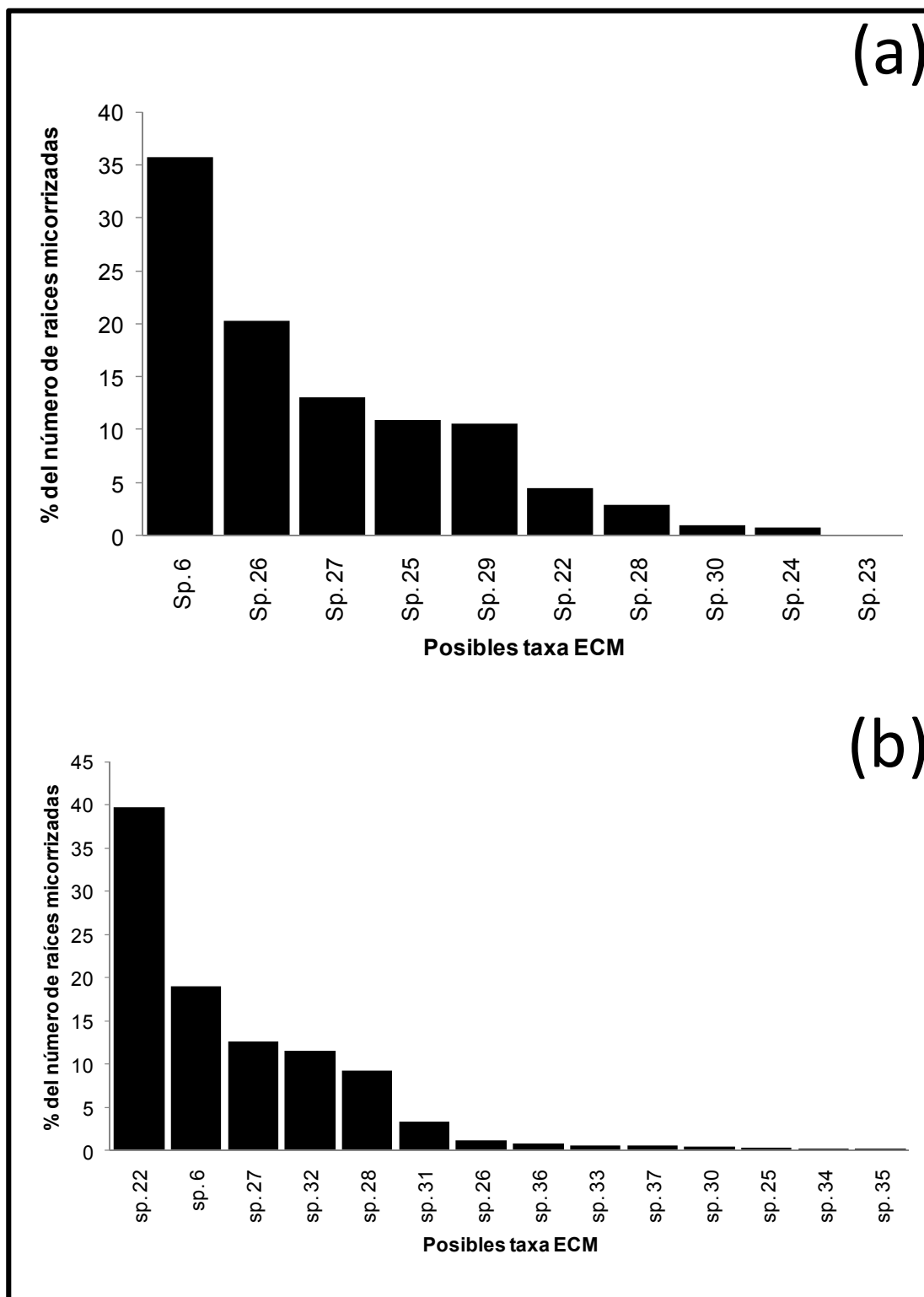


Figura 4.11. Cambios en la composición de morfo-anatotipos ectomicorrízicos encontradas por sitio y año de muestreo y ordenados en base a la abundancia relativa de taxa del Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones, (a) muestreo otoño 2006, (b) muestreo verano 2007.

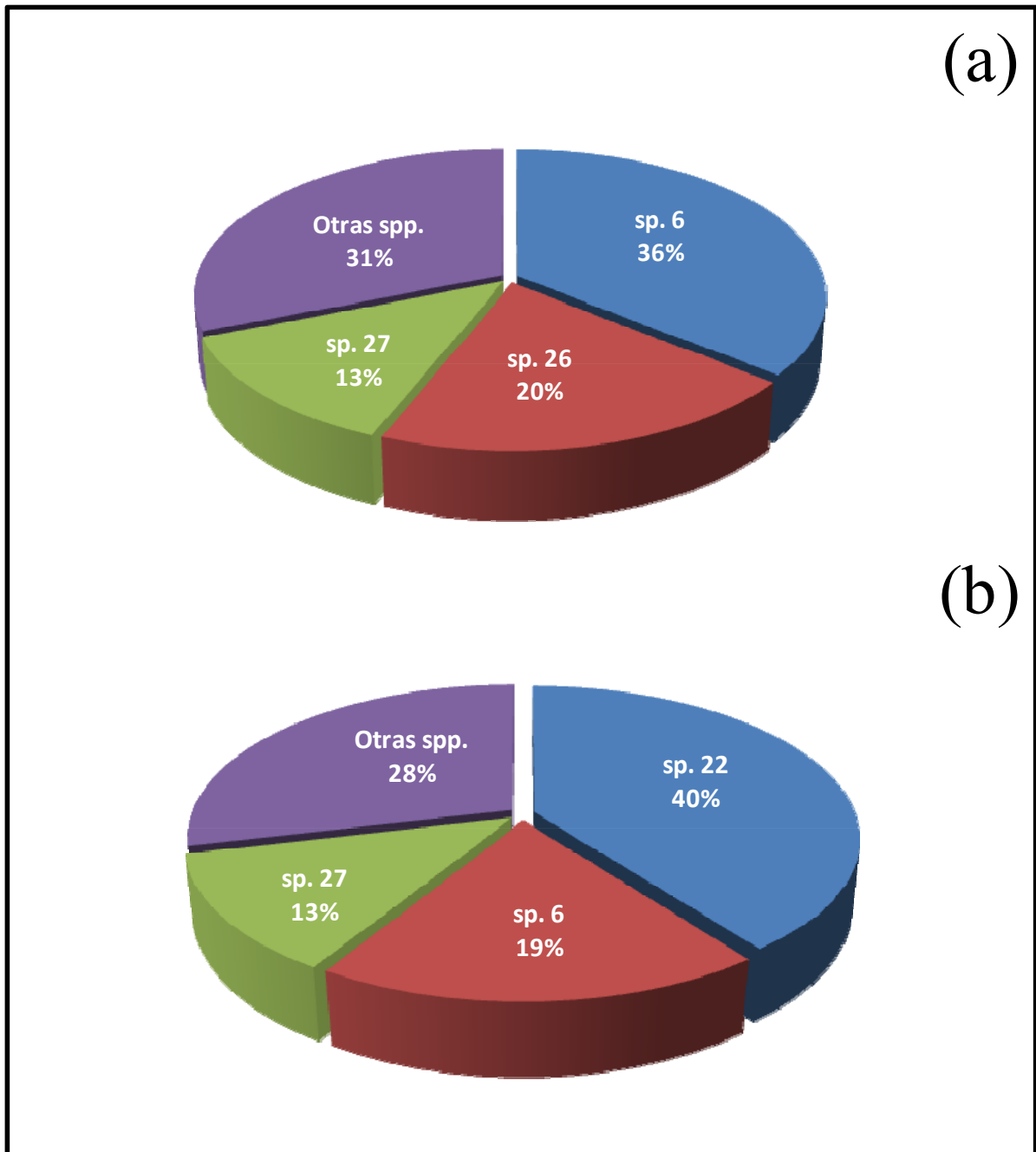


Figura 4.12. Porcentajes de los morfo-anotipos ectomicorrízicos más sobresalientes que representaron (a) 69 % del total en el muestreo otoño 2006 y (b) 72 % del total en el Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones; sp.6 = *Cenococcum geophilum*.

4.6.1.3. Beta diversidad (β)

Se estudió la distribución espacial del número de taxa y el promedio de raíces ECM en las 21 muestras de suelo tomadas a lo largo de los transectos (0m a 100m) por año/estación en ZOQ y DL (Cuadro 4.3 y 4.4). En ambos sitios se observó una gran variación en el número de raíces micorrizadas en cada punto de muestreo a lo largo del transecto al sumarizar los dos años de estudio y del número total de taxa presentes (Figuras 4.13a,b y 4.14a,b).

CAPÍTULO IV: COMUNIDADES ECTOMICORRIZICAS EN BOSQUES Y CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS.

Cuadro 4.3. Distribución de taxa ECM y él % de su abundancia relativa en las muestras de suelo tomadas a lo largo de los transectos de 100m en otoño 2006/verano 2007 en el Parque Nacional Zoquiapan.

Pt	0 m	5m	10 m	15 m	20 m	25 m	30 m	35 m	40 m	45 m	50 m	55 m	60 m	65	70 m	75 m	80 m	85 m	90 m	95 m	100m										
Año	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07									
sp.1	0.57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-									
sp.2	-	0.57	-	-	1.14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.05									
sp.3	-	-	0.12	1.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-									
sp.4	-	-	1.14	0.92	-	-	0.35	-	0.46	-	-	0.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-									
sp.5	-	-	-	-	-	-	-	0.47	-	-	-	-	-	-	0.80	-	-	-	-	-	-	-									
sp.6	0.11	0.11	0.46	3.85	1.37	3.09	1.49	1.95	0.57	0.34	2.86	1.52	6.75	3.66	1.95	4.00	1.40	1.49	0.23	-	1.37	0.12	1.37	0.23	-	0.69	2.10				
sp.7	-	-	-	-	-	3.55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
sp.8	-	-	-	-	0.11	0.57	0.34	0.12	-	-	-	0.92	0.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.12			
sp.9	-	-	-	-	7.35	-	4.92	-	-	0.12	3.62	0.35	-	-	0.70	1.05	0.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
sp.10	4.20	3.85	-	-	-	-	0.46	-	-	-	0.58	7.35	0.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
sp.11	-	-	-	-	-	-	3.89	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
sp.12	-	-	-	-	-	-	0.34	0.46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
sp.13	-	-	-	-	-	-	-	-	2.86	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
sp.14	-	-	-	-	-	-	-	-	1.98	-	6.06	-	0.23	-	0.69	-	0.34	-	0.12	0.11	-	2.75	-	-	-	-	-	-			
sp.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.34	0.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.55		
sp.16	-	-	-	-	-	-	0.47	-	-	2.80	-	-	3.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
sp.17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.37	1.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
sp.18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.69	1.03	-	-	-	-	-	-	-	0.35	-	-	-	-	-	-	-		
sp.19	-	-	-	-	-	-	-	-	0.70	-	-	-	-	-	1.95	6.41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.12		
sp.20	-	-	-	-	-	-	-	-	1.40	-	-	-	-	-	-	-	2.63	0.58	1.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
sp.21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.72	-	0.92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.14	0.46	1.28
sp.31	-	-	0.70	-	-	-	-	-	0.12	-	0.12	0.93	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.38	-	-	2.10	0.23	-	2.68	3.62	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.39	-	-	-	-	1.98	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.40	-	-	1.75	-	1.28	1.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.41	-	-	-	-	-	-	-	-	3.85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.35	-	-	1.52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.35	
sp.47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.23	
sp.48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.70	
sp.49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.82	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Pt: posición en el transecto; 06: 2006; 07: 2007; (-): sin abundancia relativa

CAPÍTULO IV: COMUNIDADES ECTOMICORRIZICAS EN BOSQUES Y CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS.

