

COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGIA

**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FORMACIÓN DE ESPOROMAS Y
MICORRIZACIÓN DE DOS HONGOS COMESTIBLES ECTOMICORRÍZICOS
ASOCIADOS CON UN PINO NEOTROPICAL**

JUAN ALFONSO VILLEGAS OLIVERA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO 2014

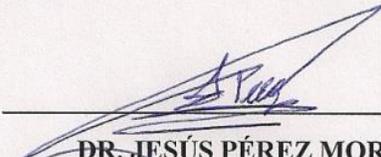
La presente tesis titulada: **Factores que influyen en la formación de esporomas y micorrización de dos hongos comestibles ectomicorrizicos asociados con un pino Neotropical**, realizado por el alumno VILLEGAS OLIVERA JUAN ALFONSO, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

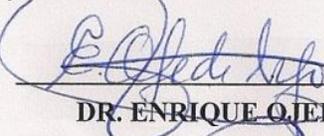
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

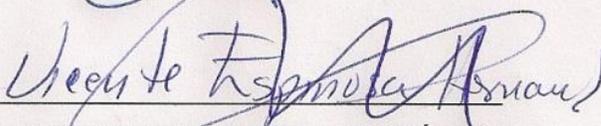
CONSEJERO


DR. JESÚS PÉREZ MORENO

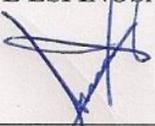
ASESOR


DR. ENRIQUE OJEDA TREJO

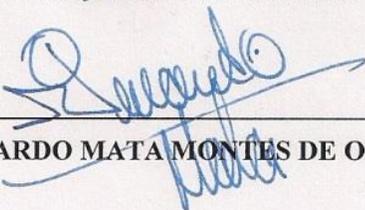
ASESOR


DR. VICENTE ESPINOSA HERNÁNDEZ

ASESOR


DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUÁREZ

ASESOR


DR. GERARDO MATA MONTES DE OCA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2014.

**Esta tesis de Maestría en Ciencias forma parte del
Proyecto CONACyT 2013- Proyectos de Desarrollo
Científico para Atender Problemas Nacionales- 213059
*“Impacto del cambio climático y la actividad agrícola en la
emisión de gases de efecto de invernadero y en los recursos
microbianos de la Sierra Nevada, México”*, dirigido por el
Dr. Juan José ALMARAZ-SUÁREZ, a quien se agradece
su valioso apoyo.**

Cada amanecer trae un nuevo día.
Cada día nos brinda una nueva oportunidad.
¡No dejes pasar la tuya, insiste, persevera, Dios
está contigo!

No temas, porque yo estoy contigo;
No desmayes, porque yo soy tu Dios que te
esfuerzo;
Siempre te ayudaré, siempre te sustentaré con la
diestra de mi justicia

Isaías 41: 10

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo en el financiamiento de la maestría.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT), por la beca tesis otorgada para concluir la escritura de la presente tesis.



Esporomas del hongo comestible ectomicorrízico *L. laccata*, *L. bicolor* y *Hebeloma mesophaeum* asociados con *P. montezumae*.

Al Colegio de Postgraduados, por la oportunidad de formarme en el amplio campo de la ciencia.

QUE ES UN MAESTRO?

No es aquél que enseña algo, sino aquél que inspira al alumno a dar lo mejor de sí para descubrir un conocimiento que ya tiene dentro de su alma (paulo coelho).

Al Dr. Jesús Pérez Moreno, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, le agradezco porque tiene una verdadera pasión por lo que enseña, por el gran esfuerzo, por creer en mí, porque me ayudo a volar cuando las piernas me fallan, porque me has enseñado a tomarme la vida con humor y amor. Gracias por los consejos y apoyo.

Al Dr. Enrique Ojeda Trejo, mil gracias por todo el apoyo brindado a lo largo del proyecto, por su paciencia, por compartir sus conocimientos conmigo. Es usted una persona maravillosa.

Al Dr. Juan José Almaraz Suárez, por el apoyo brindado en la investigación.

Al Dr. Vicente Espinosa Hernández, por el apoyo brindado en la investigación.

Al Dr. Gerardo Mata de Oca, por sus valiosas y acertadas recomendaciones a lo largo de la realización de esta investigación.

Agradece a la Dra. Greta Hanako Rosas Saito por su amable fotografía en microscopía electrónica de barrido.

Al Dr. Alejandro Alarcón, por su amistad que me brindo a lo largo de mi investigación.

Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, por su invaluable apoyo y por ser el líder del Área de Microbiología, que es un precioso y único espacio para el desarrollo profesional y personal de estudiantes de Posgrado.

A la Dra. Magdalena. Por su valiosa participación y apoyo constantemente, por sus enseñanzas y por disfrutar tanto de su trabajo que hace que uno lo disfrute de igual form

Al Dr. Roberto Quintero Lizaola, por su amistad que me brindo a lo largo de mi investigación.

Al Dr. Víctor Cetina Alcalá, por su amistad que me brindo a lo largo de mi investigación.

A la Maestra Cristina Arteaga por su valiosa amistad que me brindo durante mi estancia en el colegio.

Al personal del Laboratorio de Fijación de Nitrógeno: Edmundo Martínez Galán, Manuel Solano Díaz, Lorenzo Viana Monsalvo, por su ayuda y asesoramiento constante.

Al personal del vivero Forestal: Maximino Juárez Zarate, por su ayuda y los gratos momentos compartidos.

No por ser el último es menos importante, quiero darle las gracias a Ma. del Rosario Galicia López, Remedios, Laura Bolaños y Monserrat, porque todas las mañanas al entrar a esta institución recibo de ella un saludo cordial que me invita a empezar el día con una sonrisa.

DEDICATORIA

A Dios

En todas las cosas que hago pongo primero a Dios y siempre le doy gracias por la vida,

Haciendo posible lograr mis metas.

Porque me iluminas y estas siempre a mi lado

Para seguir adelante.

A mi Madre

“Tus brazos siempre se abrían cuando quería un abrazo. Tu corazón comprendía cuando necesitaba una amiga. Tus ojos tiernos se endurecían cuando me hacía falta una lección. Tu fuerza y tu amor me guiaron y me dieron alas para volar”

A Gilberto salgado, con mucho cariño por apoyarme.

A MIS HERMANAS.

Como un testimonio de mi gratitud por haber significado la inspiración que Necesitaba para terminar mi Carrera Profesional, prometiendo superación y éxitos Sin fin, para devolver el apoyo brindado y la mejor de las ayudas que puede haber tenido, Con Amor

A MI HERMANO.

Gracias por confiar en mí, su cariño y apoyo me sacaron adelante y fueron mí

Inspiración.

A MI ESPOSA.

M^a. Concepción Rentería, por el amor, comprensión, apoyo, dedicación que me brinda a cada instante, por creer en mí y apoyarme siempre en las buenas y en las malas, especialmente por ser parte de mi vida.

A mi abuela Emma Ruiz Soria.

A mis tíos: Octavio olivera Ruiz, Alberto olivera Ruiz, Loreli olivera Ruiz.

A la Maestra cristina Arteaga y a sus apreciables hijas por brindarme su amistad y confianza en todo momento, dios los bendiga.

A mis amigas y amigos del Laboratorio de microbiología: M.C. Cristina Arteaga, Dra. Esmeralda Cruz, M.C. Alicia, Juan Espinoza, M.C. Lucio Leos, M.C. Faustino Hernández, M.C. Azarel Angulo, M.C. Fidel, M.C. Violeta Carrasco.

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FORMACIÓN DE ESPOROMAS Y MICORRIZACIÓN DE DOS HONGOS COMESTIBLES ECTOMICORRÍZICOS ASOCIADOS CON UN PINO NEOTROPICAL

Juan Alfonso Villegas Olivera

Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN

Actualmente, la utilización de hongos ectomicorrízicos, particularmente de especies comestibles, ha cobrado una enorme importancia a la producción de árboles forestales. Sin embargo, los factores que influyen en la formación de esporomas de hongos ectomicorrízicos comestibles no son conocidos completamente. En el presente trabajo se evaluó el efecto de dos filtros de luz, amarillo y rojo, en la formación de dos especies de hongos ectomicorrízicos comestibles, asociados con dos pinos Neotropicales. El germoplasma fúngico estudiado procedió de la Sierra Nevada, México. Se registró mayor formación de esporomas de *Hebeloma leucosarx*, cuando las plantas estuvieron expuestas al filtro amarillo en comparación con plantas expuestas al filtro rojo, en *P. montezumae* y *P. greggii*. En el caso de *L. bicolor* se registró mayor formación de esporomas cuando las plantas estuvieron expuestas al filtro rojo. Además se describe detalladamente la ontogenia de *Laccaria bicolor* y *Hebeloma leucosarx*. Hasta donde conocemos esta es la primera ocasión que se registra la influencia de la calidad de luz en la formación de esporomas de hongos comestibles ectomicorrízicos. Cuando se inocularon árboles con *Laccaria laccata* y *Hebeloma mesophaeum*, se registraron altos porcentajes de micorrización, mayores a 90%, en ambas especies de pinos. Al trasplantar árboles inoculados con estos hongos de contenedores de 140 cm³ a contenedores de 6kg de capacidad, se mantuvieron estos altos porcentajes de micorrización. Este trabajo demuestra que la inoculación con *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp., tiene gran potencial de uso en la producción de plantas de *P. greggii* y *P. montezumae* en invernadero.

Palabras clave: inóculo esporal, píleos, hongos silvestres.

FACTORS AFFECTING THE FORMATION OF SPOROMES AND
MYCORRHIZATION OF TWO EDIBLE ECTOMYCORRHIZAL
MUSHROOMS ASSOCIATED WITH A NEOTROPICAL PINE

Juan Alfonso Villegas Olivera

Colegio de Postgraduados, 2014

ABSTRACT

Currently, the use of ectomycorrhizal fungi, particularly of edible species has gained immense importance in the production of forest trees. However, the factors influencing the formation of sporomes of edible ectomycorrhizal fungi are not known completely. In this work the effect of two filters light, yellow and red, in formation of sporomes of two species of edible ectomycorrhizal fungi associated with two pine Neotropical was evaluated. The studied fungal germoplasm came from the *Sierra Nevada* region, Mexico. A greater number of *Hebeloma leucosarx* sporomes was recorded when plants were exposed to the yellow filter compared to plants exposed to red filter, in *P. greggii* and *P. montezumae*. In the case of *L. bicolor* an increased formation of sporomes was recorded when plants were exposed to red filter. Also, it is described in detail the ontogeny of *Laccaria bicolor* and *Hebeloma leucosarx*. To our knowledge this is the first time that the influence of the quality of light is recorded in sporome formation of edible ectomycorrhizal mushrooms. When trees were inoculated with *Laccaria laccata* and *Hebeloma mesophaeum*, high percentages of mycorrhization, over 90% in both pine species, were recorded. When transplanting trees inoculated with these fungi, from containers with a capacity of 140 cm³ to 6 kg containers, these high percentages of mycorrhization were maintained. This work shows that the inoculation with *Hebeloma* spp. and *Laccaria* spp., has great potential for use in the production of plants of *P. greggii* and *P. montezumae* in greenhouse.

Keywords: spore inoculum, pilei, wild mushrooms.

CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIA	II
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
CONTENIDO	iii
INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 LITERATURA CITADA	3
CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	6
2.1 Objetivo General	6
2.1.1 Objetivos particulares.....	6
2.2 Hipótesis particulares	6
CAPITULO III. REVISIÓN DE LITERATURA	7
3.1 Distribución e importancia del género <i>Pinus</i> en México	7
3.2 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE <i>P. greggii</i>	7
3.2.1 Distribución y ecología	8
3.2.2 Importancia.....	9
3.3 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE <i>P. montezumae</i>	9
3.3.1 Distribución y ecología	10
3.3.2 Importancia.....	10
3.4. Hongos comestibles silvestres en México	11
3.4.1. Diversidad de hongos en México	11
3.4.2. Comercio de hongos comestibles silvestres	11
3.4.3. Importancia ecológica y económica de los hongos	12
3.5 Hongos ectomicorrízicos	13
3.5.1. Hongos ectomicorrízicos en especies forestales	14

3.5.2. Efectos de los hongos ectomicorrízicos en la nutrición de especies forestales.....	15
3.5.3. Biotecnología de los hongos ectomicorrízicos.....	15
3.5.4. Técnicas de micorrización en vivero y tipos de inóculo	16
3.5.5. El uso de los hongos en programas de inoculación en el mundo.....	17
3.6 LITERATURA CITADA	23
CAPITULO IV. Efecto de la luz, en la formación de esporomas de dos especies de hongos ectomicorrízicos comestibles asociados a pinos Neotropicales y desarrollo ontogenico.....	30
4.1. Resumen.....	30
4.2 INTRODUCCIÓN	31
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.3.1. Material vegetativo y fúngico e inoculación de plantas	32
4.3.2. Diseño experimental.....	33
4.3.3. Montaje del experimento y evaluación de variables	34
4.4 Resultados	34
4.4.1 Frecuencia de formación de esporomas.....	34
4.4.2 Efecto de la luz en la formación de esporomas	35
4.5 Desarrollo ontogénico de <i>L. bicolor</i> y <i>H. leucosarx</i>	35
4.6.1. <i>Hebeloma leucosarx</i>	35
4.6.2. <i>Laccaria bicolor</i>	36
4.7. Discusión.....	41
4.8. Conclusiones	44
4.9 LITERATURA CITADA	45
CAPITULO V. Bioensayo de escalamiento de producción de inóculo ectomicorrízico, para plantas nativas de México de interés forestal y formación de esporomas de hongos ectomicorrízicos	51
5.1 Resumen.....	51
5.2 INTRODUCCIÓN	52
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS	53
5.3.1 Material biológico y condiciones de crecimiento	53
5.4 Preparación de inoculantes	54

5.5	Diseño experimental	55
5.6	Evaluación de formación de esporomas y toma de fotomicrografías	55
5.7	Conteo de raíces	56
5.8	Resultados	56
5.8.1	Frecuencia de formación de esporomas	56
5.8.2	Efecto de la realización de orificios en los tubos de PVC en la formación de esporomas	58
5.9	Colonización micorrízica	58
5.7	Discusión.....	60
5.8	LITERATURA CITADA	70
CAPITULO VI.	Conclusiones Generales	73

INDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Descripción de estadios ontogénicos de esporomas de <i>Laccaria bicolor</i> y <i>Hebeloma leucosarx</i> , formados con asociación en árboles de <i>P. greggii</i> y <i>P. montezumae</i> de 6 años de edad.....	39
Cuadro 2. Combinaciones de especies fúngicas en los tratamientos para <i>Pinus greggii</i> y <i>P. montezumae</i>	55
Cuadro 3. Porcentaje de raíces cortas micorrizadas y no micorrizadas, vivas y muertas, de <i>Pinus greggii</i> , 421 días después del trasplante inoculadas con dos hongos comestibles ectomicorrízicos (ver sección de Materiales y Métodos).....	67
Cuadro 4. Porcentaje de raíces cortas micorrizadas y no micorrizadas, vivas y muertas, de <i>Pinus montezumae</i> , 421 días después del trasplante inoculadas con tres combinaciones de especies de hongos comestibles ectomicorrízicos (ver sección de Materiales y Métodos).....	68

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución de pinos en México.....	19
Figura 2. Distribución de <i>Pinus greggii</i> : México, Guatemala, Nicaragua y Costa Rica.....	19
Figura 3. Distribución natural de <i>Pinus montezumae</i> Lamb. En México, Guatemala, Nicaragua y Costa Rica.....	20
Figura 4. Representa a un ser en estado de éxtasis. La máscara que lleva nos indica que mira con los ojos del espíritu. Era el dios de la juventud, de la luz, de la danza, la música, los juegos, la poesía y el arte, las mariposas, del árbol florido, de los hongos sagrados. En el pedestal se observa una mariposa libando las flores de los hongos, lo que representa el espíritu de los muertos que consumen hongos, alimento de los dioses. Los grupos de círculos o adornos son hongos y las líneas onduladas representan agua, pues los hongos aparecen con las tormentas y las lluvias. En la cadera derecha de Xochipilli hay una flor de cinco pétalos que representa la flor del tabaco común, una de las plantas sagradas de todas las culturas Amerindias. En el muslo derecho se ve una flor de maravilla u ololiuhqui de los nahuas.....	21
Figura 5. Los hongos saprobios, descomposición de materia orgánica, reciclaje de nutrientes (1), hongos micorrízicos en simbiosis mutualista con árboles y arbustos de interés forestal en el intercambio bidireccional de nutrimentos (fosforo (p), Nitrógeno (N)) para las plantas, así como elementos carbonados (azucares) para los hongos (2).....	22
Figura 6. Aspectos generales del experimento. a) Venta de los hongos comestibles <i>Laccaria</i> spp. y <i>Hebeloma</i> spp., en el mercado de Ozumba, Estado de México; (b-c). Plantas de <i>Pinus montezumae</i> (<i>Pm</i>) con filtro rojo (b) y filtro amarillo (c); d) Plantas ectomicorrizadas de <i>Pinus greggii</i> con abundante micelio externo de <i>Hebeloma leucosarx</i> (<i>Hl</i>); e) Macromorfología de raíz ectomicorrizada de <i>Pm</i> con <i>Hl</i> ; f-l) Ontogenia de <i>H. leucosarx</i> : f) Agregado micelial; g) Primordios hemisféricos (una flecha) y esporomas inmaduros (dos flechas); h) Esporoma inmaduro con píleo hemisférico a convexo; i) esporoma inmaduro; j) himenio laminar de esporoma maduro senescente fértil, mostrando esporada de color café oscuro (flecha); k) Esporas de <i>H. leucosarx</i> mostrando su forma amigdaliforme y su ornamentación característica. Barras: a) 10 cm, d) 3 cm f), 1mm g) 1cm, h) 1cm, i) 4 cm, j) 3cm, k) 10 μ m.....	37
Figura 7. Producción de esporomas, durante un periodo de 4 meses (de Octubre a Enero del 2012) de dos especies de hongos comestibles ectomicorrizicos asociados con 2 especies de árboles neotropicales de 6 años de edad, cubiertos con un filtro de luz amarillo (columnas huecas) o rojo (columnas llenas), (para detalles ver sección de Materiales y métodos).....	38

Figura 8. Desarrollo ontogénico de esporomas de *Laccaria bicolor*. a) Agregado micelial, b) Primordio subesférico, c) Primordio piriforme, d) Primordio subovoide a subcilíndrico de color blanquecino y posteriormente violáceo, e) Esporomas inmaduros con píleos inconspicuos, f) Esporomas jóvenes con píleos subesféricos, g) Esporomas maduro, h) Láminas de un esporoma senescente fértil (parte superior) y esporas de *L. bicolor* mostrando su forma globosa y ornamentación espinosa ; i) Raíz ectomicorrizadas de *P. greggii* con *L. bicolor*, mostrando manto, red de Hartig y micelio externo en microscopía electrónica de barrido. Barras: a) 500µm, b) 1mm, c) 2mm, d) 3mm, e) 1cm, f) 2cm, g) 1.75 cm, h) 3cm (para el píleo) y 10µm (para las esporas).....

40

Figura 9. Porciones analizadas en los contenedores de los PVC para cada una de los tratamientos evaluados.....

62

Figura 10. a, b y c) con la ayuda de un bisturí y un mechero se procedió a efectuar orificios en los contenedores de PVC; b y d) una vez efectuados los orificios se utilizó un tubo de PVC de 3cm de diámetro para muestrear las tres secciones correspondiente, en la parte superior, media e inferior a distancias de 10-20 cm; 21-40cm y 41-60cm de longitud; e) Una vez tomadas las muestras con el suelo y las raíces ectomicorrizadas se colocaron en una recipiente con agua y se tamizaron con el objetivo de recuperar las raíces; f) se recolectaron las raíces en una caja de Petri para observarlas en microscopio estereoscópico y evaluar la colonización ectomicorrízica.....

63

Figura 11. a-e) Ontogenia de los esporomas de *Laccaria laccata s.l.* asociados con *Pinus greggii*, todas las imágenes mostradas corresponden a distintos estadios del mismo esporoma: a) primordio de 5 mm formado 5 meses después del trasplante; b) esporoma inmaduro, con estípite elongado, píleo hemisférico y láminas semiexpuestas, 5 días después de la foto mostrada en (a); c) esporoma con píleo plano con los márgenes levantados, 10 días después de la foto mostrada en (a). d y e) Esporoma maduro con píleo con láminas expuestas, lamélulas maduras, inicio de esporulación, y estípite fibriloso, 15 días después de la foto mostrada en (a). f) Abundante micelio externo de *Hebeloma mesophaeum s.l.* formado en contenedores de PVC con orificios de 4cm².....

