



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN CIENCIAS FORESTALES

**COADAPTACIÓN DE
CONSORCIOS MICORRÍZICOS EN
POBLACIONES CONTRASTANTES
DE *Pinus greggii* var. *australis***

GABRIELA RODRÍGUEZ GÓMEZ TAGLE

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

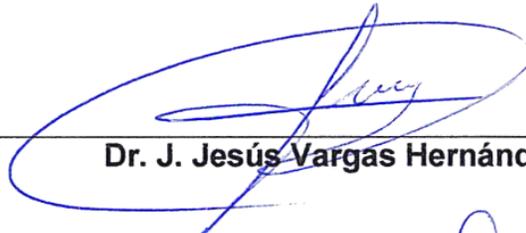
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Coadaptación de consorcios micorrizicos en poblaciones contrastantes de *P. greggii***, realizada por la estudiante: **Gabriela Rodríguez Gómez Tagle**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
CIENCIAS FORESTALES

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



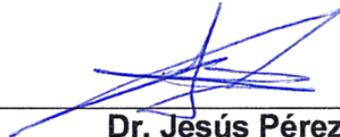
Dr. J. Jesús Vargas Hernández

ASESOR



Dr. Javier López Upton

ASESOR



Dr. Jesús Pérez Moreno

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, noviembre de 2022

COADAPTACIÓN DE CONSORCIOS MICORRÍZICOS EN POBLACIONES CONTRASTANTES DE *PINUS GREGGII* VAR. *AUSTRALIS*

Gabriela Rodríguez Gómez Tagle, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

Los bosques son ecosistemas de gran importancia ecológica debido a su capacidad de almacenar carbono y contrarrestar el aumento en la concentración de CO₂ en la atmósfera; de igual manera, poseen un alto económico y social por los servicios que proveen a la sociedad como fuente de materias primas, aprovechamiento de recursos naturales y áreas recreativas. Por su elevado valor de uso, los bosques son susceptibles a presiones ambientales y antropológicas; por tanto, es vital considerar estrategias para la recuperación de zonas forestales degradadas con especies nativas. *Pinus greggii* Engelm., es una especie que posee altas probabilidades de éxito en programas de restauración ecológica, debido su capacidad de adaptación en un amplio rango de condiciones ambientales. Sin embargo, factores como la deforestación y el cambio climático, han generado aislamiento en sus poblaciones naturales, propiciando una diferenciación entre ellas al ser sometidas a condiciones edáficas y climáticas distintas. La diferenciación no sólo radica en las características de las poblaciones de *P. greggii*, también en sus asociaciones mutualistas con organismos edáficos como los hongos ectomicorrízicos. La relación que establecen es resultado del proceso de coadaptación entre ambos organismos con la finalidad de recibir un beneficio mutuo, el cual puede modificarse debido a factores como la precedencia del hospedero, el huésped, su interacción o el ambiente. Lamentablemente, no existen estudios suficientes que aborden esta interacción. En el presente estudio se evaluó la importancia de la coadaptación de asociaciones ectomicorrízicas a través de la estimación de la diversidad y diferenciación de las comunidades ectomicorrízicas (ECM) en dos poblaciones naturales de *Pinus greggii* var. *australis* (Zacualpan y Cieneguilla), en ambientes contrastantes y en un bioensayo en vivero con combinaciones recíprocas de orígenes de semilla e inóculo nativo. Se encontraron 32 morfotipos distintos en las poblaciones naturales, 17 de ellos exclusivos de Zacualpan, nueve exclusivos de Cieneguilla y ocho en común. La población de Zacualpan, localidad con condiciones ambientales más favorables, la que tuvo mayor diversidad, pero con una fuerte diferenciación con respecto a la otra comunidad. En las plantas del bioensayo dominó el morfotipo *Tomentella* sp. en los primeros meses de crecimiento, pero a los ocho meses *Rhizopogon* sp. fue más abundante. La dinámica de colonización de raíces fue más rápida con el huésped u hospedero originario de Cieneguilla. Al inicio, la diversidad de morfotipos fue mayor en la asociación simpátrica, pero a los 12 meses después de la siembra, fue mayor en la alopátrica. La diversidad y la diferenciación de la comunidad ECM se redujo con la edad de las plantas, lo que indica un efecto del ambiente del bioensayo en la homogeneización de la composición de comunidades ECM.