Cuadro 4.4. Distribución de taxa ECM y el % de su abundancia relativa en las muestras de suelo tomadas a lo largo de los transectos de 100m en otoño 2006/verano 2007 en el Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones.

Pt	0 m	5 m	10 m	15 m	20 m	25 m	30 m	35 m	40 m	45 m	50 m	55 m	60 m	65 m	70 m	75 m	80 m	85 m	90 m	95 m	100m																								
Año	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07	06	07																							
sp.6	0.53	1.94	0.53	0.23	1.32	0.00	5.95	-	4.10	0.68	6.88	6.50	0.79	2.28	0.40	0.34	1.59	0.34	1.59	-	0.46	-	0.46	-	0.34	1.59	-	3.17	-	0.57	-	-	1.48	0.13	0.13	0.11	0.13	0.80	-	0.23					
sp.22	1.46	-	-	39.68	-	-	-	-	-	-	0.66	-	0.66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
sp.23	0.13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
sp.24	0.79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
sp.25	0.53	-	-	-	-	-	-	-	2.12	-	6.88	-	-	-	1.06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
sp.26	1.72	-	1.32	-	0.53	-	-	-	0.13	-	0.26	-	0.26	-	0.26	-	0.53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
sp.27	0.26	-	-	-	0.34	0.26	0.57	-	4.56	0.66	0.80	-	0.91	2.78	0.11	0.66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
sp.28	-	-	-	-	1.25	-	-	-	-	-	-	-	1.46	-	-	-	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
sp.29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.31	0.11	-	-	-	0.57	-	0.34	-	-	-	-	-	0.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.32	-	-	-	-	2.96	-	1.71	-	1.37	-	1.37	-	3.08	-	0.34	-	1.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sp.33	-	-	-	-	-	-	0.23	-	-	-	0.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sp.34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sp.35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sp.36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sp.37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Pt: posición en el transecto; 06: 2006; 07: 2007; (-): sin abundancia relativa.

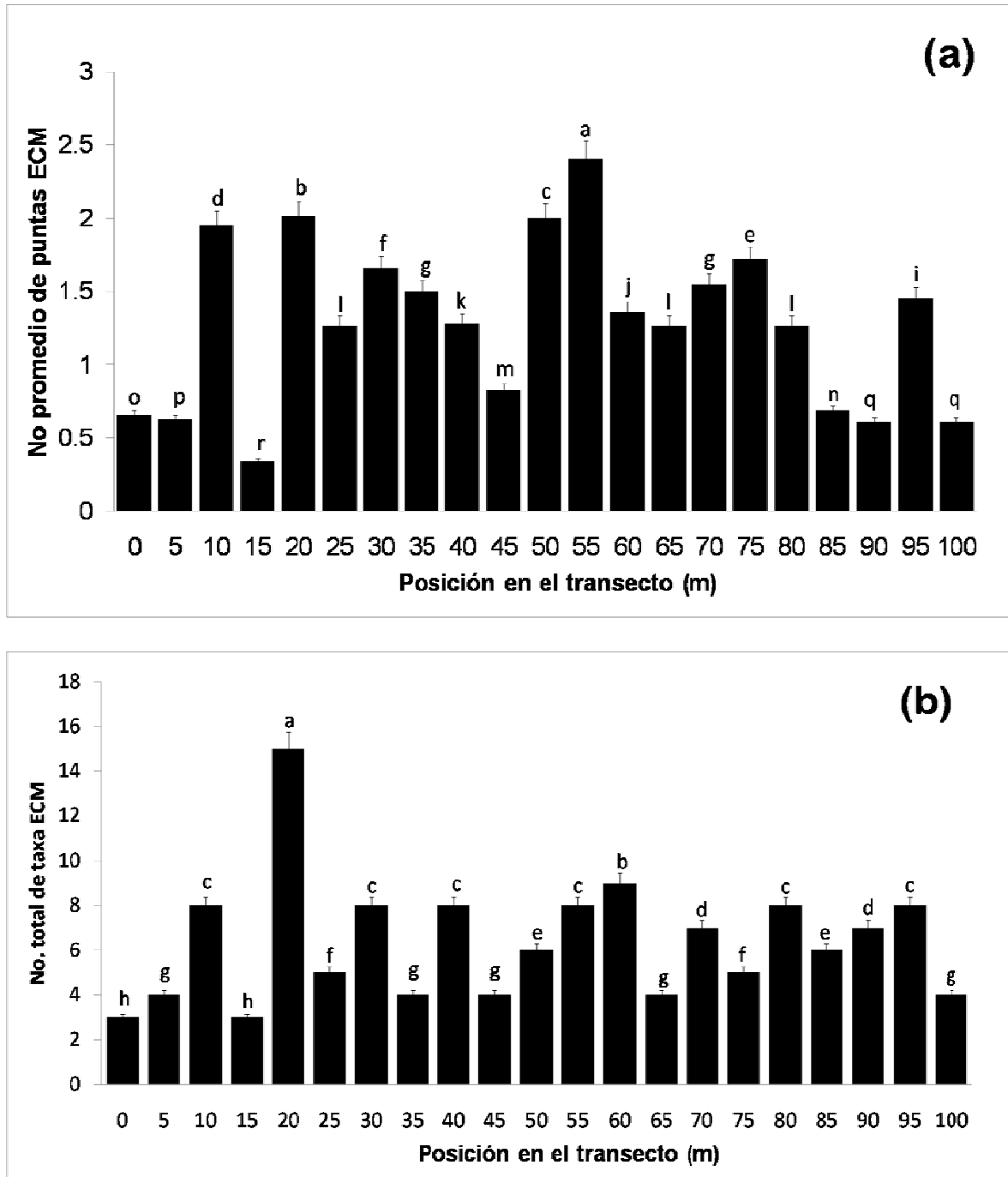


Figura 4.13. Distribución del número de raíces y taxa ECM a intervalos de 5m, lo largo del transecto de 100m (2006/2007) en el Parque Nacional Zoquiapan. (a) No promedio de raíces ECM por muestra de suelo. (b) No. total de la riqueza de taxa ECM. Un cambio de letra sobre una barra indica diferencias estadísticas, según la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$). Las líneas sobre las barras representan el error estándar de la media.

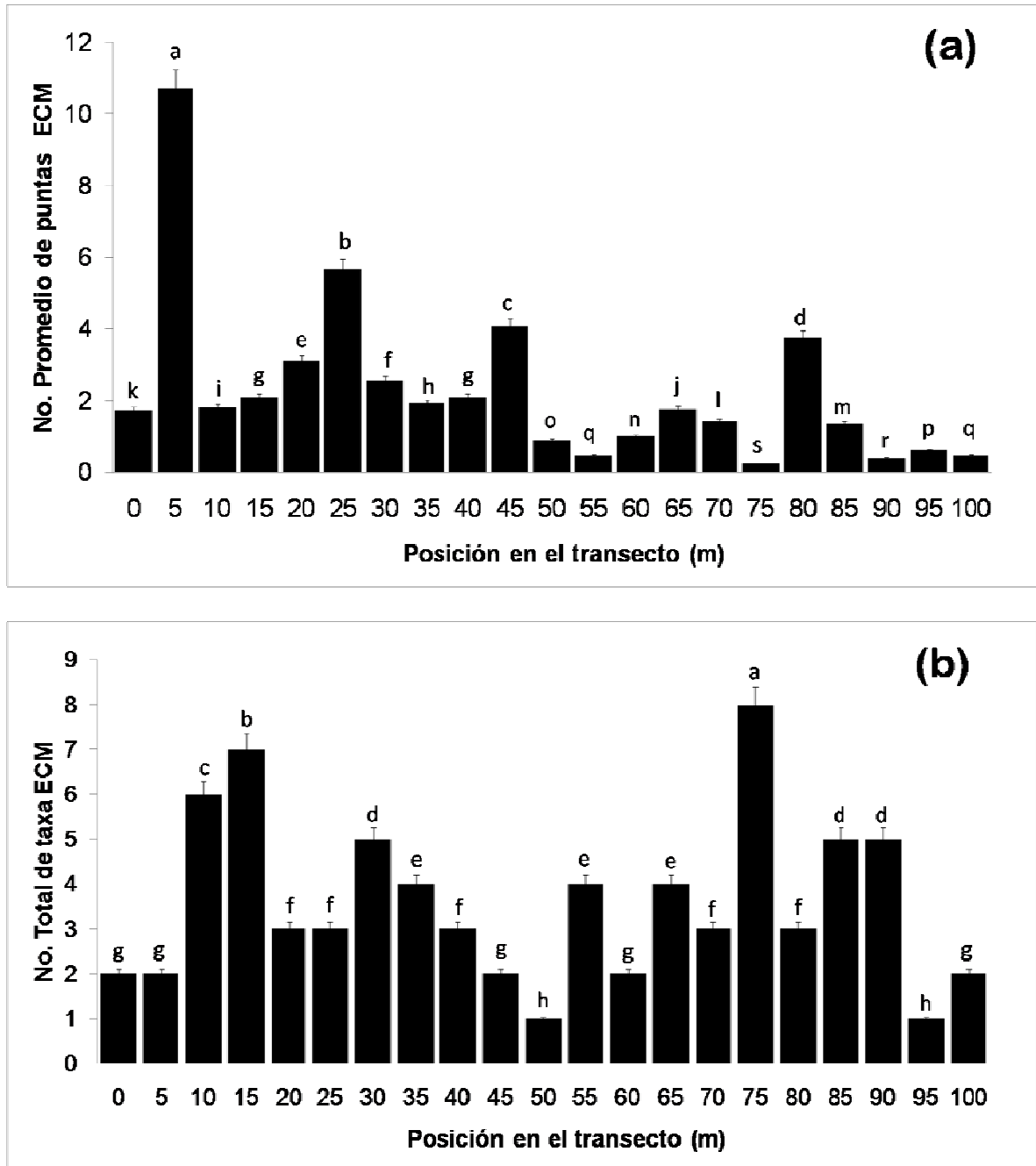


Figura 4.14. Distribución del número de raíces y taxa ECM a intervalos de 5m, lo largo del transecto de 100m (2006/2007) en el Parque Recreativo y Cultural Desierto de los Leones. (a) No promedio de raíces ECM por muestra de suelo. (b) No. total de la riqueza de taxa ECM. Un cambio de letra sobre una barra indica diferencias estadísticas, según la prueba de comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$). Las líneas sobre las barras representan el error estándar de la media.