64

Figura 12. Formación de esporoma de *Laccaria laccata s.l.* asociados con *Pinus montezumae*, todas las imágenes mostradas corresponden al mismo esporoma. b) Primordio de 3 mm, formado 7 meses después de la realización del orificio; c) Esporomas inmaduros con píleos hemisféricos; d) esporoma joven, con estípite elongado, píleo hemisférico y láminas semiexpuestas. e) Esporoma maduro con píleo con láminas expuestas, lamélulas maduras, inicio de esporulación, y estípite fibriloso. f) Esporas globosas equinuladas características de *Laccaria laccata* producidas por el esporoma maduro.

65

Figura 13. Producción de esporomas un periodo de 4 meses (de Octubre 2012 a Enero 2013) de dos especies de hongos comestibles ectomicorrízicos asociados con 2 especies de árboles neotropicales de 6 años de edad en tubos de PVC, sin orificios (columnas huecas) y con orificios (columnas llenas) (para detalles ver sección de Materiales y métodos).....

66

Figura 14. a) Raíces micorrizadas o no con hongos ectomicorrízicos, tres meses después de montado el experimento. a) se muestra una raíz de *Pinus montezumae* no micorrizada mostrando abundantes pelos radicales; b y c) raíces micorrizadas con *Laccaria laccata* el micelio es transparente y gelatinoso en la superficies de la raíz de *Pinus montezumae*; d) raíz micorrizada de *Pinus greggii* con *Laccaria bicolor*. e y f) raíces de *Pinus montezumae* micorrizadas con *Hebeloma mesophaeum s.l.*, se distinguen de las demás raíces por sus abundantes hifas emanantes de color blanco.....

69

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Actualmente, en diversas partes del mundo existe una declinación de los bosques como consecuencia de la contaminación ambiental y del cambio climático (Alvarado-Rosales *et al.*, 2002; Paoletti *et al.*, 2007). Principalmente en México existe una seria preocupación por la reducción de masas boscosas tanto de zonas templadas como tropicales, afectadas ambas por la deforestación, van de 75 mil a casi 2 millones de hectáreas de pérdida de recurso forestal por año (Lund *et al.*, 2002). En la mayoría de bosques templados y boreales las especies de árboles presentes forman asociaciones ectomicorrízicas (Smith and Read, 2008). Estas asociaciones contribuyen a la biodiversidad de suelos y al funcionamiento del ecosistema, siendo reguladores de la productividad de los bosques (Smith and Read, 2008). Adicionalmente, México es un importante reservorio cultural y biológico de hongos silvestres comestibles a nivel internacional. Un gran porcentaje de las especies de hongos silvestres comestibles en México forman asociaciones ectomicorrízicas (Pérez-Moreno *et al.*, 2008). Las micorrizas son asociaciones simbióticas que se establecen entre la mayoría de las plantas vasculares terrestres y hongos principalmente Basidiomycetes, Ascomycetes y Glomeromycetes. El principal beneficio para ambos simbioses es el intercambio nutrimental. Los hongos que establecen esta simbiosis reciben carbono de las plantas hospedadas y las plantas reciben, principalmente, fósforo (P) y nitrógeno (N) a través de las hifas asociadas (Smith and Read, 1997). Una de las estructuras más importantes de las simbiosis micorrízicas es el micelio externo. Por ejemplo en la simbiosis ectomicorrízica (ECM), este componente, en condiciones naturales, puede constituir aproximadamente 800 kg ha⁻¹ (Wallander *et al.*, 2001), representar un tercio de la biomasa microbiana (Högberg and Högberg, 2002) y contribuir, junto con las raíces ectomicorrizadas, hasta en 50% de la respiración del suelo (Högberg *et al.*, 2001). El micelio externo ectomicorrízico

en realidad forma una interfase entre el suelo y la planta huésped en donde las hifas extrarradicales sirven como extensiones de la raíz y funcionan como estructuras de absorción de agua y minerales (Leake *et al.*, 2004). Este micelio externo de las ectomicorrizas puede entonces explorar en forma más eficiente el suelo y formar agregados, los cuales 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 nutrientes, favorecen cambios fisiológicos y morfológicos de la planta huésped. Estos cambios de la planta, causados por la micorrización, aminoran condiciones de estrés ambiental, como la limitación de agua y nutrientes (Davies *et al.*, 1996). Las especies forestales dependen de la simbiosis ECM y diversas especies de árboles, incluyendo pinos, no se desarrollarían sin esa simbiosis. Es importante la inoculación en vivero con hongos ectomicorrízicos seleccionados para mejorar el establecimiento de plantas en campo (Marx *et al.*, 1994).

La inoculación de árboles de importancia forestal con hongos micorrízicos representa una importante herramienta en la producción de plantas en invernadero, el hongo simbionte o micobionte cubre las raíces cortas 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 and Read, 2004) y biotecnológica en la producción de inoculantes ectomicorrízicos para plantas de interés forestal. Por ello la adecuada selección de las especies de hongos micorrízicos como simbiontes y su posterior manipulación, tanto en laboratorio como en vivero, pueden ser aspectos claves para lograr con éxito el establecimiento de muchas especies vegetales en campo (Honrubia *et al.* 1992; Pereira *et al.* 2007).

Sin embargo, en México en general, la producción de hongos no se tiene en cuenta a la hora de establecer las plantaciones. Adicionalmente, el uso de productos forestales no maderables, ha recibido recientemente atención como un factor de enorme importancia para la conservación forestal, por su importancia

socioeconómica. Los hongos silvestres comestibles constituyen un recurso natural renovable que, últimamente, está adquiriendo importancia en países como Brasil, Nepal y China (Subhrendu and Pattanayak, 2001; Maharjan, 2005). A pesar de la enorme importancia de la simbiosis ectomicorrízica desde una perspectiva biotecnológica, y de los hongos comestibles ectomicorrízicos como un recurso forestal no maderable, existen un conjunto de aspectos básicos y aplicados que han sido escasamente estudiados en México. El presente trabajo pretende contribuir al conocimiento de la simbiosis ectomicorrízica mediante: i) El estudio de la influencia de la luz en la formación de esporomas de dos especies de hongos comestibles ectomicorrízicos, y descripción de su desarrollo ontogénico; y ii) el desarrollo de un bioensayo de escalamiento de producción de inóculo ectomicorrízico.

1.1 LITERATURA CITADA

- Alvarado-Rosales D, T Hernandez-Tejeda. 2002. Decline of sacred fir in the Desierto de los Leones National Park. Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin. In: M E Fenn, L I de Bauer, T Hernandez T (eds). Ecological Studies 156. Springer-Verlag. New York. pp:243-260.
- 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 Soil* 267:213-223.
- Davies F T, S E Svenson, J C Cole, L Phavaphutanon, S A Duray, V Olalde-Portugal, C E Meier, S H Bo. 1996. Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiol.* 16:985-993.
- Honrubia, M.; Torres, P.; Díaz, G. y Cano, A. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA. 47 p.
- Högberg, P., A. Nordren, N. Bechmann, A.F.S. Taylor, A. Ekblad, M.N. Högberg, G. Nyberg, M. Ottosson-Löfuenius y D.J. Read. 2001. Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature* 411: 789-792.

- Högberg MN, Högberg P. 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes half the microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist*. 154: 791–795.
- Leake J, J David J, D Damian, M Gemma, B Lynne. 2004. Networks of power and influence: The role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* 82:1016-1045.
- Lund, H.G., Torres V., Turner A.y L. Wood. 2002. Análisis crítico de los estimados disponibles de deforestación. USAID. SEMARNAT. México.
- Marx, D.H., J.L. Ruehle y C.E. Cordell. 1994. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. pp. 383-411. *In:* Norris, J.R., D.J. Read y A.K. Varma (eds.). *Techniques for mycorrhizal research, Methods in Microbiology*. Academic Press. London, UK.
- Maharjan K.L. 2005. Community participation in forest resource management in Nepal. *Journal of Mountain Science* 2(1):52-41.
- Martin, K.J. 2007. Introduction to molecular analysis of ectomycorrhizal communities. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* (71):601-610.
- Paoletti E, B Andrzej , A Chris, A Algirdas, F Marco, G Nancy, G G Madeleine, I John, J Dale, K Dave, L Jesada, M Rainer, M Steven, S Gerhard Muller, M Robert, P Kevin. 2007. Impacts of Air Pollution and Climate Change on Forest Ecosystems-Emerging Research Needs. *Sci. World J.* 7:1-8.
- Pérez-Moreno J. and D.J. READ. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247.
- Pérez-Moreno, J.; Martínez-Reyes, M.; Yesca-Pérez, A.; Delgado-Alvarado, A. y Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Econ. Bot.* 62(3):425-436.
- Pereira, G.; Herrera, J.; Machuca, A. y Sánchez, M. 2007. Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrízicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque*. 28(3):215-219.
- Subhrendu K, Pattanayak S. E.O. 2001. Do tropical forest provide natural insurance? The microeconomics of non-timber forest product collection in the Brazilian Amazon. *Land Economics*. 77(4): 595-612.
- Smith, S. E. and D. J. Read. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. London, UK.

Smith S.E., and D. Read. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London, UK. 787 pp.

Wallander, H., L.O. Nilson, D. Hagerberg y E. Baat. 2001. Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytologist* 151: 753-760.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General

Contribuir al conocimiento de la simbiosis ectomicorrízica en México, al estudiar la influencia de la luz en la formación de esporomas de hongos comestibles ectomicorrízicos nativos, así como el desarrollo ontogénico de dichas especies y evaluar la posibilidad de escalamiento de inóculo ectomicorrízico.

2.1.1 Objetivos particulares

- Evaluar la influencia de la luz en la formación de esporomas de los hongos comestibles ectomicorrízicos *Laccaria bicolor* y *Hebeloma leucosarx*.
- Describir detalladamente la ontogenia de esporomas de *Laccaria bicolor* y *Hebeloma leucosarx*.
- Evaluar la factibilidad de escalamiento de inóculo ectomicorrízico con fines de aplicación forestal.

2.2 Hipótesis particulares

- La calidad de luz es un factor que influye diferencialmente en la formación de esporomas de *Laccaria bicolor* y *Hebeloma leucosarx*.
- Existe un mantenimiento de una alta colonización ectomicorrízica cuando se trasplantan árboles ectomicorrizados de contenedores pequeños a contenedores de mayor tamaño.

CAPITULO III

REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Distribución e importancia del género *Pinus* en México

México tiene una enorme diversidad biológica. Dentro de sus límites se pueden encontrar 10% de las especies del mundo conocidas de plantas y animales. El género *Pinus* (Pinaceae) está representado por un poco más de 100 especies en el mundo (Farjon *et al.*, 1997; Price *et al.*, 1998). La distribución natural del género abarca desde las regiones árticas y subárticas de Norteamérica y Eurasia hasta las regiones tropicales y subtropicales de Centroamérica y Eurasia (Price *et al.*, 1998). El mayor centro de diversificación del género es Norte y Centroamérica con 70 especies; la mayor concentración de especies se encuentra en México, California y el sureste de Estados Unidos (Price *et al.*, 1998). Particularmente en México y Centroamérica se agrupan el mayor número de especies de pinos comparado con las especies conocidas de cualquier otra región de tamaño similar; esta región se considera como una segunda zona de evolución y especiación para el género (Perry *et al.*, 1998). Farjon *et al.* (1997) reportan que el género *Pinus* en México, está representado por aproximadamente 45 especies. Villaseñor (2004) considera un total de 72 taxa (Figura 1). Estos números colocan al país como el mayor poseedor de especies de pinos del mundo (Martínez, 1992; Farjon *et al.*, 1997; Valencia 2004).

3.2 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE *Pinus greggii*

3.2.1 Nombre científico

Pinus greggii Engelm.

Pinus greggii Engelm, es una especie endémica de México con gran importancia ecológica y económica. Este pino se distribuye en poblaciones aisladas a lo largo de la Sierra Madre Oriental, en zonas semiáridas y a veces semitropicales

(Donahue and López-Upton, 1999). Es un árbol de 10 a 15 m de altura (Martínez, 1948). En algunos lugares se le ha encontrado de 20 m con 40 cm de diámetro, tronco recto, copa amplia e irregularmente redonda (Eguiluz, 1978). En áreas donde las condiciones ecológicas y ambientales favorecen a la especie alcanza una altura de hasta 25 m (Perry, 1991). Por otro lado, a nivel regional, *P. greggii* es uno de los árboles de mayor valor económico para las poblaciones humanas que habitan en zonas aledañas. Se aprovecha para la obtención de madera para la industria del aserrío, y localmente en la obtención de postes para cerca y leña combustible. Además, *P. greggii* ha mostrado altas tasas de crecimiento en altura y diámetro en ensayos de plantaciones (López *et al.*, 1999; Salazar *et al.*, 1999; Azamar *et al.*, 2000), así como un gran potencial para adaptarse a condiciones limitantes de humedad (Vargas and Muñoz, 1988, 1991; López and Muñoz, 1991). Estas características favorecen el uso de *P. greggii* en programas de reforestación para la recuperación de suelos degradados en diferentes partes de México y en programas de plantaciones comerciales en sitios marginales donde no se adaptan otras especies de *Pinus*. En México, es la cuarta especie de pino en términos de importancia en plantaciones del Programa Nacional de Reforestación (Dvorak and Donahue, 1993; Dvorak *et al.*, 1996).

3.2.2 Distribución y ecología

Se distribuye en la Sierra Madre Oriental en el Centro y Norte de México. En el Norte se encuentra en altitudes de 2,300 a 2,800 msnm (Dvorak *et al.*, 2000), mientras que en el centro del país se encuentran en altitudes que van de 1,200 a 2,800 (Hernández, 2003). Las coordenadas geográficas para el área de distribución de las poblaciones del centro y norte del país se encuentran entre 20° 00' a 25° 40' de latitud Norte y 97° 40' a 101° 20' de longitud Oeste (Eguiluz, 1978), y comprende los estados de, Coahuila, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, Puebla, San Luis Potosí y Veracruz (Figura 2). Se reportan dos variedades de *Pinus greggii*, la variedad *australis* que se encuentra en el Centro-Este de México, y la variedad *greggii* representa la población localizada en el Norte del país en los

estado de Coahuila y Nuevo León (Dvorak, *et al.*, 2000; Martínez, 1948; Perry, 1991).

3.2.3 Importancia

Es una especie que ha logrado importancia a nivel nacional e internacional en países como Brasil, Chile, Colombia, México, Nueva Zelanda, el Sur de África y Zimbabwe (Dvorak *et al.*, 2000). Actualmente se considera importante por su plasticidad genética para adaptarse en suelos pobres, erosionados, con poca profundidad y materia orgánica, por lo que se ha recomendado su uso en programas de protección, recuperación de cuencas hidrológicas y áreas degradadas, debido a que muestra adaptación al igual que rápido crecimiento en terrenos con tales condiciones. Ha demostrado tolerancia a sequía así como resistencia a ciertas plagas y enfermedades forestales; además tiene gran potencial para usarse en programas de mejoramiento genético dado, que presenta floración precoz, producción de abundante semilla a temprana edad y rápido crecimiento (INIFAP, 2003). Se le ha encontrado otros beneficios como producción de árboles de navidad (Prieto and Merlín, 2000).

3.3 Descripción de la especie *Pinus montezumae*

Nombre científico

Pinus montezumae

P. montezumae Lamb. Se considera una especie maderable de gran importancia económica (Calderón *et al.*, 2006), se utiliza en la fabricación de triplay, celulosa, papel, cajas de empaque, puntales para mina, postes para cableados, ebanistería, duela y en la industria constructora, además de ser una especie resinera importante (Eguiluz Piedra, 1988). La especie se ha utilizado en la recuperación de suelos degradados y se recomienda para plantaciones ornamentales (Eguiluz Piedra, 1988).

3.3.1 Distribución y ecología

El amplio intervalo latitudinal y altitudinal de *P. montezumae*, le permite habitar en climas templados, fríos y semi-secos (Vázquez, 1962), donde las temperaturas extremas mínimas y máximas son de -4 °C y 40 °C respectivamente. Regularmente la especie habita en suelos profundos de origen volcánico montañoso, con buen drenaje, ricos en nitrógeno, calcio, potasio y materia orgánica, y bajos en fósforo, con pH de 5.4 a 6.9 (Eguiluz, 1978). Se asocia indiscriminadamente con *Pinus hartwegii* Lindl., *P. rudis* Endl., *P. pseudostrobus* Lindl., *P. leiophylla* Schl. et. Cham., *P. lawsonii* Roetzl., *P. michoacana* Mtz., *P. douglasiana* Mtz., *P. ayacahuite* Ehrenb. y *P. teocote* Schl. et. Cham.; además, con *Abies religiosa* y *Quercus* sp. (Santillán, 1991). *Pinus montezumae* se distribuye en el país entre los paralelos 16° 50' a 25° 21' de Latitud Norte, y entre los meridianos 92° 15' a 105° 10' de Longitud Oeste; su rango altitudinal es de 1150 a 3150 msnm, teniendo sus mejores desarrollos alrededor de los 2500 msnm. Se localiza principalmente en las montañas de la Cordillera Neovolcánica, y se extiende hacia el norte a lo largo de la Sierra Madre Occidental hasta el estado de Durango, en la Sierra Madre Oriental se extiende hasta el estado de Coahuila, así como en Guatemala, Nicaragua y costa Rica (Figura 3) (Perry, 1991).

3.3.2 Importancia

P. montezumae Lamb. Se considera una especie maderable de gran importancia económica (Calderón *et. al.*, 2006), se utiliza en la fabricación de triplay, celulosa, papel, cajas de empaque, puntales para mina, postes para cableados, ebanistería, duela y en la industria constructora, además de ser una especie resinera importante (Eguiluz Piedra, 1988). La especie se ha utilizado en la recuperación de suelos degradados y se recomienda para plantaciones ornamentales (Eguiluz Piedra, 1988).

3.4. Hongos comestibles silvestres en México

La diversidad biológica presente en México se debe principalmente a la intersección de dos regiones biogeográficas, la Neártica y la Neotropical. Además, la compleja orografía del territorio nacional genera una variedad de climas y hábitats, lo cual da como resultado una diversidad distribuida de forma heterogénea en este territorio (Sarukhán *et al.*, 1996). México se ubica entre los primeros doce países megadiversos (CONABIO, 2008), que cuenta con una gran diversidad de hongos silvestres comestibles. Éstos han sido recolectados desde tiempos prehispánicos, desde la aparición de culturas como son: los mayas, olmecas, y aztecas. Adicionalmente los hongos han tenido una importancia cultural, no solo como alimento o medicina, sino también por su uso en ceremonias sagradas, por grupos prehispánicos como los mexicas, representadas en la pieza arqueológica Xochipilli el denominado príncipe de las flores, quien tiene tatuado en su cuerpo hongos alucinógenos (Zamora, 2001).

3.4.1. Diversidad de hongos en México

A nivel mundial, los hongos son el segundo grupo de organismos más diverso después de los insectos, con aproximadamente 1.5 millones de especies, de las cuales sólo se conoce el 4.5% (Mueller *et al.*, 2007). El conocimiento sobre la diversidad fúngica de México es todavía muy incipiente. Se estima que existe cerca del 10% de la microbiota mundial, con aproximadamente 200,000 especies, de las cuales se conocen 6,000 especies (3.5%): 4,000 macromicetos y 2,000 micromicetos (Mueller *et al.*, 2007).

3.4.2. Comercio de hongos comestibles silvestres

El comercio de hongos comestibles silvestres es una actividad que se realiza en parte central y Sur de la república Mexicana (Ruan-Soto *et al.*, 2004; Ruan-Soto *et al.*, 2006; Montoya *et al.*, 2008; Pérez-Moreno *et al.*, 2008; Garibay-Orijel *et*

al., 2009). Una gran proporción de las especies de hongos silvestres comestibles de México poseen un mayor valor económico como son el “tecomate” (*Amanita caesarea*), las “pancitas” (*Boletus edulis*), el “duraznillo” (*Cantharellus cibarius*), y el “hongo blanco de ocote” (*Tricholoma magnivelare*), los cuales forman micorrizas (Villarreal, 1996). Estos hongos formadores de micorrizas pueden alcanzar los precios más elevados del mercado (Yun and Hall, 2004).

