



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGIA

INOCULACIÓN DE HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES EN PINOS NATIVOS DE MÉXICO

VIOLETA CARRASCO HERNÁNDEZ

T E S I S

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

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis titulada: **Inoculación de hongos silvestres comestibles en pinos nativos de México**, realizada por la alumna: Violeta Carrasco Hernández bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

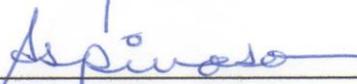
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Roberto Quintero Lizaola

DIRECTOR DE TESIS



Dr. Teodoro Espinosa Solares

ASESOR



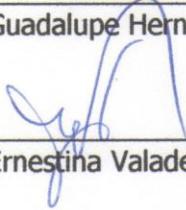
Dr. Jesús Pérez Moreno

ASESOR



Dra. Guadalupe Hernández Eugenio

ASESOR



Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR



Dr. Nagamani Balagurusamy

Montecillo, Texcoco, Estado de México, diciembre de 2014

INOCULACIÓN DE HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES EN PINOS NATIVOS DE MÉXICO

Violeta Carrasco Hernández, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2014

RESUMEN

En México existe una gran diversidad de hongos silvestres comestibles los cuales además de su valor nutracéutico tienen un gran potencial biotecnológico aplicado al área forestal. En el presente trabajo se realizó la inoculación de hongos ectomicorrizicos comestibles deshidratados del género *Hebeloma* sp. *Laccaria* sp. y *Suillus* sp. en *Pinus patula*, *Pinus pseudostrobus* y *Pinus greggii*. Una vez lograda la síntesis de los hongos estudiados, plantas de *Pinus greggii* micorrizadas se plantaron en condiciones de campo. Adicionalmente se plantaron pinos sin micorrizar. Siete años después del establecimiento del bioensayo en campo, la supervivencia fue del 57 % para pinos inoculados con *Suillus brevipes* y 0 % para el caso de las plantas que no fueron micorrizadas. Debido a la importancia que pudiera tener el uso de especies de *Suillus* spp. como inoculante micorrízico se estudiaron las especies del género comercializadas en el mercado de Ozumba, Estado de México. Las especies identificadas se agruparon en cuatro grupos. Así mismo se realizó la caracterización morfológica de los esporomas de *Hebeloma mesophaeum*, *Hebeloma leucosarx* y *Hebeloma alpinum*. El conocimiento de los hongos silvestres comestibles en su estado de esporoma y ectomicorriza es indispensable para su uso como inoculante micorrízico en vivero, lo cual podría aumentar la supervivencia de plantas en campo.

Palabras claves: ectomicorriza, *Suillus* sp., *Hebeloma* sp. y *Laccaria* sp.

INOCULATION OF WILD EDIBLE FUNGI IN NATIVE PINES OF MEXICO

Violeta Carrasco Hernández, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2014

ABSTRACT

In México there is a great diversity of wild edible fungi with nutraceutical value and a great biotechnological potential applied to the forest area. In this paper the inoculation of dried wild edible fungi of the genus *Hebeloma* sp. *Laccaria* sp. and *Suillus* sp. was done in *Pinus patula*, *Pinus pseudostrobus* and *Pinus greggii*. When was achieved the synthesis of the fungi studied in plants of *Pinus greggii* mycorrhized were transplanted to field. Further pines were planted without mycorrhizal. Seven years after the establishment of bioassay in field, the survival was of 57 % for pine inoculated with *Suillus brevipes* and zero for the case of plants that were not mycorrhized. Because of the importance that could have the use of species of *Suillus* spp. as mycorrhizal inoculant was studied the species of the genus marketed in the market of Ozumba, State of Mexico. The species identified were grouped into four groups. The morphological characterization of sporome of *Hebeloma mesophaeum*, *Hebeloma leucosarx* and *Hebeloma alpinum* was done. The knowledge of wild edible fungi in their sporoma and ectomycorrhiza status is essential for use as mycorrhizal inoculants in nursery and which could increase the survival of plants in field.

Key words: ectomycorrhiza, *Suillus* sp., *Hebeloma* sp. and *Laccaria* sp.

DEDICATORIAS

A mí amada Elizabeth quien es mi alegría y mi fuente de inspiración.

A mí amado esposo Víctor, por apoyarme durante mi trayecto en el doctorado, pero sobre todo por lo que hemos compartido juntos.

A mí mamá, papá, hermana, hermano y a mi querida sobrinita Marlene porque a pesar de la distancia siempre los llevo en mi corazón.

A mis amigas y amigos: Ma. Isabel, Ana Laura, Vivian, Guadalupe Conde, Ariadna, Rosalba, Esmeralda, Socorro, Enrique, Luis Manuel, Alfonso y Lucio por siempre brindarme su apoyo y gran amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Roberto Quintero Lizaola, por su apoyo incondicional siempre otorgado y haber confiado en mí. Mil gracias doctor.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno porque siempre me brindó su apoyo cuando más lo he necesitado. Por sus enseñanzas académicas y de vida. Por haber sembrado en mí el gran gusto por los hongos.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por su invaluable apoyo, asesoría, consejos y facilidades para trabajar en el laboratorio de biología molecular.

Al Dr. Teodoro Espinosa Solares, a la Dra. Guadalupe Hernández Eugenio y al Dr. Nagamani Balagurusamy por brindarme su apoyo y asesoramiento.

A la M. C. Juliana Padilla Cuevas, del Laboratorio de Fertilidad de Suelos, por su apoyo brindado.

Al Dr. Juan José Almaraz Suarez, por el apoyo brindado en momentos difíciles y por todo lo que me enseñó.

Al laboratorista Alberto Zaragoza, por su amable apoyo y facilidades otorgadas en el laboratorio de biología molecular de Fitotecnia.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
LITERATURA CITADA	3
CAPITULO I.	5
OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
HIPÓTESIS.....	6
CAPITULO II	7
SUPERVIVENCIA EN CAMPO DE <i>Pinus greggii</i> MICORRIZADOS CON <i>Hebeloma mesophaeum</i> , <i>Laccaria proxima</i> y <i>Suillus brevipes</i>	7
I. INTRODUCCIÓN.....	8
II. MATERIALES Y MÉTODOS	9
2.1. Preparación de inóculo fúngico	9
2.2. Síntesis de la micorriza.....	9
2.3. Trasplante de pinos y evaluaciones en campo	10
2.4. Identificación morfológica y molecular de <i>Suillus brevipes</i> en <i>P. greggii</i>	10
2.4.1. Caracterización macroscópica del esporoma.....	10
2.4.2. Extracción de ADN del esporoma	10
2.4.3. Amplificación por PCR para esporoma.....	11
2.4.4. Secuenciación de ADN de esporoma.....	11
2.5. Identificación y cuantificación de la micorriza de <i>Suillus brevipes</i> en <i>P. greggii</i>	12
2.5.1. Extracción de ADN de puntas micorrizadas	12
2.5.2. Amplificación por PCR para puntas micorrizadas.....	13
2.5.3. Secuenciación del ADN de puntas micorrizadas	13
2.6. Análisis de las secuencias del ADN de esporoma y puntas micorrizadas.....	14
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
IV. CONCLUSIONES.....	20

V. LITERATURA CITADA	21
CAPITULO III	26
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS SILVESTRES COMESTIBLES DEL GÉNERO FUNGÍCO <i>Hebeloma</i> Y DOS PINOS NEOTROPICALE	26
I. INTRODUCCIÓN	27
II. MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1. Colecta e identificación de las especies fúngicas estudiadas	28
2.2. Síntesis de ectomicorriza	29
2.3. Descripción de morfotipos	30
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
3.1. Descripción de esporomas	31
3.2. Descripción de morfotipos	35
IV. CONCLUSIONES	40
V. LITERATURA CITADA	41
V. CONCLUSIONES GENERALES	47
ANEXO I	
CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA INICIAL DEL GÉNERO <i>Suillus</i> QUE SE COMERCIALIZAN EN OZUMBA, ESTADO DE MÉXICO	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tasa de supervivencia de <i>Pinus greggii</i> micorrizados con HSEC trasplantados en campo.....	15
Cuadro 2. Estadística descriptiva de las medidas morfológicas, biomasa y Contenido de carbono en <i>P. greggii</i>	16
Cuadro 3. Análisis de suelo del área donde se plantaron los pinos.....	18
Cuadro 4. Caracterización de esporomas de <i>Suillus brevipes</i>	19
Cuadro 5. Comparación de las características diagnósticas de los esporomas de <i>H. alpinum</i> , <i>H. leucosarx</i> y <i>H. mesophaeum</i> descritos en este estudio.	34
Cuadro 6. Características distintivas de las raíces cortas micorrizadas de <i>H. mesophaeum</i> (Carrasco-Hernández <i>et al.</i> , 2010) y comparadas con descripciones previas.....	37
Cuadro A1. Características macroscópicas de los esporomas de <i>Suillus sp.</i> , colectados en Ozumba, Estado de México.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. a. Imagen taxonómica de *Suillus brevipes*; b. Ectomicorriza de *Suillus brevipes* en *Pinus greggii* en campo; c. Esporas de *S. brevipes*; d. *Pinus greggii* al año de trasplante; e. *Pinus greggii* micorrizado con *S. brevipes* a los 7 años de trasplante..... 20
- Figura 2. Esporas de *H. leucosarx* (a), *H. mesophaeum* (c), *H. alpinum* (e) a 6000x; Esporomas of *H. leucosarx* (b), *H. mesophaeum* (d) and *H. alpinum* (f). Barras blancas = 2µm (a, c and e), 4 cm (b), 3cm (d) y 1 cm (f). 38
- Figura 3. a. Comercialización de *Hebeloma* sp. en el mercado de Ozumba, b. Comparación de *Pinus patula* inoculado con *H. mesophaeum* (izquierda) y sin inocular (derecha), c. Morfotipos de *H. leucosarx*, d. Red de Harting de *H. leucosarx*, e. morfotipo de *H. alpinum* y f. manto de *H. leucosarx*. Barras negras= 0.5 cm (c) y 0.3 cm (e). 39
- Figura A1. Esporomas de *Suillus* sp.; a. Grupo I., b. Grupo II., c. Grupo III., d. Grupo IV..... 53

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Una de las principales riquezas y patrimonios de México es la diversidad que posee. De acuerdo al Centro de Monitoreo de la Conservación del Ambiente, México es el quinto país megadiverso de 17 países dentro de los cuales se encuentra: Brasil, Colombia, Ecuador, Estados Unidos, Perú, Venezuela, China, Filipinas, Indonesia, India, Malasia, Madagascar, República Democrática del Congo, Sudáfrica, Australia y Papúa Nueva Guinea. Estos países albergan el 70 % de la diversidad mundial en tan solo 10 % de la superficie del planeta (Mittermejer y Goettsch, 1992). Así mismo México alberga 7 320 especies endémicas (CONABIO, 1998; Rzedowski, 1990). Un ejemplo de ello es que el 85 % de las 55 especies de pino y 70 % de las 138 especies de encino que se encuentran en territorio mexicano son endémicas (Mittermejer y Gotettsch, 1992). El género *Pinus* representa tan solo el 60 % de las especies maderables comerciales, de amplia distribución geográfica y gran valor económico (Gómez-Romero *et al.*, 2012).

Desafortunadamente y en contraste con lo anterior México también se encuentra dentro de los diez países con mayor pérdida forestal anual (354 000 hectáreas por año) y dentro de los cinco países con mayor disminución en el bosque primario en el período 1990-2010 (FAO, 2010). Las pérdidas son alarmantes debido a que en los bosques se encuentra un reservorio de gran diversidad de organismos biológicos. Un ejemplo de ello son los hongos ectomicorrízicos de los cuales se ha reportado más de 5, 000 especies (Smith and Read, 1997). En México se concentra el 40 % de los géneros de hongos ectomicorrízicos que se conocen a nivel mundial (Pérez-Moreno *et al.*, 2013).

Las ectomicorrizas son hongos que se asocian con raíces de árboles y cumplen funciones básicas para el funcionamiento de los bosques. En términos generales el hongo recibe de la planta carbono y este a su vez le proporciona nitrógeno y otros minerales a la planta. A lo largo de décadas de investigación se ha comprobado que tienen que ver con la transferencia de nutrientes,

resistencia a estrés hídrico (Tibbett and Sanders, 2002). Existe una gran diversidad y aún falta mucho por conocer sobre todo porque algunas asociaciones aún no se han estudiado.