4.6.2. Coeficiente de comunidad

Se utilizó el índice de Sørensen para investigar los niveles de similaridad entre los dos sitios y la época de muestreo. Los resultados muestran que los niveles de similaridad observados en ZOQ-2006 y ZOQ-2007 (índice de Sørensen = 60%) y DL-2006 y DL-2007 (índice de Sørensen = 58.33 %) presento variaciones que pueden ser atribuidas a un efecto estacional. Por otra parte, cuando se analizaron ZOQ y DL en forma independiente se observó un nivel de similaridad muy bajo (índice de Sørensen = 7.54%), compartiendo únicamente dos especies en común, lo que indica que la composición de especies entre los sitios estudiados pudiera estar siendo afectada por factores de sitio pero también por factores exógenos vía contaminación atmosférica como el depósito de nitrógeno, entre otros muchos (cuadro 4.5).

Cuadro 4.5. Índice de similaridad de Sorensen en los dos sitios y dos años de muestreo.

Sitio y año	ZOQ-2006	ZOQ-2007	DL-2006	DL-2007
DL-2006	6.45	5.12	-	58.33
DL-2007	5.12	9.30	58.33	-
ZOQ-2006	-	60	6.45	5.12
ZOQ-2007	60	-	5.12	9.30

DL= Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones; ZOQ = Parque Nacional Zoquiapan.

4.6.3. Características edáficas de los sitios de estudio

Algunas características específicas de los sitios de estudio observados en ZOQ y DL fueron los siguientes: los suelos fueron ácidos para ambos lugares, sin embargo presentaron diferencias significativas en la conductividad eléctrica y el contenido de N y P. Se observaron valores más altos en ZOQ en comparación con DL. Específicamente en los sitios donde se realizó el muestreo en ZOQ y DL predomina el suelo andosol-húmico con clase textural media del tipo migajón (Cuadro 4.6). El suelo de ZOQ tuvo un alto contenido

de materia orgánica en comparación con DL. El sitio ZOQ tiene una precipitación menor en relación con el sitio DL que presenta lluvias torrenciales y un mayor número al año, en el DL y ZOQ. Cuando se realizaron las regresiones lineales de los factores de pH, CE, % Humedad, N y P en relación con el número de raíces cortas ECM vivas y muertas no existió una relación directa que afectara el comportamiento entre estos factores.

Cuadro 4.6. Valores y promedio de características edáficas y número de raíces cortas vivas micorrizadas y muertas del Parque Nacional Zoquiapan. Y del Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones.

Punto de muestreo	pH		% Humedad		CE mS/cm		N (%)		P (ppm)		ZOQ (Número)		DL (Número)		RCV-ECM		
	DL	ZOQ	DL	ZOQ	DL	ZOQ	DL	ZOQ	DL	ZOQ	RCM	ZOQ	RCM	ZOQ	RCM	ZOQ	RCV-ECM
1	5.530	5.410	76.908	55.760	0.010	0.107	0.44	0.36	4	7	10	38	10	38	36	36	18
2	5.490	5.520	57.612	55.368	0.011	0.162	0.37	0.51	4	7	4	141	4	141	34	34	350
3	5.430	5.230	45.955	52.539	0.011	0.086	0.26	0.48	3	8	39	75	39	75	98	98	47
4	5.080	5.200	69.546	62.913	0.065	0.226	0.36	0.53	3	12	15	33	15	33	2	2	23
5	5.190	5.530	75.831	62.759	0.032	0.162	0.30	0.44	3	8	19	59	19	59	91	91	58
6	5.500	5.370	49.311	86.264	0.032	0.184	0.30	0.60	4	8	31	73	31	73	32	32	67
7	6.050	5.410	41.271	72.869	0.011	0.184	0.19	0.55	3	3	29	37	29	37	39	39	63
8	5.690	5.510	51.871	73.066	0.011	0.043	0.36	0.55	4	5	22	3	22	3	4	4	11
9	5.560	5.370	53.350	71.939	0.032	0.217	0.29	0.60	4	4	18	21	18	21	69	69	7
10	5.670	5.350	61.873	58.616	0.009	0.141	0.29	0.50	3	7	1	47	1	47	25	25	30
11	5.030	5.510	52.757	70.443	0.054	0.130	0.24	0.46	3	8	12	17	12	17	50	50	5
12	5.200	5.600	37.910	74.012	0.076	0.130	0.30	0.37	3	9	13	48	13	48	84	84	16
13	5.780	5.340	48.459	56.376	0.003	0.076	0.27	0.38	3	10	46	10	46	10	14	14	18
14	5.230	6.030	34.129	71.921	0.043	0.054	0.23	0.58	3	8	35	34	35	34	55	55	25
15	5.570	5.540	31.690	72.239	0.017	0.217	0.36	0.33	3	5	30	54	30	54	34	34	13
16	5.310	5.590	35.729	67.677	0.033	0.097	0.21	0.27	2	2	34	9	34	9	41	41	8
17	5.490	5.560	45.379	48.658	0.043	0.141	0.31	0.39	9	13	42	10	42	10	47	47	42
18	5.560	5.110	48.564	44.807	0.001	0.196	0.21	0.41	4	7	29	8	29	8	5	5	46
19	6.000	5.530	46.419	68.304	0.087	0.130	0.32	0.37	3	5	17	35	17	35	11	11	9
20	5.680	5.550	52.715	61.796	0.001	0.163	0.40	0.47	5	3	16	7	16	7	57	57	7
21	5.100	5.870	60.278	60.643	0.032	0.130	0.36	0.43	4	5	44	9	44	9	29	29	14
Promedio	5.483 a	5.482 a	51.312 b	64.237 a	0.029 b	0.142 a	0.303 b	0.456 a	3.667 b	6.857 a	24.09a	36.57a	24.09a	36.57a	40.80a	40.80a	41.76a
CV	5.15	3.77	24.42	15.59	85.10	36.96	21.95	20.40	37.92	41.32	0.544	0.889	0.544	0.889	0.679	0.679	1.756

CE= Conductividad eléctrica; N= nitrógeno; P= fósforo; RCM=raíces cortas muertas; RCV-ECM= ectomicorizadas; Valores con la misma letra dentro de cada variable son iguales de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Tukey (P<0.05), n= 21, CV= Coeficiente de variación dado en porcentaje.

4.7. DISCUSIÓN

En este trabajo se reconocieron un total de 52 morfo-anatotipos en los bosques de *P. hartwegii* en DL y ZOQ, resultando importante destacar que en México existen pocos trabajos relacionados con el estudio de las comunidades de hongos ECM en las raíces micorrizadas de los pinos mexicanos. Recientemente Valdéz *et al.* (2009) presentaron un interesante estudio sobre comunidades ectomicorrízicas en *Pinus oaxacana* en bosques del sureste de México, bajo diferentes tratamientos silvícola (árboles semilleros, árboles semilleros + fuego, control) en cinco cuadrantes de 6m x 6 m y en los que se registraron la presencia de 41 taxa que formaron esporomas (en realidad fueron 40, ya que en la lista aparece *Cenococcum geophilum* que es un ascomiceto mitospórico). Además lograron diferenciar 42 morfotipos ITS-RFLP-taxa en las raíces de *P. oaxacana* que contrasta con los 52 registrados en este trabajo en *P. hartwegii*. Dichos autores reportaron que 16 morfotipos tuvieron patrones similares de ITS-RFLP con los esporomas observados. Sin embargo, dado que las conclusiones estuvieron basadas mayormente en la presencia-ausencia de esporomas/morfotipos y no se presentaron datos cuantitativos de la estructura de comunidades, no es posible establecer mayores comparaciones con los datos aquí presentados.

En relación a los ejercicios realizados para detectar el mayor número de taxa de las comunidades estudiadas mediante (1) el establecimiento de muestreos en diferentes estaciones del año y (2) el incrementar el esfuerzo de recolección en el número muestras de suelo (de 21 a 31) en el sitio con mayor riqueza de especies: en el primer caso fue posible detectar un mayor número de taxa ECM muestreando en otoño 2006 y verano 2007 y así

evitar atribuir los cambios en riqueza de especies al depósito de N, pudiéndose observar que se debió a un efecto estacional, tal y como ha sido reportado por Koide *et al.* (2004) y que se discutirá más adelante. Sin embargo, se pudo observar que el cambio en composición de taxa ECM pareció ser independiente al efecto estacional registrado en la riqueza de taxa. En el segundo caso no fue posible detectar teóricamente, y de acuerdo a los estimadores jackknife de primer y segundo orden (Burnham and Overton, 1979; Palmer 1991) un tercio de los taxa presentes en las comunidades de hongos ECM. Por lo tanto es importante hacer notar las recomendaciones de Villarreal-Ruiz (2006) sobre la importancia de realizar estudios pilotos observacionales previos en este tipo de estudios, para estimar el esfuerzo de recolección necesario en la toma de muestras que por una parte sean manejables durante su procesamiento en el laboratorio y que además nos permitan detectar una proporción significativa de los taxa ECM presentes en las comunidades estudiadas.