3.4.3. Importancia ecológica y económica de los hongos

Los hongos, al igual que otros organismos, son un componente vital en el funcionamiento de los ecosistemas, ya que contribuyen en el desarrollo de las poblaciones vegetales y animales. Algunas de sus funciones son: descomponedores de materia orgánica, establecimiento de asociaciones mutualistas con plantas y animales e intervienen en los ciclos y transferencia de nutrientes. Existen diferentes tipos de hongos, dependiendo de su ecología, como son: los parásitos, los cuales requieren de un organismo vivo al que algunas veces matan para cumplir su ciclo biológico; otros son simbióticos (micorrizas), por que viven en asociaciones con plantas; mientras que los saprófitos, son aquellos hongos que viven sobre restos orgánicos en descomposición (Herrera, 1998). Los hongos presentan una amplia distribución debido a que en diversos lugares de la Tierra existen las condiciones apropiadas de temperatura y humedad para el desarrollo de éstos, y a la fácil distribución de sus esporas, las cuales se forman en enormes cantidades y son capaces de tener vida latente por periodos largos y soportar condiciones adversas (Herrera, 2000).

Además de su importancia ecológica, los hongos forman parte del patrimonio de diversas culturas, ya que son utilizados como recurso alimenticio, industrial, ornamental, medicinal, (Zamora-Martínez, 1999). En relación a su uso medicinal se han registrado más de 100 especies de macromicetos que han sido empleados para el tratamiento de diversas enfermedades (Galván *et al.*, 1997).

3.5 Hongos ectomicorrízicos

Una de las relaciones más importantes entre plantas y microorganismos es la micorriza. Este término, acuñado por Frank (1885), es utilizado para describir diversos tipos de simbiosis que se establecen entre las raíces de las plantas y ciertos grupos de hongos. La micorriza es una asociación mutualista entre los hongos del suelo y raíces de las plantas superiores. El término micorriza (del griego mico=hongo y riza=raíz) “Hongo de la raíz”, fue acuñado por primera vez en 1885 por el botánico alemán Frank, para describir la unión de dos organismos que forman un solo órgano morfológico, en donde existe una retroalimentación de los simbioses (Agarwal and Sah, 2009). El principal beneficio para ambos simbioses micorrízicos es el intercambio de nutrientes (Read and Pérez-Moreno, 2003). Los hongos que establecen esta simbiosis reciben carbono de las plantas hospedadoras y las plantas reciben principalmente fósforo y nitrógeno a través de las hifas asociadas. Las plantas micorrízicas en algunas ocasiones pueden adquirir también protección en contra de organismos patógenos por factores distintos al de una nutrición mineral incrementada (Smith and Read, 1997). Actualmente las asociaciones micorrízicas se encuentran distribuidas en todos los ecosistemas terrestres. Existe asimismo un reconocimiento de la importancia de la micorriza tanto en el funcionamiento como en el mantenimiento de dichos ecosistemas, principalmente en las regiones boreales y templadas (Grime *et al.*, 1987; Allen, 1993; Heijden *et al.*, 1998), y tropicales (Pérez Moreno and Ferrera-Cerrato, 1997; Moyersoen *et al.*, 1998a, b, 2001; Newbery *et al.*, 2000). Uno de los más importantes tipos de asociaciones micorrízicas, desde el punto de vista ecológico y biogeográfico, es la ectomicorriza, término propuesto por Peyronel *et al.* (1969). En esta simbiosis el hongo asociado cubre las raíces cortas, formando un manto o vaina. Las hifas crecen de este manto hacia afuera en el substrato y hacia dentro entre los espacios intersticiales de la células corticales de la raíz, formando un complejo sistema intercelular denominado “red de Hartig” sin que exista generalmente penetración intracelular en las plantas asociadas (Smith and Read, 1997). Esta simbiosis tiene una enorme relevancia ecológica debido a su importancia en la estructura y funcionamiento de ecosistemas boreales, templados

y tropicales (Pérez-Moreno and Read, 2004; Smith and Read, 2008), consecuencia de la ancestral coevolución entre los hongos y las plantas involucradas (Arnold *et al.*, 2010; Peay *et al.*, 2010). A través de su micelio externo, los hongos ectomicorrízicos son capaces de movilizar y transportar agua y nutrientes minerales como N, P, K, así como nutrientes poco accesibles tales como formas orgánicas de N y P (Figura 5). Diversas investigaciones han demostrado que, una parte importante de dichos nutrientes son movilizados del suelo o de sustratos orgánicos naturales a las plantas hospederas asociadas (Read and Pérez-Moreno, 2003).

3.5.1. Hongos ectomicorrízicos en especies forestales

Actualmente, en diversas partes del mundo existe una declinación de los bosques como consecuencia de la contaminación ambiental y del cambio climático (Alvarado-Rosales *et al.*, 2002; Paoletti *et al.*, 2007). Las especies forestales dependen de la simbiosis ECM y diversas especies de árboles, incluyendo pinos. La simbiosis ectomicorrízica (ECM) se establece en unas 3000 especies de plantas y alrededor de 5000 especies de hongos, principalmente basidiomicetos y ascomicetos (Smith and Read, 1997; Estrada-Torres and Santiago-Martínez, 2003). Es importante la inoculación en vivero con hongos ectomicorrízicos seleccionados para mejorar el establecimiento de plantas en campo, en sitios rutinarios o adversos (Marx *et al.*, 1994). Los hongos ectomicorrízicos (ECM), debido en parte a las conspicuas redes miceliales que establecen, incrementan la adquisición de agua y nutrientes de las plantas con las que se asocian y pueden llegar a constituir también un importante factor de control de patógenos vegetales (Smith and Read, 1997). Debido a esto, la inoculación con hongos ECM constituye una importante herramienta en la propagación masiva de plantas, dado que con frecuencia la ectomicorriza es obligada para los árboles con los que se asocia (Bruns *et al.*, 2002; Castellano and Molina, 1989).

3.5.2. Efectos de los hongos ectomicorrízicos en la nutrición de especies forestales

La importancia de la simbiosis ectomicorrízica (ECM) para la nutrición de plantas y ecosistemas forestales, radica principalmente en la relación que existe entre el carbono y el nitrógeno, donde existe un intercambio que ha sido reconocido en diversos estudios sobre las ectomicorrizas (Meyer *et al.*, 2010). Los hongos ectomicorrízicos forman relaciones mutualistas a fin de recibir hidratos de carbono de las plantas y en intercambio (Figura 5), el hongo le otorga nutrimentos importantes como N, P, K y Ca (Nehls, 2008). Los hongos ectomicorrízicos producen diversas enzimas extracelulares capaces de degradar la materia orgánica particularmente proteínas, lignocelulosa y polifenoles, permitiendo la mineralización del nitrógeno (Talbot and Treseder, 2010). Además, presentan mecanismos de disolución de compuestos minerales en suelos, mismo que se llevan a cabo con la liberación de compuestos orgánicos como: ácido oxálico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido acético y ferricrosinas que solubilizan compuestos minerales del suelo y hacen disponibles los nutrimentos para el hongo y las plantas (Courty *et al.*, 2010).

3.5.3. Biotecnología de los hongos ectomicorrízicos

Actualmente, la producción de inoculantes basados en hongos ectomicorrízicos ha cobrado una enorme importancia en los países con tradición forestal. En países como México, esta biotecnología ha recibido escasa atención, a pesar de su enorme potencial. Por tal motivo, es necesaria la generación de conocimientos vinculados con la utilización de hongos ectomicorrízicos nativos, con plantas de interés forestal. Dada la enorme importancia a nivel mundial por diversas razones, dentro de las que se incluyen de manera importante las siguientes: i) existe una búsqueda de tecnologías que originen un menor deterioro ambiental, y se ha intentado entonces buscar alternativas biológicas, al utilizar microorganismos benéficos importantes para la nutrición vegetal y evitar así la utilización excesiva

de fertilizantes químicos (Pérez-Moreno and Ferrera-Cerrato, 1996); ii) se ha demostrado que los hongos ECM juegan un importante papel tanto en la nutrición de las plantas (Read and Pérez-Moreno, 2003) como en su protección contra patógenos (Whipps, 2004); y iii) estudios básicos desarrollados en el último siglo han permitido cultivar algunos hongos ECM en medios sintéticos, lo que ha facilitado su manipulación (Pérez-Moreno *et al.*, 2002).

3.5.4. Técnicas de micorrización en vivero y tipos de inóculo

Existe flexibilidad para seleccionar el hongo a inocular, la forma del inóculo, el método de aplicación y las condiciones culturales más adecuadas para la formación de las ectomicorrizas y crecimiento de las plántulas; la selección depende del nivel de sofisticación de los viveros (Grove y Malajczuk, 1994).

Para las especies ectomicorrizas se distinguen tres tipos de inóculo, de acuerdo con las formas de manipulación de los hongos: i) Inóculo forestal, que consiste en los propágulos existentes en el suelo (micelio, rizomorfos, cordones miceliales, esporas, raíces micorrizadas) y del que no se conoce la cantidad de las especies o de los mismos propágulos; ii) Inóculo esporal, constituido por esporas maduras, y iii) Inóculo micelial, producido en laboratorio y consistente en el micelio aislado y cultivado en medios sintéticos (Honrubia *et al.*, 1992).

i) Inóculo forestal. Es el método más simple y ampliamente usado para inocular nuevas áreas. Consiste en extraer suelo forestal y utilizarlo en la producción de planta (Marx and Cordell, 1994). Sin embargo, requiere del movimiento de grandes volúmenes de suelo por lo que implica altos costos de transporte y provoca una gran alteración en la zona de extracción (Honrubia *et al.*, 1992; Torres, 1992; Marx and Cordell, 1994). Esta es la práctica más comúnmente utilizada en los viveros mexicanos, poniendo en riesgo muchos de nuestros ecosistemas forestales al favorecer procesos de erosión (Varela and Estrada-Torres, 1997). Los mayores problemas que presentan este sistema de micorrización son de origen biológico, ya que se puede introducir semillas de

malas hiervas y patógenos como hongos, bacterias, virus y nematodos; además, la calidad y cantidad del inóculo (Honrubia *et al.*, 1992)

ii) Inóculo micelial. La micorrización con inóculo micelial obtenido a partir de cultivos puros o inoculación vegetativa, es el método más seguro, ya que carece de riesgo de introducción de otros organismos no deseables como patógenos y competidores. Es también el más efectivo y con el que se alcanza mayor porcentaje de micorrización en menos tiempos; sin embargo, es el más costoso y de manipulación más sofisticada, ya que su implantación en los viveros requiere de una adecuación tecnológica de las instalaciones (Honrubia *et al.*, 1992). En México, los inoculantes vegetativos se han utilizado principalmente a nivel experimental y solamente ha existido un intento formal por producirlos a gran escala para su utilización en plantas forestales (Sáenz *et al.*, 1982). Actualmente, se vende en el país inóculos vegetativos comerciales producidos en el país o importados de los estados unidos (Zamora *et al.*, 2002).

iii) Inóculo Esporal. La inoculación con esporas ha sido ampliamente utilizada, ya que es relativamente fácil de aplicar mezclándolas con el suelo antes de la plantación, en el riego de las camas o de los contenedores, en forma de píldoras o bañando las semillas con una suspensión de esporas (Grove y Malajczuk, 1994). Además, no se requiere de una fase de crecimiento bajo condiciones asépticas (Marx and Cordell, 1994). Este inóculo consiste en limpiar los esporomas de los hongos recolectados en campo y previa identificación, retirando el púleo y cortando el estípote como es el caso de los hongos epigeos. Posteriormente se procede al fragmentado o triturado de los hongos; se hace el conteo de las esporas, con técnicas precisas y confiables; se recomienda que las esporas estén en concentraciones de 10^5 y 10^7 por planta.

3.5.5. El uso de los hongos en programas de inoculación en el mundo

La importancia de la inoculación fue reportada primero en 1997 en Australia donde se asoció el crecimiento rápido de *Pinus radiata* con la aparición de *Rhizopogon luteolus*, mientras que en los lugares donde se encontraron plantas

con desarrollo pobre no se encontraron esporocarpios de este hongo. Durante las siguientes décadas solo hubo reportes dispersos sobre el uso de la inoculación con varios hongos micorrizicos en diferentes especies de plantas inoculadas, fue hasta la década de los 70 que se hicieron investigaciones exhaustivas (Castellano, 1994). Hasta la fecha, se han realizados estudios en viveros sobre los efectos de la inoculación en árboles jóvenes con más de 500 especies de hongos, donde casi la mitad ha demostrado tener un efecto positivo a la inoculación, aunque en algunos casos también se ha detectado efectos negativos (Grove and Malajczuk, 1994). *Pisolithus arhizus* (*P. tinctorius*) ha sido una de las especies más estudiadas con 38% de todos los estudios según Castellano, 1994, e incluso se ha utilizado en inoculaciones en Australia, Brasil, Canada, China, Congo, Corea del sur, Estados Unidos, Francia y México (Castellano, 1994). Otras especies de hongos se han utilizados para la inoculación de árboles y bajo diferentes condiciones como son: *Amanita muscaria*, *Corticium bicolor*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Lactarius rufus*.



Figura 1. Distribución de pinos en México (Rubrum,2013)



Figura 2. Distribución de *Pinus greggii*: México, Guatemala, Nicaragua y Costa Rica (Eguiluz, 1978; Perry, 1991; Martínez, 1992).



Figura 3. Distribución natural de *Pinus montezumae* Lamb. en México, Guatemala, Nicaragua y *Costa Rica* (Perry, 1991).

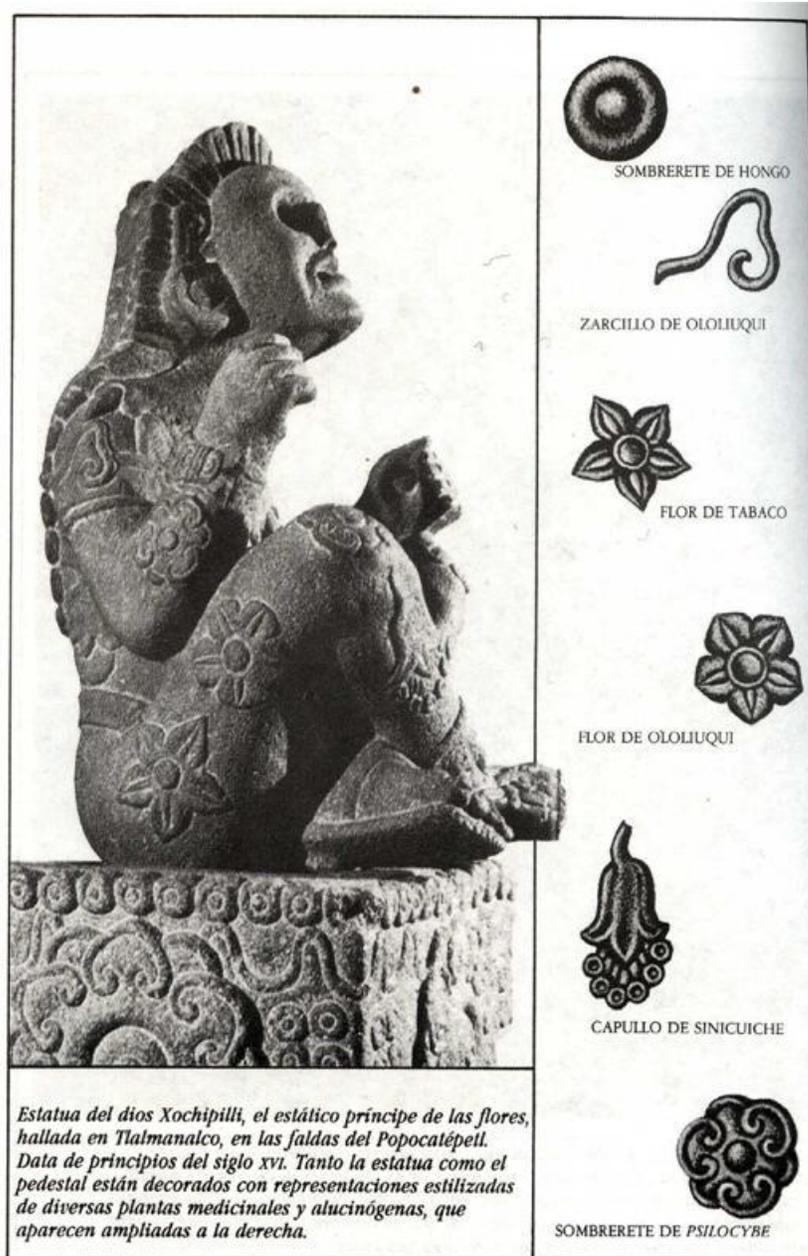


Figura 4. Representación de Xochipilli el príncipe de las flores entre los mexicas. Era el dios de la juventud, de la luz, de la danza, la música, los juegos, la poesía y el arte, las mariposas, del árbol florido, de los hongos sagrados. En el pedestal se observa una mariposa libando las flores de los hongos, lo que representa el espíritu de los muertos que consumen hongos, alimento de los dioses. Los grupos de círculos o adornos son hongos y las líneas onduladas representan agua, pues los hongos aparecen con las tormentas y las lluvias. En la cadera derecha de Xochipilli hay una flor de cinco pétalos que representa la flor del tabaco común, una de las plantas sagradas de todas las culturas Amerindias. En el muslo derecho se ve una flor de maravilla u ololiuhqui de los nahuas. [<http://pladelafont.blogspot.mx/2012/05/soma-y-r-gordon-wasson.html>]

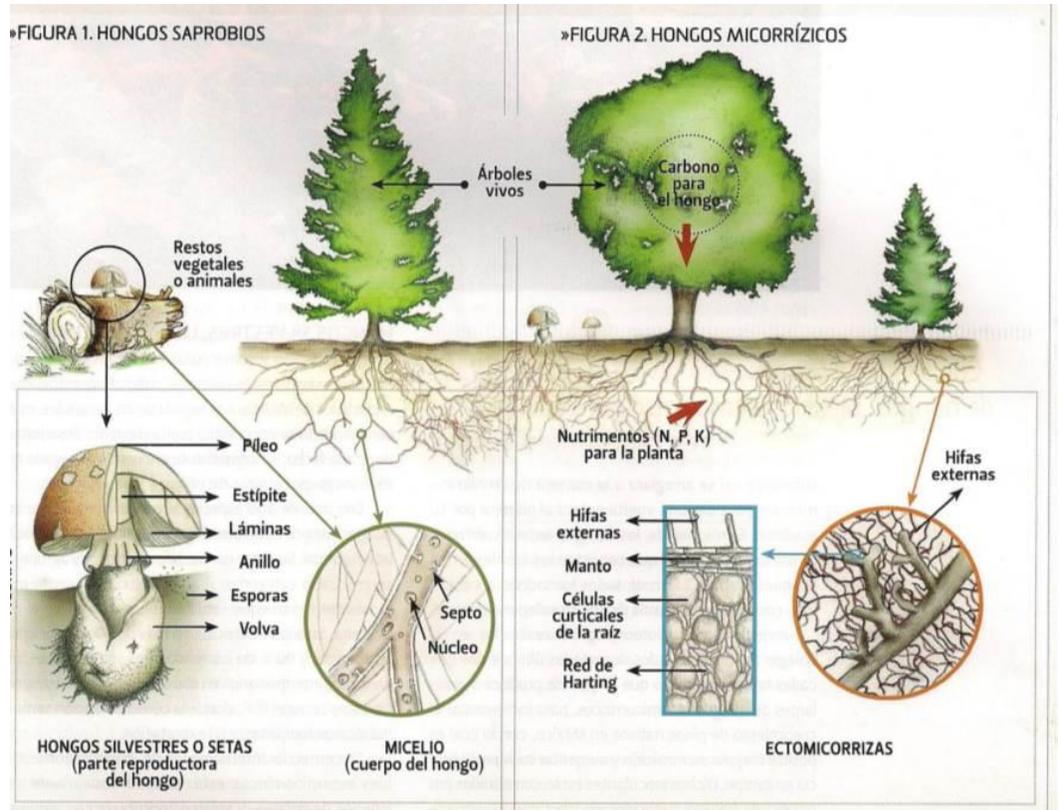


Figura 5. Los hongos saprobios y hongos micorrízicos en simbiosis mutualista con árboles y arbustos de interés forestal en el intercambio bidireccional de nutrientes Fósforo (P), Nitrógeno (N) para las plantas, así como elementos carbonados (azúcares) para los hongos (FUENTE: Pérez-Moreno *et al.*, 2011).