La implicación ecológica de los hongos ectomicorrízicos es indudable para el mantenimiento de los bosques, aunado a esto varios de ellos son comestibles. A este grupo de hongos se denominan hongos silvestres comestibles los cuales tienen propiedades nutraceuticas y medicinales (Pérez-Moreno and Martínez-Reyes, 2014). Estos hongos se recolectan, comercializan y consumen en 85 países y se han registrado alrededor de 2 327 especies que pertenecen a este grupo en todo el mundo (Boa, 2005). El valor comercial de estos hongos se calcula en aproximadamente 2 mil millones de dólares (Hall *et al.*, 2003).

Ante el presente escenario, México tiene dos retos principales, por un lado disminuir las tasas de deforestación y por otro aumentar las tasas de supervivencia en programas de reforestación.

Con la finalidad de incidir en aumentar la tasa de supervivencia en programas de reforestación en el presente trabajo se llevó a campo plantas previamente micorrizadas en invernadero con *Suillus* sp., *Laccaria* sp. y *Hebeloma* sp. y sin micorrizar a campo con la finalidad de evaluar la influencia de estas en el porcentajes de supervivencia. En virtud de los resultados obtenidos se decidió explorar la diversidad del género *Suillus* sp. y *Hebeloma* sp. presentes en el área de estudio donde originalmente se colectó el hongo que se utilizó para micorrizar las plantas. Así mismo se realizó la caracterización de la ectomicorriza de *H. mesophaeum*, *H. leucosarx*, *H. alpinum* en *P. patula* y *P. pseudostrobus* y *S. brevipes* con *P. greggii*.

LITERUATURA CITADA

- CONABIO. 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de país, 1998. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México.
- Boa, E. 2005. Los hongos silvestres comestibles. Perspectiva global de uso e importancia para la población. FAO. Roma
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2010. Global Forest Resources Assessment. Rome, Italy. 163 p.
- Hall, I. R., S. Stephenson, P. Buchanan, Y. Wang and A. L. J. Cole. 2003. Edible and poisonous mushrooms of the world. Portland, Oregon, E.U., Timber Press.
- Gómez-Romero, M., J. C. Soto-Correa, J. A. Blanco-García, C. Sáenz-Romero, J. Villegas, R. Lindig-Cisneros. 2012. Agrociencia. Estudio de especies de pino para restauración de sitios degradados. Agrociencia 46: 795 – 807.
- Mittermeier, R. y C. Goettsch. 1992. La importancia de la diversidad biológica de México. pp. 57 – 62. En: México ante los retos de la biodiversidad. CONABIO, México.
- Pera, J. y J. Parladé. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. Sist. Recur. For. 14(3): 419 – 433.
- Pérez-Moreno, J., M. Martínez-Reyes, A. Yesca-Pérez, A. Delgado-Alvarado and B. Xoconostle-Cázares. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. Economic Botany, 62 (3): 425 – 436.

- Pérez-Moreno, J. and M. Martínez-Reyes. 2014. Edible ectomycorrhizal mushrooms: biofactories for sustainable development. In: Biosystems Engineering. Springer International Publishing Switzerland.
- Pérez-Moreno, J., A. Lorenzana Fernández, R. Medel Ortíz, R. Ferrera-Cerrato y G. Mata Montes de Oca. 2013. Los hongos ectomicorrízicos de México: una perspectiva global. In: Alvarez J., M.P. Rodríguez-Guzmán and A. Alarcón (eds.) Biodiversidad Microbiana de México. SUBNARGEM-CONABIO. Mexico City (in press).
- Roldán, A. and J. Albaladejo. 1994. Effect of mycorrhizal inoculation and soil restoration on the growth of *Pinus halepensis* seedlings in a semiarid soil. Biol. Fertil Soils, 18: 143 – 149.
- Rzedowski, J. 1990. Vegetación Potencial: Atlas Nacional de México. Vol. II de geografía, UNAM. México.
- Smith, S. E. and D. J. Read. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.
- Tibbett M. and F. E. Sanders. 2002. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. Annals. of Botany 89: 783 – 789.

CAPITULO I

OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento relacionado con la influencia de la inoculación con especies de hongos ectomicorrízicos comestibles de los géneros *Suillus* spp., *Hebeloma* spp., y *Laccaria* spp. en pinos nativos de México, en relación a la supervivencia en campo así como en la identificación de dichas especies que se comercializan en zonas aledañas al parque nacional Izta Popo.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Evaluar el efecto de plantas micorrizadas con *Suillus* sp., *Hebeloma* sp. y *Laccaria* sp. en *Pinus greggii* en términos de supervivencia en campo.
- b) Identificar y describir las especies involucradas en el complejo de *Hebeloma* spp. que se comercializan en el mercado de Ozumba, Estado de México.
- c) Identificar y describir las especies involucradas en el complejo de *Suillus* spp. que se comercializan en el mercado de Ozumba, Estado de México.
- d) Caracterizar morfológicamente y genéticamente la simbiosis ectomicorrízica establecida entre *Suillus brevipes* y *Pinus greggii*.

HIPÓTESIS

- a) Las plantas micorrizadas con al menos alguna especie ectomicorrízica poseen una mayor supervivencia en campo, en relación a plantas no micorrizadas de *Pinus greggii*.

- b) Existe más de una especie en el complejo del género *Suillus* spp., comercializado en el mercado de Ozumba, Estado de México.

- c) Existe más de una especie en el complejo del género *Hebeloma* spp., comercializado en el mercado de Ozumba, Estado de México.

CAPITULO II

SUPERVIVENCIA EN CAMPO DE *Pinus greggii* MICORRIZADOS CON *Hebeloma mesophaeum*, *Laccaria proxima* y *Suillus brevipes*

RESUMEN

Uno de los retos para la reforestación en México es disminuir las altas tasas de mortalidad de especies forestales al ser trasplantados de vivero a campo. Una de las posibles soluciones a dicho problema es garantizar que la planta antes de ser llevada a campo tenga su simbionte natural necesario para enfrentar situaciones adversas. En el presente trabajo se realizó la inoculación y síntesis de *Suillus brevipes*, *Hebeloma mesophaeum* y *Laccaria proxima* en *Pinus greggii* en invernadero y se llevó posteriormente a campo con la finalidad de evaluar el porcentaje de supervivencia, el cual siete años después de establecido el bioensayo en campo fue de 57 % en plantas micorrizadas y de 0 % para las plantas no micorrizadas. Así mismo se identificó por biología molecular las micorrizas y esporomas de los pinos inoculados con *Suillus brevipes*. Incorporar de forma sistematizada protocolos de micorrización por medio de esporas en viveros podría ser uno de los factores que pudieran disminuir las altas tasas de mortalidad en reforestación con pinos, existentes actualmente en México.

Palabras claves: ectomicorrizas, reforestación, hongos silvestres comestibles.

I. INTRODUCCIÓN

La ectomicorriza se encuentra de forma natural en los árboles del bosque y desde que surgió el término descrito por el botánico alemán Frank se han hecho diversos estudios que han demostrado que tiene que ver con diversas funciones como son: la absorción y transferencia de nutrientes, tolerancia a enfermedades y a estrés hídrico (Chakravarty and Hwang, 1991; Pérez-Moreno and Read, 2000; Péra y Parladé, 2005;). A pesar de que se conoce ampliamente el beneficio de la ectomicorriza no se le ha dado mucha importancia en programas de reforestación en México. Aunque si se ha considerado la micorrización de la planta como un parámetro de calidad no se han estandarizados los procesos de esta y tampoco se especifica un rango de porcentaje de micorrización óptimo antes de ser llevadas a campo.

En México las técnica de micorrización en viero en su mayoría es mediante el suelo que se extrae de los montes los cuales pueden tener desde propágulos de esporas, micelio, rizomorfos, cordones miceliales y partes de raíces micorrizadas que puede no ser suficiente para garantizar la micorrización y que esta sea abundante (Santiago y Galindo, 2003). Las otras dos técnicas de micorrización en vivero son: inóculo micelial y esporas. De estas dos la más rentable y viable en cuestión de tecnología y recursos es mediante esporas (Bassani *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 1998). En el presente trabajo la inoculación se realizó mediante esporas el cual ya se ha demostrado su efectividad en pinos nativos de México en invernadero (Carrasco-Hernández, *et al.*, 2011; Martínez-Reyes *et al.*, 2012; Mendez-Neri *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se inoculó y logró la síntesis de *Hebeloma mesophaeum*, *Laccaria proxima* y *Suillus brevipes* en *Pinus greggii* bajo condiciones de invernadero y posteriormente se llevó a campó con el objetivo de evaluar su supervivencia. Así mismo se realizó la identificación por biología molecular de las micorrizas y de los esporomas de los pinos inoculados con *Suillus* sp. Hasta donde se conoce es el primer reporte en México donde se

evalúa la supervivencia en plantas micorrizadas comparadas con plantas sin micorrizar.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de inóculo fúngico

Las especies fúngicas utilizadas en el presente trabajo se colectaron en el mercado de Ozumba, Estado de México, localizado a 18°15'00" de latitud norte y a los 98°46'30" de latitud oeste del meridiano de Greenwich. En el centro de México *Laccaria* sp., *Hebeloma* sp. y *Suillus* sp. se comercializan en abundancia en mercados regionales (Pérez-Moreno *et al.*, 2008). El himenio de *Suillus brevipes* y el píleo de *Hebeloma mesophaeum* y *L. próxima* se deshidrataron por separado a una temperatura no mayor a 36 °C. Posteriormente el hongo se molió y se pasó por un tamiz de 1mm. Finalmente el inóculo en polvo se almacenó a 5 °C hasta la inoculación de los pinos.

2.2. Síntesis de la micorriza

Las semillas de *Pinus greggii* fueron esterilizadas con H₂O₂ al 30 % durante 20 minutos y lavadas con agua estéril; las cuales se sembraron en tubetes de plástico de 140 cm³, previamente llenados con una mezcla de aserrín-arena-suelo en proporción 2:2:1. La inoculación consistió en realizar una cavidad en la superficie del sustrato y agregar el inóculo en polvo. Se llevaron a cabo dos inoculaciones; la primera a los 30 días antes de la siembra y la segunda a los 90 días después de la siembra. Cada una con al menos 10⁷ a 10⁸ esporas. Adicionalmente se mantuvieron pinos sin inocular que correspondieron a los testigos.

2.3. Trasplante de pinos y evaluaciones en campo

Las plantas permanecieron en invernadero año y medio y después fueron trasplantadas. Los pinos se sembraron en la localidad de Jesús del Monte, Toluca, Estado de México, entre las coordenadas de 19° 09' 59.02 Latitud Norte y 99° 58' 50 Longitud Oeste.

Se evaluó la supervivencia de los pinos al año y a los 7 años después del trasplante. A los siete años también se realizó la evaluación morfométrica de los pinos (altura y diámetro), la biomasa y captura de carbono de acuerdo a la ecuación especificada por Pacheco *et al.*, 2007, e identificación de micorrizas y esporomas colectados en los pinos que sobrevivieron.

Se prepararon cinco muestras de suelo compuestas para análisis del suelo. Cada muestra se preparó de tres submuestras colectadas en transeptos de norte a sur a una distancia de 10 m cada una y a una profundidad de 30 cm tomadas con una barrena metálica de acero inoxidable.

2.4. Identificación morfológica y molecular de *Suillus brevipes* en *P. greggii*

2.4.1. Caracterización macroscópica del esporoma

Se colectaron 30 esporomas de *Suillus brevipes* de los *Pinus greggii* que sobrevivieron y que fueron inoculados con dicho hongo para la caracterización macroscópica e identificación por biología molecular.

2.4.2. Extracción de ADN del esporoma

La extracción de ADN del esporoma se realizó por el método CTAB al 4 % (Weising *et al.*, 2005). Los esporomas colectados fueron lavados cuidadosamente con agua destilada y se tomó del contexto del píleo una muestra para el análisis. Dicha estructura se roció con alcohol al 70 % y se dejaron secar por 12 horas. Una vez secas las estructuras se molieron por separado con nitrógeno líquido y se transfirieron a tubos de centrífuga de 50

mL con 15 mL de solución CTAB al 4 % previamente calentado a 60 °C. Los tubos se incubaron durante 2 h a 60 °C y en agitación. Las muestras se dejaron enfriar y se adicionó 15 mL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo; los cuales se agitaron durante 10 min. Posteriormente se centrifugaron por 10 minutos a 8000 rpm. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se refrigeraron durante 12 h. Las muestras se descongelaron y se centrifugaron a 5000 g por 10 minutos. Se utilizó exclusivamente el pellet que se formó en el fondo del tubo al cual se le adicionó 5 mL de etanol al 70% y se agitó por unos minutos. Posteriormente se centrifugaron a 5000 g durante 10 minutos y después se invirtieron para drenar el alcohol. Finalmente se adicionó 500 µL de solución TE buffer y se almacenaron a -20 °C. Las muestras se leyeron el Nano Drop para cuantificar la cantidad de ADN extraído.