Palabras clave: deforestación, cambio climático, diversidad de ectomicorrización

COADAPTATION OF MYCORRHIZAL COMMUNITIES IN CONTRASTING POPULATIONS OF *PINUS GREGGII* VAR. *AUSTRALIS*

Gabriela Rodríguez-Gómez-Tagle, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

Forests have a large ecological importance due to their ability to store carbon and counteract the increase in CO₂ concentration in the atmosphere; similarly, they have a high economic and social value linked to the broad range of services they provide to society, either as source of raw materials and other natural resources or as leisure areas. Given their high use value, forests are susceptible to environmental and anthropological pressures, so it is important to look for strategies to recover impacted and degraded forest areas using native species. *Pinus greggii* Engelm is a forest species with a high potential for success in ecological restoration programs due to its adaptation to a broad range of environmental conditions. However, deforestation and climate change have isolated its natural populations, exposing them to different edaphic and climate conditions and triggering a differentiation process. Population differentiation not only takes place in *P. greggii*, it also occurs in their mutualistic associations with edaphic microorganisms, such as ectomycorrhizal fungi. Ectomycorrhizal symbiosis is the result of coadaptation processes between host and guest to achieve mutual benefits, which can be modified by their origin and environment conditions. Unfortunately, there are not enough studies addressing this issue. In this study the importance of the coadaptation process in ectomycorrhizal associations was evaluated through the estimation of diversity and differentiation of ectomycorrhizal (ECM) communities in two natural populations of *Pinus greggii* var. *australis* (Zacualpan and Cieneguilla), growing in contrasting environments, and in a nursery bioassay with reciprocal combination of seed and native inoculum origins. Thirty two (32) different ECM morphotypes were found in natural populations, 17 exclusives of Zacualpan, nine exclusives of Cieneguilla and eight in common. The greatest diversity was reported in Zacualpan who had the best environmental conditions, but with a strong differentiation from the other community. In the bioassay, the *Tomentella* sp. Morphotype dominated during the first months of seedling growth, but after eight months *Rhizopogon* sp. was more abundant. Root colonization dynamic was faster either with host or guest from Cieneguilla. At the beginning of the bioassay, ECM diversity was higher in the sympatric association, but 12 months after sowing, it was higher in the allopatric one. The diversity and differentiation of ECM communities decreased with seedling age, showing an effect of the bioassay environment on the homogenization of ECM community composition.

Key words: deforestation, climate change, ectomycorrhizal diversity

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo y beca brindada para llevar a cabo mi proyecto de investigación

Al **Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo** y al **Postgrado en Ciencias Forestales** por ser parte de mi crecimiento académico, fortalecer mis habilidades y permitirme conocer nuevas áreas de oportunidad en mi desarrollo

A mi profesor consejero el **Dr. J. Jesús Vargas Hernández** por su apoyo incondicional, entusiasmo, paciencia y guía en el proceso de crecimiento profesional y personal.

A mi asesor el Dr. **Javier López Upton** por su carisma, gran disposición para colaborar, apoyo y consejos.

A mi asesor el **Dr. Jesús Pérez Moreno** por su guía, sabiduría y gusto por compartir su conocimiento

A la **Dra. Magdalena Martínez Reyes** por su apoyo y asesoría A mis **profesores del Postgrado Forestal** por ser partícipes en mi formación académica

Al **Ing. Tomás Guzmán Pérez, Pedro Ángel Badillo, Cristobal Alvarado Pérez y Rosario Flores Vásquez** por su apoyo en las recolectas de suelo en Zacualpan, Veracruz.