A pesar de la importante riqueza y alta diversidad de hongos ECM que se encuentran en los bosques naturales (Agerer, 2006; Gehring *et al.*, 1998; Bruns, 1995), los resultados encontrados en la presente investigación indican que existieron diferencias en la composición y una baja similaridad de especies entre ZOQ y DL. , lo cual podría atribuirse, con las reservas del caso, a las diferencias en depósito de N atmosférico reportadas por Fenn *et al.* (1999), aunque existen factores del sitio que pueden contribuir con estas diferencias en la composición de taxa ECM.

En línea con los resultados obtenidos en esta investigación, Peter *et al.* (2001) encontraron que la adición de N tiene efectos en la composición de los hongos ECM a nivel de la raíz.

Estos investigadores mencionan que algunas especies ECM presentaron cambios significativos en abundancia dos años después de la adición de N. Los cambios más significativos fueron observados en *Russula laricina*, que fue una de las especies más abundantes a nivel de raíz antes de la aplicación de N y que decreció drásticamente en el segundo año después de la aplicación de este elemento. Los valores altos de equitabilidad en el sitio ZOQ en el último año indican que el número de morfo-anatotipos encontrados en esta área es mayor y están mejor distribuidos. La equidad varió dependiendo de la localidad y existió la dominancia de una o un número reducido de morfo-anatotipos en el sitio DL. Margalef (1980) señala que las comunidades con dominancia de una ó pocas especies son siempre comunidades con poca diversidad, explicándose los valores relativamente bajos de la diversidad en el sitio DL-2007, donde dominan dos morfo-anatotipos, sp. 22 y sp. 6 (*C. geophilum*). En ZOQ-2007, la diversidad aumentó debido a que la dominancia se distribuye entre cinco posibles morfo-anatotipos (sp. 9, sp. 10, sp. 6, sp. 38, sp.21). Al respecto, Koide *et al.* (2004) mencionan que la estructura de las comunidades de hongos ECM puede variar después de un tiempo, ya que algunos hongos ECM podrían cambiar temporalmente en frecuencia de aparición por efecto estacional. Estos hongos son afectados por la concentración de carbohidratos de las raíces, la textura y la temperatura del suelo, así como otros factores ambientales. Las comunidades encontradas en la presente investigación se caracterizaron porque existieron pocos morfo-anatotipos que fueron abundantes, lo cual es característico en comunidades de hongos ECM (Karen y Nylund, 1996; Gehring *et al.*, 1998).

C. geophilum fue la ectomicorriza más abundante en ZOQ y DL en el primer año de muestreo. Valentine *et al.* (2004) mencionan que una posible razón de la prevalencia de este taxa se debe a que frecuentemente crece sobre el tejido de las raíces muertas. Ello concuerda con Koide *et al.* (2004) quienes observaron que *C. geophilum* fue la especie más abundante encontrada y es considerada como una especie “cosmopolita”. La persistencia de esta puede deberse a su habilidad para excluir a otras especies que colonizan las raíces (Fleming, 1985). La exclusión de algunas especies ECM puede ocurrir como consecuencia de la competencia, o en algunos casos, esto puede involucrar la producción de sustancias químicas inhibitoras (Koide *et al.*, 2004). También la exclusión competitiva puede estar relacionada con la tolerancia de algunas especies a las diferentes condiciones del suelo. Por ejemplo Koide *et al.* (1998), presentaron una comparación entre varias especies de hongos ECM, reportando que *Cenococcum* tenía una alta tolerancia a los extractos de las acículas de pinos que contienen una alta concentración de taninos.

Otro morfo-anatotipo ECM descubierto en la presente investigación y registrado por primera ocasión en México fue *Cadophora* aff. *finlandica*. *C. finlandica* es un ascomyceto mitospórico frecuentemente confundido con *C. geophilum* por su morfología externa, aunque su manto externo es completamente diferente. En algunos estudios *C. finlandica* ha sido reportada como formadora de ECM, ectendomicorrizas (ECEM) incluso en la misma planta huésped y micorriza ericoide (ERM) en diferentes plantas Ericales (Villarreal-Ruiz *et al.*, 2004; Vrålstad, 2002). Todos estos reportes sugieren que *C. finlandica* es un hongo que puede actuar como ERM y ECM y por lo tanto los hongos que las forman pueden pertenecer a un mismo consorcio (Vrålstad, 2004).

Las plantas ericales han sido reconocidas como un grupo importante, por su distribución mundial e importancia económica; y algunas de ellas dominan de vastas áreas del hemisferio norte. Tradicionalmente se pensaba que la mayoría de hongos que forman micorizas ericoides son Ascomycetes y que la mayoría de los basidiomycetes forman ectomicorizas (Smith y Read, 1997). Sin embargo existe evidencia creciente de que tanto el arbolado de gimnospermas y angiospermas y los arbustos de Ericales de zonas mediterráneas, templadas y boreales, son colonizadas por grupos de hongos micorrízicos (Asco- y Basidiomycetes), con características taxonómicas y funcionales similares (Aëlle *et al.* 2009, Vrålstad, 2000, 2002a y 2002b, Villarreal-Ruiz *et al.*, 2004, Vrålstad, 2004). Resulta importante mencionar que los aspectos funcionales de las micorizas ericoides se basa en el comportamiento de *Rhizoscyphus ericae* anteriormente llamada “*Hymenosyphus ericae*” (Aëlle *et al.* 2009). *R. ericae* es parte de un complejo de especies que también incluyen hongos que forman la ectomicoriza conocida como *Piceirhiza bicolorata* (Vrålstad, 2000, 2002a), además de otras especies descritas por Hambleton y Singler (2005) *Meliniomyces variabilis*, *M. meliniomyces* y *M. bicolor*. Se ha demostrado que estos hongos pueden formar ECM o micorizas ericoides en las raíces de sus hospederos (Aëlle *et al.* 2009, Villarreal-Ruiz *et al.*, 2004).

En el presente estudio, el descubrimiento en México de *C. finlandica* indica que los arbustos ericoides, podrían estar interconectados físicamente por una red micorrízica común (RMC) y por lo tanto existir transferencia de carbono entre diferentes especies de plantas (Villarreal-Ruiz *et al.*, 2004, Vrålstad, 2004), tal y como lo demostraron Grelet *et al.* (2009).

4.7.1. Depósito de N atmosférico

En este estudio se encontró una reducción en la riqueza de especies en DL, con alrededor de 50% comparado con ZOQ. Estos resultados concuerdan con Lilleskov *et al.* (2002), quienes observaron un decremento del 70% en la riqueza de especies, así como cambios acentuados en la composición y la estructura de comunidades de hongos ECM en sitios con altos niveles de depósito de N atmosférico. Jonsson *et al.* (2000) reportan que la riqueza y diversidad de esporomas disminuyó en sitios con aplicación de N mineral, sin embargo la adición de N no afectó la riqueza y diversidad de las raíces cortas ECM. La fertilización nitrogenada tiene efectos mixtos sobre la mayoría de las micorrizas ya que en situaciones de deficiencia de N, la fertilización nitrogenada puede ayudar a incrementar el número de micorrizas, sin embargo, el N puede saturar rápidamente a los ecosistemas provocando una disminución de la abundancia de micorrizas a menudo dentro de los tres primeros años siguientes a la fertilización con N (Egerton-Warburton y Allen 2000). Bidartondo *et al.* (2001) mencionan que la tolerancia de las micorrizas a elevados niveles de N puede estar asociada con la actividad de la enzima deshidrogenasa, la cual elimina el hidrógeno en la molécula y puede ser uno de los factores que regulan la distribución de los hongos ECM de acuerdo al nivel de depósito atmosférico (alto ó bajo), y quizá por esta causa existió un porcentaje de similaridad bajo entre especies de ZOQ y DL donde solamente fueron dos las especies similares para ambos sitios. Por ejemplo Kraigher *et al.* (1996) en un estudio de un bosque de *Picea abies* encontraron que varias especies de hongos ECM desaparecieron, mientras que otras especies proliferaron en sitios con altos depósitos de contaminantes atmosféricos. De esta manera Kraigher *et al.* (2007) sugieren que *Hydnum rufescens* es una especie sensitiva a sitios contaminados y *Paxillus involutus* como insensible, y

posiblemente *C. geophilum* como especie abundante en sitios no contaminados. Sin embargo, la tendencia observada en el segundo año de este estudio indica que *C. geophilum* fue desplazado en ZOQ por otras especies que lo marginaron a un tercer lugar y en DL fue desplazado al segundo sitio. Las observaciones del presente estudio coinciden con los resultados reportados por Kraigher *et al.* (2007) en el sentido de que *C. geophilum* es una especie que se desarrolla mejor en ambientes no perturbados.

Lilleskov *et al.* (2002) especulan que el aumento de N, desplazará a las comunidades ECM, de taxones especializados en la absorción baja de N (*Cortinarius*, *Piloderma*), por taxa especializados en la absorción de altos niveles de nutrimentos (por ejemplo, *Tomentella sublilacina*, *Thelephora terrestris*) y finalmente hacia los taxones especializados en la absorción de P-bajo, N-alto y condiciones ácidas del suelo (por ejemplo, *Paxillus involutus*, *Lactarius theiogalus*).

4.7.2. Fijación de fósforo

Otro factor que podría estar influyendo en los cambios de las comunidades subterráneas de hongos ECM es la fijación del P. Marin *et al.* (2002) reportaron que los suelos volcánicos de los ecosistemas forestales (andisoles) tienen una alta capacidad de fijación de P y puede existir limitación de nutrimentos. Gusewell (2004) encontró que el P es un factor limitante en las plantas cuando existen altos niveles de N. Taniguchi *et al.* (2008) mencionan que las ectomicorrizas que prevalecen en ambientes enriquecidos con N tienen una alta capacidad para producir la enzima fosfatasa, que ayuda a absorber el P de sustancias difíciles de degradar. Por ejemplo *Lactarius subdulcis* está adaptado a crecer en ambientes orgánicos

ricos y tiene mayor capacidad para producir fosfatasa con respecto a *C. geophilum* (Buee *et al.* 2005). Taniguchi *et al.* 2008, en un experimento con plántulas de *Pinus thumbergii* inoculadas con siete hongos ECM recolectados en dos sitios con diferente nivel de depósito de N (alto y bajo) y fertilizadas con nitrato de amonio, encontraron que la capacidad de absorción de P fue mayor en los hongos ECM recolectados del sitio con alto depósito de N en comparación con las ECM recolectadas en el sitio con bajo depósito de N. Fenn *et al.* (2006) mencionan que posiblemente la deficiencia de P limita la capacidad de retención de N en el bosque de DL, en donde el P y N existentes no están siendo asimilados por las plantas, ya que este último elemento se pierde, y no sería extraño encontrar altos niveles de N en los arroyos y las aguas subterráneas de este lugar.