2.4.3. Amplificación por PCR para esporoma

Alícuotas de 3 µL de ADN diluido fueron combinadas con 22 µL del mix de PCR que contenían la solución buffer, cloruro de magnesio, nucleótidos de trifosfato, Taq polimerasa y agua HPLC. La concentración final de los componentes fue: 1x para la solución buffer; 2.5 mM para Cl₂Mg; 200 µM de cada dNTP's; 20 pM y 10pM para ITS5HP y NL4, respectivamente y 1.5 unidades de Taq polimerasa. Los primers utilizados fueron ITS5HP (5' GGA-AGG-AGA-AGT-CGT-AAC-AAG-G 3') y NL4 (5' GGT-CCG-TGT-TTC-AAG-ACG-G 3'): El programa de termociclaje fue el siguiente: 95 °C por 4 minutos, (95 ° C por 1 min; 62 °C por 1 min y 72 °C por 2 min) durante 35 ciclos y 72 °C por 10 min. Se realizó la electroforesis del producto de PCR en un gel de agarosa al 2 %. El gel fue teñido con 1 µg/mL de bromuro de etidio durante 10 minutos, desteñido con agua durante 8 minutos y fotografiado con luz ultravioleta.

2.4.4. Secuenciación de ADN de esporoma

El producto de PCR se limpió. Dicho procedimiento consistió en tomar 5 µL de la reacción de PCR y adicionar 2 µL de la enzima EXOSAP-IT para ser incubada a 37 °C durante 15 minutos y posteriormente a 80 °C por 15 minutos en el termociclador. Finalmente las muestras se leyeron en el NANO DROP y se

diluyeron a 50 ng/ μ L para enviar 10 μ L por muestra a secuenciar a MACROGEN. De cada primer se envió 5 μ L de reacción a 10 pM.

2.5. Identificación y cuantificación de la micorriza de *Suillus brevipes* en *P. greggii*

Se realizó un muestreo de las raíces de los pinos para el tratamiento inoculado con *Suillus brevipes*. El muestreo consistió en tomar la muestra con un tubo de 3 cm de diámetro y 30 cm de longitud de PVC; el cual se enterró a 30 cm de profundidad en el suelo y a una distancia aproximada de un metro del tallo del pino. El tubo se extrajo y posteriormente se remojó en agua durante 12 horas. La muestra se colocó en un tamiz de malla número 16 y apertura de 1.18 mm y se lavó cuidadosamente con agua con la finalidad de eliminar el suelo y coleccionar las ectomicorrizas. Una vez seleccionadas las raíces micorrizadas se observaron en un microscopio estereoscópico Olympus, para su caracterización de acuerdo al sistema de información para caracterización y determinación de ectomicorrizas (Agerer and Rambold, 2009).

2.5.1. Extracción de ADN de puntas micorrizadas

La extracción de ADN de las micorrizas se realizó por el protocolo CYMMYT, 2004. Las puntas ectomicorrizadas seleccionadas de 2 cm de longitud se molieron con nitrógeno líquido y se colocaron en tubos Eppendorf de capacidad de 2 mL a los cuales se les adicionó 1.5 mL de solución CTAB al 4% previamente calentado a 65 °C. Los tubos se incubaron a 60 °C con agitación durante 90 minutos. Posteriormente se retiraron y se dejaron enfriar. Una vez fríos se les adicionó 500 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico en proporción (24:1). Los tubos se centrifugaron a 350 rpm durante diez minutos. Posteriormente se recuperó la fase superior acuosa de 700 μ L y se colocó en un tubo nuevo de capacidad de 2 mL. A los tubos se les agregó 5 μ L de RNasa y se mezcló por inversión para su incubación a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente se les adicionó 700 μ L de isopropanol al 100%, previamente enfriado a -20 °C. Las muestras se almacenaron a -20 °C durante una noche. Al día siguiente, se les adicionó 1 mL de alcohol al 75 % y se lavó suavemente

la pastilla de ADN. El alcohol se desechó por decantación y se repitió el lavado. Una vez concluidos los lavados los tubos se centrifugaron durante 3 minutos y posteriormente se eliminó el alcohol por decantación dejando que se evaporara el alcohol a temperatura ambiente hasta que la pastilla estuvo completamente seca. Finalmente la pastilla se suspendió con 500 μ L de solución TE y se almacenó a 4 °C.

2.5.2. Amplificación por PCR para puntas micorrizadas

Alícuotas de 2 μ L de ADN diluido fueron combinadas con 23 μ L del mix de PCR que contenían la solución buffer, cloruro de magnesio, nucleótidos de trifosfato, Taq polimerasa y agua HPLC. La concentración final de los componentes fue: 1x para la solución buffer; 2.5 mM para Mg Cl₂; 200 μ M de dNTP's; 10 pM para cada primer utilizado y 1.5 unidades de Taq polimerasa. Los primers utilizados fueron ITS1 (5' TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-G 3') y ITS8 (5' ACA-GGC-ATG-CTC-CTC-GGA-A 3'). El programa de termociclaje fue el siguiente: 95 °C por 5 minutos, (95 °C por 1 min; 43 °C por 1 min y 72 °C por 1 min) durante 35 ciclos y 72 °C por 8 min. Se realizaron dos amplificaciones y posteriormente se realizó la electroforesis del producto doble de PCR en un gel de agarosa al 2 %. El gel fue teñido con 1- μ g/mL de bromuro de etidio durante 10 minutos, desteñido con agua durante 8 minutos y fotografiado con luz ultravioleta.

2.5.3. Secuenciación del ADN de puntas micorrizadas

Previamente a la secuenciación se realizó la limpieza de los fragmentos amplificados mediante el empleo de la enzima fosfatasa y exonucleasa III (SAP/Exo III). Se realizó la mezcla de SAP/Exo III que consistió en tomar 1 μ L de Exo III y 2 μ L de SAP y 6 μ L de agua HPLC para cada reacción. A cada muestra con 4 μ L de producto de PCR se le adicionó 8 μ L de la mezcla SAP/Exo III. La reacción de limpieza se realizó bajo las siguientes condiciones: La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C y posteriormente 15 min. A 72 °C. Finalmente se realizó la lectura de la concentración de ADN y se realizó la dilución a 50 ng/ μ L. para

enviar 10 µL por muestra a secuenciar a MACROGEN. De cada primer se envió 10µL a 10 pM. por reacción.

2.6. Análisis de las secuencias del ADN de esporoma y puntas micorrizadas.

Las secuencias recibidas por la empresa MACROGEN se limpiaron con el programa FinchTV. Se generaron consensos en BioEdit y alineamiento con dicho programa y finalmente se realizó la edición de secuencias con el programa MEGA. Finalmente realizó un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), de las secuencias obtenidas del esporoma para la identificación del organismo.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La supervivencia de pinos trasplantados de vivero a campo en términos generales son bajas por diversos factores. Una de las prácticas comunes en los viveros es sembrar la planta en suelo de monte con la finalidad de lograr la micorrización con los propágulos ectomicorrízicos presentes en el suelo. Sin embargo, en diversas investigaciones han encontrado que los propágulos no son suficientes para garantizar porcentajes altos de micorrización, teniendo como resultado con este método de inoculación una micorrización escasa (Trappe y Strand, 1969). Cabe señalar que de esto depende en gran medida que la planta tenga su simbionte mutualista obligado para sobrevivir.

En México la supervivencia en plantaciones se encuentra del 15 al 40 % al año y en algunos sitios llega a ser de 0% (Cetina, 2004). En el presente trabajo los individuos de *Pinus greggii*, previamente inoculados con hongos silvestre ectomicorrízicos comestibles (HSEC), después de siete años de su establecimiento en campo, presentaron una notable disminución en la tasa de supervivencia, en relación al total de individuos sembrados y comparados al primer año de sembrados (Pérez-Moreno *et al.* 2009).

En el Cuadro 1 se presentan los porcentajes de la tasa de supervivencia de los *Pinus* inoculados con las diferentes especies de HSEC, donde se aprecia que

los individuos inoculados con LHS, *Suillus* sp y *Laccaria proxima* presentaron las tasas más altas de supervivencia; sin embargo, a los siete años, sólo los árboles que fueron inoculados con *Suillus brevipes* presentaron una alta supervivencia (57%), seguidos de LHS (18%) y de los individuos inoculados con *Hebeloma mesophaeum* (6%). Los testigos (sin micorrizar) sólo tuvieron una tasa de supervivencia del 18% en el primer año y para los siete años murieron todos los individuos. Una de las posibilidades por las cuales *Suillus brevipes* mostró mayor supervivencia es debido a que este hongo tiene rizomorfos y se creó que estas estructuras le confieren cierta resistencia al estrés hídrico (Duddridge *et al.*, 1980).

Algunas de las investigaciones llevadas a cabo en España con algunas especies de *Suillus*, mediante la micorrización controlada de planta de vivero y establecidas en repoblaciones o revegetaciones experimentales se han realizado con *Suillus collinitus* y *S. mediterraneensis* para *Pinus pinaster* Mill. y *Pinus halepensis* Mill. en el cual también se ha probado con *S. granulatus* y *S. luteus* (Pera y Parladé, 2005). En el caso de *Suillus collinitus* mostró tener un efecto positivo en el crecimiento de la planta en campo en una zona semiárida (Roldan y Albaladejo, 1994).

Cuadro 1. Tasa de supervivencia de *Pinus greggii* micorrizados con HSEC trasplantados en campo.

	No. de pinos plantados	Tasa de supervivencia (%)	
		1 año*	7 años
Testigo	16	18	0
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	16	13	6
<i>Laccaria proxima</i>	16	50	6
<i>Suillus brevipes</i>	16	57	57
LHS**	16	100	18

*Fuente: Pérez-Moreno *et al.*, 2009

**LHS = *Laccaria proxima* + *Hebeloma mesophaeum*, + *Suillus brevipes*.

De acuerdo con López *et al.* (2000) el *Pinus greggii* es una especie endémica de México de alta plasticidad, que es empleada en plantaciones y reforestaciones debido a su rápido crecimiento y buena adaptación a diversos

ambientes. Según Vargas y Muñoz (1988) el *P. greggii* tiene un gran potencial para adaptarse a condiciones limitantes de humedad. López-Uptón *et al.* (2004), reportó una tasa de supervivencia del 70% en plantaciones de *P. greggii*, realizada en una zona húmeda y subtropical. Sin embargo, se ha reportado tasas de mortalidad hasta del 57% en zonas de sequía prolongada (Cetina-Alcalá *et al.*, 2002). Lo mismo sucedió en la plantación evaluada en este trabajo, las sequías son prolongadas y las tasas de mortalidad, resultaron elevadas excepto para las plantas micorrizadas con *S. brevipes*.

Los árboles inoculados con *Suillus brevipes*, presentaron una altura promedio de 6.38 m, un diámetro de 125 mm; la biomasa fue de 123 kg/árbol, mientras que el contenido de carbono fue de 63 kg/árbol. Por otra parte, en el tratamiento con LHS se registraron datos promedios de altura de 6.57 m, un diámetro de 128 mm, una biomasa de 114.8 kg/árbol y 58.5 kg/árbol de C (Cuadro 2). Los sobrevivientes del tratamiento con *Hebeloma mesophaeum*, registraron una altura de 7.4 m de altura, un diámetro de 142.2 mm, una biomasa de 190.2 kg/árbol y un contenido de carbono de 97 kg/árbol. Mientras que en los pinos sobrevivientes inoculados con *Laccaria proxima*, se encontró una altura de 6.4 m, 96.8 mm de diámetro, 40.5 kg/árbol y 20.6 kg/árbol.

Cuadro 2. Estadística descriptiva de las medidas morfológicas, biomasa y contenido de carbono en *P. greggii*.

Estadístico	Altura (m)	Diámetro (mm)	Biomasa (kg/árbol)	Carbono (kg/árbol)
<i>Suillus brevipes</i>				
Mínimo	5.15	86.67	20.89	10.62
Máximo	7.30	162.00	284.53	145.23
Media	6.38	125.01	122.82	62.65
CV	0.11	0.22	0.79	0.79
LHS***				
Mínimo	6.20	116.73	72.37	36.88
Máximo	7.20	144.09	187.17	95.50
Media	6.57	128.06	114.75	58.51
CV	0.08	0.11	0.55	0.55

***LHS = *Laccaria proxima* + *Hebeloma mesophaeum*, + *Suillus brevipes*.

La supervivencia de los árboles de *P. greggii* establecidos en un programa de reforestación es la principal prueba de calidad (Sutinen *et al.*, 1992). Sin embargo, otros parámetros como altura de planta, diámetro del tallo, el vigor de la planta (Ritchie, 1984), contenido de carbohidratos (Tschaplinski y Terence, 1994), tasa de fotosíntesis (Livingston *et al.*, 1994), entre otros, también son usados como indicadores de éxito.