3.6 LITERATURA CITADA

- Agarwal, P., and P. Sah. 2009. Ecological importance of ectomycorrhizae in world forest ecosystems. *Nature and Science* 7(2): 107–116.
- Alvarado-Rosales, D., T., Hernandez-Tejeda. 2002. Decline of sacred fir in the Desierto de los Leones National Park. *Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin*. In: M E Fenn, L I de Bauer, T Hernandez T (eds). *Ecological Studies* 156. Springer-Verlag. New York. pp:243-260.
- Allen, M. 1993. *The ecology of mycorrhizae*. Cambridge University Press. Cambridge, RU. 196 pp.
- Arnold AE, L. J., Lamit, M.I Bidartondo, CA Gehring y H Callahan. 2010. Interwoven branches of the plant and fungal trees of life. *New Phytologist* 185: 874-878.
- Azamar, O., M., J. López U., J. J. Vargas H., y A. Plancarte B. 2000. Evaluación de un ensayo de procedencias-progenies de *Pinus greggii* y su conversión a huerto semillero. *Memorias del 1er. Congreso Nacional de Reforestación. Programa Nacional de Reforestación-Colegio de Postgraduados*. Montecillo, Méx. 7 pp.
- 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 Soil* 267:213-223.
- Bruns, T., D., Bidartondo M. I., Taylor, D. L. 2002. Host Specificity in Ectomycorrhizal Communities: What Do The Exceptions Tell Us. *Integ and Comp. Biol.*(42):352-359.
- Calderón, P., N., J. Jasson M., J.J Martínez H., J. Vargas H. y A. Gomez G. 2006. Estimulación temprana del crecimiento del epicotili en plántulas de *Pinus montezumae* Lamb., *Ra Ximai*, año/vol. 2, No. 3 p. 847-864.
- Castellano, M. A., Molina, R. 1989. *Manual de viveros para la producción de especies forestales en contenedor*. U.S. Department of Agriculture, Forest Service. pp. 96-147.
- Courty, P, E. Buée. M, Diedhiou, A, G. Frey-Klett, P.; Tacon, F. L.; Rineau, F.; Turpault, M. P.; Uroz, S. y Garbaye, J. 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biol. Bioch.* 42: 679- 698.
- Conabio. 2008. *Biodiversidad Mexicana ¿cuántas especies hay?* Consultado en enero del 2014.

- Davies, F, T, S E Svenson, J C Cole, L Phavaphutanon, S A Duray, V Olalde-Portugal, C E Meier, S H Bo. 1996. Non-nutritional stress acclimation of mycorrhizal woody plants exposed to drought. *Tree Physiol.* 16:985-993.
- Donahue, J, K, y J. López-Upton. 1996. Geographic variation in leaf, cone and seed morphology of *Pinus greggii* Engelm. in native forest. *For. Ecol. Manag.* 82: 145- 157.
- Dvorak, W, S, J, E. Kietzka, J. K. Donahue, G. R. Hodge y T. K. Stanger. 2000. *Pinus greggii*. In: Conservation & Testing of Tropical & Subtropical Forest Tree Species by the CAMCORE Cooperative. Central America & Mexico Coniferous Resources Cooperative, North Carolina State University, Raleigh, NC. pp. 52-73.
- Dvorak, W. S., J. E. Kietzka y J. K. Donahue. 1996. Three-year survival and growth of provenances of *Pinus greggii* in the tropics. *For. Ecol. Manag.* 83: 123-131.
- Dvorak, W. S. y J. K. Donahue. 1993. Reseña de investigaciones de la cooperativa CAMCORE. 1980-1992. Central America & Mexico Coniferous Resources Cooperative. Raleigh, NC. 94 pp.
- Estrada-Torres A, G. Santiago-Martínez. 2003. Avances en el Estudio de la Ectomicorriza en el Estado de Tlaxcala, México. Tlaxcala, México. Universidad Autónoma de Tlaxcala. 76 p.
- Eguiluz, Piedra., T. 1988, Distribución natural de los pinos en México. México, Centro de Genética Forestal, A.C. Nota Técnica No. 1. 6 p.
- Eguiluz, P., T. 1978. Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género *Pinus* en México. Tesis profesional, UACh. Chapingo, México. 446 p.
- Farjon, A., J., A. Pérez de la Rosa, B. T. Styles. 1997. Guía de Campo de los Pinos de México y América Central. Royal Botanic Garden & Universidad de Oxford. pp. 3-5.
- Farjon, A., T., Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotropica Monograph* 75. The New York Botanical Garden. USA. pp 25-27.
- Garibay-Orijel, R.; CORDOVA J.; CIFUENTES J.; VALENZUELA R.; ESTRADATORRES A.; KONG A. 2009. Integrating wild mushrooms into a model of sustainable management for indigenous community foresters. *Forest Ecology and Management* 258: 122-131.
- Galván E., L. Pérez-Ramírez y J. Cifuentes. 1997. Los hongos macroscópicos en la medicina. Memorias del IX congreso Nacional de Micología. Tapachula, Chiapas. Gándara e. y V. Ramírez, 2005. El género *Hohenbuehelia* (Basidiomycotina, agaricales, Tricholomataceae) en Veracruz, México. *Revista Mexicana de Micología* 21: 29-37.

- Grime, J., P. Mackey J., M., L. Hillier S, H, read D, J. 1987. Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. *Nature* 328: 420-422.
- Hernández, M, J. 2003. Zonas semilleros de *Pinus greggii* Engelm. en el estado de Hidalgo. Tesis profesional, UACH. Texcoco, Estado de México. 89 p.
- Herrera, T. 200. Hongos en peligro de extinción que habitan en México. *Revista sobre conservación y biodiversidad* 9: 13-14.
- Herrera, T. 1998. El Reino de los hongos: micología básica y aplicada 2^a ed. FCE-IB-UNAM, México, D.F.
- Heijden, M., G., A. van, der, Klironomos J., N. Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engell R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- Högberg, P., A. Nordren, N. Bechmann, A.F.S. Taylor, A. Ekblad, M.N. Högberg, G. Nyberg, M. Ottosson-Löfuenius y D.J. Read. 2001. Large-scale forest girdling shows that current photosynthesis drives soil respiration. *Nature* 411: 789-792.
- Högberg, M, N, Högberg P. 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes half the microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist*. 154: 791–795.
- Honrubia, M.; Torres, P.; Díaz, G. y Cano, A. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA. 47 p.
- INIFAP. 2003. Monografía de *Pinus greggii* Engelm. Campo experimental del Valle de México. Chapingo, México. Jiménez Editores. 341 p.
- Leake, J, J David J, D Damian, M Gemma, B Lynne. 2004. Networks of power and influence: The role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* 82:1016-1045.
- López, A., J., L., J. Vargas H., C. Ramírez H. y J. López, U. 1999. Variación intraespecífica en el patrón de crecimiento del brote terminal de *Pinus greggii* Engelm. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 5(2): 133-140.
- López, U., J. y A., Muñoz O. 1991. Selección familiar por tolerancia a sequía en *Pinus greggii* Engelm. I. Evaluación en plántula. *Agrociencia, Serie Fitociencia* 2(2): 111-123.
- Maharjan, K. L. 2005. Community participation in forest resource management in Nepal. *Journal of Mountain Science* 2(1):52-41.

- Martínez, M. 1948. Los Pinos mexicanos. Segunda Edición. Ediciones Botas. México. 431 p.
- Martínez, M. 1992. Los Pinos Mexicanos. 3er ed. Ediciones Botas, México, D.F. pp. 38-78.
- Marx, D. H., J. L. Ruehle y C.E. Cordell. 1994. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. pp. 383-411. In: Norris, J.R., D.J. Read y A.K. Varma (eds.). Techniques for mycorrhizal research, Methods in Microbiology. Academic Press. London, UK.
- Martin, K., J. 2007. Introduction to molecular analysis of ectomycorrhizal communities. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* (71):601-610.
- Montoya, A.; Hernández, N.; Mapes, C.; Kong, A. and Estrada-Torres, A. 2008. The collection and sale of wild mushrooms in a community of Tlaxcala, Mexico. *Economic Botany* 62: 413-424.
- Moyersoen, B, Fitter AH, Alexander I, J.1998a. Spatial distribution of ectomycorrhizas and arbuscular mycorrhizas in Korup National Park rain forest, Cameroon, in relation to edaphic parameters. *New Phytol.* 139: 311- 320.
- Moyersoen, B, Alexander I, J, Fitter A, H. 1998b. Phosphorus nutrition of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal tree seedlings from a lowland tropical rainforest in Korup National Park, Cameroon. *J. Trop. Ecol.* 14: 47-61.
- Mueller, G., J. Schmit. P. Leacock, B. Buyck, J. Cifuentes, D. Desjardin, R. Halling, K. Hjortstam, T. Iturriaga, K. Larson, D. Lodge, T. May, D. Minter, M. Rajchenberg, S. Redhead, L. Ryvardeen, J. Trappe R. Watlin y Q. Wu. 2007. Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodivers. Conserv.* 16: 37-48.
- Nehls, U. 2008. Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. *J. Exp. Bot.* 59: 1097-1108.
- Newbery, D., M. Alexander, I., J. Rother J, A. 2000. Does proximity to conspecific adults influence the establishment of ectomycorrhizal trees in rain forest? *New Phytol.* 147: 401 409.
- Paoletti, E., B. Andrzej A. Chris, A Algirdas, F Marco, G Nancy, G G Madeleine, I John, J Dale, K Dave, L Jesada, M Rainer, M Steven, S Gerhard Muller, M Robert, P Kevin. 2007. Impacts of Air Pollution and Climate Change on Forest Ecosystems- Emerging Research Needs. *Sci. World J.* 7:1-8.

- Perry, P. J., A. Graham., D. M. Richardson. 1998. pp. 137-149; en: Richardson, D.M. (comp).1998. Ecology and Biogeography of Pinus. Cambridge, University Press, United Kingdom.
- Perry, J., r., J., P. 1991. The pines of México and Central America. Timber Press, Inc. Portland, Oregon, EUA. 563 p.
- Pérez-Moreno J, Ferrera-Cerrato R. 1997. Mycorrhizal interactions with plants and soil organisms in sustainable agroecosystems. En Brussaard L, Ferrera Cerrato R (Eds.) Soil ecology in sustainable agricultural systems. CRC Lewis. Boca Raton, Florida, EEUU. pp. 91-112.
- Pérez-Moreno, J. and, R. Ferrera-Cerrato. 1996. (eds.). Nuevos horizontes en agricultura: agroecología y desarrollo sostenible. Colegio de Postgraduados. Montecillo, estado de México.
- Pérez-Moreno, J. and D, J read. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. Interciencia 29: 239-247.
- Pérez-Moreno, J., J. Alvarado-Lopez y R. Ferrera-Cerrato (Eds.). 2002. Producción y control de calidad de inoculantes agrícolas y forestales. Colegio de Postgraduados y Comité Mexicano de Inoculantes Agrícolas y Forestales. Montecillo, Texcoco, Estado de México.107 pp.
- Pérez-Moreno, J.; Martínez-Reyes, M.; Yesca-Pérez, A.; Delgado-Alvarado, A. y Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. Econ. Bot. 62(3):425-436.
- Pereira, G.; Herrera, J.; Machuca, A. y Sánchez, M. 2007. Efecto del pH sobre el crecimiento in vitro de hongos ectomicorrízicos recolectados de plantaciones de Pinus radiata. Bosque 28(3):215-219.
- Pea y k, g, Mibidartondo. And, A, E, Arnold. 2010. Not every fungus is everywhere: Scaling to the biogeography of fungal-plant interactions across roots, shoots and ecosystems. New Phytologist 185: 878-882.
- Peyronel, B., Fassi B, Fontana A, Trappe J, M. 1969. Terminology of mycorrhizae. Mycologia 61: 410-411.
- Prieto, R., J. A. y E. Merlín, B. 2000. Producción de árboles de Navidad en regiones semiáridas del Norte de México. Boletín Técnico INIFAP. 1 (1):3-26.
- Price, A. R., Liston, A. H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematics of Pinus in: Ecology and Biogeography of Pinus. Cambridge University Press. USA. Pp 49-68.
- Read D. J. and J. Pérez-Moreno. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems a journey towards relevante? New Phytologist 157: 475-492.

- Ruan-Soto, F. Garibay-Orijel, R. Cifuentes J. 2004. Conocimiento micológico tradicional en la planicie costera del Golfo de México. *Rev. Mex. Micol.* 19:57-70.
- Ruan-SOTO, F. Garibay-Orijel, R. Cifuentes J. 2004. Conocimiento micológico tradicional en la planicie costera del Golfo de México. *Revista Mexicana de Micología* 19:57-70.
- Salazar G., G., J., J., J. Vargas H., J. Jasso M., J. D. Molina G., C. Ramírez H. y J. López U. 1999. Variación en el patrón de crecimiento en altura de cuatro especies de *Pinus* en edades tempranas. *Madera y Bosques* 5(2): 19-34.
- Sarukhán J., J. soberón y J. Larson-Guerra. 1996. Biological conservation in a high beta-diversity country. In: F. di Castri y T. Younes (eds). *Biodiversity, Science and Development: Towards a New Partnership*. Cab International IUBS, England. 243-263.
- Smith, S. E. and D. J. Read. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Third edition. Academic Press, New York, USA.
- Smith, S., E., and, D., J. Read. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego and London.
- Smith SE, DJ Read. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. 2nd ed. Academic Press. Nueva York, EEUU. 605 pp.
- Talbot, J., M, and Treseder, K. K. 2010. Controls over mycorrhizal uptake of organic nitrogen. *Pedobiologia* 53: 169-179.
- Vargas H., J., J. y A. Muñoz O. 1991. Potencial hídrico, transpiración y resistencia estomatal en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. *Agrociencia, Serie Recursos Naturales Renovables* 1(3): 25-38.
- Vargas H., J., J., y A. Muñoz O. 1988. Resistencia a sequía: II. Crecimiento y supervivencia en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. *Agrociencia* 72: 197-208.
- Villaseñor, J., L. 2004. Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 105-135.
- Villarreal, L. 1996. Los hongos silvestres: componentes de la biodiversidad y alternativa para la sustentabilidad de los bosques templados. Informe Final. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, estado de México.
- Whipps, J.M. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot.* 82: 1198-1227.
- Yun, W. and Hall, I. R. 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Can. J. Bot.* 82: 1063-1073.

Zamora, M. G. 2001. Hongos comestibles. Énfasis Alimentación México. FLC. A.A. de C.V., pp 22-28.

Zamora-Martínez M. 1999. Hongos comestibles de México. Memorias del ciclo de conferencias “La investigación y la educación forestal en México”. SEMARNAP. México D.F.

CAPITULO IV

Efecto de la luz, en la formación de esporomas de dos especies de hongos ectomicorrízicos comestibles asociados a pinos Neotropicales y desarrollo ontogénico

4.1. Resumen

A la fecha, los factores que influyen en la formación de los esporomas de los hongos ectomicorrízicos no han sido totalmente comprendidos. El presente estudio evaluó el efecto de dos longitudes de onda de luz en la producción de esporomas de dos especies de hongos ectomicorrízicos (*Laccaria bicolor* y *Hebeloma leucosarx*) asociados a los árboles Neotropicales, *Pinus greggii* y *Pinus montezumae* de cinco años de edad. Las dos especies de hongos evaluados son ampliamente utilizadas como alimento y comercializadas en mercados tradicionales de México. En general, el tipo de luz influyó diferencialmente la formación de esporomas de las especies de hongos estudiados en invernadero. Se observó un mayor número de esporomas de *H. leucosarx* asociado con árboles crecidos en macetas cubiertas con filtros con una longitud de onda de $\sim 5900 \text{ \AA}$, en comparación con aquellas cubiertas con filtros con una longitud de onda de $\sim 6600 \text{ \AA}$. En contraste, se observó la tendencia opuesta en la producción de esporomas de *L. bicolor*. Las especies de árboles hospedantes influyeron en la formación de esporomas, existiendo una mayor formación de esporomas de *H. leucosarx* asociado con *P. montezumae* que con *P. greggii*. Hasta donde sabemos, este es el primer registro del efecto de las longitudes de onda de luz en la producción de esporomas de hongos ectomicorrízicos comestibles, lo que demuestra que este fenómeno es más complejo de lo que se creía previamente.

Palabras clave: ectomicorrizas, inóculo esporal, píleos, primordios, hongos silvestres.

4.2 INTRODUCCIÓN

La ectomicorriza es una simbiosis mutualista de enorme importancia estructural y funcional en los ecosistemas boreales, templados y algunos subtropicales y tropicales (Read and Pérez-Moreno, 2003). Actualmente, la utilización de hongos ectomicorrízicos, particularmente de especies comestibles, ha cobrado una enorme importancia a la producción de árboles forestales (Smith and Read, 2008). Los géneros de hongos comestibles ectomicorrízicos *Hebeloma* y *Laccaria* tienen una distribución cosmopolita (Cairney and Chambers, 1999). Mueller (1985) reconoció 75 especies a nivel mundial para el género de *Laccaria* y en el caso de *Hebeloma* se ha estimado que existen de 250 a 600 especies (Cairney and Chambers, 1999). El nombre genérico de *Hebeloma* se compone de la palabra del antiguo griego *Hebe*, "juventud" o "pubertad", y el sufijo - *loma*, "una franja" (perteneciente al hongo velo) se traduce como "velo juvenil", en referencia a la forma del velo de los hongos que sólo se ve en las muestras inmaduras. Ambos géneros tienen un alto potencial para ser usados en programas de inoculación de plantas en vivero debido que poseen especies pioneras, que prosperan en condiciones de baja fertilidad y se asocian con una amplia variedad de árboles hospederos (Cairney and Chambers, 1999; Trocha *et al.*, 2007, Obase *et al.*, 2009), que incluyen especies de enorme importancia forestal incluidas en los géneros *Eucalyptus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* y *Pseudotsuga* (Baar *et al.*, 1994; Danielson, 1984; Wong *et al.*, 1989).