A mis **compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados** Liliana, Rigo, Oli, César, Eliseo, Nina, Norma, Eddy, Frida, Marce, Amauri, Vicente, Jesús, Deyanira, Manuel, Fresia, Ani, Uziel, Ivette, Olivia Ayala, Tomás, José Luis, Ana, Wendy, Mary, José Luis, Humberto, Jazmín.

DEDICATORIA

A mis padres y hermano por su apoyo incondicional, complicidad

A Juan Carlos Guido Patiño por el apoyo, cariño, amor y pasión por la ciencia

A mis grandes amigos: Zyanya, Dany, Siboney, Ileana, Edgar, Mónica

A mis colegas y amigos: Liliana, Yolanda, Lorena, Fabiola, Abigail, Toño, Cristóbal,
Ángel

A mis mentores: Jorge Lugo de la Fuente, Cristina Burrola Aguilar, Griselda Chávez
Aguilar, Blanca Jaimes, Victoria Rivas Manzano, Luis Isaac Gómez, Yuriana Gómez,

A la familia Caracheo Uría, especialmente a Graciela Uría Gómez (QEPD) por todas
las enseñanzas, amistad y el apoyo incondicional

A Chesy

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA.....	vi
LISTAS DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos	3
Hipótesis	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Importancia y problemática de los bosques templados.....	5
Uso de especies nativas para restauración de bosques: caso <i>Pinus greggii</i>	5
Diversidad y diferenciación genética de <i>Pinus greggii</i>	7
Coadaptación de especies forestales y consorcios micorrízicos	7
CAPÍTULO I: DIVERSIDAD Y COADAPTACIÓN DE COMUNIDADES ECTOMICORRÍZICAS EN POBLACIONES CONTRASTANTES DE <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i>	10
1.1 RESUMEN	10
1.2 ABSTRACT	11
1.3 INTRODUCCIÓN	12

1.4	MATERIALES Y MÉTODOS	15
1.4.1	Poblaciones naturales muestreadas	15
1.4.2	Obtención de muestras de suelo.....	17
1.4.3	Establecimiento del bioensayo.....	18
1.4.4	Evaluación de la comunidad micorrízica en poblaciones naturales y bioensayo	21
1.4.5	Estimación de la diversidad y diferenciación de la comunidad ectomicorrízica.....	24
1.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	25
1.6	RESULTADOS.....	26
1.6.1	Diversidad y diferenciación de la comunidad ECM en localidades naturales.....	26
1.6.2	Dinámica de micorrización y colonización de raíces en vivero.....	29
1.6.3	Diversidad y diferenciación de morfotipos en plantas de vivero.....	31
1.7	DISCUSIÓN	36
1.7.1	Diversidad y diferenciación de la comunidad ECM en poblaciones naturales.....	36
1.7.2	Colonización de raíces por la comunidad ECM en plantas de vivero.....	37
1.7.3	Diversidad y diferenciación de la comunidad ECM en plantas de vivero.	39
1.8	CONCLUSIONES	43
	CONCLUSIÓN GENERAL	44
	LITERATURA CITADA.....	46

ANEXOS	52
Anexo A. Caracterización morfo-anatómica de los morfotipos identificados en poblaciones naturales de <i>Pinus greggii</i> y plantas del bioensayo en vivero.....	52
Anexo B. Tipos de manto externo identificados en los morfotipos encontrados en la investigación.	55
Anexo C. Tipo de hifas identificadas en los morfotipos encontrados. A) Hifa con fíbula identificada en M1- <i>Tomentella</i> sp. y B) Hifa con septo identificada en M32- <i>Cenococum geophilum</i>	56