Con respecto a altura y diámetro, en el presente trabajo se encontró una altura media anual de 91 cm y 17.8 mm de diámetro medio anual en los pinos inoculados con *Suillus brevipes*, 93.8 cm y 18.3 mm en los pinos con LHS, 105.3 cm y 27.2 mm en árboles con *Hebeloma meospheum*. y 90.4 cm y 7.6 mm en los pinos con *Laccaria proxima*. Estos resultados, excepto en los pinos inoculados con *Laccaria proxima*, fueron superiores a los reportados por Salazar *et al.* (1999) que encontró un incremento medio anual en altura de 87.6 cm y a los resultados reportados por Sámano *et al.* (2003) quienes registraron valores promedio de altura y diámetro de 77.1 cm y 19.4 mm, respectivamente, a los cuatro años de la plantación. Sin embargo, fueron inferiores a los resultados que reportó López *et al.* (1999), quienes encontraron un incremento promedio anual en altura y diámetro de 121 cm y 24 mm, respectivamente. Valencia *et al.* (2006), atribuyen la variación en el grado de desarrollo de *P. greggii* al grado de precipitación, a la variedad y al tipo de suelos. Cabe señalar que en el presente estudio se realizó el análisis del suelo del área donde se plantaron *Pinus greggii* micorrizadas y sin micorrizar y se encontró la misma textura de suelo para ambas zonas (Cuadro 3). Pérez-Moreno *et al.* (2009), reportó que la especie ectomicorrizada dominante, también influye en el crecimiento de los pinos.

Con respecto a la biomasa y al contenido de carbono, se registraron valores de mayor a menor en relación al distinto inoculo de HSEC de la siguiente manera: *Pinus* + *H. mesophaeum* > *Pinus* + *S. brevipes* > *Pinus* + LSH > *Pinus* + *Laccaria proxima*, lo cual no corresponde con los tratamientos donde predominó la tasa más elevada de supervivencia, en donde el tratamiento

Pinus + *S. brevipes* fue el más elevado después de los siete años del establecimiento en campo.

Cuadro 3. Análisis de suelo del área donde se plantaron los pinos.

	pH	CE (dSm ⁻¹)	MO (%)	N (%)	P (ppm)	K	Arena	Textura Limo (%)	arcilla	Clase textural
Suelo s/pinos	6.1	0.07	11.9	0.05	9	0.9	52	31	17	Franco
Suelo c/ pinos	5.9	0.068	11.38	0.05	3.25	0.5	50.5	32.5	17	Franco

La caracterización de los esporomas *Suillus brevipes*, colectados en los *Pinus greggii* que sobrevivieron se realizó morfológicamente (Figura 1 a.) y por biología molecular y se identificó como *Suillus brevipes* con un 99%.

***Suillus brevipes*.** - Presentó un píleo convexo de color crema y margen ligeramente ondulado, con un diámetro de 4 a 12 cm. El himenio fue de color amarillo con poros circulares de 2 a 3 poros por mm de una profundidad de 0.2 a 0.9 mm. Un estípite cilíndrico de color blanco, de ancho de 0.5 a 1.7 cm y longitud de 2.5 a 6 cm (Cuadro 4 y Figura 1 a). De olor no característico. Las esporas presentaron una forma cilíndrica, color café y lisa (Figura 1 c).

Algunas de las micorrizas que se han descrito en previos trabajos del género *Suillus* sp. son: *S. luteus* con *Pinus ponderosa* (Barroetaveña *et al.*, 2012), *S. collinitus* (Fr.) O. Kuntze y *S. plorans* (Roll.) Sing. con *Pinus* (Agerer and Rambold, 2013), *S. pseudobrevipes* con *Pinus montezumae* (Garibay-Orijel *et al.*, 2013), *S. brevipes* con *Pinus radiata* (Brundrett *et al.*, 1996), *S. brevipes* con *Pinus patula* (Mohan *et al.*, 1993).

Las micorrizas identificadas en los pinos con mayor supervivencia fue *Suillus brevipes* con un 97 % de similitud lo cual coincidió con lo que inicialmente se inoculó (Cuadro 4; Figura 1 a).

La micorriza de *Suillus brevipes* presentó ramificación dicotómica. Con superficie lisa y de (Figura 1 a) color café. Longitud de 2 a 2.5 mm, y 0.4 mm de ancho en el eje principal. Las puntas micorrizadas presentaron una longitud

de 0.5 mm y ancho de 0.3 mm. Con hifas emanantes y blanquecinas. Se observó la presencia rizomórfos.

Cuadro 4. Caracterización de esporomas de *Suillus brevipes*.

Estructura	Características	<i>Suillus brevipes</i> ¹	<i>S. brevipes</i> ²
Píleo	Forma	De convexo a ligeramente plano	Convexo a plano
	Color	crema	Marrón vinoso oscuro
	Diámetro (cm)	4 -12 ($\bar{x} = 7$)	5-10
	Textura	viscosa	Viscosa o pegajosa
Estípite	Forma	cilindrico	cilíndrico
	Color	blanco	Blanco a amarillento
	Ancho (cm)	0.5-1.7 ($\bar{x} = 1$)	1 – 3
	Longitud (cm)	2.5-6 ($\bar{x} = 3.8$)	2 – 5
Himenio	Forma del poro	circular	
	Número de poros por mm	2-3 ($\bar{x} = 2$)	1 - 2
	Profundidad del poro (mm)	.2-.9 ($\bar{x} = 5.6$)	4 - 10
	Color	amarillo	amarillo
Esporas	Forma	cilíndrica	Estrechamente elíptica a oblonga
	Color	café	canela
	Ornamentación	lisa	lisa
	Longitud (μ m)	6 - 10	7 – 9
	Ancho (μ m)	3 - 4	2.8 – 3.2
Olor		No característico	
Fuente		Presente trabajo	

¹ n=30.

²Smith and Thiers, 1964

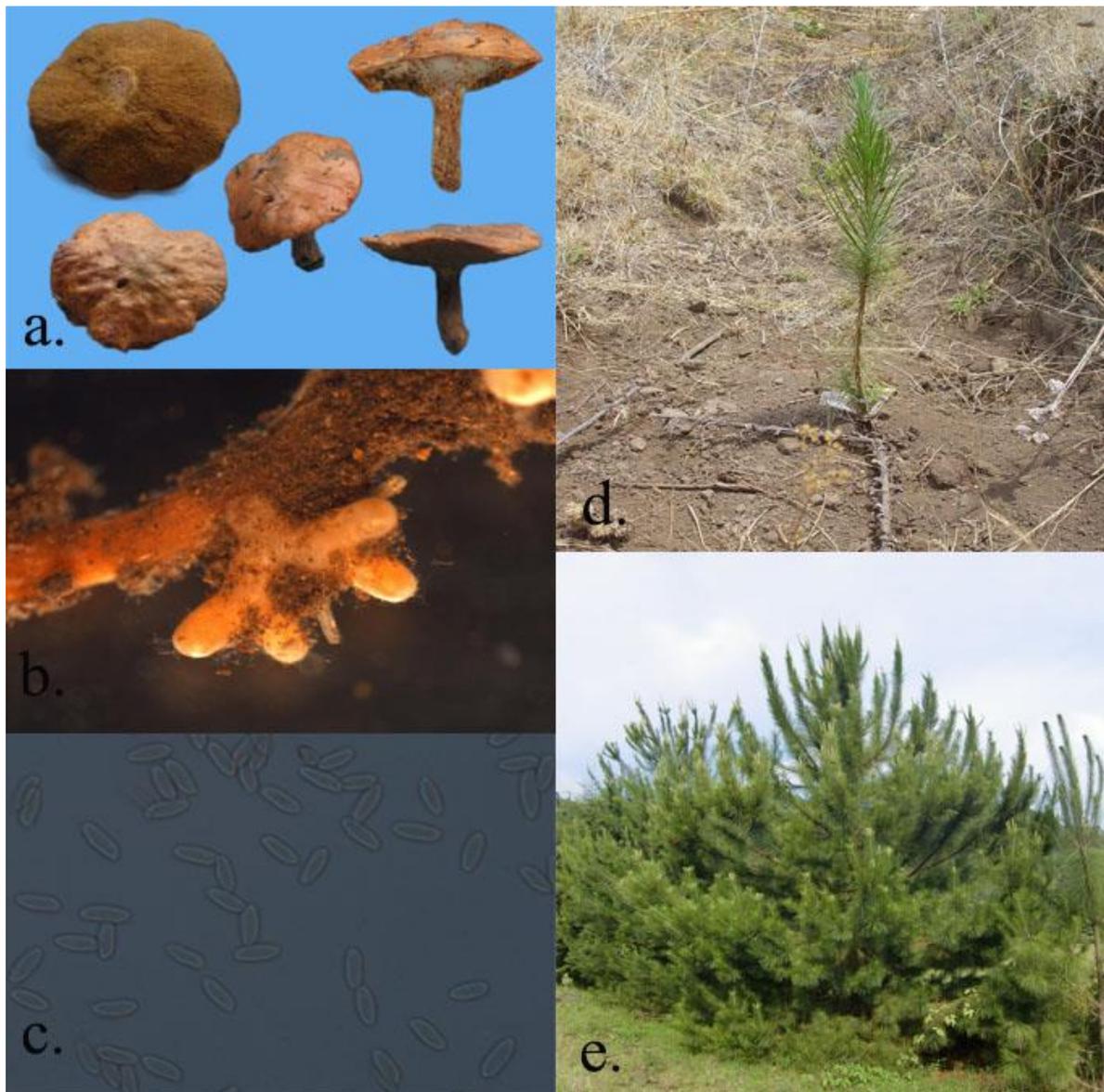


Figura 1. a. Imagen taxonómica de *Suillus brevipes*; b. Ectomicorriza de *Suillus brevipes* en *Pinus greggii* en campo; c. Esporas de *S. brevipes*; d. *Pinus greggii* al año de trasplante; e. *Pinus greggii* micorrizado con *S. brevipes*, 7 años después del trasplante.

IV. CONCLUSIONES

La micorrización previa de *Pinus greggii* en invernadero con *Suillus brevipes* favoreció dramáticamente su supervivencia en campo.

Las técnicas empleadas de inoculación con esporas es efectiva para la micorrización en invernadero.

El tipo de micorriza influyó diferencialmente en la tasa de supervivencia de *Pinus greggii* en campo.

V. LITERATURA CITADA

Agerer R. and G. Rambold. 2013. DEEMY – An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. www.deemy.de – München, Germany.

Barroetaveña, C., V. N. Bassani and M. Rajchenberg. 2012. Inoculación micorrícica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. *Bosque* 33(2): 163-169.

Bassani, V. N., C. Barroetaveña and M. Rajchenberg. 2013. Spores of ectomycorrhizal fungi as inoculants for *Nothofagus pumilio* and exotic conifer seedlings in Patagonia, Argentina: their activity and conservation. *New Forest*, 44 (1): 471-485.

Brundrett M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and N. Malajczuk. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and Agriculture. ACIAR Monograph.

Carrasco-Hernández, V., J. Pérez-Moreno, V. Espinosa-Hernández, J. J. Almaraz-Suárez, R. Quintero-Lizaola and M. Torres-Aquino. 2011. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural*, 84: 83 – 96.

Cetina, V. M. 2004. Deforestación y reforestación In: Temas ambientales del siglo XXI. Colegio de Postgraduados. pp.12-13.