Diversos estudios han reportado la producción de esporomas de hongos comestibles ectomicorrízicos, tales como *Cantharellus cibarius* Fr., *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke, *Hebeloma cylindrosporum* y *H. sarcophyllum* (Peck) Sacc. (Danell and Camacho 1997; Debaud and Gay 1987; Wang and Hall, 2004). Adicionalmente algunas otras especies de hongos ectomicorrízicos comestibles han producido esporádicamente esporomas en condiciones controladas, por ejemplo, *Lactarius deliciosus*, *Tricholoma portentosum* y *Rhizopogon rubescens* (Danell and Camacho 1997; Guerin Laguette *et al* 2000; Yamada *et al* 2001a; Danell, 2002). Previamente se ha registrado que los factores que influyen en la

formación de esporomas de hongos ectomicorrízicos comestibles asociados con sus hospederos vegetales son principalmente la temperatura, el régimen de fertilización (Debaud and Gay 1987; Godbout and Fortin 1990), la humedad relativa (Yamada *et al.*, 2007) el aporte de carbohidratos e incluso los impulsos eléctricos (Ohga and Iida 2001). Sin embargo, hasta donde conocemos la influencia de la luz en la formación de esporomas de hongos ectomicorrízicos comestibles no ha sido estudiada previamente.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el uso de dos filtros de la luz, amarillo y rojo en la formación de esporomas con dos especies de hongos ectomicorrízicos comestibles *L. bicolor* y *H. leucosarx*, asociados con dos pinos Neotropicales de gran importancia económica, *Pinus greggii* y *P. montezumae*. Adicionalmente, se describe detalladamente el desarrollo ontogénico de dichos hongos desde agregados miceliales hasta esporomas senescentes.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Material vegetativo y fúngico e inoculación de plantas

Las especies de *Laccaria* y *Hebeloma* adquiridas en el mercado de Ozumba, localizado en la región de la Sierra Nevada en el Estado de México (Figura 6.a), se clasificaron de acuerdo a características macro y microscópicas, siguiendo los métodos descritos por Largent (1973), Largent *et al.* (1977) y Mueller (1992). Principalmente, como: *Laccaria laccata s.l.*, *L. bicolor*, *L. proxima* y *L. proximela*, en el caso de especies del género *Laccaria*; y *Hebeloma mesophaeum s.l.*, *H. alpinum* y *H. leucosarx*, en el caso de las especies de género *Hebeloma*. Se seleccionaron para este estudio los esporomas pertenecientes a: *L. bicolor* y *H. leucosarx*, debido a que la comercialización de estas especies comestibles ectomicorrízicos tiene gran importancia social, económica y cultural en el centro de México y un gran potencial en la producción de inoculo para árboles de importancia forestal. En el caso de los árboles se utilizaron dos especies neotropicales nativas de México de gran importancia forestal y con fines de reforestación: *Pinus greggii*, la cual es ampliamente utilizada en la reforestación

en sitios degradados por su alto porcentaje de sobrevivencia (Domínguez *et al.*, 2001); y *Pinus montezumae* Lamb., la cual es una especie maderable de gran importancia económica en México y Centro América (Calderón *et al.*, 2006). Las semillas de las especies *P. greggii* y *P. montezumae* en estudio, procedieron de bosques naturales de Xochicoatlán, Hidalgo y del Cofre de Perote, Veracruz, respectivamente. Previo a su siembra, las semillas se esterilizaron con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a 30% durante 20 minutos y se enjuagaron por tres ocasiones con agua destilada estéril. Se utilizaron tubetes de plástico negro de 140 mL, los cuales fueron lavados y desinfectados con alcohol a 70%. Se agregó sustrato al 90% del volumen del tubete, aplicando posteriormente el inóculo esporal en cada uno de ellos, colocando las semillas de las especies de acuerdo a los tratamientos y cubriéndolas con una capa superficial del mismo sustrato y posteriormente una capa de tezontle. El sustrato utilizado, consistió en una mezcla de arena, corteza de pino y suelo forestal en una proporción 2:2:1, esterilizado en autoclave a 1.3 libras de presión (kg cm⁻²) y una temperatura de 125 °C, durante 5 h. Los píleos de *L. bicolor* y *H. leucosarx*, fueron cortados de sus estípites, dado que estas estructuras contienen las esporas en los himenios laminares. Estos píleos fueron deshidratados a 35 °C, y posteriormente molidos, tamizados en una malla de apertura de 1.19 mm, para homogeneizar el tamaño de las partículas obtenidas. El inóculo fue conservado en viales de plástico Eppendorf con una capacidad de 1.5 mL, a una temperatura de 5 °C, hasta su utilización. Cada planta fue inoculada con 10⁷ a 10⁸ esporas. Las plantas se mantuvieron en invernadero durante cinco años posteriormente, regándolas cada tercer día con agua destilada estéril. Se seleccionaron árboles de *P. greggii* y *P. montezumae*, con un porcentaje de micorrización de 90% o más (Fig. 6.d), para ser trasplantados en recipientes de 6 kg de volumen.

4.3.2. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con ocho tratamientos. Se evaluaron dos especies de pinos, *P. greggii* y *P. montezumae*, inoculadas con *L. bicolor* o *H. leucosarx*. El contenedor de cada una de las

combinaciones planta-hongo ectomicorrízico, se cubrió con un filtro de papel de color amarillo (con una longitud de onda ~ 5900 Å), o de color rojo (con una longitud de onda de ~ 6600 Å), se dejó la parte aérea de la planta descubierta (Fig. 6.b). Para cada uno de los 8 tratamientos así generados, se tuvieron 4 réplicas, lo cual dio un total de 32 unidades experimentales, cada una constituida por un árbol.

4.3.3. Montaje del experimento y evaluación de variables

Los árboles inoculados de *P. greggii* y *P. montezumae*, cubiertos con los 2 colores de filtro, permanecieron durante 365 días en invernadero en los recipientes de 6kg y fueron regados cada tercer día. Se realizaron evaluaciones de los esporomas formados durante cuatro meses (de Octubre a Enero del 2012), debido a que solo se detectó formación de ellos en esta etapa del año. La edad de los árboles al final del experimento fue de 6 años. Se contabilizó el número total de esporomas formados en cada tratamiento, y se realizó una descripción detallada de la ontogenia de *L. bicolor* y de *H. leucosarx*, desde la formación de agregados miceliales hasta la formación de esporomas maduros fértiles y su subsecuente senescencia (Tabla 1). Las fotografías de los estadios ontogénicos de los esporomas se tomaron con un microscopio estereoscópico Olympus SZ61, modelo SZ2-LGB. En el caso de los esporomas de ambas especies, se colocaron portaobjetos debajo de los mismos para recolectar las esporas y registrar el color de las esporas y la morfología de las esporas con un microscopio Leica modelo MD1000.

4.4 Resultados

4.4.1 Frecuencia de formación de esporomas

Se registró un total de 102 esporomas maduros (con láminas completamente expuestas) de *L. bicolor* y *H. leucosarx*. La gran mayoría de ellos (90%) correspondieron a *H. leucosarx* y un porcentaje más bajo (10%) a *L. bicolor*. La mayor cantidad de esporomas (55) se registraron asociados con *P. montezumae* en

comparación con *P. greggii* (47) (Figura 7). La formación de los mismos se registró desde los 280 y 330 días después del trasplante en los contenedores de 6kg. Los primeros esporomas de *Hebeloma leucosarx*, 280 días después del trasplante, se observaron asociados con *P. montezumae*.

4.4.2 Efecto de la luz en la formación de esporomas

Existió un efecto conspicuo en la formación de esporomas de *Laccaria* y *Hebeloma* como consecuencia de cubrir las macetas con los dos filtros de luz evaluados. Se observó un mayor número de esporomas de *H. leucosarx*, que de *L. bicolor*, independientemente de la planta hospedera. En el caso del número de esporomas de *Hebeloma* este fue 2.6 y 2.1 veces mayor cuando las plantas estuvieron expuestas al filtro amarillo en comparación con plantas expuestas al filtro rojo, en *P. montezumae* y *P. greggii*, respectivamente. En el caso del número de esporomas de *L. bicolor* registrados, se observó un número relativamente pequeño, ocho y un esporoma en asociación de *P. greggii* expuestas a filtro rojo y filtro amarillo, respectivamente. No se observaron esporomas de *L. bicolor* en asociación con *P. montezumae* (Figura 7). La longevidad de los esporomas de *L. bicolor* desde un primordio pequeño visible hasta esporomas senescentes fue en promedio de 18 días. En contraste, el tiempo transcurrido desde el inicio de los agregados miceliales hasta la senescencia de los esporomas fue de 35 a 40 días. En el caso de *L. bicolor* se observó la expulsión de esporadas abundantes de color blanquecino 14 días después de la aparición de primordios visibles cuya presencia fue confirmada al ser recolectados en portaobjetos.

4.5 Desarrollo ontogénico de *L. bicolor* y *H. leucosarx*

4.5.1. *Hebeloma leucosarx*. Doscientos ochenta días después del trasplante se observaron agregados miceliales de color blanco (Figura 6.e), en la base del cepellón de árboles de *P. montezumae*. Después de esta fase inicial, se registró la formación de primordios pequeños, de color blanco a blanquecino (Figura 6.f), los

cuales comenzaron a ensancharse en su base y el píleo inició su formación (Figura 6.g), se observó la presencia de láminas de color crema y posteriormente éstas fueron de color café claro (Figura 6.h). El píleo se fue expandiendo simétricamente. La forma del píleo varió de subglobosa a hemisférica, posteriormente convexa y plana en esporomas totalmente maduros (Figura 6.i), presentan esporas almendradas o amigdaliforme ($L= 9.36-12.05 \mu\text{m}$; $A= 5.27-7.39 \mu\text{m}$; $Q= 1.77-1.63$; $Q_m=1.76 \mu\text{m}$) (Figura 6.k). Hasta donde se conoce, esta es la primera ocasión que se describe la ontogenia de *H. leucosarx*. A nivel mundial existe poca información de la descripción de ontogenia de la especie de *H. leucosarx*. En términos generales la mayoría de las publicaciones de *Hebeloma* se han enfocado a *H. crustuliniforme* y *H. cylindrosporun* (Cairney and Chambers, 1999).

4.5.2. *Laccaria bicolor*. Doscientos ochenta días después del trasplante, se observaron agregados miceliales de color blanco (Fig. 8.a), en la base del cepellón de árboles de *P. greggii*. Después de esta fase inicial, se registró la formación de primordios pequeños, de color morado en su totalidad (Fig. 8.e), los cuales comenzaron a ensancharse en su base, el píleo inició su formación y se observó la presencia de láminas de color rosa, píleo convexo a plano, finamente fibroso o escamoso con láminas presentes, esporadas de color blanco a blanquecina, estípites de color violáceo intenso en la base y más claro en la parte superior (Fig. 8.g), esporas globosas, y ornamentación espinosa ($L= 5.01-7.16 \mu\text{m}$; $A= 6.01-7.08 \mu\text{m}$; $Q= 0.83-1.01$; $Q_m=0.99 \mu\text{m}$). Las características de *Laccaria bicolor* descritas coinciden con la descripción realizada por Muller (1992).



Figura 6. Aspectos generales del experimento. a) Venta de los hongos comestibles *Laccaria* spp. y *Hebeloma* spp., en el mercado de Ozumba, Estado de México; (b-c). Plantas de *Pinus montezumae* (*Pm*) con filtro rojo (b) y filtro amarillo (c); d) Plantas ectomicorrizadas de *Pinus greggii* con abundante micelio externo de *Hebeloma leucorsarx* (*Hl*); e) Macromorfología de raíz ectomicorrizada de *Pm* con *Hl*; f-l) Ontogenia de *H. leucorsarx*: f) Agregado micelial; g) Primordios hemisféricos (una flecha) y esporomas inmaduros (dos flechas); h) Esporoma inmaduro con píleo

hemisférico a convexo; i) esporoma inmaduro; j) himenio laminar de esporoma maduro senescente fértil, mostrando esporada de color café oscuro (flecha); k) Esporas de *H. leucosarx* mostrando su forma amigdaliforme y su ornamentación característica. Barras: a) 10 cm, d) 3 cm f), 1mm g) 1cm, h) 1cm, i) 4 cm, j) 3cm, k) 10 μ m.

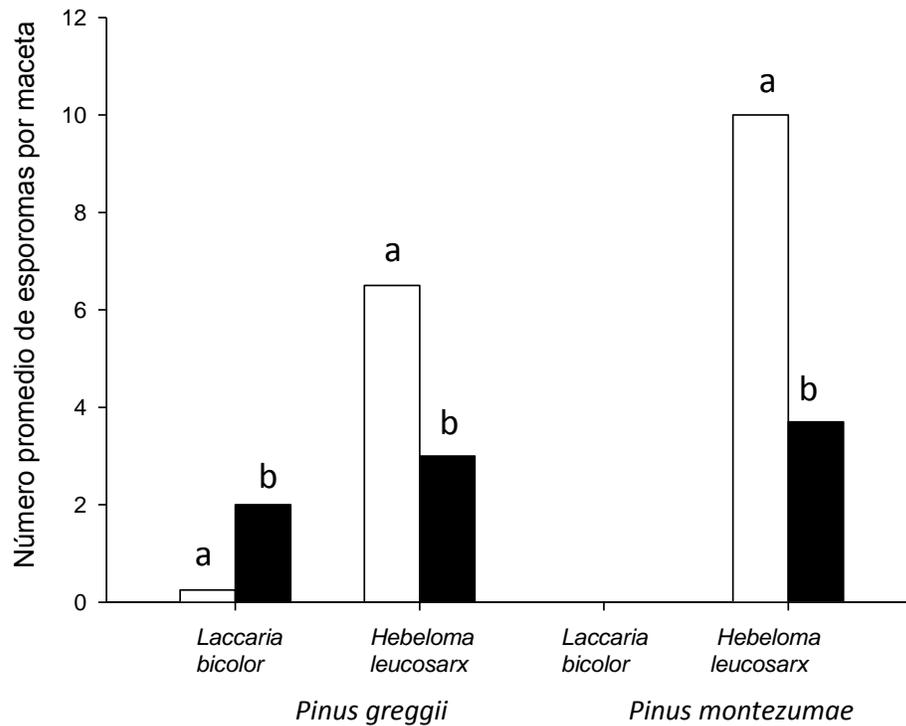


Figura 7. Producción de esporomas, durante un periodo de 4 meses (de Octubre a Enero del 2012) de dos especies de hongos comestibles ectomicorrízicos asociados con 2 especies de árboles neotropicales de 6 años de edad, cubiertos con un filtro de luz amarillo (columnas huecas) o rojo (columnas llenas), (para detalles ver sección de Materiales y métodos).

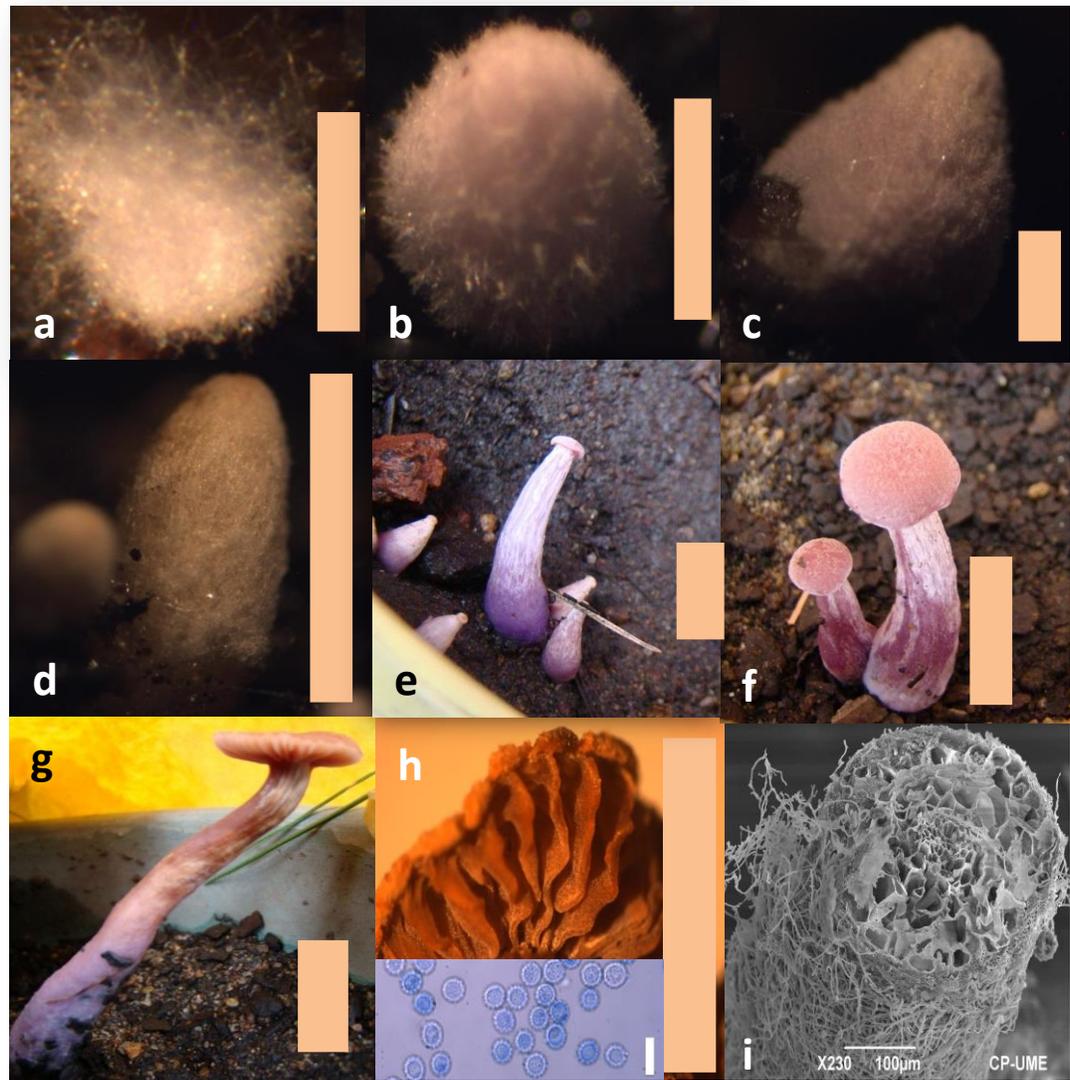


Figura 8. Desarrollo ontogénico de esporomas de *Laccaria bicolor*. a) Agregado micelial, b) Primordio subsférico, c) Primordio piriforme, d) Primordio subovoide a subcilíndrico de color blanquecino y posteriormente violáceo, e) Esporomas inmaduros con píleos inconspicuos, f) Esporomas jóvenes con píleos subsféricos, g) Esporomas maduro, h) Láminas de un esporoma senescente fértil (parte superior) y esporas de *L. bicolor* mostrando su forma globosa y ornamentación espinosa ; i) Raíz ectomicorrizadas de *P. greggii* con *L. bicolor*, mostrando manto, red de Hartig y micelio externo en microscopía electrónica de barrido. Barras: a) 500 μ m, b) 1mm, c) 2mm, d) 3mm, e) 1cm, f) 2cm, g) 1.75 cm, h) 3cm (para el píleo) y 10 μ m (para las esporas).

4.6. Discusión

En el presente trabajo se registró una abundante formación de esporomas maduros fértiles de *L. bicolor* y de *H. leucosarx* asociados con los árboles Neotropicales, *Pinus greggii* y *P. montezumae* de cinco años de edad, utilizando como fuente de inóculo píleos molidos. Previamente han existido reportes de formación de esporomas de algunas especies de hongos ectomicorrizicos comestibles utilizando como fuente de inóculo micelio, por ejemplo: se han producido esporomas de *H. cylindrosporum* con *Pinus pinaster* (Debaud and Gay 1987), *Laccaria laccata* con *Pinus patula*, *Laccaria bicolor* con *Pinus strobus* (Lamhamedi *et al.*, 1994), *Lactarius deliciosus* con *Pinus sylvestris* y *Tricholoma matsutake* con *Pinus densiflora* (Guerin-Laguette *et al.*, 2000). Massicotte *et al.* (2005) reportó parte de la ontogenia de *L. bicolor* asociado con *Pinus sylvestris* en medio sólido, sin embargo no reportó si estos esporomas fueron fértiles o no, las características descritas son similares en cuanto a la forma de agregados miceliales y primordios que se encontró en la ontogenia de *L. bicolor* del presente trabajo. La formación de esporomas de especies de hongos ectomicorrízicos es un fenómeno complejo, debido al conjunto de requerimientos muy específicos de factores físicos, nutrimentales y bióticos además de la presencia obligada, en la mayoría de los casos, de la planta huésped (Debaud and Gay, 1987; Godbout and Fortín, 1990; Ohta, 1998; Kaneko and Sagara, 2002). En términos generales estas condiciones han sido escasamente estudiadas en el caso de esporomas de hongos ectomicorrízicos comestibles.

En cuanto al género *Laccaria* existen reportes previos de formación de primordios para *Laccaria laccata*, asociado con *Pinus sylvestris* (Massicotte *et al.*, 2005). Asimismo estos autores reportaron la formación solo de primordios de *L. bicolor* con *Pinus resinosa*, 50 días después de la inoculación (Massicotte *et al.*, 2005). En relación a la formación de esporomas del género *Hebeloma*, diversas investigaciones han reportado dicho fenómeno. Debaud *et al.*, (1981), reportaron la síntesis micorrízica entre un arbusto perenne ártico-alpino, *Dryas octopetala* L. y *Hebeloma alpinum* (Favre) Brucher y *H. marginatum* (Favre) Brucher, los

cuales fructificaron después de ocho meses de cultivo. Debaud *et al.*, (1987) reportaron la formación de primordios de *Hebeloma cylindrosporum* asociado con *Pinus pinaster*, año y medio después de la inoculación en condiciones estériles utilizando como sustrato turba y vermiculita. Sin embargo, este hongo no completó su ciclo de vida en la ausencia de la planta huésped en las mismas condiciones de cultivo y solo produjo primordios. Ohta (1998) logró la producción de esporomas sin reportar si estos eran fértiles o no, de *Hebeloma radicosum* y *Hebeloma* sp. en medio de cultivo reportando, los nutrimentos que promueven el crecimiento micelial y la producción de esporomas para estas dos especies. Las especies de *Laccaria* y *Hebeloma* que formaron esporomas en el presente trabajo, tienen gran potencial biotecnológico para ser utilizadas como inoculantes de árboles Neotropicales de importancia forestal, debido a que son especies pioneras que producen efectos benéficos en términos de crecimiento y contenido nutrimental (N, P, K, Ca y Mg) en sus hospederos asociados (Carrasco-Hernández *et al.*, 2011; Martínez-Reyes *et al.*, 2012) y son ampliamente comercializados para su consumo en los mercados del centro y sureste de México (Pérez-Moreno *et al.*, 2008).