A pesar de las evidencias de los altos niveles de depósito de contaminantes atmosféricos que se presentan en el DL en comparación con ZOQ, no se descarta la posibilidad de que las diferencias encontradas en la riqueza y estructura de comunidades de hongos ECM, también podrían tener alguna influencia de los factores abióticos y la estacionalidad. Por ejemplo Becerra *et al.* (2007) mencionan que la colonización micorrízica fue influenciada positivamente por la alta conductividad eléctrica, materia orgánica y el N total encontrados en los suelos de los sitios muestreados, ya que la CE está relacionada con una alta disponibilidad de nutrimentos minerales.

4.7.3. Materia orgánica

En la presente investigación se observó un mayor número de morfo-anotipos ECM en ZOQ, posiblemente por el mayor contenido de materia orgánica en este lugar. Al respecto

Frank (1885) propuso la conocida “Teoría del N Orgánico” donde el papel primario de la simbiosis ECM era facilitar la transferencia de N de la materia orgánica del suelo a las raíces de las plantas. Desafortunadamente, durante los dos primeros tercios del siglo XX, esta idea recibió muy poca atención experimental y fue hasta los años 80s donde diversos investigadores demostraron que los hongos ECM producen una amplia variedad de enzimas capaces de degradar sustratos que constituyen parte de los materiales orgánicos del suelo (Leake y Read, 1997). En el presente trabajo, se detectó una mayor acumulación de humedad y materia orgánica en ZOQ en comparación con DL. Uno de las funciones que tiene la materia orgánica es reducir pérdidas de agua por evaporación (Ortiz y Ortiz, 1984). De esta forma la disponibilidad de agua afecta la nutrición y la fotosíntesis, lo cual es de central importancia en la fisiología de la planta. (Marjanovic y Nehls, 2008). Lodge (1989) demostró que la humedad del suelo tiene una fuerte influencia sobre los patrones de micorrización, bajo condiciones de alta disponibilidad de humedad del suelo la colonización ECM se incrementa. Gehrin *et al.* (2006) mencionan que las ECM son más susceptibles a factores de estrés hídrico en comparación de las micorrizas arbusculares. Saikkonen *et al* (1999) hipotetizaron que bajo condiciones de estrés ambiental en la planta hospedera hay una limitación en la transferencia de C a las ectomicorrizas, mientras que en condiciones ambientales favorables las plantas pueden traslocar más C y las ectomicorrizas pueden ser más eficientes en la toma de nutrientes. El suelo orgánico provee nutrientes, mantiene la humedad y la estructura, por lo tanto esto contribuye a la actividad de las ectomicorrizas formadas por algunos hongos *Boletales* y del género *Cortinarius*. Dichas especies ECM crecen preferentemente en el horizonte O (orgánico) ó A (humus), lo que

indica su preferencia por altos contenidos de materia orgánica, menor influencia de la contaminación ambiental y concentración de metales pesados DL (Ogawa, 1985).

4.7.4. Conductividad eléctrica

Los valores más altos de CE encontrados en ZOQ comparados con DL, se relacionan con una alta disponibilidad de nutrientes minerales. En la presente investigación no se presentaron diferencias estadísticas significativas en el número de raíces cortas ECM, pero si existió un ligero aumento de morfo-anatotipos en ZOQ con respecto a DL. Al respecto Becerra *et al.* (2005) reportaron que la CE afectó la colonización ectomicorrízica en *Alnus acuminata* en mayor medida que otros factores como: capacidad de campo, pH, fosforo disponible, N total y materia orgánica.

4.7.5. Otros factores a considerar

4.7.5.1. Temperatura

Otro posible factor que puede estar asociado con la declinación de ECM en el DL es el cambio en la temperatura, ya que en la Ciudad de México, la temperatura media anual ha cambiado de 14.5°C (en 1900) a 17.0°C en 1995 (Jauregui 2002). En el ámbito nacional se han aplicado algunos modelos de sensibilidad en el impacto y vulnerabilidad del Cambio Climático sobre los ecosistemas forestales en México (Gay 2000). Estos modelos simulan las condiciones de temperatura y precipitación que imperarían ante esas nuevas condiciones. Para el país se aplicaron los modelos creados por algunos laboratorios como el Geophysical Fluids Dynamic Laboratory (GFDL-R30), el Canadian Climatic Center Model

(CCCM), y el modelo de sensibilidad, en donde se supone un incremento en la temperatura de +2°C y -10% en la precipitación (Villers y Trejo, 1997).

Los bosques son factor clave en la mitigación del cambio climático (Magaña *et al.* 2004), ya que atrapan y almacenan bióxido de carbono, con lo cual contribuyen considerablemente a mitigar el cambio climático (FAO, 2006). Sin embargo, el cambio climático podría tener un importante impacto sobre el funcionamiento y la distribución de ecosistemas forestales, biodiversidad y sus recursos genéticos (Bawa, 1998). Recientemente se han observado cambios en poblaciones y comunidades, así como en su distribución, composición, estructura y funcionamiento debidos a cambios en el clima (McCarty, 2001).

4.7.5.2. Metales pesados

Los metales pesados también influyen en el deterioro de las condiciones naturales del suelo de DL y posiblemente en las comunidades ectomicorrízicas, considerando que Fenn *et al.* (2006) reportaron una alta concentración de Pb en la superficie del suelo a profundidades de 0-5 y 5-15 cm en DL con valores de 9.1 y 7.7 veces respectivamente más altos comparados con ZOQ, mientras que el Ni y Zn fueron 3-4 veces más altas en DL que en ZOQ. Stankeviciene y Peciulyte (2004) en un estudio a través de un gradiente de siete puntos de muestreo espaciados a diferentes distancias y grado de contaminación de una fábrica de fertilizantes en Lituania, encontraron que los sitios localizados de 3-5 km de la fábrica fueron los más contaminados por metales pesados y existió decremento en la formación de raíces micorrizadas en los bosques cercanos a la fábrica. Las más altas concentraciones de metales pesados fueron Zn, As, Cr y Ni.

4.8. CONCLUSIONES

- A pesar de las marcadas diferencias en el depósito de contaminantes atmosféricos en ZOQ y DL, no se observaron diferencias en la proporción de raíces micorrizadas vivas y muertas, sin embargo se encontró una gran variación en la proporción de raíces micorrizadas a lo largo del transecto, así como del número total de taxas ECM.
- Los muestreos en diferentes épocas del año incrementaron la riqueza de especies en cada uno de los sitios estudiados, lo que podría atribuirse a un efecto estacional y no a la presencia de contaminantes atmosféricos.
- La composición de taxa ECM fue diferente entre sitios e independiente al factor estacional, lo que podría sugerir el posible efecto de contaminantes atmosféricos como el depósito de N previamente reportado para ambos sitios, sin descartar otros factores de sitio.

4.9. RECOMENDACIONES

- Sería de gran importancia identificar cada una de las especies ectomicorrízicas encontradas empleando métodos de biología molecular en los dos sitios de estudio, ya que algunas especies pueden aparecer o desaparecer dependiendo el grado de contaminación del lugar.
- Es necesario hacer más estudios en México, relacionados con la diversidad y abundancia de comunidades ECM en sitios expuestos a diferentes niveles de depósito de contaminantes atmosféricos.

- Es necesario que en estudios futuros se tomen en cuenta los factores abióticos (suelo, pH, CE, etc) en diferentes épocas del año y así tener más elementos de discusión en los cambios de comunidades ectomicorrizicas de los bosques en México.
- En el trabajo de campo sería importante considerar más sitios de muestreo a través de un gradiente de depósito de N atmosférico y otros contaminantes de la fuente de emisión a la periferia.

4.10. LITERATURA CITADA

- Aber, J. W., Mc. Dowell, K., Nadelhoffer, A., Magil, G., Berntson, M., Kamakea, S., Mc. Nuty, W., Currie, L., Rustand I. and Fernandez, C. 1998. Nitrogen saturation in temperate forest ecosystem. *Bio Science* 11: 921-934.
- Agerer, R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Progress* 5:67-107.
- Aguilar, V. B., y Plateros, G. P. A. 2003. Monitoreo de Vegetación y Fauna en la Estación Forestal Experimental Zoquiapan. *In: Memoria de la XIX Presentación de Trabajos de Investigación, Producción y Servicio de la Universidad Autónoma Chapingo. Dirección General de Investigación y Posgrado. Chapingo, México. pp: 111-125.*
- Alvarado, R. D, Hernández, and Tejeda T. T. 2002. Decline of sacred fir in the Desierto de los Leones National Park. *In: M.E. Fenn, L.I. de Bauer and Hernandez T. T. (eds.), Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin. pp. 243-260. Ecological Studies 156. Springer-Verlag. New York.*
- Arce, A., N. L. y Yolanda, G. H. 1990. Estudio de la corteza del árbol como indicador de contaminación por la lluvia ácida en el parque Cultural y Recreativo Desierto de los

- Leones. Informe de Servicio Social del 2 de marzo de 1987 al 23 de agosto de 1988. Carrera de Biología. Departamento del hombre y su Ambiente. Universidad Autónoma Metropolitana. Plantel Xochimilco. 21 de febrero. 50 p.
- Arnolds, E. 1991. Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 35: 209-244.
- Bastian, G. R. M., LópezLópez, M. A., VelázquezMartínez, A. and PérezMoreno, J. 1998. Mycorrhizal and saprotrophic macrofungi in declining sacred-fir stands. *Micología Neotropical Aplicada* 11: 9-21.
- Bawa, K.S., Dayanandan, S. 1998. Global Climate Change and Tropical Forest Genetic Resources. *Climatic Change* 39: 473-485.
- Becerra, A. G., Arrigo, N. M., Bartonoli, N., Dominguez, L. S. and Cofre, M. N. 2007. Arbuscular mycorrhizal colonization of *Alnus acuminata* kunth in northwestern argentina in relation to season and soil parameters. *CI. Suelo* 25: 7-13
- Becerra, A., Karin, P., Nilda, A., Martha, P. and Norberto, B. 2005. Ecomycorrhizal colonization of *Alnus acuminata* Kunth in northwestern Argentina in relation to season and soil parameters. *Ann. For. Sci.* 62: 325-332.
- Bidartondo, M.I., Wallander, Ek. H. and Söderström, H. B. 2001. Do nutrient additions alter carbon sink strength of ectomycorrhizal fungi?. *New Phytol.* 151: 543-550.
- Bogeat-Triboulot, M. B., Bartoli, F., Garbaye, J., Marmeisse, R. and Tagu, D. 2004. Fungal ectomycorrhizal community and drought affect root hydraulic properties and soil adherence to roots of *Pinus pinaster* seedlings. *Plant and Soil* 267: 213-223.