LISTAS DE CUADROS

Cuadro 1. Localización y principales condiciones ambientales de las dos poblaciones de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> muestreadas.....	16
Cuadro 2. Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto de la comunidad ECM, la procedencia de la semilla y la edad de la planta en el porcentaje de plantas micorrizadas (pm) y raíces colonizadas (rc) de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> en el bioensayo	30
Cuadro 3. Índice de diversidad de Shannon de los morfotipos encontrados en las raíces colonizadas a los ocho y 12 meses de edad en plantas de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> (bioensayo en vivero) en relación con el origen del inóculo nativo del sustrato	34
Cuadro 4. Índices de similitud de Bray-Curtis de la comunidad ECM estimados entre los orígenes de ECM, origen de semilla y tipo de asociación (simpátrica y alopátrica) a los ocho y 12 meses de edad en las plantas de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> del bioensayo	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica del método de selección de árboles adultos de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> en Zacualpan, Veracruz. y Cieneguilla, Hgo. Elaboración propia.	17
Figura 2. a) Representación gráfica de la técnica de recolección de muestras de suelo en bosques de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> localizados en Zacualpan, Ver. y Cieneguilla, Hgo. Elaboración propia. b) Fotografía de la barrena metálica utilizada para la obtención de muestras.....	18
Figura 3. Distribución de las parcelas y repeticiones de los tratamientos de Zacualpan y Cieneguilla.	19
Figura 4. Establecimiento y distribución de los cuatro ambientes en el invernadero localizado en el vivero del Postgrado Forestal. a) Ambientes con inóculo de Zacualpan y b) Cieneguilla. Los ambientes de la izquierda, en ambas fotografías, contienen a las plantas.....	20
Figura 5. Procesamiento del sistema radical para la observación, recolección y caracterización de puntas micorrizadas.	22
Figura 6. a) Proceso de limpieza de las raíces cortas y b) caracterización de las puntas micorrizadas de las plantas del bioensayo a partir de las guías de Agerer (1994).	23
Figura 7. Curvas de rarefacción de los morfotipos recolectados en las poblaciones naturales de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> de Zacualpan, Ver. y Cieneguilla Hgo., con intervalos de confianza del 95%.....	26

Figura 8. Morfotipos encontrados en las dos poblaciones naturales de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> en Zacualpan Ver. y Cieneguilla, Hgo.....	27
Figura 9. Abundancia de los morfotipos ectomicorrízicos (M) identificados en poblaciones naturales de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> de Zacualpan, Ver. y Cieneguilla, Hgo.	29
Figura 10. Dinámica del porcentaje de plantas ectomicorrizadas (ECM) de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> a diferentes edades por el efecto de (a) origen de la comunidad ECM y b) la procedencia de la semilla.....	30
Figura 11. Porcentaje de raíces colonizadas en plantas de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> de diferentes edades crecidas en inóculos ECM con comunidades alopátricas o simpátricas recolectados en dos poblaciones naturales.....	31
Figura 12. Morfotipos encontrados en las plantas del bioensayo de <i>P. greggii</i> var. <i>australis</i> en diferentes edades de las plantas y localizadas tanto en asociaciones simpátricas como alopátricas.....	32
Figura 13. Dinámica de aparición de los morfotipos ECM en plantas del bioensayo de <i>Pinus greggii</i> var. <i>australis</i> en asociaciones origen del inóculo nativo y de la semilla, simpátricas (ZZ y CC) y alopátricas (ZC y CZ), Z: Zacualpan; C: Cieneguilla.	33

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los bosques templados son ecosistemas de suma importancia ecológica debido a su papel en la mitigación de la erosión del suelo, participan en la disminución de CO₂ y ser albergue del 75% de la diversidad terrestre (Granados-Sánchez et al., 2007, FAO,2016). En ámbito social y económico, desempeñan un papel importante al generar espacios recreativos, así como el aprovechamiento de recursos como la madera y sus derivados (Granados-Sánchez et al., 2007, Zulueta-Rodríguez et al., 2015).

Sin embargo, las presiones ambientales y antropológicas, han reportado una reducción de 75 000 ha de masas forestales en nuestro país en el periodo del 2005 al 2010 (López-Gutiérrez et al., 2018). Por lo tanto, la implementación de estrategias de restauración utilizando especies endémicas del género *Pinus*, como *Pinus patula* Schldt & Cham, *Pinus montezumae* Lamb y *Pinus greggii* Engelm. han sido planteadas como una opción para la recuperación de los bosques mexicanos (López-Gutiérrez et al., 2018).