Diversas investigaciones han demostrado que las condiciones ambientales son determinantes en la formación de los esporomas de hongos ectomicorrízicos, incluyendo la influencia de temperatura, concentraciones de dióxido de carbono en el ambiente, humedad, salinidad (Wessels, 1993a, Kües and Liu, 2000) el régimen de fertilización (Debaud and Gay 1987; Godbout and Fortin 1990), la humedad relativa (Yamada *et al.*, 2007), el aporte de carbohidratos (Reis *et al.*, 1983; Lamhamedi *et al.*, 1994) y la abundancia de colonización ectomicorrízica de la especie del hongo de interés (Pilz and Molina, 2001; Guenn-Lagette *et al.*, 2013; 2014). Adicionalmente se ha demostrado, que la formación de hongos ectomicorrízicos al utilizar impulsos eléctricos, promueve la formación de esporomas, debido a que éstos originan rupturas de las hifas, o activación de enzimas, mediante la aplicación de alto voltaje, lo que funciona como un estimulador para la formación de esporomas en *L. laccata*, *Pholiota nameko*, *Lyophyllum decastes* (Ohga and Ida, 2001; Ohga *et al.*, 2004; Takaki *et al.*,

2009a, b) Jitsufuchi *et al.* (1987), reportó una tendencia similar en la producción del hongo saprobio *Lentinula edodes* conocido como shiitake, utilizando impulsos eléctricos.

En nuestro caso se encontró que diferentes longitudes de onda de luz ($\sim 5900 \text{ \AA}$ versus $\sim 6600 \text{ \AA}$) influyen en la formación diferencial del número de esporomas de *L. bicolor* y de *H. leucosarx* producidos. Previamente Lamhamedi *et al.* (1994) utilizaron tres intensidades de luz (20, 50 y 90 $\mu\text{molrrr+s}$) y obtener formación de esporomas de *L. bicolor* asociado a *Pinus strobus*. Dichos autores demostraron que la formación de estos esporomas incrementa la fotosíntesis y la conducción estomática de las plantas huésped. Dado que al cortar los esporomas existieron una reducción notable de dichas variables fisiológicas. Previamente ha sido reportadas, la producción de esporomas de hongos saprobios, utilizando diferente intensidades de luz, teniendo excelentes resultados en la formación de esporomas (Yli-Mattila *et al.*, 1989) para varias especies de *Coprinus* (Ellis *et al.*, 1999, Kües, 2000) y *Favolus arcularius* (Kitamoto *et al.*, 1972). Hasta donde conocemos en este trabajo se demuestra por primera ocasión que las longitudes de onda de luz son un factor que influye en la formación de esporomas de hongos ectomicorrízicos.

Una observación interesante en el presente trabajo fue la diferencia del tamaño de esporomas de *L. bicolor* y *H. leucosarx* en relación al tamaño de los contenedores. Cuando las plantas se encontraban en los contenedores de 140cm^3 , se observó la formación de esporomas de *L. bicolor* con un máximo de 4cm de altura, mientras que los esporomas formados en los contenedores de 6kg fueron de hasta 7cm de altura (Fig. 6). De manera similar en el caso de *H. leucosarx*, los esporomas formados tuvieron un máximo de 6cm de altura en los contenedores de 140cm^3 ; muestran que en los contenedores de 6kg, los esporomas formados fueron de hasta 18cm de altura, que es su tamaño natural cuando son recolectados en campo (Fig. 1). Una razón que podría explicar el menor tamaño de los esporomas en los contenedores de menor tamaño podría ser un abastecimiento reducido de nutrientes y de agua, tal y como lo señalaron Godbout *et al.* (1990) y Kikuchi *et*

al. (2009). Otra observación interesante fue que los primordios de *H. leucosarx* y *L. bicolor*, que se obtuvieron en este experimento se desarrollaron en algunas ocasiones en la base del cepellón, cerca de los orificios de drenaje de los contenedores, como sucedió en el caso de *C. cibarius* inoculado en *P. sylvestris* reportado por (Danell and Camacho, 1997), y con algunos primordios de *L. bicolor* (Godbout and Fortin, 1990). En nuestro caso los esporomas no presentaron gravitropismo positivo, cuando crecieron cerca de los orificios de drenaje dado que sus estípites permanecieron rectos con sus píleos en la parte inferior.

4.7. Conclusiones

Hasta donde se conoce, este es el primer reporte de la influencia de la calidad de luz en la formación de esporomas de hongos comestibles ectomicorrízicos. En el caso de *Hebeloma leucosarx*, se observó un mayor número de esporomas cuando las macetas estuvieron cubiertas con filtro amarillo, en comparación con las macetas cubiertas con filtro rojo, independientemente de la especie del árbol asociada. Una tendencia contraria se observó para *L. bicolor*, donde se registró mayor número de esporomas en *Pinus greggii* cubiertas con filtro rojo. El número de esporomas de *H. leucosarx* asociados con *P. montezumae* fue mayor, comparado con el número de los esporomas registrados en asociación con *P. greggii*. En el caso de *L. bicolor* solo se registraron esporomas asociados con *P. greggii*.

Se logró registrar con detalle el desarrollo ontogénico de esporomas tanto de *Laccaria bicolor* como de *Hebeloma leucosarx* y se establecieron estadios definidos para cada una de estas especies, desde agregados miceliales hasta esporomas senescentes. Hasta donde conocemos la influencia de la longitud de onda de la luz en la formación de esporomas de hongos ectomicorrízicos comestibles, no han sido estudiadas previamente.

4.8 LITERATURA CITADA

- Baar J, Ozinga WA, Kuyper TW. 1994. Spatial distribution of *Laccaria bicolor* genets reflected by sporocarps after removal of litter and humus layer in a *Pinus sylvestris* forest. *Mycol Res* 98: 726-728.
- Cairney JWG, Chambers SM. 1999. *Ectomycorrhizae fungi: key genera in profile*. Berlin, Germany: Springer.
- Calderón PN, J. Jasso J, Martínez JJ, Vargas J, Gómez A. 2006. Estimulación temprana del crecimiento del epicotilo en plántulas de *Pinus montezumae* Lamb. *Ra Ximhai* 2: 847-864.
- Carrasco-Hernández V, Pérez-Moreno J, Espinosa-Hernández V, Almaraz-Suárez JJ, Quintero-Lizaola R, Torres-Aquino M. 2011. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Rev Chil Hist Nat* 84: 83-96.
- Danell E, Camacho FJ. 1997. Successful cultivation of the golden chanterelle. *Nature* 385: 303.
- Danell E. 2002. Current research on chantharelle cultivation in Sweden. In: Hall I, Wang Y, Danell E, Zambonelli A, editors. *Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation*. Christchurch, New Zealand: Crop and Food Research, pp 1-4.
- Danielson RM. 1984. Ectomycorrhizal associations in Jack pine stand in Northeastern Alberta. *Can J Bot* 62: 932-939.
- Debaud JC, Pepin R, Bruchet G. 1981. Etude des ectomycorhizes de *Dryas octopetala*. Obtention de synthèses mycorhiziennes et de carpophores d'*Hebeloma alpinum* et *H. marginalatum*. *Can J Bot* 59: 1014-1020.

- Debaud JC, Gay G. 1987. In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytol* 105: 429–435.
- Domínguez C, Navar J, Loera O. 2001. Comparación del rendimiento de pinos en la reforestación de sitios marginales en Nuevo León. *Mad Bosq* 7: 27-35.
- Ellis RJ, Bragdon GA, Schlosser BJ. 1999. Properties of the blue light requirements for primordia initiation and basidiocarp maturation in *Coprinus stercorarius*. *Mycol Res* 103: 779-784.
- Godbout C., Fortin J.A. 1990. Cultural control of basidiome formation in *Laccaria bicolor* with container-grow White pine seedlings. *Mycol Res.* 94:1051-1058.
- Guerin-Laguette A, Plassard C, Mousain D. 2000. Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Can J Microbiol* 46:790–799.
- Guerin-Laguette A, Cummings, N., Hesom-Williams N, Butler R, Wang Y. 2013. Mycorrhiza analyses in New Zealand truffières reveal frequent but variable persistence of *Tuber melanosporum* in coexistence with other truffle species. *Mycorrhiza* 23:87–98.
- Guerin-Laguette A, Cummings N, Catherine –Butler C, Willows A, Hesom-Williams N, Shuhong L, Wang Y. 2014. *Lactarius deliciosus* and *Pinus radiata* in New Zealand: towards the development of innovative gourmet mushroom orchards. *Mycorrhiza* (in press). doi: 10.1007/s00572-014-0570-y.
- Kikuchi K, Matsushita N, Suzuki K. 2009. Fruit body formation of *Tylopilus castaneiceps* in pure culture. *Mycoscience* 50:313-316.

- Kitamoto Y, Suzuki A, Furikawa S. 1972. An action spectrum for light-induced primordium formation in a basidiomycete, *Favolus arcularius* (Fr.) Ames. *Plant Physiol* 49: 338-340.
- Kües U. 2000. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 316-353.
- Kües U, Liu Y. 2000. Fruiting body production in Basidiomycetes. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:141-52.
- Lamhamedi MS, Godbout C, Fortin JA. 1994). Dependence of *Laccaria bicolor* basidiome development on current photosynthesis of *Pinus strobus* seedlings. *Can J For Res* 14: 412-415.
- Largent DL. 1973. How to identify mushrooms to genus I: Macroscopic features. Eureka, California, USA: Mad River Press.
- Largent DL, Johnson D, Stuntz DE, Watling R. 1977. How to identify mushrooms to genus III: Microscopic features. Eureka, California, USA: Mad River Press.
- Martínez-Reyes M, Pérez-Moreno J, Villarreal-Ruiz L, Ferrera- Cerrato R, Xoconostle-Cázares B, Vargas-Hernández J, Honrubia-García M. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Rev Chapingo Ser Cienc For Amb* 18: 183-192.
- Massicotte HB, Melville LH, Peterson RL. 2005. Building a basidiocarp: a case study of *Laccaria* spp. fruitbodies in the extraradical mycelium of *Pinus* ectomycorrhizas. *Mycologist* 19:141-149.
- Mueller GM. 1985. Numerical taxonomic analyses on *Laccaria* (Agaricales). *Mycologia* 77: 121-129.

- Mueller GM. 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana Botany* 30: 1-158.
- Obase K, Tamai Y, Yajima T, Miyamoto T. 2009. Mycorrhizal synthesis of four ectomycorrhizal fungi in potted *Populus maximowiczii* seedlings. *Mycoscience* 50: 143-145.
- Ohga S, Iida S. 2001. Effect of electric impulse on sporocarp formation of ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in Japanese red pine plantation. *J For Res* 6: 37-41.
- Ohga S, Cho NS, Li Y, Royse DJ . 2004. Utilization of pulsed power to stimulate fructification of edible mushrooms. *Int Soc Mush Sc* 16: 343-351.
- Ohta A. 1998. Fruit-body production of two ectomycorrhizal fungi in the genus *Hebeloma* in pure culture. *Mycoscience* 39: 15–19.
- Pérez-Moreno J, Read DJ. 2000. Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytol* 145: 301-309.
- Pérez-Moreno J, Read DJ. 2001a. Exploitation of pollen by mycorrhizal mycelial systems with special reference to nutrient recycling in boreal forests. *Proc. Roy Soc London B* 268: 1329-1335.
- Pérez-Moreno J, Read DJ. 2001b. Nutrient transfer from soil nematodes to plants: a direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. *Plant Cell Environ* 24: 1219-1226.
- Pérez-Moreno J, Martínez-Reyes M, Yescas-Pérez A, Delgado-Alvarado A, Xoconostle-Cázares B. 2008. Wild mushroom markets in Central Mexico and a case study at Ozumba. *Econ Bot* 62: 425–436.

- Pilz D, Molina R. 2001. Commercial harvests of edible mushrooms from the forests of the Pacific Northwest United States: issues, management and monitoring for sustainability. *For Ecol Management* 155: 3-16.
- Read DJ, Pérez-Moreno J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - a journey towards relevance? *New Phytol* 157: 475–492.
- SAS. 2002. Statistical Analysis System Institute. SAS User's guide. Version 9. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Smith SE, Read DJ. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd ed. London, UK: Academic Press.
- Takaki K, Kaneshawa K, Yamazaki N, Mukaigawa S, Fujiwara T, Takahashi K, Yamasita K, Nagane K. 2009a. Improvement of edible mushroom yield by electric stimulations. *J. Plasma Fusion Res Ser.* 8: 556-559.
- Takaki K, Yamazaki N, Mukaigawa S, Fujiwara T, Kofujita H, Takahashi K, Narimatsu M, Nagane K. 2009b. Effect of pulsed high-voltage stimulation on *Pholiota nameko* mushroom yield. *Acta Phys Pol A* 115: 1062-1065.
- Takaki K, Yamaguchi R, Kusaka T, Kofujita H, Takahashi K, Sakamoto Y, Narimatsu M, Nagane K. 2010. Effects of pulse voltage stimulation on fruit body formation in *Lentinula edodes* cultivation. *Int J Plasma Environ Science Technol* 4: 108-112.
- Trocha LK, Oleksyn J, Turzanska E, Rudawska M, Reich PB. 2007. Living on the edge: ecology of an incipient *Betula*-fungal community growing on brick walls. *Trees* 21:239–247.
- Wang Y, Hall IR. 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Can J Bot* 82: 1063–1073.
- Wessels JG. 1993. Fruiting in higher fungi. *Adv Microb Physiol* 34: 147-202.

- Wong KKY, Piché Y, Montpetit D, Kropp BR. 1989. Differences in the colonization of *Pinus banksiana* roots by sib-monokaryotic and dikaryotic strains of ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Can. J. Bot.* 67: 1717-1726.
- Yamada A, Ogura T, Ohmasa M. 2001. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza* 11:59-66.
- Yamada A, Kobayashi H, Ogura T, Fukada M. 2007. Sustainable fruit-body formation of edible mycorrhizal *Tricholoma* species for 3 years in open pot culture with pine seedling hosts. *Mycoscience* 48:104-108.

CAPITULO V

Bioensayo de escalamiento de producción de inóculo ectomicorrízico, para plantas nativas de México de interés forestal y formación de esporomas de hongos ectomicorrízicos.

5.1 Resumen

En la inoculación de hongos ectomicorrízicos comestibles en plantas forestales se ha utilizado generalmente micelio, mientras que la eficiencia del uso de esporas o esporomas deshidratados como fuente de inóculo ha sido escasamente estudiada. En el presente estudio se inocularon plantas de *Pinus greggii* y *P. montezumae*, con esporomas deshidratados molidos, de dos especies de hongos ectomicorrízicos comestibles: *Laccaria laccata s.l.* y *Hebeloma mesophaeum s.l.* Las plantas en donde se observaron porcentajes de colonización ectomicorrízica superiores a 90%, se trasplantaron de tubetes de 140 cm³ a contenedores de 6kg de capacidad, para evaluar la capacidad de mantener su colonización ectomicorrízica alta. Doscientos ochenta y cuatro y 330 días después del trasplante en los contenedores de PVC (siglas de material plástico de cloruro de polivinilo) de 6kg se registró la primera aparición de esporomas de *Laccaria laccata* y de *Hebeloma mesophaeum*, respectivamente. En el 2012, se registraron un total de 34 esporomas maduros (con láminas completamente expuestas) de *Laccaria laccata* y *H. mesophaeum*. La gran mayoría de ellos (57%) correspondieron a *H. mesophaeum* y un porcentaje más bajo (43%) a *L. laccata*. La mayor cantidad de esporomas (20) se registraron asociados con *P. montezumae* en comparación con *P. greggii* (15). En 2013, se registró un total de 110 esporomas maduros (con láminas completamente expuestas) de *L. laccata* y *H. mesophaeum*, con un porcentaje de (59%) correspondieron a *H. mesophaeum* y un porcentaje menor (41%) a *L. laccata*. Se registró mayor formación de esporomas (65) asociado a *P. greggii* en comparación con *P. montezumae*. La formación de los mismos se registró desde los 365 y 421 días después del trasplante en los contenedores de 6kg. Adicionalmente se registró la formación de esporomas tanto

de *L. laccata* y *H. mesophaeum* y se registró la formación de esporomas maduros y obtención de esporadas. En registros previos se ha documentado la aparición de esporomas de *Laccaria* o *Hebeloma*, utilizando como fuente de inóculo micelio, en la presencia de un hospedero, mientras que en el presente trabajo utilizando esporomas deshidratados se registraron la formación de esporomas. El presente estudio sugiere que las áreas donde se efectuaron orificios a los contenedores de PVC, tiene una influencia positiva en la formación de esporomas ectomicorrízicos. Al final del experimento, las dos especies de pino evaluadas mantuvieron altos porcentajes de colonización ectomicorrízica (que variaron de 80% a 84%).

5.2 INTRODUCCIÓN

Los hongos ectomicorrízicos (ECM) forman una interfase entre el suelo y la planta huésped en donde las hifas extrarradicales sirven como extensiones de la raíz en gimnospermas y funcionan como estructuras de absorción de agua y minerales (Leake *et al.*, 2004). Dentro de los ecosistemas naturales existen siete tipos de asociaciones micorrízicas, de las cuales dos son las más abundantes, la micorriza arbuscular y la ectomicorriza (Allen *et al.*, 2003). La micorriza arbuscular se asocia con 80% de las plantas vasculares mientras que la ectomicorriza se asocia con 3 % de las familias de plantas vasculares (Gimnospermas y Angiospermas) (Brundrett, 2002). Los hongos que forman dicha asociación pertenecen a los Basidiomycetes y Ascomycetes (Hibbett *et al.*, 2000). Las estructuras típicas de la simbiosis de hongos ectomicorrízicos son: *i*) manto, *ii*) red de Hartig y *iii*) micelio externo. Se ha demostrado que a través de la simbiosis ectomicorrízica existe un intercambio nutrimental fundamental para el funcionamiento de los ecosistemas forestales. Los hongos asociados reciben carbono de sus hospederos y las plantas reciben nutrimentos, principalmente N y P tanto inorgánico como orgánico (Smith and Read, 2008). Los hongos ectomicorrízicos juegan un papel importante dentro del ecosistema debido a que mantienen la conexión entre los árboles y el suelo (Pérez-Moreno and Read, 2004). El micelio externo de las ectomicorrizas puede ampliar las raíces de las

plantas varios metros, explorar en forma más eficiente el suelo y formar agregados, los cuales ayudan a mantener la estructura y la aireación en el suelo (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2004).

Para inducir la micorrización en especies de importancia forestal, se han utilizado principalmente tres tipos de inóculo: i) tierra de monte, ii) esporas de hongos ECM y iii) micelio de hongos ectomicorrízico. Las capas superficiales del suelo forestal (por lo común, el material orgánico que abarca los primeros 10 cm se han utilizado por mucho tiempo como fuente de inóculo, en los países denominados del tercer mundo. Las esporas de hongos ectomicorrízicos, principalmente Gasteromycetes, pero no Agaricales, también se han usado ampliamente en la producción de plantas en los denominados países desarrollados (Castellano, 1994). El micelio de los hongos ectomicorrízicos es una de las fuentes de inóculo que ha recibido mayor atención en las últimas décadas. La principal limitación de esta técnica, junto con su alto costo, es que el aislamiento de los hongos ECM en medios sintéticos se encuentra, a la fecha, muy limitado. A pesar de su enorme importancia el estudio de la producción de micelio ectomicorrízico útil para plantas de interés forestal ha recibido escasa atención en México. En el presente trabajo se evaluó el desarrollo de raíces ectomicorrizadas de *Pinus greggii* y *P. montezumae*, inoculados con *Laccaria laccata* y *Hebeloma mesophaeum*, al ser trasplantadas de contenedores de 140 cm³ a contenedores de 5kg, tendientes al escalamiento de producción de inóculo ectomicorrízico. Asimismo se registró la formación de esporomas de las especies involucradas.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Material biológico y condiciones de crecimiento

P. greggii y *P. montezumae* son especies nativas de México de gran importancia forestal. Las semillas utilizadas de dichas especies procedían de bosques naturales de Xochicoatlán, Hidalgo y Cofre de Perote, Veracruz. Las semillas se remojaron en agua corriente durante 24 horas, después se esterilizaron con H₂O₂ a 30%,

durante 20 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril bajo condiciones asépticas. Posteriormente se colocaron tres semillas de cada especie de pino en envases de plástico negro de 140 cm³, a los cuales se les agregó 150 g de sustrato compuesto de una mezcla de arena de río, corteza de pino y suelo forestal, en proporción 2:2:1. El sustrato se esterilizó con vapor a una presión de 1.3 kg/cm² y una temperatura de 125 °C durante 3 horas, se dejó reposar durante dos días y al cuarto día se volvió a esterilizar por 2 horas.