Cetina-Alcalá, V. M., V. A. González-Hernández, M. L. Ortega-Delgado, J. Vargas-Hernández, Ángel Villegas-Monter. 2002. Supervivencia y

- crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. Previamente sometidos a podas o sequía en vivero. *Agrociencia*, 36 (2): 233-241.
- Chakravarty P. and S. F. Hwang. 1991. Effect of an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria laccata*, on *Fusarium* damping-off in *Pinus banksiana* seedlings. *Eur. J. For. Path.* 21: 97-106.
- CIMMYT. 2004. Protocolos de Laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. pp.9-11.
- Duddridge, J. A., A. Malibari and D. J. Read. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature*, 287: 834 – 836.
- Garibay-Orijel, R., E. Morales-Marañón, M. Domínguez-Gutiérrez y A. Flores-García. 2013. Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 153 – 169.
- Livingston, N. J., G. J. Davies, B. M. Eby, G. Filek, E. E. Fuchs, S. Pepin, and R. E. Percy. 1994. A whole-plant cuvette system to measure short-term responses of conifer seedlings to environmental change. *Tree Physiol.* 14: 759-768.
- López J., A. J. Mendoza, J. Jasso, J. Vargas y A. Gómez. 2000. Variación morfológica de plántulas e influencia del pH de agua de riego en doce poblaciones de *Pinus greggii* Engelm. *Madera y Bosques*, 6(78): 81 – 94.
- López, J. L., J. J. Vargas, C. Ramírez, J. López. 1999. Variación intrespecífica en el patrón de crecimiento del brote en *Pinus greggii* Engelm. *Rev. Chapingo S. Ciencias For. M. Amb.* 5:133 – 140.

- López-Upton, J., C. Ramírez-Herrera, O. Plascencia-Escalante y J. Jasso-Mata. 2004. Variación en crecimiento de diferentes poblaciones de dos variedades de *Pinus greggii*. *Agrociencia* 38: 457 - 464.
- Lu, X., N. Malajczuk and B. Dell. 1998. Mycorrhiza formation and growth of *Eucalyptus globulus* seedlings inoculated with spores of various ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 8: 81-86.
- Martínez-Reyes, M., J. Pérez-Moreno, L. Villareal-Ruiz, R. Ferrera-Cerrato, B. Xoconostle-Cázares, J. Vargas-Hernández y M. Honrubia-García. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. Inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 18 (2): 183-192.
- Mendez-Neri, M., J. Pérez-Moreno, R. Quintero-Lizaola, E. Hernández-Acosta, A. Lara-Herrera. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculados con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana*, 29:73-81.
- Mohan, V., K. Natarajan and K. Ingleby. 1993. Anatomical studies on ectomycorrhizas. II. The ectomycorrhizas produced by *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata* and *Suillus brevipes* on *Pinus patula*. *Mycorrhiza* 3: 43-49.
- Pacheco Escalona, F. C., A. Aldrete, A. Gómez Guerrero, A. M. Fierro González, V. M. Cetina Alcalá y H. Vaquera Huera. 2007. Almacenamiento de carbono en la biomasa aérea de una plantación joven de *Pinus greggii* Engelm. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30 (3): 251 – 254.

- Pera, J. y J. Parladé. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de plantas destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Invest Agrar: Sist. Recur. For.*: 419 – 433.
- Pérez-Moreno J. and D. J. Read. 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., M. Martínez-Reyes, A. Yesca-Pérez, A. Delgado-Alvarado and B. Xoconostle-Cázares. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany*, 62 (3): 425 – 436.
- Pérez-Moreno, J., M. Martínez-Reyes, A. Lorenzana Fernandez, V. Carrasco Hernández. 2009. Social and Biotechnological Studies of Wild Edible Mushrooms in Mexico, with emphasis in the Izta-Popo and Zoquiapan National Parks. *Acta Botanica Yunnanica*, XVI: 55 – 61.
- Roldan, A. and J. Albaladejo. 1994. Effect of mycorrhizal inoculation and soil restoration on the growth of *Pinus halepensis* seedlings in a semiarid soil. *Biol. Fertil. Soils.* 18: 143 – 149.
- Ritchie, G. A. 1984. Assessing seedling quality. In: *Forest Nursery Manual* Forest Research Laboratory. Duryea, M. L. and T. D. Landis (eds.). Oregon State University. Corvallis, Oregon. pp: 243-259.
- Salazar, J. G., J. Vargas, J. Jasso, J. D. Molina, C. Ramírez, J. López. 1999. Variación del patrón de crecimiento en altura de cuatro especies de *Pinus* en edades tempranas. *Madera y Bosques* 5(2):19-34.
- Sámamo, J. L., L. M. Torres, A. Cano, E. Aldrete y E. H. Cornejo. 2003. Sobrevivencia y crecimiento de cinco especies de pino bajo tratamientos a la vegetación en Arteaga, Coahuila. *Agrofaz* 3(2):407-413.

- Santiago Martínez, G. y G. L. Galindo Flores. 2003. El manejo de los hongos ectomicorrizógenos en vivero y campo. In: Estrada-Torres y M. G. Santiago-Martínez. Avances en el estudio de la ectomicorriza en el Estado de Tlaxcala, México. Fundación Produce, Tlaxcala. Mexico 2003.
- Smith, A. H. and H. D. Thiers. 1964. A contribution toward a monograph of North American species of *Suillus*. Ann Arbor, Michigan.
- Sutinen, M. L., J. P. Palta, and P. B. Reich. 1992. Seasonal differences in freezing stress resistance needles of *Pinus nigra* and *Pinus resinosa* evaluation of the electrolyte leakage method. Tree Physiol. 11: 241-245.
- Trappe, J. M. and R. F. Strand. 1969. Mycorrhizal deficiency in a Douglas-fir region nursery. For. Sci. 15: 381-389.
- Tschapinski, T. J. and T. J. Blake. 1994. Carbohydrate mobilization following shoot defoliation and decapitation in hybrid poplar. Tree Physiol. 14: 141-151.
- Valencia, S., M. V. Velasco, M. Gómez, M. Ruiz y M. A. Capó. 2006. Ensayo de procedencias de *Pinus greggii* Engelm. en dos localidades de la mixteca alta de Oaxaca, México. Revista Fitotecnia Mexicana, 29 (1): 27-32.
- Vargas 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.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl. 2005. DNA Fingerprinting in Plants: principles, methods, and application. CRS Press Taylor & Francis Group. United States of America. 444 pp.

CAPITULO III

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS SILVESTRES COMESTIBLES DEL GÉNERO FUNGÍCO *Hebeloma* Y DOS PINOS NEOTROPICALES

RESUMEN

México cuenta con una gran diversidad de pinos y de hongos ectomicorrizicos que se asocian a éstos. Es trascendental la descripción de estas especies asociadas a pinos debido a su potencial biotecnológico en el ámbito forestal y alimenticio. *Hebeloma* generalmente se ha considerado en todo el mundo un género de hongos ectomicorrízica venenoso. Sin embargo, interesantemente en el centro de México hay un complejo de especies de *Hebeloma*, no muy bien estudiado, que se utilizan como alimento en grandes cantidades y de gran importancia económica y social. Tres especies comestibles de *Hebeloma* ampliamente comercializados en el país fueron identificados: *Hebeloma alpinum*, *H. mesophaeum* y *H. leucosarx*. Con microscopía electrónica de barrido fue posible observar diferencias en la ornamentación de las esporas de estas especies. La síntesis se llevó a cabo mediante la inoculación de los pinos con esporomas de las tres especies del *Hebeloma* descritas. Los pinos inoculados con *Hebeloma* permanecieron en invernadero durante un año. Se logró la síntesis de las ectomicorrizas estudiadas las cuales produjeron un morfotipo característico. Este trabajo proporcionan herramientas para identificar morfotipos producidos por las principales especies ectomicorrízicas comestibles de *Hebeloma* comercializadas en México, con potencial biotecnológico para inocular pinos usados en programas de reforestación en áreas neotropicales.

Palabras claves: *Pinus patula*, *Pinus pseudostrobus*, caracterización morfoanatómica.

I. INTRODUCCIÓN

México es un país megadiverso con una amplia riqueza de especies forestales a nivel mundial, en especial en numerosas especies de pino con 71 taxa de las cuales 55% son endémicas (Sánchez-González, 2008). Asimismo también existe una gran diversidad de hongos ectomicorrizicos asociados a pinos de importancia económica por su uso como alimento, medicinales y biotecnológica por su aplicación forestal. Cabe señalar que el cuarenta por ciento de los géneros de hongos ectomicorrizicos conocidos en el mundo han sido registrados en México (Pérez-Moreno *et al.*, 2013). Uno de estos es el género *Hebeloma* el cual se encuentra ampliamente distribuido con alrededor de 250 a 600 especies a nivel mundial (Marmeisse *et al.*, 1999). De acuerdo a diversos reportes este género ha sido registrado en Europa, Australia, África, Norte América y Sur América (Aremu *et al.*, 2009; Cairney and Chambers, 1999; Ohenoja and Ohenoja, 2010).

A nivel mundial el género *Hebeloma* ha sido considerado tóxico. Entre las especies en las cuales se ha estudiado que contienen metabolitos tóxicos se encuentran: *H. crustuliniforme*, *H. sinapizans* (De Bernardi, *et al.*, 1983), *H. spoliatum* (Fujimoto *et al.*, 1992), *H. senescens* (Bocchi *et al.*, 1992; Garlschelli *et al.*, 1995), *H. vinosophyllum* (Fujimoto *et al.*, 1986; Fujimoto *et al.*, 1991), *H. longicaudum* (Wichlacz *et al.*, 1999) y *H. versipelle* (Liu *et al.*, 2002). Algunas de las toxinas en este género son: triterpenos citotóxicos, lanostano del tipo triterpeno ester, la neurotóxina cucurbitano del tipo glucósidos y 6, 7-seco-cariofilales relacionados a sesquiterpenoides (Fujimoto *et al.*, 1986, 1991, 1992; Garlaschelli *et al.*, 1995; Wichlacz *et al.*, 1999). Interesantemente en el centro de México se comercializan y se utilizan como alimento grandes cantidades de esporomas del género ectomicorrizico *Hebeloma* (Montoya *et al.*, 2008; Pérez-Moreno *et al.*, 2008) las cuales se venden en un complejo de diversas especies; por lo que este es un primer acercamiento para identificar que especies están involucradas. Cabe mencionar que su comestibilidad hasta donde se conoce solo se ha reportado en México (Pérez-Moreno *et al.*, 2008; presente trabajo) y en Nigeria, África (Aremu *et al.*, 2009). Sin embargo, la

identificación de estas especies y su caracterización ectomicorrízica a recibido escasa atención a pesar de su potencial de uso biotecnológico.

Los objetivos de la presente investigación fueron: i) identificar y describir especies comestibles de *Hebeloma* que son ampliamente comercializadas en el centro de México; ii) Efectuar la síntesis de la ectomicorriza de las especies comestibles más comunes de *Hebeloma* en *Pinus patula* Schl. et Cham. y *P. pseudostrobus* Lindl. var. *pseudostrobus* con el objetivo de caracterizar morfológicamente sus ectomicorrizas

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Colecta e identificación de las especies fúngicas estudiadas

Las especies estudiadas se colectaron en el mercado de Ozumba, Estado de México, el cual se encuentra ubicado en la parte central de México, a 19 ° 02' latitud norte y 98 ° 48'14" longitud oeste y una altitud media de 2340 m (SEGOB, 2010). Los colectores de dicho mercado recolectan las especies del género *Hebeloma* en bosque de pino circundantes. Se adquirieron en específico las especies del género *Hebeloma* las cuales se caracterizaron de acuerdo a las características macro y microscópicas especificadas por Largent (1973) y Largent *et al.* (1977). Las medidas de las medias presentadas corresponden al análisis de 25 esporomas para cada caso. Los especímenes fueron seleccionados de una colección de alrededor 500 esporomas colectados durante la temporada de lluvias. Las fotografías de las esporas de las especies de *Hebeloma* fueron tomadas con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5800LV.

2.2. Síntesis de ectomicorriza

Una vez colectado el material fúngico y clasificado por especies se procedió a preparar el inóculo. A los esporomas se les cortó el estípite y se utilizó solo el píleo. El píleo se deshidrató a una temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ debido a que una temperatura por encima de 35°C , las esporas localizadas en las láminas del píleo pierden su viabilidad (Brundrett *et al.*, 1996). Una vez deshidratada cada especie fúngica se prosiguió a la molienda de los píleos por especie en un molino marca Thomas con un número de malla de 2 mm. Finalmente el inóculo obtenido a base de esporas se almacenó en viales con capacidad de 1.5 mL a 5°C hasta la inoculación de pinos.

Previo a la inoculación se preparó la semilla y el sustrato. La semilla de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* se remojó en agua durante 24 h y se desinfectaron con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 %, manteniendo las semillas en agitación durante 30 minutos, posteriormente se enjuagaron con agua destilada. *Pinus patula* es una especie nativa de México ampliamente introducida en África, Asia y Sur de América. En México su madera se utiliza para la construcción, elaboración de cajas, postes y es usada para la protección de cuencas hidrográficas, así como para la conservación y restauración de suelos degradados (Patiño and Yoshio, 1991). *Pinus pseudostrobus* es una especie nativa de México, Guatemala, Honduras y el Salvador (Cambrón-Salvador *et al.*, 2013). Esta especie es de gran importancia económica porque su madera es fuerte por lo que se utiliza ampliamente para la construcción; también se usa en la producción de trementina y posee propiedades medicinales. (Avendaño y Acosta, 2000; Iloff and Mirov, 1953; Estrada-Catillón, *et al.*, 2012).