- Brandrud, T. E. 1995. The effects of experimental nitrogen addition on the ectomycorrhizal fungus flora in a oligotrophic spruce forest at Gardsjon, Sweden. *Forest Ecology and Management* 71: 111-122.
- Bravo, A. H. and Torres, J. R. 2002. Air Pollution Levels and Trends in the Mexico City Metropolitan Area. pp. 121-159 *In: Fenn, M.E., de Bauer, L. I. and Hernandez T. T. (eds.), Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin.* pp. 121-159 *Ecological Studies* 156. Springer-Verlag. New York.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen *In: (Black, C.A. ed.) Methods of Soil Analysis. Part 2. Agronomy* 9. American Society of Agronomy pp. 1149-1178. Madison, Wisconsin EE UU.
- Bruns, T. D. 1995. Thoughts on the processes that maintain local species diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant Soil*. 170:63-73.
- Buee, M., Vairelles, D. and Garbaye, J. 2005. Year-round monitoring of diversity and potential metabolic activity of the ectomycorrhizal community in beech (*Fagus sylvatica*) forest subjected to two thinning regimes. *Mycorrhiza* 15: 235-245.
- Burnham, K.P. and Overton WS. 1979. Robust estimation of population size when capture probabilities vary among animals. *Ecology* 60: 927-936.
- Carfrae, J. A., Skene, K. R., Sheppard, L. J., Ingleby, K. and Crooley, A. 2006. Effects of nitrogen with and without acidified sulphur on an ectomycorrhizal community in a sitka spruce (*Picea sitchensis* Bong. Carr) Forest. *Environmental Pollution* 141: 131-138.

- de Bauer, L.I., Hernández-Tejeda, T. and Manning, W.J. 1985. Ozone causes needle injury and tree decline in *Pinus hartwegii* at high altitudes in the mountains around Mexico City. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 35:838.
- Deemy. 2008. Characterization and determination of ectomycorrhizae. (www.deemy.de) consultado el 1 de septiembre del 2008.
- Edwards, I. P., Criplier, J. I., Gillespie, A. R., Johnsen, K. H., Scholler, M. and Turco, R. F. 2004. Nitrogen availability alters macrofungal basidiomycete community structure in optimally fertilized loblolly pine forest. *New Phytol.* 162: 755-770.
- Egerton-Warburton, L. M. and Allen, E. B. 2000. Shifts in arbuscular mycorrhizal communities along an anthropogenic nitrogen deposition gradient. *Ecol. Appl.* 10: 484-496.
- FAO. 2006. Los bosques y el cambio climático. Consultado 19 de enero del 2009. <http://www.fao.org/newsroom/es/focus/2006/1000247/index.html>
- FAO-UNESCO. 1988. Soil map of the world. World Soil Resources Report, 60. FAO. Roma.
- Fenn, M. E., De Bauer, L. I. and Hernández-Tejeda, T. 2002. Summary of air pollution impacts on forest in the Mexico City Air Basin *In*: M.E. Fenn, L.I de Bauer and T. Hernandez T. (Eds.), *Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin.* pp. 337-355 *Ecological Studies* 156. Springer-Verlag. New York.
- Fenn, M. E., De Bauer, L. I., Quevedo, N. A. and Rodríguez F. C. 1999. Nitrogen and sulfur deposition and forest nutrient status in the Valley of Mexico. *Water, Air, and Soil Pollution* 112: 155-174.

- Fenn, M. E., Geiser, L., Bachman, R., Blubaugh, T. J. and Bytnerowicz, A. 2007. Atmospheric deposition inputs and effects on lichen chemistry and indicator species in the Columbia River George, USA. *Environ. Poll.* 146: 77-91.
- Fenn, M. E., Perea-Estrada, V. M., De Bauer, L. I., Pérez-Suárez, M., Parker, D. R. and Cetina-Alcalá, V. M.. 2006. Nutrient status and plant growth effects of forest soils in the Basin of Mexico. *Environ. Poll.* 140: 187-199.
- Fenn, M. E., Poth, A., Aber, D., Baron, J. S., Bormann, B. T., Jonson, D. W., Lemly, A. D, McNulty, S. G., Ryan, D.F. and Sttlemyer. R. 1998. Nitrogen Excess in North American Ecosystems. Predisposing factors, ecosystem responses and management strategies. *Ecol. Appl.* 8: 706-733.
- Fleming, I. V. 1985. Experimental study of sequences of ectomycorrhizal fungi on birch (*Betula* sp.) seedlings root systems. *Soil Biology and Biodiversity* 17: 591-600.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Editorial UNAM, México.
- Garcia, M. O., Ovasapyan, T., Greas, M., Treseder, K. K. 2008. Mycorrhizal dynamics under elevated CO₂ and nitrogen fertilization in a warm temperate forest. *Plant and Soil.* 303: 301-310.
- Gay, C. 2000. México: una visión hacia el siglo XXI. El cambio climático en México UNAM-SEMARNAP, México. pp. 119-142.
- Gehring, C. A., Muller, R. C. and Whitham, T. G. 2006. Environmental and genetic effects on the formation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal associations in cottonwoods. *Oecologia* 149: 158-164.

- Gehring, C. A., Theiner, T. C., Whitham, T. G. and Keim, P. 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology* 79: 1562-1572.
- Grebenc, T. and Kraigher, H. 2006. Changes in the Community of Ectomycorrhizal Fungi and Increase Fine Number Under adult Beech Trees Chronically Fumigated with Double Ambient Ozone Concentration. *Plant Biology* 9: 279-287.
- Güsewell, S. 2004. N:P ratios in terrestrial plants: variation and functional significance. *New Phytol.* 164: 243-266.
- Harley, J. L. and Smith, S. E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, UK.
- Hernández, T. T. y De Bauer, L. I. 1989. *La supervivencia Vegetal ante la Contaminación Atmosférica*. Montecillo, México: Colegio de Postgraduados.
- INEGI (2000) Carta edafológica 1:50000
- Jáuregui, E. 2002. The climate of the Mexico City Air Basin: Its effects on Formation and transport of Pollutants *In*: M.E. Fenn, L.I de Bauer and Tomas H T (eds.), *Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin*. pp. 86-117. Ecological Studies 156. Springer-Verlag. New York.
- Jonsson, I., Dahlberg, A., Nilsson, M-C., Karen, O. and Zackrisson, O. 1999. Continuity of ectomycorrhizal fungi in self- regeneration boreal *Pinus sylvestris* forest by comparing mycobiont diversity on seedlings and mature trees. *New Phytologist* 142: 151- 162.
- Jonsson, L., Anders, D. and Tor-Erik, B. 2000. Spatiotemporal distribution of an ectomycorrhizal community in an oligotrophic Swedish *Picea abies* forest subjected

- to experimental nitrogen addition: above- and below-ground views. *Forest Ecology and Management* 132: 143-152.
- Karen, O. and Nylund J.E. 1996. Effects of N-free fertilization on ectomycorrhiza community structure in Norway spruce stands in southern Sweden. *Plant and Soil* 181: 295-305.
- Kim, C.G., Power, S. A., Bell, J. N. B. 2003. Effects of cadmium on growth and glucose utilization of ectomycorrhizal fungi in vitro. *Mycorrhiza* 4: 223-226.
- Koide, R. T., Suomi, L., Stevens, C. M. and McCormick, L. 1998. Interactions between needles of *Pinus resinosa* and ectomycorrhizal fungi. *New Phytologist* 140: 539-547.
- Koide, R.T., Xu, B., and Sharda, J. 2004. Contrasting below-ground views of an ectomycorrhizal fungal community. *New Phytologist* 166: 251-262.
- Kraigher, H. and Samar, A. S. P. 2007. Types of Ectomycorrhiza as Pollution Stress Indicators: Case Studies in Slovenia. *Environ Monitoring Assess* 128: 31-45.
- Kraigher, H., Batic, F., Agerer, R. 1996. Types of ectomycorrhizae and mycobioremediation of forest site pollution. *Phyton (Horn, Austria)* 36: 115-120
- Krupa, S. V. y De Bauer, L. I. 1976. La ciudad daña los pinos del Ajusco. *Panagfa*. 31: 5-7.
- Lilleskov, E. A., Fahe, T. J. and Lovett, G. M. 2001. Ectomycorrhizal fungal aboveground community change over an atmospheric nitrogen deposition gradient. *Ecological Appl.* 11: 397-410.

- Lilleskov, E.A., Fahey, T. J., Horton, T. R. and Lovett, G. M.. 2002. Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology* 83: 104-115.
- Lodge, D. J. 1989. The influence of soil moisture and flooding on formation of VA-endo and ectomycorrhizae in *Populus* and *Salix*. *Plant and Soil*. 117: 243-253.
- Magaña, V., Méndez, Morales y Millán, 2004. “Consecuencias presentes y futuras de la variabilidad y el cambio climático en México”, en cambio climático, una visión desde México p. 203. México, INE-SEMARNAT 2004, .
- Margalef, R. 1980. *Ecología*. Ediciones Omega S. A. Casanova, Barcelona, España, 961 p.
- Marín, L. E., Escolero-Fuentes, O. and Trinidad-Santos, A. 2002. Physical geography, hydrogeology, and forest soils of the Basin of Mexico. *In: M.E. Fenn, L.I. De Bauer and Hernandez T. T.(eds.)*, *Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin*. pp. 44–67. *Ecological Studies* 156. Springer-Verlag. New York.
- Marjanovic, Z. and Nehls, U. 2008. Ectomycorrhiza and Water Transport. *In: A. Varna Heidelberg (eds.)*, pp: 149-159. *Mycorrhiza*. Springer-Verlag Berlin.
- McCarty, J. P. 2001. Ecological consequences of Recent Climate Change. *Conservation Biology*. 15: 320-331.
- McCune, B. and Mefford, M.J. 1999. *Multivariate analysis of ecological data, version 4*. MjM Software Design, Gleneden Beach, Oregon.
- Miller, P. R., de Bauer, L. I., Hernández-Tejeda, T. 2002. Oxidant exposure and effects on pines in forest in the Mexico City and Los Angeles, California, Air Basins. *In: M.E. Fenn, L.I de Bauer and Tomas H T (eds.)*, *Urban Air Pollution and Forests:*