5.4 Preparación de inoculantes

Para la preparación de inoculantes se utilizaron hongos que procedían de la región de la Sierra Nevada en el municipio de Ozumba, del estado de México. Las especies empleadas para la producción de inóculo fueron *Laccaria laccata s.l.* y *H. mesophaeum s.l.*, debido a que la comercialización de estas especies comestibles ectomicorrízicos tiene gran importancia social, económica y cultural en el centro de México y un gran potencial en la producción de inóculo para árboles de importancia forestal. Los píleos de *L. bicolor* y *H. mesophaeum*, fueron cortados de sus estípites, dado que estas estructuras contienen las esporas en los himenios laminares. Estos píleos fueron deshidratados a 35 °C, y posteriormente molidos, tamizados en una malla de apertura de 1.19 mm, para homogeneizar el tamaño de las partículas obtenidas. El inóculo fue conservado en viales de plástico Eppendorf con una capacidad de 1.5 mL, a una temperatura de 5 °C, hasta su utilización. Cada planta fue inoculada con 10⁷ a 10⁸ esporas. Las plantas se mantuvieron en invernadero durante cinco años posteriormente, regándolas cada tercer día con agua destilada estéril. Se seleccionaron árboles de *P. greggii* y *P. montezumae*, tomando como criterio de selección que la plantas tuviesen un porcentaje de micorrización de 90% o más, para ser trasplantados de contenedores de 140 cm³ a contenedores de PVC de 6 kg de volumen.

5.5 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con cuatro tratamientos las cuales fueron inoculadas con los hongos ectomicorrízicos señalados (Cuadro 2). Se evaluaron dos especies de pinos, *P. greggii* y *P. montezumae*, inoculadas con dos especies de hongos, *Laccaria laccata*, y *H. mesophaeum*. Para cada uno de los 4 tratamientos así generados, se tuvieron 6 réplicas; dado que se consideraron dos especies de pinos se generó entonces un $2 \times 2 \times 6 = 24$ unidades experimentales, cada una constituida por un árbol.

Cuadro 2. Combinaciones de especies fúngicas en los tratamientos para *Pinus greggii* y *P. montezumae*.

No. de tratamiento	Micobionte	Fitobionte	Clave de referencia
1	<i>Laccaria laccata</i>	<i>Pinus montezumae</i>	Ll+Pm
2	<i>Laccaria laccata</i>	<i>Pinus greggii</i>	Ll+Pg
3	<i>Hebeloma mesophaeum</i>	<i>P. montezumae</i>	Hm+Pm
4	<i>Hebeloma mesophaeum</i>	<i>Pinus greggii</i>	Hm +Pg

6 réplicas por 4 tratamientos = 24 unidades experimentales

5.6 Evaluación de formación de esporomas y toma de fotomicrografías

Una vez que se registraron los primeros esporomas, se efectuaron, al menos cada tercer día, evaluaciones periódicas durante 137 días registrando la formación de nuevos esporomas o primordios. Se describieron las características morfológicas de los esporomas y de las raíces micorrizadas; en el caso de los esporomas maduros, se realizó un análisis destructivo de éstos, cortando el píleo del estípite y se pesaron para inocular a otros pinos con el objetivo de buscar nuevas formas de micorrización más eficiente. Se tomaron fotografías de esporomas maduros en invernadero con una cámara digital Full HD 1080 (SONY Corporation, Japón). En esporomas maduros se colocó un portaobjetos debajo de los mismos para

recolectar las esporas y registrar el color de las esporadas. Las fotografías de las esporas se tomaron con un microscopio Olympus BX51 modelo U-LH100H.

5.7 conteo de raíces

Las plantas fueron evaluadas a los dos años de ser trasplantadas en los tubos de PVC. Los pinos fueron regados con abundante agua un día antes que fueran muestreados. Se extrajeron tres muestras con la ayuda de un tubo delgado de dicho material de un diámetro de 3cm, a una distancia de 20,40 y 60 cm de distancia del tallo de cada pino, posteriormente se sumergió en una tina con agua y se tamizó cuidadosamente para obtener la raíz (figura 10). Con un microscopio estereoscópico se contó el número de raíces micorrizadas, siguiendo las técnicas propuestas por Grand *et al.* (1982), Castellano *et al.* (1989) y Marx *et al.* (1994). El tubete fue dividido en tres partes, con la finalidad de realizar un conteo más específico (figura 9).

5.8 Resultados

5.8.1 Frecuencia de formación de esporomas

Durante el transcurso del experimento del 2012, se registró un total de 34 esporomas maduros (con láminas completamente expuestas) de *Laccaria laccata* y *H. mesophaeum*. La gran mayoría de ellos (57%) correspondieron a *H. mesophaeum* y un porcentaje más bajo (43%) a *L. laccata*. La mayor cantidad de esporomas (20) se registraron asociados con *P. montezumae* en comparación con *P. greggii* (15) (Figura 11). La formación de los mismos se registró desde los 284 y 420 días después del trasplante en los contenedores de 6kg. Los primeros esporomas de *Hebeloma mesophaeum*, 280 días después del trasplante, se observaron asociados con *P. montezumae*. Se registró un total de 110 esporomas maduros en el 2013 (con láminas completamente expuestas) de *L. laccata* y *H. mesophaeum*, con un porcentaje de (59%) correspondieron a *H. mesophaeum* y un porcentaje menor (41%) a *L. laccata*. Se registró mayor formación de esporomas

(65) asociado a *P. greggii* en comparación con *P. montezumae* (Figura 11). La formación de los mismos se registró desde los 365 y 421 días después del trasplante en los contenedores de 6kg.

Existió un efecto conspicuo en la formación de esporomas de *L. laccata* y *Hebeloma mesophaeum* como consecuencia de dejar un orificio de 4 cm² los tubos de PVC evaluados. Se observó un mayor número de esporomas de *H. mesophaeum* y de *Laccaria laccata*, independientemente de la planta hospedera. En el caso del número de esporomas de *Hebeloma mesophaeum* este fue 2 veces mayor cuando las plantas estuvieron expuestas al orificio de 4 cm² en comparación con las plantas que no tenían el orificio, en *P. montezumae* y *P. greggii*, respectivamente. En el caso del número de esporomas de *L. laccata* registrados fue 3 veces mayor (Figura 11).

La mayoría de los contenedores presentaron más de 4 esporomas tanto de *L. laccata* y *H. mesophaeum*. Es interesante señalar que en un contenedor con *P. montezumae* se registró más de 200 primordios de *H. mesophaeum*, Sin embargo, todos estos primordios abortaron y ninguno formó esporomas maduros. 56 días después en ese mismo contenedor se volvió a formar otros esporomas alcanzando su estado maduro. La longevidad de los esporomas desde un primordio pequeño visible hasta esporomas senescentes fue en promedio de 18 días. En contraste, el tiempo transcurrido desde el inicio de los agregados miceliales hasta la senescencia de los esporomas fue de 35 a 40 días. Tanto de *L. laccata* y *H. mesophaeum* se observó la expulsión de esporadas abundantes 14 días después de la aparición de primordios visibles cuya presencia fue confirmada al ser recolectados en portaobjetos. Todos los primordios de *L. laccata* y *H. mesophaeum* se desarrollaron en los orificios que se dejaron en el contenedor observándose que los esporomas son geotrópicamente positivos, debido a que se observaron estípites rectos en todos los casos, los esporomas formados alcanzaron su tamaño natural cuando son recolectados en campo.

5.8.2 Efecto de la realización de orificios en los tubos de PVC en la formación de esporomas

Existió un efecto conspicuo en la formación de esporomas de *L. laccata* y *Hebeloma mesophaeum* como consecuencia de crear orificios de 4 cm² en los tubos de PVC evaluados. Se observó un mayor número de esporomas de *H. mesophaeum* y de *Laccaria laccata*, independientemente de la planta hospedera. En el caso del número de esporomas de *Hebeloma mesophaeum* este fue 2 veces mayor cuando las plantas estuvieron expuestas al orificio de 4 cm² en comparación con las plantas que no tenían el orificio, en *P. montezumae* y *P. greggii*, respectivamente. En el caso del número de esporomas de *L. laccata* registrados fue 3 veces mayor. La longevidad de los esporomas desde un primordio pequeño visible hasta esporomas senescentes fue en promedio de 18 días. En contraste, el tiempo transcurrido desde el inicio de los agregados miceliales hasta la senescencia de los esporomas fue de 35 a 40 días. Tanto de *L. laccata* y *H. mesophaeum* se observó la expulsión de esporas abundantes 14 días después de la aparición de primordios visibles cuya presencia fue confirmada al ser recolectados en portaobjetos. Todos los primordios de *L. laccata* y *H. mesophaeum* se desarrollaron en los orificios que se dejaron en el contenedor observándose que los esporomas son geotrópicamente positivos, debido a que se observaron estípites rectos en todos los casos, los esporomas formados alcanzaron su tamaño natural cuando son recolectados en campo.

5.9 Colonización micorrízica

En términos generales las dos especies de pino presentaron altos porcentajes de micorrización con las especies de hongos inoculadas. Los valores de colonización por micorrizas vivas totales variaron de 89 a 95% (cuadros 2 y 3) En *P. greggii* el valor más alto en porcentaje de colonización (91.3 %) se encontró en pinos inoculados con *Hebeloma mesophaeum* (cuadro 2). Estos son porcentajes de colonización muy altos, por ejemplo Parladé *et al.* (1999) encontraron que el

máximo porcentaje que se obtuvo con la coinoculación de *L. bicolor* y *Rhizopogon spp.* en plantas de *Pseudotsuga menziesii* y *Pinus pinaster* fue de 50%. En el caso de *P. montezumae*, el valor con el máximo porcentaje de colonización se registró cuando se inoculó con *Laccaria laccata* (Cuadro 3).

El porcentaje de raíces micorrizadas vivas en *Pinus greggi* fue mayor en el área inferior del cepellón (40.1 a 60 cm de profundidad), independientemente de la especie de hongos inoculado. Un factor que podría haber influido en esta distribución, es la cantidad de raíces y entonces de espacio aéreo, la cual fue diferencial en las tres secciones evaluadas, lo cual podría haber limitado la respiración del hongo estudiado y reducir su colonización en las partes superior y media. Para el caso de *Pinus montezumae* se observó una tendencia similar a la observada en *Pinus greggi*, cuando las plantas fueron inoculadas con *Laccaria laccata*. Sin embargo, cuando las plantas se inocularon con *Hebeloma mesophaeum* se observó una tendencia distinta dado que los mayores valores de colonización ectomicorrízica fueron observados en la parte superior y media; y los valores inferiores en las parte inferior. Es decir, al parecer fue la especie de hongo, más que la especie de planta la que determinó la colonización diferencial en las diferentes partes de los contenedores de PVC.

A continuación se presenta la caracterización micromorfológica realizada a las raíces cortas de las especies de *Pinus*, con *L. laccata s.l.* y *H. mesophaeum s.l.*

Caracterización micromorfológica *Laccaria laccata s.l.* Raíces micorrizadas de 2 a 6 mm de longitud y hasta 0.5 mm de diámetro, con un tipo de ramificación ausente o dicotómica en la misma proporción, con superficie lisa, sin rizomorfos, las puntas no ramificadas presentaron formas moniliformes e hinchadas en la punta. Las raíces micorrizadas poseían la base de color café oscuro y los ápices fueron blancos cuando jóvenes y posteriormente se tornaron de color crema o café claro. El ápice fue ligeramente más largo que la base en la mayoría de las ocasiones; ya que este fue de 0.1 a 0.4 mm más largo que la base. El color de la superficie del manto no se encontró distribuido homogéneamente, ya que en

general era brillante. Las hifas de la capa externa del manto presentaron un arreglo plectenquimatoso. Macromorfológicamente se apreciaron hifas gelatinosas blanquecinas o más frecuentemente café claro amarillentas (figura 12)

Caracterización micromorfológica *H. mesophaeum s.l.* también formó micorrizas con ambas especies de pino. El porcentaje de colonización al inocular exclusivamente dicha especie fue de alrededor de 80% en ambas especies de pinos, mientras que se registraron porcentajes menores cuando se efectuó la inoculación simultánea de dicha especie de hongo con *L. laccata* (Cuadro 3.1). Las ramificaciones de las micorrizas de *H. mesophaeum* presentó un tipo de ramificación en su mayoría ausente y raramente dicotómica, con una longitud aproximada de 1 – 9 mm y un diámetro de 0.3 mm, no presentó rizomorfos, las puntas no ramificadas eran de tipo moniliformes y cilíndricas de color café claro, siendo más oscura la base que la punta (Figura 8 b), las que estaban en un estadio más joven tenían la punta blanca. En su etapa adulta la base (10 mm) fue mayor que el ápice (2 mm). El tipo de manto en la superficie fue liso, su anatomía en la capa externa resultó plectenquimatoso. Macromorfológicamente se observaron hifas emanantes abundantes, de color blanco y en algunas partes café (Figura 12).

5.10 Discusión

En el caso de los hongos ectomicorrízicos comestibles se ha utilizado usualmente esporas y micelio como inoculante de plántulas (Yamada *et al.*, 2001a; 2001b; 2007; Ruiz-Díez *et al.*, 2006). Se ha demostrado que las esporas son exitosamente utilizadas como fuente de inóculo ectomicorrízico en plantaciones forestales (Pérez-Moreno *et al.*, 2010). En países como México, esta biotecnología ha recibido escasa atención, a pesar de su enorme potencial. En nuestro caso se utilizó esporomas deshidratados como fuente de inóculo esporal. Se observó una clara preferencia en la formación de esporomas de *L. laccata* con *P. montezumae*, en comparación con *P. greggii*, bajo las mismas condiciones ambientales. En

cuanto a la formación de *Hebeloma mesophaeum* nuevamente se registró un alto porcentaje de formación de esporomas en *P. montezumae*, en comparación con *P. greggii*. Así mismo, al parecer existe una relación entre el porcentaje de micorrización y la formación de esporomas (Ohta, 1998; Guerin-Laguette *et al.*, 2000; Alexis *et al.*, 2014), aun y cuando esos porcentajes no sean únicamente del esporoma formado. Previamente, Godbout *et al.* (1990) señalaron como una observación que *L. bicolor* formó más esporomas con *P. strobus* que con *P. taeda* y *Picea glauca* (Last *et al.*, 1984; Baum *et al.*, 2009).

Se ha reportado que la formación de esporomas requiere CO₂, las proporciones relativas de oxígeno y de bióxido de carbono en el aire son de vital importancia tanto para el crecimiento del micelio como para la producción de esporomas. Algunas especies requieren concentraciones elevadas de bióxido de carbono en la atmósfera, 22%. Zadrazil (1978) reporta que concentraciones de CO₂ más allá del 28% estimulan el crecimiento del micelio, pero por arriba de 40% lo inhiben. *Pleurotus* al igual que otros hongos requiere niveles de oxígeno muy bajos para su crecimiento (Rajarathnam and Bano, 1987).

L. laccata y *H. mesophaeum* son especies de hongos que se venden y consumen tradicionalmente en diversas regiones de México (Montoya *et al.* 2003; Pérez-Moreno *et al.*, 2008; Estrada-Martínez *et al.*, 2009). Las especies estudiadas tienen un gran potencial para su uso en invernadero, dado que poseen características tales como: ser especies pioneras (Obase *et al.*, 2009), desarrollarse en sitios con bajas cantidades de nutrimentos (Trocha *et al.*, 2007) y ser especies registradas abundantemente en plantaciones (Barroetaveña *et al.*, 2005) y en invernadero (Barroetaveña *et al.*, 2005; Rincon *et al.*, 2007), y en México, al ser comestibles, es relativamente fácil el acceder a grandes cantidades por su amplia y comercialización en el área de estudio (Pérez-Moreno *et al.*, 2008) y en otras áreas del centro de México (Montoya *et al.*, 2008).

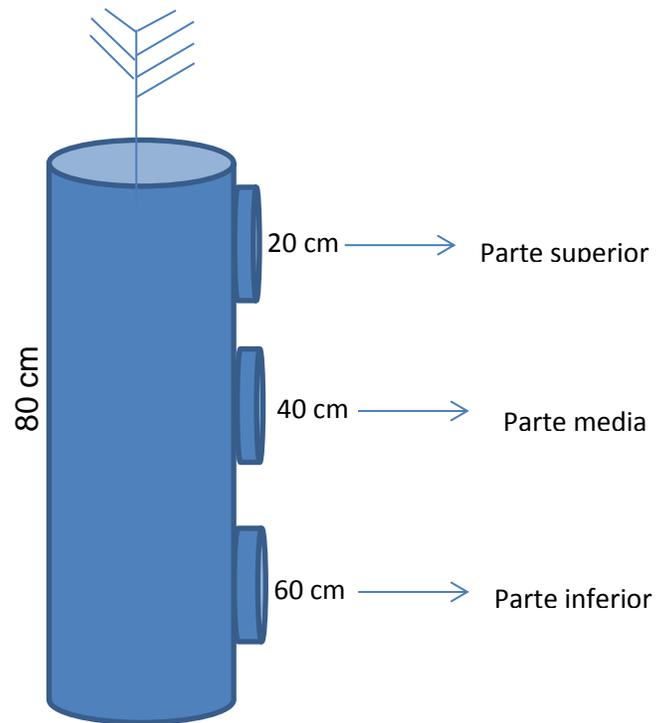


Figura 9. Porciones analizadas en los contenedores de los PVC para cada una de los tratamientos evaluados.



Figura 10. a, b y c) con la ayuda de un bisturí y un mechero se procedió a efectuar orificios en los contenedores de PVC; b y d) una vez efectuados los orificios se utilizó un tubo de PVC de 3cm de diámetro para muestrear las tres secciones correspondiente, en la parte superior, media e inferior a distancias de 10-20 cm; 21-40cm y 41-60cm de longitud; e) Una vez tomadas las muestras con el suelo y las raíces ectomicorrizadas se colocaron en una recipiente con agua y se tamizaron con el objetivo de recuperar las raíces; f) se recolectaron las raíces en una caja de Petri para observarlas en microscopio estereoscópico y evaluar la colonización ectomicorrízica.

Formación es esporomas en los contenedores de PVC (en orificio de drenaje)



Figura 11. a-e) Ontogenia de los esporomas de *Laccaria laccata s.l.* asociados con *Pinus greggii*, todas las imágenes mostradas corresponden a distintos estadios del mismo esporoma: a) primordio de 5 mm formado 5 meses después del trasplante; b) esporoma inmaduro, con estípite elongado, píleo hemisférico y láminas semiexpuestas, 5 días después de la foto mostrada en (a); c) esporoma con píleo plano con los márgenes levantados, 10 días después de la foto mostrada en (a). d y e) Esporoma maduro con píleo con láminas expuestas, lamélulas maduras, inicio de esporulación, y estípite fibroso, 15 días después de la foto mostrada en (a). f) Abundante micelio externo de *Hebeloma mesophaeum s.l.* formado en contenedores de PVC con orificios de 4cm².