Particularmente, *Pinus greggii* es una especie que posee la capacidad de establecerse en un amplio rango de condiciones ambientales, lo que le permite ser una especie ideal para los programas de restauración (García-García et al., 2003; Hernández-Martínez et al., 2007; Martínez-Reyes et al., 2012; Rentería-Chávez et al., 2017). Lamentablemente, factores como la deforestación y el cambio climático, han disminuido y aislado sus poblaciones exponiéndolas a diferentes condiciones edáficas y climáticas, lo cual ha desencadenado diferenciación de sus poblaciones en *P. var. greggii* y *P. var. australis* (Parraguirre Lezama et al., 2002; Hernández-Martínez et al., 2007).

La diferenciación de las poblaciones de *P. greggii*, no solo radica en cambio en ellas, también en los organismos que suelen establecer simbiosis como los hongos ectomicorrízicos (Hoeksema et al., 2012). La simbiosis mutualista resultante de la interacción planta y hongo, es considerada una selección entre hospedero huésped debido al proceso coevolutivo entre ambos que propicia una afinidad entre ellos y, por lo tanto, la adquisición de beneficios nutrimentales y de establecimiento (Hoeksema et al., 2012). Sin embargo, el ambiente, la procedencia del hospedero y huésped podrían ser factores que modifiquen la asociación simbiótica, como se reportó en el estudio de Hoeksema et al. (2012) donde cinco poblaciones de *Pinus radiata* presentaban divergencia y también de sus comunidades micorrízicas.

En el caso de *P. greggii*, los estudios de sus comunidades micorrízicas se han restringido al desempeño de plantas de vivero tras ser inoculadas con hongos silvestres comestibles (Méndez-Neri et al., 2011; Martínez-Reyes et al., 2012; Salcido Ruiz et al., 2021), sin embargo, pocos son los estudios como el de Casique-Valdéz et al., 2018 donde se ha estimado la diversidad de hongos ectomicorrízicos en poblaciones naturales de *P. greggii* var. *greggii*, sin embargo, para *P. greggii* var. *australis* no existe información. Por ello en el presente estudio se estimó la diversidad y la diferenciación de las comunidades ectomicorrízicas en dos poblaciones de *P. greggii* var. *australis* distribuidas en condiciones edáficas y climáticas diferentes.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Evaluar el grado de co-adaptación local en las comunidades ectomicorrízicas asociadas a poblaciones de *Pinus greggii* var. *australis*

Objetivos específicos

- Evaluar la diversidad y el grado de diferenciación en las comunidades ectomicorrízicas asociadas en poblaciones naturales *P. greggii* var. *australis* originarias de ambientes contrastantes
- Evaluar la dinámica de colonización de raíces, diversidad y diferenciación de las comunidades ectomicorrízica presentes en combinaciones simpátricas y alopátricas
- Determinar si existe un efecto de la procedencia del hospedero y el huésped y su interacción sobre la diversidad y diferenciación en las poblaciones contrastantes bajo análisis.

Hipótesis

- La diversidad del consorcio ectomicorrízico es mayor en la población de *Pinus greggii* en el sitio con condiciones ambientales favorables.
- La colonización micorrizica y la diversidad del consorcio micorrízico aumentan con el desarrollo de las plantas en vivero.

- Las asociaciones cuyo hospedero y huésped poseen la misma procedencia, tendrán mayor diversidad que aquellas con diferente origen.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia y problemática de los bosques templados