El sustrato utilizado consistió en una mezcla de arena-corteza-suelo en proporción 2:2:1, el cual se esterilizó con vapor de agua durante 24 h. Los tubetes de 140 mL utilizados para la siembra del pino se lavaron y desinfectaron previo a su llenado con el sustrato. Los pinos se sembraron en los tubetes con sustrato y se regaron cada tercer día. La germinación de

ambos pinos fue alrededor de las 2 semanas después de la siembra. Con la finalidad de evitar el "damping off" se aplicó funguicida Captan (N-triclorometilitio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida) en su etapa de cerillo en proporción $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ en cada riego hasta que el tallo estuvo lignificado. La inoculación del hongo ectomicorrizico al pino se realizó en dos etapas, la primera fue una semana después de la germinación y la segunda inoculación 90 días después de ésta. La concentración en cada inoculación correspondió de 10^6 a 10^8 esporas por pino. El experimento fue mantenido durante 52 semanas en invernadero.

2.3. Descripción de morfotipos

Se extrajo el cepellón de los tubetes y se remojó durante 24 h, posteriormente se cortó la parte aérea del pino y se enjuagó cuidadosamente la raíz. Las raíces en mejor estado se seleccionaron para analizar las estructuras diagnósticas de cada ectomicorriza (longitud, diámetro, proporción base-ápice, tipo de ramificación, forma de las puntas, textura del manto, color del ápice y anatomía en la capa externa del manto) llamado morfotipo basado en el sistema de información para caracterización y determinación de ectomicorrizas (Agerer y Rambold, 2013). El término morfotipo se refiere a la estructura formada por el hongo y el tejido de la planta en la raíz modificada de la planta huésped, el cual presenta un tamaño característico, color, textura y patrones de ramificación para cada combinación planta-hongo (Brundrett, 2008). Estas características básicas han sido ampliamente utilizadas para caracterizar una combinación particular de hongo ectomicorrizico y su huésped asociado (Agerer and Rambold, 2004). La toma de fotografía de los morfotipos se realizó en un estereoscopio Olympus SZ61, modelo SZ2-LGB y para el manto en un microscopio Olympus BX51 modelo U-LH100H.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Descripción de esporomas

Dentro del complejo de *Hebeloma* estudiado se identificaron tres especies:

H. mesophaeum (Pers.) Quél., *H. leucosarx* P. D. Orton (1960) y *H. alpinum* (J. Favre) Bruchet. (1970).

***Hebeloma alpinum*:** De píleo convexo, café oscuro y de un diámetro de 1.2 – 5.2 ($\bar{x} = 3.2$) cm. Su estípite es de forma cilíndrica, color crema y de longitud de 1.2 – 5.7 ($\bar{x} = 3.8$) cm con un ancho de 0.4 – 1.8 ($\bar{x} = 0.9$) cm (Figura 2 f). Las láminas son libres y café oscuras. La forma de las esporas es elíptica con una ornamentación reticulada (Figura 1 e). Al igual que *H. leucosarx* y *H. mesophaeum*, las esporas son de color café y una longitud y ancho de 9 μm y 5 μm , respectivamente ($E = 1.8$). Se observa tamaños muy similares en esporas, siendo de mayor longitud la de *Hebeloma alpinum* y más ancha para el caso de *Hebeloma leucosarx* (Cuadro 5).

***Hebeloma leucosarx*:** La forma del píleo fue plano con un diámetro aproximado de 1.5 – 9.8 ($\bar{x} = 5.3$) cm. Presentó un color café claro, dando una apariencia blanquecina del píleo (Cuadro 5 y Figura 2 b). En algunos ejemplares se observó un círculo café rojizo en el centro, sobre todo en aquellos que se encontraban en un estadio maduro. En el caso del estípite fue casi en su totalidad blanco y la forma de este fue cilíndrica. La longitud de los estípites medidos varió de un promedio de 2.8 – 8.7 ($\bar{x} = 4.8$) cm y un ancho de 0.4 – 2.1 ($\bar{x} = 1.2$) cm. El tipo de adherencia de las láminas al ápice del estípite que se observó fue libre; es decir las láminas no tocaron el estípite, el color de estas fue café oscuro. La forma de las esporas fueron elíptica con una longitud promedio de 8 μm y un ancho de 5 μm ($E = 1.6$), color café y ornamentación punteada a ligeramente reticulada de acuerdo a lo observado en las fotografías de barrido (Figura 2 a).

La mayoría de las observaciones realizadas en el presente trabajo para *H. leucosarx* coinciden con las de Vesterholt (2000), quien observó también un

píleo convexo que con el tiempo se expande, de color blanquecino a crema, con un centro rosado y que se desvanece a crema pálido conforme se aleja de este. El color de las láminas también fue café. Las diferencias en las observaciones de dicho autor con respecto al presente trabajo radican en las medidas del píleo menores (diámetro: 1.9-6.0 cm), estípite (1.9-8.0 x 0.5-1.8 cm) y esporas (10.4-12.8 x 5.8-6.9 μm). La descripción del tipo de espécimen de *Hebeloma leucosarx* de acuerdo a Orton (1960) es consistente con la descripción del espécimen descrito en el presente trabajo particularmente en la forma del píleo, color del estípite y el olor característico del hongo.

Hebeloma mesophaeum: Presentó un píleo convexo con un diámetro aproximado de 20 a 60 mm, de color café crema, tendiendo a rojizo en el centro de este (Figura 2 d). El estípite correspondió a una forma cilíndrica del mismo color que el píleo con una longitud de 35 a 50 mm y un ancho de 2 a 6 mm. Las láminas presentaron un tipo de adherencia libre y de color café oscuro. En cuanto a las esporas fueron elípticas con una longitud promedio de 8.7 μm y un ancho de 4.5 μm , de color café y ornamentación reticulada (Cuadro 5 y Figura 2 c). Dichas observaciones coinciden con las observadas por Arora, (1979) en cuanto al diámetro del píleo y color, forma de estípite, tipo y color de láminas y difiere en lo que respecta a una longitud mayor para el estípite (8 cm), tipo de ornamentación de la espora quien la reporta como lisa así como un ancho de espora mayor (5-6 μm) que a la reportada en el presente trabajo.

La principal diferencia entre *H. mesophaeum*, *H. leucosarx* y *H. alpinum* a simple vista fue el tamaño de los esporomas y el color más oscuro para el caso de *H. alpinum* (Cuadro 5). Se observó una ornamentación reticulada para *H. mesophaeum*, lo cual difiere a la ornamentación lisa reportada por Arora (1979). Por esta razón se realizó microscopía electrónica de barrido y se observaron claramente diferencias en la ornamentación de las tres especies mediante esta técnica. La ornamentación de las esporas es una característica importante en las especies de *Hebeloma* de acuerdo a Vesterholt (2005). Rucker (1987), describió la ultraestructura de 55 especies de *Hebeloma* y

clasificó las diferentes ornamentaciones de esporas en tres grupos: A, B and C. El tipo A fue definido como una espora con crestas ramificadas, el tipo de espora B con crestas simples y uniformes y finalmente el tipo de espora C, con estructuras en forma de placas. De acuerdo a esta clasificación el tipo de ornamentación observado en el presente trabajo correspondió al tipo B en el caso de *H. leucosarx* y al tipo C para *H. alpinum* y *H. mesophaeum*. Hasta donde se conoce esta es la primera vez que se ilustra la ultraestructura de *H. alpinum* y *H. leucosarx* usando microscopía electrónica de barrido. Especímenes de estas especies se encuentran depositadas en la colección del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

Cuadro 5. Comparación de las características diagnósticas de los esporomas de *H. alpinum*, *H. leucosarx* y *H. mesophaeum* descritos en este estudio.

Estructura	Características	<i>H. alpinum</i>	<i>H. leucosarx</i>	<i>H. mesophaeum</i>
Píleo	Forma	convexo	plano	convexo
	Color	café oscuro	blanquecino	café crema
	Diámetro (cm)	1.7 – 7.1 ($\bar{x} = 4.1$)	1.5 – 9.8 ($\bar{x} = 5.3$)	1.2 – 5.2 ($\bar{x} = 3.2$)
Estípite	Forma	cilíndrico	cilíndrico	cilíndrico
	Color	crema	blanquecino	crema
	Ancho (cm)	0.3 – 1.9 ($\bar{x} = 1.4$)	0.4 – 2.1 ($\bar{x} = 1.2$)	0.4 – 1.8 ($\bar{x} = 0.9$)
	Longitud (cm)	2 – 6.2 ($\bar{x} = 3.9$)	2.8 – 8.7 ($\bar{x} = 4.8$)	1.2 – 5.7 ($\bar{x} = 3.8$)
Laminas	Adherencia	libres	libres	libres
	Color	café oscuro	café oscuro	café oscuro
Esporas	Forma	elíptica	elíptica	elíptica
	Color	café	café	café
	Ornamentación	reticulada	puntada a ligeramente reticulada	lacunosa o con estructuras tipo placas (de acuerdo a Rucker, (1987))
	Longitud (μm)	9	8	8.7
	Ancho (μm)	5	5	4.5
Olor		rafanoide	rafanoide	rafanoide

n= 25 esporomas (Ver materiales y métodos).

3.2. Descripción de morfotipos

Las especies del género *Hebeloma* tienen una gran importancia económica, biotecnológica y ecológica en México. Recientemente Garibay-Orijel *et al.* (2013), demostraron que es uno de los géneros mejor representado en los bancos de esporas de los bosques del eje neovolcanico que cruza el país del océano atlántico al pacífico. Debido a ello resulta biotecnológicamente muy importante la identificación y descripción de las especies del género *Hebeloma* sintetizados en especies de pino útiles para la restauración de áreas degradadas.

Un antecedente de la descripción de los morfotipos de *Hebeloma alpinum*, *H. leucosarx* y *H. mesophaeum* sin una discusión detallada, fue realizada por la autora previamente (Carrasco-Hernández *et al.*, 2010).

Algunas de las observaciones realizadas por Carrasco-Hernández *et al.*, (2010) con respecto a la descripción de *H. leucosarx* coinciden con las realizadas por Garibay-Orijel, (2013), quien describe el morfotipo de *Hebeloma leucosarx* P. D. Orton asociado a *P. montezumae*. Las similitudes se encuentran en el crecimiento monopodial e hifas emanantes delgadas y difiere en la percepción del color del morfotipo ya que los describe de color café grisáceo denso. Así mismo en el trabajo realizado por Carrasco-Hernández *et al.*, (2010) no se observó que el morfotipo se ramificara dicotómicamente (Figura 3 c y d).

Una de las evidencias más importantes que demuestran la naturaleza ectomicorrízica de los hongos es la síntesis de estas en la planta huésped (Rinaldi *et al.*, 2008). Algunas de las especies del género *Hebeloma* que han sido previamente sintetizados incluyen: *H. crustuliniforme*, *H. cylindrosporum*, *H. sacchariolens* (Brunner, 1991; Debaud *et al.*, 1981; Fox, 1986; Obase *et al.*, 2009; Wong and Fortin, 1989).

A continuación se discute las principales diferencias de las ectomicorrizas de *Hebeloma alpinum*, *H. mesophaeum* y *H. leucosarx* descritas por Carrasco-Hernández *et al.*, (2010):

En el caso de *H. leucosarx* se observa que fue la especie con raíces cortas de mayor longitud seguida de *H. mesophaeum* y *H. alpinum*. Además de que en la mayoría de las ocasiones presentó tipos de ramificación ausentes y en menor proporción dicotómicas, caso contrario para *H. alpinum* (Figura 3 e y f). En cuanto a *H. mesophaeum* fue fácil identificarlo debido a su textura del manto algodonosa y un tamaño intermedio con respecto a *H. alpinum* y *H. leucosarx*. Cabe destacar que a pesar de que se observaron diferencias entre hongos, estas no se presentaron en los dos pinos estudiados (*Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus*). Aunque existe una gran diversidad de especies dentro de este género la mayoría de las investigaciones se ha enfocado principalmente en dos especies *H. crustuliniforme* y *H. cylindrosporum*. Una de las razones es que *H. cylindrosporum* es fácilmente manejable en laboratorio y en el caso de *Hebeloma crustuliniforme* porque tiene una gran diversidad de huéspedes, además de su potencial como inóculo forestal (Cairney and Chambers, 1999). Los estudios de estas especies versan desde su fisiología, bioquímica, hasta su genética y biología molecular (Kedi *et al.*, 2013). En general todas las especies discutidas en la presente contribución han recibido escasa atención a nivel mundial.