Formación de esporomas en los contenedores de PVC (en orificio de 4cm²)

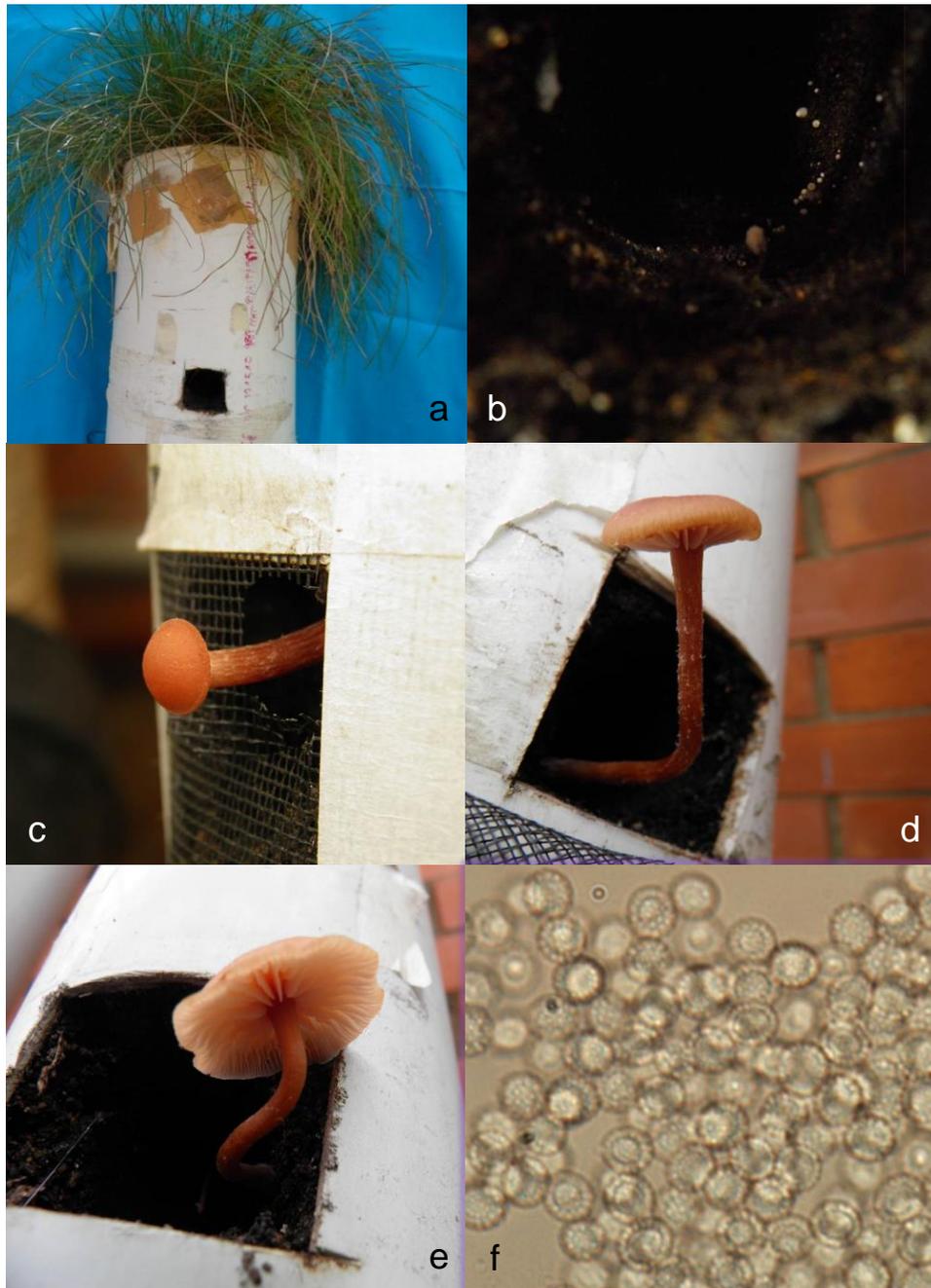


Figura 12. Formación de esporoma de *Laccaria laccata* s.l. asociados con *Pinus montezumae*, todas las imágenes mostradas corresponden al mismo esporoma. b) Primordio de 3 mm, formado 7 meses después de la realización del orificio; c) Esporomas inmaduros con píleos hemisféricos; d) esporoma joven, con estípote elongado, píleo hemisférico y láminas semiexpuestas. e) Esporoma maduro con píleo con láminas expuestas, lamélulas maduras, inicio de esporulación, y estípote fibriloso. f) Esporas globosas equinuladas características de *Laccaria laccata* producidas por el esporoma maduro.

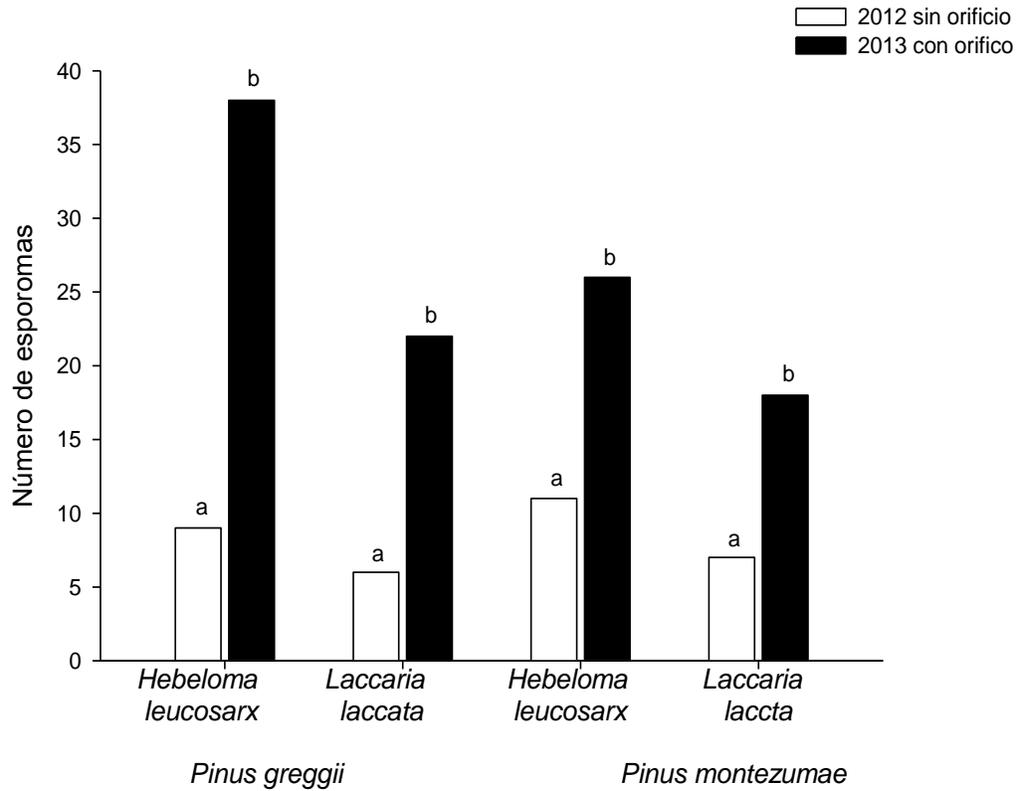


Figura 13. Producción de esporomas un periodo de 4 meses (de Octubre 2012 a Enero 2013) de dos especies de hongos comestibles ectomicorrízicos asociados con 2 especies de árboles neotropicales de 6 años de edad en tubos de PVC, sin orificios (columnas huecas) y con orificios (columnas llenas) (para detalles ver sección de Materiales y métodos).

Cuadro 3. Porcentaje de raíces cortas micorrizadas y no micorrizadas, vivas y muertas, de *Pinus greggii*, 421 días después del trasplante inoculadas con dos hongos comestibles ectomicorrízicos (ver sección de Materiales y Métodos).

Tratamiento §	Profundidad del cepellón ¶ (cm)	Vivas		Muertas	
		Micorrizadas	No Micorrizadas	Micorrizadas	No Micorrizadas
		%			
Ll	1	18.5	0.7	1.2	0
	2	29.5	0	5.3	0
	3	41	0	3.5	0
	Total	89	0.7	10.0	0
Hm	1	12.8	0	3.8	0
	2	32.8	0	3.2	0
	3	45.7	0	1.1	0
	Total	91.3	0	8.1	0

Ll= *Laccaria laccata*, Hl= *Hebeloma mesophaeum*. ¶=Profundidad del cepellón a partir del cuello de la raíz de la planta; 1=0 a 20 cm, 2=21 a 40 cm y 3=41 a 60 cm. Se consideró como 100% a la sumatoria de raíces cortas vivas y muertas independientemente de si estaban o no micorrizadas.

Cuadro 4. Porcentaje de raíces cortas micorrizadas y no micorrizadas, vivas y muertas, de *Pinus montezumae*, 421 días después del trasplante inoculadas con tres combinaciones de especies de hongos comestibles ectomicorrízicos (ver sección de Materiales y Métodos).

Tratamiento §	Profundidad del cepellón ¶ (cm)	Vivas		Muertas	
		Micorrizadas	No Micorrizadas	No Micorrizadas	Micorrizadas
		%		%	
Ll	1	25.5	0	0.9	0
	2	26.3	0	0.9	0
	3	43.3	0	2.3	0
	Total	95.1	0	4.1	0
Hm	1	35.1	0	3.9	0
	2	35.0	0	1.6	0
	3	23.3	0	0.7	0
	Total	93.4	0	6.2	0

Ll= *Laccaria laccata*, Hm= *Hebeloma mesophaeum*. ¶=Profundidad del cepellón a partir del cuello de la raíz de la planta; 1=0 a 20 cm, 2=21 a 40 cm y 3=41 a 60 cm. Se consideró como 100% a la sumatoria de raíces cortas vivas y muertas independientemente de si estaban o no micorrizadas.

Propagación de raíces ectomicorrizadas

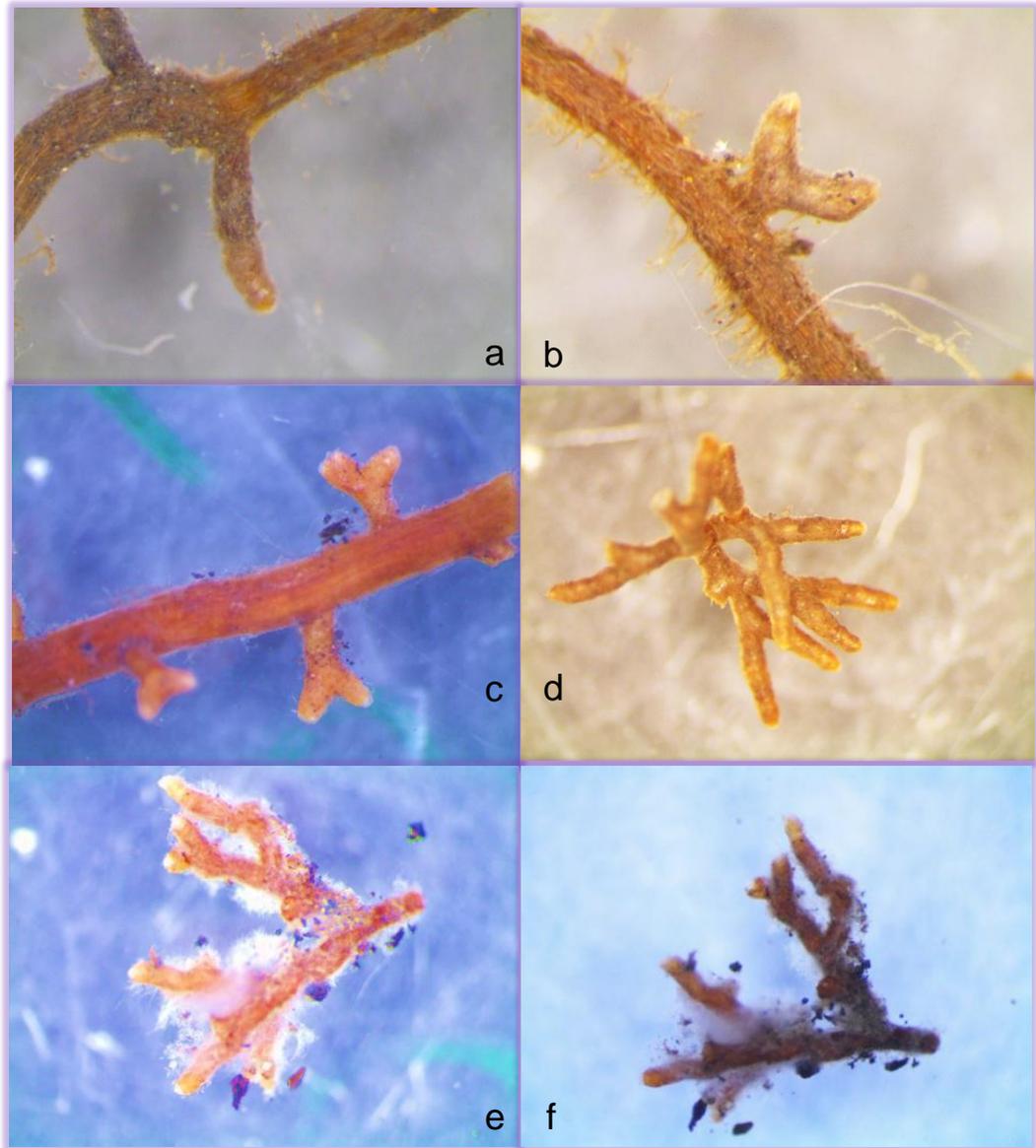


Figura 14. a) Raíces micorrizadas o no con hongos ectomicorrízicos, tres meses después de montado el experimento. a) se muestra una raíz de *Pinus montezumae* no micorrizada mostrando abundantes pelos radicales; b y c) raíces micorrizadas con *Laccaria laccata* el micelio es transparente y gelatinoso en la superficies de la raíz de *Pinus montezumae*; d) raíz micorrizada de *Pinus greggii* con *Laccaria bicolor*. e y f) raíces de *Pinus montezumae* micorrizadas con *Hebeloma mesophaeum s.l.*, se distinguen de las demás raíces por sus abundantes hifas emanantes de color blanco.

5.11 LITERATURA CITADA

- Alvarado-Rosales, D., T., Hernandez-Tejeda. 200. Decline of sacred fir in the Desierto de los Leones National Park. Urban Air Pollution and Forests: Resources at Risk in the Mexico City Air Basin. In: M E Fenn, L I de Bauer, T Hernandez T (eds). Ecological Studies 156. Springer-Verlag. New York. pp:243-260.
- Baum, C.,h., Toljander Y.K., Eckhardt K., Weih M. 2009. The significance of host-fungus combinations in ectomycorrhizal symbioses for the chemical quality of willow foliage. *Plant Soil*. 323:213-224.
- Barroetaveña, C., Cázares E., Rajchenberg M. 2005. Mycorrhizal fungi in *Pinus ponderosa* introduced in Central Patagonia (Argentina). *Nova Hedwigia* 80:453- 464.
- Brundett, M, C. 2002.Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol*. 154: 275-304.
- Castellano, M. A. 1994. Current Status of Outplanting Studies using Ectomycorrhiza Inoculated Forest Trees. In: Pflieger F.L. y R.G. Linderman (ed) *Mycorrhizae and Plant Health*. APS press, St paul. 261-281.
- Castellano, M., and R. Molina. 1989. "Mycorrhizae". In: Landis, T., R. Tinus, S. Mc Donald, J. Barnett. *The Container Tree Nursery Manual*, vol. 5. Agric. Handbk. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service: 101–167 pp.
- Estrada-Martínez, E., Gastón G., Cibrián-Tovar D., Ortega-Paczka R. 2009. Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos comestibles silvestres de mercados regionales y comunidades de la Sierra Nevada (México). *Interciencia* 34:25-33.
- Godbout, C., Fortin J.A. 1990. Cultural control of basidiome formation in *Laccaria bicolor* with container-grow White pine seedlings. *Mycol Res*. 94:1051-1058.
- Guerin-Laguette, A., Plassard C., Mousain D. 2000. Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Can. J. Microbiol*. 46:790-799.
- Last, F.T., Mason P.A., Pelham J., Ingleby K. 1984. Fruitbody production by sheathing mycorrhizal fungi: effects of 'host' genotypes and propagating soils. *For Ecol Manage*. 9:221-227.

- Largent, D. L.; Johnson, D. and Watling, R. 1977. How to identify mushrooms to genus III: microscopic features. Mad River Press Inc. Eureka, California. 148 p.
- Largent, D. L. 1973. How to identify mushrooms to genus I: macroscopic features. Mad River Press In. Eureka, California. 86 p.
- Leake, J., J., David J, D., Damian, M Gemma, B Lynne. 2004. Networks of power and influence: The role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can. J. Bot.* 82:1016-1045.
- Marx, D. H., J. L. Ruelle y C. E. Cordell. 1994. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. pp. 383-411. In: Norris, J.R., D.J. Read y A.K. Varma (eds.). *Techniques for mycorrhizal research, Methods in Microbiology.* Academic Press. London, UK.
- Montoya, A., Hernández N., Mapes C, Kong A., Estrada-Torres A. 2008. The collection and sale of wild mushrooms in a community of Tlaxcala, México. *Economic Botany* 62: 413-424.
- Montoya, A., Hernández-Totomoch O., Estrada-Torres A., Kong A. 2003. Traditional knowledge about mushrooms in a Nahua community in the state of Tlaxcala, México. *Mycologia* 95:793-806.
- Mueller, G. M. 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana: Botany*, Chicago: Field Museum of Natural History. 158 p.
- Obase, K., Tamai Y., Yajima T., Miyamoto T. 2009. Mycorrhizal synthesis of four ectomycorrhizal fungi in potted *Populus maximowiczii* seedlings. *Mycoscience* 50:143-145.
- Ohta, A. 1998. Fruit-body production of two ectomycorrhizal fungi in the genus *Hebeloma* in pure culture. *Mycoscience* 39:15-19.
- Paoletti, E, B Andrzej , A Chris, A Algirdas, F, Marco, G Nancy, G G Madeleine, I John, J Dale, K Dave, L Jesada, M Rainer, M Steven, S Gerhard Muller, M Robert, P Kevin. 2007. Impacts of Air Pollution and Climate Change on Forest Ecosystems- Emerging Research Needs. *Sci. World J.* 7:1-8.
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes M., Yescas-Pérez A., Delgado-Alvarado A., Xoconostle- Cázares B. 2008. Wild mushroom markets in Central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany* 62:425-436.
- Pérez-Moreno, J., and, dj read. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247.

- Rincón, A., Parladé J., Pera J. 2007. Influence of the fertilisation method in controlled ectomycorrhizal inoculation of two Mediterranean pines. *Ann. For. Sci.* 64:577-583.
- Smith, se and dj read. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Third edition. Academic Press, New York, USA.
- Trocha, L., K., Oleksyn J., Turzanska E., Rudawska M., Reich P.B. 2007. Living on the edge: Ecology of an incipient *Betula*-fungal community growing on brick walls. *Trees* 21:239–247.
- Yamada, A., Kobayashi H., Ogura T., Fukada M. 2007. Sustainable fruit-body formation of edible mycorrhizal *Tricholoma* species for 3 years in open pot culture with pine seedling host. *Mycoscience* 48:104-108.
- Yamada, A., Ogura T., Ohmasa M. 2001a. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza* 11:59-66.
- Yamada, A., Ogura T., Ohmasa M. 2001b. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis. II. Morphology of mycorrhizas in open-pot soil. *Mycorrhiza* 11:67-81.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

Hasta donde conocemos este es el primer trabajo que demuestra que la calidad de luz influye en la formación de esporomas de hongos comestibles ectomicorrízicos. Se observó una frecuencia 2.6 y 2.1 veces mayor de formación de esporomas de *Hebeloma leucosarx* en las plantas que estuvieron expuestas al filtro amarillo en comparación con plantas expuestas al filtro rojo, en *P. montezumae* y *P. greggii*, respectivamente. Una tendencia opuesta se observó para *L. bicolor*. Adicionalmente, se describe detalladamente la ontogenia de *L. bicolor* y *H. leucosarx* y se establecieron estadios definidos para cada una de estas especies, desde agregados miceliales hasta esporomas senescentes.

Cuando *P. montezumae* y *P. greggii* se inocularon con *Laccaria laccata s.l.* y *Hebeloma mesophaeum s.l.* se registraron altos porcentajes de colonización, superiores a 90 %. Esta alta colonización estuvo asociada con la formación de esporomas de *L. laccata* y de *H. mesophaeum*, lo cual es una evidencia de la eficiencia de los métodos de inoculación empleados. La aparición de los primeros esporomas de *H. leucosarx* y *L. laccata* ocurrió 280 y 420 días después del trasplante a contenedores de 6kg de capacidad, respectivamente.

Los resultados de la presente investigación demuestran que las especies comestibles ectomicorrízicas evaluadas, pertenecientes a los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* poseen un enorme potencial biotecnológico para la producción de plantas de *Pinus greggii* y *Pinus montezumae* en invernadero en México.

“CUANDO CREÍAMOS
QUE TENÍAMOS
TODAS LAS
RESPUESTAS, DE
PRONTO, CAMBIARON
TODAS LAS
PREGUNTAS”
MARIO BENEDETTI