Los bosques templados son el segundo ecosistema con mayor extensión en superficie del planeta, ya que ocupan 1.8 millones de hectáreas a nivel mundial (FAO, 2016). Dentro de su importancia radica el papel que desempeña en la mitigación de la erosión del suelo, la disminución de gran parte de las emisiones de CO₂ atmosférico y ser albergue de aproximadamente del 75% de la diversidad terrestre mundial (Granados-Sánchez et al., 2007). Así mismo, los bosques generan servicios ecosistémicos (FAO, 2016) con los cuales la sociedad se ve directamente beneficiada al obtener espacios recreativos y recursos como la madera y sus derivados (Granados-Sánchez et al., 2007; Zulueta-Rodríguez et al., 2015). Sin embargo, debido al cambio de uso de suelo y al incremento de la población humana, los ecosistemas forestales, han sido sometido a fuertes presiones (FAO, 2016; López-Gutiérrez et al., 2018) que han generado la pérdida del más del 50% de las masas forestales en los trópicos de América y África durante los últimos 25 años (López-Gutiérrez et al., 2018). Particularmente en México, durante el año 2005-2010, se perdieron al menos 75 000 hectáreas de bosque templado y tropical (López-Gutiérrez et al., 2018).

Uso de especies nativas para restauración de bosques: caso *Pinus greggii*.

Ante la reducción de los bosques, autores como López-Gutiérrez y colaboradores (2018), han propuesto implementar estrategias de restauración utilizando especies del género *Pinus*, debido al potencial de adaptación que posee a condiciones nativas por tener 49 especies en México, posicionando al país como el segundo centro de

diversificación a nivel mundial. El 55% de las especies registradas para nuestro país son endémicas, algunas de ellas se encuentran bajo protección y otras como *Pinus patula* Schlrldt & Cham, *Pinus montezumae* Lamb y *P. greggii* Engelm ex Parl. han sido utilizadas en programas de reforestación (López-Gutiérrez et al., 2018).

Pinus greggii Engelm. es una especie neotropical, nativa de mesoamérica, endémica de México (García-García, 2002, Hernández-Pérez et al., 2007; Rentería-Chávez et al., 2017) presente en bosques puros o mezclados donde generan un microambiente del cual son dependientes especies herbáceas y arbustivas (Hernández-Martínez et al., 2007; Martínez-Reyes et al., 2012). Su distribución natural está restringida a dos zonas con diferentes condiciones ambientales: región norte y centro-este de México (Parraguirre-Lezama et al., 2002). En la región norte, que comprende Coahuila y Nuevo León, se distribuye a 2100 a 2600 msnm en suelos neutros o ligeramente alcalinos, con una precipitación media anual de 650 mm (Parraguirre-Lezama et al., 2002), mientras que en la región centro-este (San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo, Veracruz y Puebla), crece entre los 1100 y 2400 msnm, en suelos ácidos y con una precipitación media anual de 800 a 1600 mm (Parraguirre-Lezama et al., 2002).

Debido al amplio rango de condiciones de establecimiento que posee, tiene la capacidad de adaptación en sitios con condiciones ambientales extremas, favoreciendo la recuperación de suelos degradados (García-García, 2002, Rentería-Chávez et al. 2017). La plasticidad de la especie ha permitido su cultivo fuera de su hábitat natural, siendo la cuarta especie más importante en el Programa Nacional de Reforestación (García-García et al., 2003) para su uso en plantaciones comerciales (García-García et al., 2003; Hernández-Martínez et al., 2007; Martínez-Reyes et al., 2012; Rentería-Chávez et al.,

2017) donde, por su rápido crecimiento (Rentería-Chávez et al., 2017), buen desarrollo y capacidad de adaptación en los primeros años de crecimiento (García-García et al., 2003) es utilizado para la obtención de combustible y postes para cerca (Hernández-Pérez et al., 2007; Martínez-Reyes et al., 2012; Rentería-Chávez, et al., 2017).

Diversidad y diferenciación genética de *Pinus greggii*

Pese a la importancia y al potencial de uso de la especie, las poblaciones naturales han sufrido grandes presiones ambientales y antropogénicas (Parraguirre-Lezama et al., 2002; Hernández-Martínez et al., 2007) que han provocado el aislamiento geográfico entre poblaciones, exponiéndolas a las diferentes condiciones edáficas y climáticas lo cual puede limitar el flujo génico y generar metapoblaciones, así como diferenciación genética en cada región (Parraguirre Lezama et al., 2002; Hernández-Martínez, 2007). Por lo tanto, surgen dos variedades: *greggii* (norte) y la *austalis* (sur) (Parraguirre Lezama et al., 2002). *P. greggi* Engelm. var *asutralis* Donahue & López es una especie con una erosión genética que limita la variabilidad debido a la deforestación, (Hernández-Martínez, 2007).