- Resources at Risk in the Mexico City Air Basin. pp. 225-242 Ecological Studies 156. Springer-Verlag. New York.
- Mostacedo, B. y Fredericksen. 2000. Manual de métodos Básicos de muestreo y análisis en Ecología vegetal. Proyecto de manejo forestal sostenible (BOLFOR). Santa Cruz, Bolivia. 87 p.
- Musalem, S. M. A y Solís, M. A.,. 2000. Monografía de *Pinus hartwegii*. SAGAR, INIFAP y CIRCE Campo Experimental Valle de México. Libro Técnico No. 3, Chapingo, Estado de México. 96 p.
- Ogawa, M. 1985. Ecological characters of ectomycorrhizal fungi, and their mycorrhizae. An introduction to the ecology of higher fungi, JARQ 18: 305-314.
- Ogawa, M. 1985. Ecological characters of ectomycorrhizal fungi, and their mycorrhizae. An introduction to the ecology of higher fungi, JARQ 18: 305-314.
- Olsen, S. R., Cole, C.V., Wantable, F. S. and Dean, L. A. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. United States department of agriculture, circular No. 939 p.
- Ortíz-García, C. F., Laguette-Rey, H. and de Bauer, L. I. 2002. Effects of Oxidants in Ambient on Annual Crops in the Basin of Mexico. *In*: M.E. Fenn, L.I de Bauer and T. Hernandez T. (Eds.), Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin. pp. 320-333 Ecological Studies 156. Springer-Verlag. New York.
- Ortiz-Villanueva, B. y Ortiz-Solorio, C. A. 1984. Edafología. pp. 105-106. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México,.

- Palmer, M.W. 1990. The estimation of species richness by extrapolation. *Ecology* 72: 1195-1198.
- Palmer, M.W. 1991. Estimating species richness: the second order jackknife reconsidered. *Ecology* 72: 1512-1513.
- Parladé, J., Pera, J. and Luque, J. 2004. Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza* 14: 171-176.
- Parrent, J. L., William, F., Morris, R. and Vilgalys, T. 2006. CO₂-enrichment and nutrient availability alter ectomycorrhizal fungal communities. *Ecology* 87: 2278–2287.
- Perea-Estrada, V.M. 2003. Fertilización Atmosférica y Edáfica en *Pinus hartwegii* y *Eucalyptus camaldulensis* y su interacción con Hongos Simbiontes. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Instituto de Recursos Naturales, Programa Forestal, Montecillo, Texcoco, Edo. de México.
- Perry, J. P. 1991. The pines of Mexico and Central America, Timber Press. Oregon. EUA.
- Peter, M., Ayer, F. and Simon, E. 2001. Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species. *New Phytologist* 149: 311-325.
- Piotrowski, J. S., Lekberg, Y., Harner, M. J., Ramsey, P. W. and Rillig, M. C. 2008. Dynamics of mycorrhizae during development of riparian forests along an unregulated river *Ecography* 31: 245-253.
- Rincón, A., Álvarez, I. F. and Pera, J. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11: 265–271.

- Roth, D. R. and Fahey, T. J. 1998. The effects of acid precipitation and ozone on the ectomycorrhizae of red spruce saplings. *Water, Air and Soil Pollution* 103: 263-276.
- Rygiewicz, P. T. and Andersen, C. P. 1994. Mycorrhizae alter quality and quantity of carbón allocated below-ground. *Nature* 369: 58-60.
- Saikkonen, K., Ahonen-Jonnarth, U., Markkola, A. M., Helender, M., Tuomi, J., Poitto, M. and Ranta, H. 1999. Defoliation and mycorrhizal symbiosis: a functional balance between carbon source and below-ground sinks. *Ecol Lett.* 2: 19-26.
- SARH. 1993. Diagnóstico del Parque Nacional Zoquiapan y Anexas, Estado de México. Subsecretaría Forestal y de Fauna Silvestre (Consultores en Ecología y Medio Ambiente, S.A de C.V.). 44 p.
- Schlapfer, J.C. 1968. Carta Geológica de México. Serie 1: 100 000. Hoja México. 14 Q-H (5) Instituto de Geografía, UNAM.
- Smith, S. E. and Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. 3rd ed. Academic Press. London, UK. 78p.
- Stankeviciene, D. and Peciulyte, D.. 2004. Functioning of Ectomycorrhizae and Soil Microfungi in Deciduous Forest Situated Along a Pollution gradient Next to Fertilizer Factory. *Polish J. of Environ. Studies* 13: 715-721.
- Sylvia, D. F. J., Hartel, P. and Zuberer, D. 1999. Principles and applications of soil microbiology. Ed. Prentice Hall Inc. New Jersey, USA, 550 p.
- Taniguchi, T., Ryota, K. and Kazuyoshi, F. 2008. Plant growth and nutrition in pine (*Pinus thunbergii*) seedling and dehydrogenase and phosphatase activity of ectomycorrhizal root tips inoculated with seven individual ectomycorrhizal fungal species at high and low nitrogen conditions. *Soil Biol. and Biochem.* 40: 1235-1243.

- Treseder, K. K. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytol.* 164: 347-355.
- Valdés, M., V. Pereda, P. Ramírez, R. Valenzuela y RM Pineda. 2009. The ectomycorrhizal community in a *Pinus oaxacana* forest under different silvicultural treatments. *Journal of Tropical Forest Sciences* 21: 88-97.
- Valentine, L. L., Fiedler, T. L., Hart, A. N., Petersen, C. A., Berninghausen, H. K. and Southworth, D. 2004. Diversity of ectomycorrhizas associated with *Quercus garryana* in southern Oregon. *Can. J. Bot.* 82: 123-135.
- Villarreal, L. 2006. Biodiversity and ecology of native pinewood ectomycorrhizal fungi across a chronosequence and their in vitro interactions with ericaceous plants. Thesis, doctor of Philosophy, University of Aberdeen.
- Villarreal, L., Ian, C., Anderson, Ian and Alexander J. 2004. Interaction between an isolate from the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and roots of *Pinus* and *Vaccinium*. *New Phytol.* 164: 183-192.
- Villers, R. L. and Trejo-Vázquez, I. 1997. Assessment of the vulnerability of forest ecosystems to climate change in Mexico. *Climate Research* 9: 87-93.
- Vrålstad, T. 2004. Are ericoid and ectomycorrhizal fungi part of a common guide? *New Phytol.* 164: 1-4.
- Vrålstad, T., Myhre, E. and Schumacher, T. 2002. Molecular diversity and phylogenetic affinities of symbiotic root-associated ascomycetes of the Helotiales in burnt and metal polluted habitats. *New Phytol.* 155: 131-148.

CAPÍTULO V

5.1. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en la presente tesis ponen de manifiesto la existencia de una importante interacción entre el crecimiento de especies de pino inoculadas con hongos ECM y el recurso hídrico. Wright (1971), Castellano y Molina (1989) mencionan que un buen desarrollo de ECM en las raíces se reflejara en una mayor supervivencia y mejor establecimiento de plantaciones en el campo. En diversos trabajos de investigación con hongos ECM inoculados en viveros se ha demostrado que mejoran su establecimiento en campo, porque ayudan principalmente al crecimiento inicial de las plantas (Grove y Le Tacon 1993). Además se ha considerado que una de las principales razones de la presencia de las ectomicorrizas en campo se deba a la absorción de nutrientes de los árboles en los bosques (Vogt *et al.*, 1982). La simbiosis también proporciona a los fitobiontes mayor captación hídrica y nutrimental, si se considera que el hongo ECM es una extensión de la raíz, con la que se mejora la búsqueda y absorción de agua, sales minerales, fitohormonas y protección contra patógenos (Harley y Smith, 1983; Smith y Read, 1997; Xoconostle y Ruíz, 2002).

El primer experimento de esta investigación demostró que se incrementó la altura y el peso seco de los árboles como consecuencia de la inoculación con *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. De igual forma el régimen de humedad de 80 a 100 % de la CMRAS produjo mayor peso seco total en las plantas de *P. patula* inoculadas con *Hebeloma* spp. en comparación con el régimen de humedad de 40 a 60 % de la CMRAS.

Los esporomas molidos de *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. fueron un inoculo que favoreció el crecimiento y desarrollo diferencial de las plantas de pinos estudiadas, además de que la influencia de la humedad del sustrato de 80 a 100 % de la CMRAS fue un factor determinante. La biomasa en las plantas, la eficiencia en el uso del agua y la tasa relativa de crecimiento cuando existe humedad y micorrizas, es significativamente mayor que cuando no existe humedad ni micorrizas. Esto probablemente se debe a que las micorrizas proveen a su planta hospedera de un aumento en la obtención de nutrimentos minerales y agua, optimizando de esta manera los recursos disponibles y aumentando el desarrollo de las plantas (Muhsin y Zwiazek, 2000; Marjanovic y Nehls, 2008; Gonzalez–Monterrubio *et al.*, 2005). Es difícil extrapolar los resultados que se obtuvieron en invernadero a campo, pero este tipo de fenómenos probablemente pueden estar sucediendo en ecosistemas forestales.

En la investigación en campo, las comunidades de hongos ECM son afectados también por factores abióticos y bióticos. Por ejemplo las ectomicorrizas en los ecosistemas naturales pueden ser fuertemente influenciados por varias propiedades del suelo incluyendo (i) el material parental (Gehring *et al.*, 1998), (ii) la estratificación del suelo (Malajczuk y Hindston, 1981) (iii) el contenido de materia orgánica (Harvey *et al.*, 1987), (iv) la calidad de la hojarasca (Goodman y Trofymow, 1987), (v) el contenido de la humedad (Marjanovic y Nehls, 2008) y (vi) la fertilidad (Lilleskov *et al.*, 2001). La variación en cualquiera de estas propiedades tienen por lo tanto, el potencial para contribuir a la diversidad de hongos ECM en los ecosistemas forestales (Koide *et al.*, 2004).

Muchos de los factores físicos o químicos que afectan a la productividad y sanidad de los bosques, también producen daños a los hongos ECM directa o indirectamente. Por ejemplo: el exceso del depósito de N atmosférico ha provocado una reducción de la riqueza de

especies de hongos ectomicorrizicos (Peter *et al.*, 2001). A este respecto podemos mencionar que en el segundo experimento en campo se encontró una disminución en la riqueza, composición y abundancia de especies ECM, en DL en comparación con ZOQ.