Cuadro 6. Características distintivas de las raíces cortas micorrizadas de *H. mesophaeum* (Carrasco-Hernández *et al.*, 2010) comparadas con descripciones previas.

Características	<i>H. mesophaeum</i> con <i>P. patula</i> y <i>P. pseudostrobus</i>	<i>H. mesophaeum</i> con <i>P. ponderosa</i>	<i>Hebeloma</i> <i>mesophaeum</i> (Pers.) Quel. con <i>Pinus</i>	<i>Hebeloma</i> <i>mesophaeum</i> (Pers.) Quél.
Tipo de ramificación	dicotómica o simples en la misma proporción	dicotómicas o simples	dicotómica	ramificación poco frecuente
Forma de las puntas no ramificadas	recta con terminaciones cilíndrica	derechas o curvadas	cilíndricas	longitudinal y delgada
Rizomorfos	ausentes	ausentes	ausentes	n.r
Textura del manto	algodonoso	afieltrada	n.r	n.r
Color del ápice (en estadio juvenil)	café	ocre amarillentas con manto traslúcido con parches blancos ocasionales	café a blanco	de plateado a blanca
Color del ápice (en estadio maduro)	blanco	n.r	n.r	oxidado
Anatomía en la capa externa del manto	plectenquimatoso	plectenquimatoso	plectenquimatoso	n.r
Fuente	Carrasco-Hernández <i>et al.</i> , (2010)	Barroetaveña <i>et al.</i> , (2012)	Agerer, R. and G. Rambold, (2013)	Ingleby <i>et al.</i> , 1990.

n.r = no reportado



Figura 2. Esporas de *H. leucosarx* (a), *H. mesophaeum* (c), *H. alpinum* (e) a 6000 x; Esporomas of *H. leucosarx* (b), *H. mesophaeum* (d) y *H. alpinum* (f). Barras blancas = 2 μ m (a, c and e), 4 cm (b), 3cm (d) y 1 cm (f).



Figura 3. a. Comercialización de *Hebeloma* sp. en el mercado de Ozumba, b. Comparación de *Pinus patula* inoculado con *H. mesophaeum* (izquierda) y sin inocular (derecha), c. Morfotipos de *H. leucosarx*, d. Red de Harting de *H. leucosarx*, e. morfotipo de *H. alpinum* y f. manto de *H. alpinum* en *Pinus patula*. Barras negras= 0.5 cm (c) y 0.3 cm (e).

IV. CONCLUSIONES

La inoculación con en esporomas secos de *H. alpinum*, *H. leucosarx* and *H. mesophaeum* fue exitosa en la formación de ectomicorriza con *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus*.

Se observaron diferencias morfológicas en la morfología de los esporomas y morfotipos de las tres especies de hongos (*H. alpinum*, *H. leucosarx* y *H. mesophaeum*) en longitud, diámetro, radio (base-ápice), tipo de ramificación, forma de la punta, textura y color. Sin embargo, la morfología de las ectomicorrizas analizadas es la misma entre ambas especies de pinos.

Hasta donde se conoce el presente estudio ilustra por primera vez con microscopía electrónica de barrido la ornamentación de la espóra de *H. alpinum* y *H. leucosarx*.

Es importante la caracterización de las especies fúngicas estudiadas de *Hebeloma* spp. y sus morfotipos ectomicorrízicos asociados, debido a la gran importancia local para la silvicultura y su potencial económico y social.

V. LITERATURA CITADA

- Agerer R. 1990. Color atlas of ectomycorrhizae. Einhorn Verlag, Munich.
- Agerer, R. and G. Rambold. 2004. DEEMY - An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. München, Germany. <http://www.deemy.de/>. Date accessed: 14 May, 2014.
- Aremu, M. O., S. K. Basu, S. D. Gyar, A. Goyal, P. K. Bhowmik and B. S. Datta. 2009. Proximate composition and functional properties of mushroom flours from.
- Ganoderma* spp., *Omphalotus olearius* (DC.) Sing. and *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. Used in Nasarawa State, Nigeria. *Mal. J. Nutr.*, 15: 233-241.
- Arora, D. 1979. Mushrooms demystified. Ten Speed Press, Berkeley. California, USA. 355 – 356 pp.
- Avendaño S. y I. Acosta. 2000. Plantas utilizadas como cercas vivas en el estado de Veracruz. *Madera y Bosques*, 6: 55-71.
- Barroetaveña, C., V. N. Bassani and M. Rajcherberg. 2012. Inoculación micorrícica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. *Bosque*, 32: 163 - 169.
- Bocchi, M., L. Garlaschelli, G. Vidari and G. Mellerio. 1992. New farnesane feskiterpenes from *Hebeloma senescens*. *J. Nat. Prod.*, 55: 428–431.
- Brunner, I. 1991. Comparative studies on ectomycorrhizae synthesized with various *in vitro* techniques using *Picea abies* and two *Hebeloma* species. *Trees*, 5: 90 – 94.

- Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and N. Malajczuk. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR. Monograph 32: 374 p.
- Brundrett, M. C. 2008. Ectomycorrhizas. In: Mycorrhizal Associations: The Web Resource. Version 2.0. <http://mycorrhizas.info/ecm.html#s4>. Date accessed: 14 May, 2014.
- Cairney, J. W. G. and S. M. Chambers. 1999. Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. 369 pp.
- Cambrón-Sandoval, V. H., N. M. Sánchez-Vargas, C. Saénz-Romero, J. J. Vargas- Hernández, M. L. España-Boquera and Y. Herrerías-Diego. 2013. Genetic parameters for seedling growth in *Pinus pseudostrobus* families under different competitive environments. *New Forests*, 44: 219 – 232.
- Carrasco-Hernández, V., V. Espinosa-Hernández, J. Pérez-Moreno, R. Quintero-Lizaola, M. Torres-Aquino. 2010. Aspectos ecofisiológicos de la raíz de *Pinus pseudostrobus* y *P. patula* y especies ectomicorrízicas comestibles de *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. Colegio de Postgraduados. Tesis de maestría.
- Debaud, J. C., R. Pepin and G. Bruchet. 1981. Étude des ectomycorhizes de *Dryas octopetala*. Obtention de synthèses mycorrhiziennes et de carpophores d' *Hebeloma alpinum* et *H. marginatum*. *Can. J. Bot.*, 59: 1014 – 1020.
- De Bernardi, M., G. Fronza, M. P. Gianotti, G. Mellerio, G. Vidari and P. Vita-Finzi. 1983. Fungal metabolites XIII: New cytotoxic triterpene from *Hebeloma* species (Basidiomycetes). *Tetrahedron Letters*, 24: 1635–1638.

- Estrada-Castillón, E., B. E. Soto-Mata, M. Garza-López, J. A. Villareal-Quintanilla, J. Jiménez-Pérez, M. Pando-Moreno, J. Sánchez-Salas, L. Scott-Morales and M. Cotera-Correa. 2012. Medicinal plants in the southern region of the State of Nuevo León, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 8:45.
- Fox, F. M. 1986. Groupings of ectomycorrhizal fungi of birch and pine, based on establishment of mycorrhizas on seedlings from spores in unsterile soils. *Transactions of the British Mycological Society*, 87: 371 – 380.
- Fujimoto, H., K. Suzuki, H. Hagiwara and M. Yamazaki. 1986. New toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma vinosophyllum*. I. Structures of hebevinosides I, II, III, IV, and V. *Chem. Pharm. Bull.*, 34: 88–99.
- Fujimoto, H., K. Maeda and M. Yamazaki. 1991. New toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma vinosophyllum*. III. Isolation and structures of three new glycosides, hebevinosides XII, XIII, and XIV, and productivity of the hebevinosides at three growth stages of the mushroom. *Chem. Pharm. Bull.*, 39: 1958 – 1961.
- Fujimoto, H., Y. Takano and M. Yamazaki. 1992. Isolation, identification and pharmacological studies on three toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma spoliatum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 40: 869 – 872.
- Garibay-Orijel, R., E. Morales-Marañón, M. Domínguez-Gutiérrez y A. Flores-García. 2013. Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 153-169.

- Garlaschelli, L., G. Vidari, M. Virtuani, P. Vita-Finzi and G. Mellerio. 1995. The structures of new lanostane triterpenes from the fruiting bodies of *Hebeloma senescens*. *J. Nat. Prod.*, 58: 992–1002.
- Iloff, P. M. and N. T. Mirov. 1953. Composition of gum turpentines of pines. XVI. A report on *Pinus oocarpa* and *P. pseudostrobus* var. *oaxacana* from Chiapas and *P. cooperi* from Durango. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 42: 46-49.
- Ingleby, K., P. A. Mason, F. T. Last and L. V. Fleming. 1990. Identification of ectomycorrhizas. Institute of Terrestrial Ecology. London. 112 p.
- Kedi, B., J. Abadie, J. Sei, H. Quiquampoix and S. Staunton. 2013. Diversity of adsorption affinity and catalytic activity of fungal phosphatases adsorbed on some tropical soils. *Soil Biol. and Biochem.*: 13-20.
- Largent, D. L. 1973. How to identify mushrooms to genus I. Macroscopic features. Mad River Press In. Eureka, California.
- Largent, D. L., D. Johnson and R. Watling. 1977. How to identify mushrooms to genus III: Microscopic features. Mad River Press Inc. Eureka, California.
- Liu, J. 2002. Biologically active substances from mushrooms in Yunnan, China. *Heterocycles*, 57: 157–167.
- Marmeisse, R., H. Gryta, P. Jargeat, L. Fraissinet-Tachetm, G. Gay and J. C. Debaud. 1999. *Hebeloma*. In: Cairney J.W.G., S.M.Chambers, eds. *Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile*. Berlin, Germany: Springer, 89-120.

- Montoya, A., N. Hernández, C. Mapes, A. Kong and A. Estrada-Torres. 2008. The collection and sale of wild mushrooms in a community of Tlaxcala, Mexico. *Econ. Bot.*, 62: 413-424.
- Obase, K., Y. Tamai, T. Yajima and T. Miyamoto. 2009. Mycorrhizal synthesis of four ectomycorrhizal fungi in potted *Populus maximowiczii* seedlings. *Mycoscience*, 50: 143-145.
- Ohenoja, E. and M. Ohenoja. 2010. Larger fungi of the Canadian Arctic. *North American Fungi*, 5: 85-96.
- Orton, P. D. 1960. New check list of British Agarics and Boleti. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 43: 159 – 439.
- Patiño, F. and P. Yoshio. 1991. *Pinus patula*, Schiede & Deppe. Seedleaflet No. 8A. - Danida Forest Seed Centre, Humlebæk, Denmark.
- Pérez-Moreno, J., M. Martínez-Reyes, A. Yesca-Pérez, A. Delgado-Alvarado and B. Xoconostle-Cázares. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany*, 62: 425 – 436.
- Pérez-Moreno, J., A. Lorenzana Fernández, R. Medel Ortiz, R. Ferrera-Cerrato y G. Mata Montes de Oca. 2013. Los hongos ectomicorrízicos de México: una perspectiva global. In: Alvarez J., M.P. Rodríguez-Guzmán and A. Alarcón (eds.) *Biodiversidad Microbiana de México*. SUBNARGEM-CONABIO. Mexico City (in press).
- Rinaldi, A.C., O. Comandini and T.W. Kuyper. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*, 33: 1-45.

- Rücker, T. 1987. Ultrastruktur der Sporen bei *Hebeloma* (Pers.: Fr.) Kummer (Agaricales). Zeitschrift Für Mykologie Band, 53: 59 – 72.
- Sánchez-González, A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. Madera y Bosque, 14: 107 – 120.
- Secretaría de Gobernación (SEGOB), 2010. Enciclopedia de los municipios del Estado de México. Municipio de Ozumba. Gobierno Federal. México. <http://www.elocal.gob.mx/work/templates/enciclo/mexico/mpios/15068a.htm>. Date accessed: 1 May, 2014.
- Vesterholt, J. 2000. *Hebeloma crustuliniforme* and related species. Field Mycology, 1: 58 – 68.
- Vesterholt, J. 2005. The genus *Hebeloma* (Fungi of Northern Europe-vol. 3). The Danish Mycological Society. 144 pp.
- Wichlacz, M., W. A. Ayer, L. S. Trifonov, P. Chakravarty and D. Khasa. 1999. A caryophyllene-related sesquiterpene and two 6,7-secocaryophyllenes from liquid cultures of *Hebeloma longicaudum*. J. Nat. Prod., 62: 484 – 486.
- Wong, K. K. Y. and A. Fortin. 1989. A Petri dish technique for the aseptic synthesis of ectomycorrhizae. Canadian Journal of Botany, 67: 1713 - 1716.

V. CONCLUSIONES GENERALES

Hasta donde conocemos el presente trabajo es el primer reporte en México que demuestra que la inoculación con *Suillus brevipes* en plantas de *Pinus greggii* en vivero es un factor crucial para la supervivencia y establecimiento de dicho pino después de 7 años en condiciones de campo.

La micorrización de *Pinus greggii* con hongos ectomicorrízicos silvestres en viveros influye en su establecimiento de pinos en campo.

A pesar de la gran importancia económica, biotecnológica y ecológica del género *Hebeloma* y *Suillus* en México, pocos estudios se han llevado a cabo en el país de la diversidad fúngica en áreas neotropicales. Por lo que éste es un acercamiento seminal de identificación de las especies más abundantes dentro del complejo de especies de dichos géneros comercializadas en México de los géneros *Hebeloma* spp. y *Suillus* spp., así como de los morfotipos formados por dichos hongos.

ANEXO I

CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA INICIAL DEL GÉNERO *Suillus* QUE SE COMERCIALIZAN EN OZUMBA, ESTADO DE MÉXICO

Resumen. México cuenta con una gran diversidad de hongos silvestres comestibles, los cuales se comercializan en todo el país. La venta de dichos hongos se da en un complejo de especies que se separan solo por género. Hasta el momento no se conoce con precisión que especies se comercializan en Ozumba, Estado de México. En el presente trabajo se colectaron esporomas de *Suillus* sp. en Ozumba a inicios de la época de lluvias y se encontraron 4 grupos principales clasificados en función de las diferencias taxonómicas observadas de los esporomas colectados en dicha área (forma, color, tamaño). El conocimiento de las especies es fundamental por los diferentes usos que tienen (alimenticio y biotecnológico), así como para su conservación.

Palabras claves: hongos silvestres comestibles, *Suillus* sp. y ectomicorrizas.

Introducción. El género *Suillus* S. F. Grey esta agrupado dentro del orden Boletales (Hawksworth *et al.* 1995), donde la mayoría de las especies forman ectomicorrizas. Los Boletos son fácilmente distinguibles de otros órdenes agaricales, ya que poseen en su mayoría tubos arreglados verticalmente en lugar de láminas en la parte inferior del píleo. Dentro de los Boletales, Hawksworth *et al.* (1995) agrupo *Suillus* dentro de la familia *Boletaceae*, mientras que Knudsen (1995) utiliza un arreglo taxonómico alternativo en el cual *Suillus* esta agrupado junto con *Gomphideus* y *Chroogomphus* en el *Gomphidaceae*. Comúnmente, los Boletos se han considerado que forman tres grupos principales; el grupo *Suillus*, el grupo de *Strobilomycete* y el grupo más grande de *Boletus*.

El género *Suillus* sp. se encuentra distribuido en el hemisferio norte el cual coincide con la distribución natural de su huésped natural, las coníferas. Cabe

mencionar que la mayor distribución de *Suillus* sp. y pinos se encuentra en el norte y centro América. *Suillus* sp. se asocia exclusivamente a la familia *Pinaceas* (Molina *et al.* 1992; Singer 1986), el cual engloba doce géneros con alrededor 220 especies distribuidas en el hemisferio norte (Mabberley 1997). Los géneros más importantes en las Pinaceas son *Pinus*, *Larix* and *Pseudotsuga* (Cairney and Chambers, 1999). El género *Pinus* comprende 94 especies y es uno de los géneros más ampliamente distribuido de árboles en el hemisferio norte (Critchenfield and Little 1966). Los pinos se extienden desde la región polar al trópico y con este enorme rango ellos dominan la vegetación natural en muchas regiones. El género *Larix* comprende diez especies, de las cuales dos son ampliamente distribuidas en Euroasia y una en Norte América, mientras que las especies restantes tienen una distribución limitada (Farjon, 1990). El género *Pseudotsuga*, comprende seis especies (Mabberley, 1997), el cual está relacionado a *Larix* (Price *et al.* 1987).

La mayor riqueza de especies de *Suillus*, alrededor de 50 especies, se encuentra en el Norte América, coincidiendo con la más alta riqueza de especies de coníferas (Smith and Thiers, 1964). Diversas especies de *Suillus* tienen un rango geográfico limitado y cerca de la mitad de las especies se encuentran en Norte América donde también se localiza una gran riqueza de pinos endémicos. En contraste Europa y Asia, se registran pocas especies de *Pinus* y de igual forma de *Suillus*. Pocas especies de *Suillus* están distribuidas dentro del rango natural de pinos en las Islas Canarias y en el norte de África. *Suillus* está ausente en Australia, Nueva Zelanda y el Sur de América.

Existen reportes de la comercialización del género de *Suillus* sp. en mercados del Estado de México como son el caso del mercado de Ozumba, Amecameca y Chalco (Pérez-Moreno *et al.*, 2008). También se ha reportado en mercados de Morelos y Tlaxcala (Pérez-Moreno *et al.*, 2008; Montoya *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se identificaron las especies comercializadas en el mercado de Ozumba, por las implicaciones y usos biotecnológico como inoculante micorrízico.

Materiales y Métodos. Se realizaron colectas del género de *Suillus* sp., comercializadas en el mercado de Ozumba, Estado de México a inicios de la época de lluvias, que es cuando se encuentra este hongo. En cada colecta se agruparon por sus diferencias características macroscópicas (color, tamaño y formas tanto del píleo como del estípite).

Resultados y discusión. El género *Suillus* sp. se caracteriza por ser carnosos de tamaño mediano a grande. El píleo es generalmente viscoso o gelatinoso aunque algunas especies son secas y escamosas. El estípite puede tener o no anillo. Himenio color amarillo de poros pequeños a grandes y con formas radiales. Las esporas de forma alargada, lisas y de color pálidas a marrón (Cairney and Chambers, 1999).

De las especies colectadas durante la época de lluvias en el mercado de Ozumba se identificaron cuatro grupos por sus diferencias macroscópicas.

Grupo I.- Esporoma con píleo convexo de 5 a 11.5 cm de diámetro y color canela, con textura gelatinosa a pegajosa y margen de píleo ligeramente ondulado y de coloración blanca. En cuanto al himenio presentó una forma circular de 1 a 2 poros por milímetro y una profundidad del poro de 2 a 6 mm. De color amarillo y adherencia recta. El estípite presentó una forma cilíndrica de longitud de 3 a 7 cm y un ancho de 0.9 – 2.5 cm, de color amarillo-blanquecino y textura estriada.

Grupo II. El píleo presentó una forma convexa a plana de color canela y un diámetro de 5 a 11.5 cm. La textura fue gelatinosa y con un margen ligeramente ondulado y de contexto blanco. El himenio presentó una forma circular de 1 a 2 poros por milímetro y una profundidad de 1 a 4 mm. De color

amarilla y color recta. El estípite de forma cilíndrica con una longitud de 4 a 6.5 cm y un ancho de 1.3 a 1.8 cm. y textura estriada.

Grupo III. El píleo fue convexo a plano con un diámetro de 5 a 10 cm, de color café oscuro, de margen entero y textura gelatinosa. El contexto del píleo fue blanco. El himenio presentó una forma amorfa de 1 a 2 poros por mm y una profundidad de 1 a 3 mm, de adherencia recta y color amarillo. El estípite presentó una forma cilíndrica de color blanco con café y longitud de 3 a 9 cm y un ancho de 1.3 a 1.5 cm y textura estriada.

Grupo IV. El píleo fue convexo con un diámetro de 1.8 a 7.5, de color café y puntos ligeramente blancos. La textura del píleo fue lisa y con margen ondulado, el contexto del píleo fue blanco. El himenio fue circular con 1 poro por mm y de profundidad de 1 a 5 mm, de color amarillo y adherencia estrecha. El estípite presentó una forma cilíndrica, de color amarillo con café, de 1 a 7 cm de longitud y de 1 a 2.3 de ancho y de textura estriada.

Por sus características macroscópicas el grupo I. se asemeja a *Suillus pseudobrevipes* debido a que se encuentra dentro de los rangos de píleo y estípite especificados por Smith and Thiers, (1964) aunque difiere con lo reportado por Lincoff and Knopf (1984), quien menciona que *Suillus pseudobrevipes* presenta anillo. En el caso del Grupo II, se asemeja a *Suillus brevipes* aunque difiere con Smith and Thiers, (1964) en lo que respecta al color del píleo lo cual puede deberse al estadio del hongo. El grupo III, se asemeja a *S. granulatus* en tamaño y color de píleo con respecto a lo reportado por Smith and Thiers, (1964) y Kuo, (2009) y. Finalmente para el caso del grupo IV. se encontró similitud con *S. collinitus* principalmente por las características del píleo y la forma ondulada del píleo, lo cual la hace completamente diferente a los grupos anteriores (Roody, 2003).

Cuadro A1. Características macroscópicas de los esporomas de *Suillus* sp., colectados en Ozumba, Estado de México.

		Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Píleo	Forma	convexo a plano	convexo a plano	convexo	convexo
	Diámetro (cm)	5 – 11.5	5.5 - 6.2	5 - 10	1.8 – 7.5
	Color	canela	amarillo	café	café
			pardo	oscuro	ligeramente oscuro con puntos blancos
	Textura (cutícula)	gelatinosa- pegajosa	gelatinosa- pegajosa	gelatinoso- pegajoso	lisa
	Margen	ligeramente ondulado	ligeramente ondulado	entero	ondulado
	Contexto (color)	blanco	blanco	blanco	blanco
Himenio	Forma del poro	circular	circular	amorfa	tendiendo a circular
	Número de poros por milímetro	1-2	1 – 2	1 – 2	1
	Profundidad del poro (mm).	2-6	1 – 4	1 - 3	1 – 5
	Color	amarillo	amarillo	amarillo	amarillo
	Adherencia	recta	recta	recta	estrecha
Estípite	Forma	cilíndrico	cilíndrico	cilíndrico	cilíndrico
	Color	amarillo- blanquecino	amarillo	blanco con café	amarillo con café
	Ancho (cm)	0.9 - 2.5	1.3 – 1.8	1.3 – 1.5	1 – 2.3
	Longitud (cm)	3 -7	4 – 6.5	3 - 9	1.7 – 7
	Textura	estriado	estriado	estriado	estriado



Figura A1. Esporomas de *Suillus* sp.; a. Grupo I., b. Grupo II., c. Grupo III., d. Grupo IV.

Conclusiones. Se encontraron cuatro grupos diferentes de *Suillus* spp., que se comercializan en el mercado de Ozumba, Estado de México.

Literatura citada

Cairney, J. W. G. and S. M. Chambers. 1999. Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile. Ed. Springer. Germany. pp.33 – 64.

Critchenfield, W. B. and J. E. L. Little. 1966. Geographical distribution of the pines of the world. US Dep Agric For Serv Misc Publ 991.

Farjon, A. 1990. Pinaceae drawings and descriptions of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koeltz Scientific Books, Königstein.

- Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton and D. N. Pegler. 1995. Dictionary of the fungi. CAB International, Wallingford.
- Knudsen, H. 1995. Taxonomy of the basidiomycetes in Nordic Macromycetes. Acta Univ Ups Symb Bot Ups XXX3:169-208.
- Lincoff, G. H. and A. A. Knopf. 1984. The Audubon Society Field Guide to North American mushrooms. New York. pp. 582 – 583.
- Mabberley, D. J. 1997. The plant book. Cambridge University Press, Cambridge.
- Molina R., H. Massicotte and J. M. Trappe. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen M. F. (ed) Mycorrhizal functioning- an integrative plant-fungal process. Chapman and Hall, New York, pp 357-423.
- Montoya, A., N. Hernández, C. Mapes, A. Kong and A. Estrada-Torres. 2008. The collection and sale of wild mushrooms in a community of Tlaxcala, Mexico. Economic Botany, 62(3): 413 – 424.
- Price, R. A., J. Olsen-Stojkovich and J. M. Lowenstein. 1987. Relationships among the genera of Pinaceae: an immunological comparison. Syst. Bot. 12: 91-97.
- Roody, W. C. 2003. Mushrooms of West Virginia and the Central Appalachians. Lexington, Kentucky: University Press of Kentucky.
- Smith, A. H. and H. D. Thiers. 1964. A contribution toward a monograph of North American species of *Suillus*. Ann. Arbor, Michigan.