Esto probablemente se debe a la combinación de efectos abióticos en campo, por ejemplo el incremento de N atmosférico y otros contaminantes ambientales, además de la influencia de la cantidad de materia orgánica, el contenido de humedad, la capacidad de intercambio cationico.

Por lo antes expuesto se propone realizar más investigaciones acerca de la importancia de la inoculación de pinos con hongos ECM y relacionar las interacciones de efectos bióticos y abióticos en las comunidades de hongos ECM en campo.

5.2. LITERATURA CITADA

Castellano, M. A. and Molina, R. 1989. Mycorrhizae. P. 101-167 in The Container Tree Nursery Manual, Volume 5. Agric. Handb. 674, Landis, T.D., *et al.* (eds.). USDA For. Serv., Washington, DC.

Gehring, C.A., Heimer, T.C., Whitha, T.G., Keim, P. 1998. Ectomycorrhizal fungal community structure of pinyon pines growing in two environmental extremes. *Ecology* 79: 1562-1572.

GonzalezMonterrubio, C.F., Arcadio, M.A., Esther, M. G. A., Maria, S. O.A. 2005. Influencia de hongos micorrizógenos arbusculares (HMA) en el desarrollo de plántulas de *Opuntia streptacantha* Lem. sometidas a sequía, en condiciones de invernadero. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 8: 5-10.

- Goodman, D.M., Trofymow, J.A. 1998. Distribution of ectomycorrhizas in microhabitats in mature and old-growth stands of Douglas-fir on southeastern Vancouver Island. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 2127-2138.
- Grove, T.S., and Le Tacon, F. 1993. Mycorrhiza in plantation forestry. *Adv Plant Pathol* 23: 191-227.
- Harley, J.L. and Smith S.E. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. Londres, RU. 483 pp.
- Harvey, A. E., Jurgensen, M. F., Larsen, M. J. and Graham, R. T. 1987. Relationships among soil microsite, ectomycorrhizae, and natural conifer regeneration of old-growth forest in western Montana. *Canadian Journal of Forest Research* 17: 58-62.
- Koide, T.K., Bing, X., Sharda, J., Ylva, L. and Nancy, O. 2004. Evidence of species interactions within an ectomycorrhizal fungal community. *New Phytologist* 165: 305-316.
- Lilleskov, E. A., Fahe. T. J., and Lovett, G. M. 2001. Ectomycorrhizal fungal aboveground community change over an atmospheric nitrogen deposition gradient. *Ecological Applications* 11: 397-410.
- Malajkzuk, N., Hingston, F.J. 1981. Ectomycorrhizae associated with Jarrah. *Australian Journal of Botany* 29: 453-462.
- Marjanovic, Z. and U. Nehls 2008. Ectomycorrhiza and Water Transport. In: A. Varna Heidelberg (ed.), *Mycorrhiza*. Springer-Verlag Berlin. pp: 149-159.
- Muhsin, T. M. and Zwiazek, J. J.. 2000. Ectomycorrhizas increase apoplastic water transport and root hydraulic conductivity in *Ulmus americana* seedlings. *New Phytologist* 153: 153-158.

- Peter, M. and Ayer, S. E. 2001. Nitrogen addition in a Norway spruce stand altered macromycete sporocarp production and below-ground ectomycorrhizal species composition. *New Phytologist* 149:311-325.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis* 2nd ed. Academic Press. New York, EEUU. 605 pp.
- Vogt, K.A., Grier, C.E., Meier, C.E. and Edmons, R.L. 1982. Mycorrhizal role in net primary production and nutrient cycling in *Abies amabilis* ecosystem in Western Washington. *Ecology* 63: 370-380.
- Wright, E. 1971. Mycorrhizae on Douglas fir and ponderosa pine seedlings. *Research Bulletin* 13, Paper 670. Forest Research Lab., Oregon State University, Corvallis. 36 pp.
- Xoconostle, C. B. y Ruiz, M.R. 2002. Impacto de la biotecnología agrícola en cultivos: el caso de las micorrizas. *Avances y perspectivas* 21: 263-266.

CAPÍTULO VI

VI. CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO III.

Cuando se inoculó con *Hebeloma* spp., existió mayor crecimiento de los pinos en el régimen de humedad del suelo de 80 a 100 % de la capacidad máxima de retención de agua del sustrato (CMRAS) en comparación con el régimen de humedad del suelo de 40 a 60 % de la CMRAS.

No existió una tendencia clara en ninguno de los tratamientos que fueron afectados con la fertilización ni la esterilización del suelo. Mientras que en caso de las plantas inoculadas con *Laccaria* spp., *Clavulina* aff. *cinerea* o plantas no inoculadas no existieron diferencias en el crecimiento vegetal en los dos regímenes hídricos evaluados.

- La colonización micorrízica no fue afectada por la fertilización.
- Los hongos ECM inoculados afectaron diferencialmente el crecimiento de las especies de pino en los regímenes de humedad estudiados.
- La inoculación de pinos con *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. originó conspicuos incrementos en la biomasa vegetal de ambas especies de pinos en comparación con plantas no inoculadas.

CAPÍTULO IV. En este estudio se encontró una reducción en la riqueza de anatotipos en el Parque Recreativo y Cultural El Desierto de los Leones (altos niveles de contaminantes atmosféricos) con alrededor de 50% comparado con el Parque Nacional Zoquiapan (bajos niveles de contaminantes atmosféricos).

- La composición y estructura de comunidades ectomicorrízicas en los sitios de estudio está definida por pocas especies con valores de importancia relativa altos. Uno de los anatotipos encontrados en los sitios de estudio fue *Cenococcum geophilum* con una abundancia alta. *Cadophora finlandica*, fue un descubrimiento destacado en esta investigación, ya que esta especie es de importancia ecológica en los bosques y es uno de los primeros reportes en México.
- Las diferencias en la composición, estructura y distribución de los anatotipos encontrados en el Parque Nacional Zoquiapan y el Parque Nacional Desierto de los Leones, podría deberse a una combinación de varios contaminantes atmosféricos e interacción de diferentes variables ambientales. De cualquier manera, son necesarios más estudios exploratorios, de carácter experimental sobre los bosques templados de México.

La aportación de esta investigación en los capítulos anteriores contribuye al entendimiento de las comunidades de hongos ECM y su relación con la planta y el suelo, en los ecosistemas forestales afectados por contaminantes atmosféricos y factores de estrés ambiental.

ANEXOS

Anexo 1.

Parque Nacional Zoquiapan (otoño del 2006)			
Especie	n	Pi	Pi*LnPi
1	5	0.00572082	-0.02954029
2	15	0.01716247	-0.06976596
3	13	0.01487414	-0.06259234
4	22	0.02517162	-0.09268288
5	7	0.00800915	-0.03866155
6	351	0.40160183	-0.366379
7	31	0.03546911	-0.11843465
8	19	0.02173913	-0.08323133
9	43	0.04919908	-0.14818175
10	4	0.00457666	-0.02465348
11	34	0.0389016	-0.1263026
12	7	0.00800915	-0.03866155
13	25	0.02860412	-0.10166489
14	89	0.10183066	-0.23262645
15	5	0.00572082	-0.02954029
16	29	0.03318078	-0.11300658
17	27	0.03089245	-0.10742057
18	15	0.01716247	-0.06976596
19	73	0.08352403	-0.2073585
20	38	0.04347826	-0.13632584
21	22	0.02517162	-0.09268288
Total	874	1	-2.28947934

Calculo del índice de Shannon-Wiener por el logaritmo natural (Ln).

$$H' = (-)(-2.28947934) = 2.2894$$

Anexo 1. Continuación

Parque Nacional Zoquiapan (verano del 2007)			
Especie	n	Pi	Pi*LnPi
1	13	0.0151692	-0.063536
3	1	0.0011669	-0.00788
4	10	0.0116686	-0.051935
5	4	0.0046674	-0.025051
6	79	0.092182	-0.219761
8	2	0.0023337	-0.014143
9	146	0.1703617	-0.301512
10	140	0.1633606	-0.295976
14	18	0.0210035	-0.081138
15	39	0.0455076	-0.140613
16	54	0.0630105	-0.17419
18	3	0.0035006	-0.019795
19	7	0.008168	-0.039268
20	17	0.0198366	-0.077764
21	60	0.0700117	-0.186168
31	25	0.0291715	-0.103109
38	74	0.0863477	-0.211498
39	32	0.0373396	-0.122761
40	20	0.0233372	-0.087694
41	33	0.0385064	-0.125413
42	16	0.0186698	-0.074322
43	37	0.0431739	-0.135675
44	2	0.0023337	-0.014143
45	1	0.0011669	-0.00788
46	3	0.0035006	-0.019795
47	2	0.0023337	-0.014143
48	6	0.0070012	-0.034738
49	6	0.0070012	-0.034738
51	7	0.008168	-0.039268
Total	857	1	-2.72390496

$$H' = (-)(-2.72390496) = 2.72390496$$

$$E = \frac{H'}{\ln S} = \frac{2.7339}{\ln (29)} = 0.808$$

Anexo 1. Continuación

Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones (verano del 2007)			
Especie	n	P _i	P _i *LnP _i
6	269	0.35582011	-0.36767959
22	34	0.04497354	-0.13949358
23	1	0.00132275	-0.00876725
24	6	0.00793651	-0.03838319
25	83	0.10978836	-0.24254453
26	154	0.2037037	-0.32411068
27	99	0.13095238	-0.26621591
28	22	0.02910053	-0.10292854
29	80	0.10582011	-0.23767352
30	8	0.01058201	-0.04813333
Total	756	1	-1.77593012

$$H' = (-)(-1.77593012) = 1.77593012$$

Parque Recreativo y Cultural el Desierto de los Leones (otoño del 2006)			
Especie	n	P _i	P _i *LnP _i
6	167	0.19042189	-0.31581722
22	348	0.3968073	-0.36677078
25	3	0.00342075	-0.01942267
26	11	0.01254276	-0.05491987
27	111	0.12656784	-0.2616128
28	81	0.09236032	-0.22000762
30	4	0.004561	-0.02458478
31	30	0.03420753	-0.11546099
32	101	0.11516534	-0.2489168
33	5	0.00570125	-0.02945877
34	2	0.0022805	-0.01387311
35	2	0.0022805	-0.01387311
36	7	0.00798176	-0.03855665
37	5	0.00570125	-0.02945877
Total	877	1	-1.75273395

$$H' = (-)(-1.75273395) = 1.75273395$$

$$E = \frac{H'}{\ln S} = \frac{1.7527}{\ln(14)} = 0.664$$