Coadaptación de especies forestales y consorcios micorrízicos

La diferenciación genética de una especie como *P. greggii*, no solo implica cambios en ella misma, si no en la relación que establece con organismos edáficos asociados como los hongos ectomicorrízicos (ECM). Los hongos ectomicorrízicos son organismos que se distribuyen ampliamente en bosques boreales, templados del hemisferio Norte y regiones mediterráneas, donde se relacionan con arbustos y árboles leñosos perennes (Smith y Read, 2008; Strullu-Derrien, 2018; Ángeles-Argaiz y Garibay-Origel, 2019 y Pérez-

Moreno *et al.* 2020). Además, son un componente ecofisiológico para el mantenimiento de los bosques, especialmente las especies de la familia Pinaceae, la cual es el grupo de plantas ectomicorrízicas más antiguo registrado (Martínez-Reyes *et al.* 2012, Ángeles-Argaiz y Garibay-Orijel, 2019).

Debido a la estrecha relación entre planta-hongo, la simbiosis ectomicorrízica es considerada una asociación mutualista obligada donde el huésped recibe carbohidratos resultantes de la fotosíntesis y un porcentaje es dirigido al sumidero de C en el suelo (Cairney, 2012). A su vez, el hospedero adquiere mayor área de absorción de agua y nutrientes (N y P), por el papel que desempeña el micelio externo de ampliar el área de alcance. Igualmente, se cree que los reguladores de crecimiento de las plantas, suministrado por hongos ECM influyen en el hinchamiento, extensión y la ramificación de las raíces (Brundrett, 2002). Así mismo, tiene mayor acceso a formas orgánicas recalcitrantes; incrementa su tolerancia a la sequía, aumenta su protección ante factores bióticos y compuestos potencialmente tóxicos (Cairney, 2000, Martínez-Reyes *et al.*, 2012, Strullu-Derrien, 2018, Pérez-Moreno *et al.* 2020 y Tomao *et al.* 2020).

Los beneficios mutualistas mencionados, son el resultado de la preferencia hereditaria de la planta por socios fúngicos ectomicorrízicos (Hoeksema, 2008 y Ning *et al.*, 2009) que surge de los procesos de selección coevolutiva (Hoeksema, 2010). La coevolución se define como los cambios evolutivos en las especies, conducidos por selección natural impuesta por las especies recíprocamente entre sí y es considerada, una potente fuerza para mantener y general diversidad biológica (Hoeksema, 2010). A su vez, el proceso coevolutivo genera una afinidad entre hospedero-huésped y puede desencadenar en co adaptación local y posteriormente a la especiación (Hoeksema, 2010). La compatibilidad

hospedero-huésped permite asegurar el establecimiento de las especies forestales, sin embargo, factores como el ambiente y la procedencia de ambos pueden incidir en el establecimiento de la simbiosis ectomicorrízica. Estudios como el de Hoeksema et al. 2012, se observó divergencia en cinco poblaciones de *Pinus radiata*, lo cual también se observó diferenciación en sus comunidades ectomicorrízicas, sin embargo, no se detectó adaptación.

Por ello, es necesaria la generación de conocimientos vinculados con la utilización de hongos ectomicorrízicos nativos, con plantas de interés forestal como *Pinus greggii*. Estudios como el de Mendez-Neri et al., 2011, Martínez-Reyes et al., 2012', Rentería-Chávez et al., 2018 y Salcido-Ruíz et al., 2021 han estudiado el desempeño de plantas de vivero inoculados con hongos ectomicorrízicos comestibles sin embargo existen pocos estudios como el de Casique-Valdéz et al., 2018 donde se estimó la diversidad y funcionalidad de las ectomicorrizas de dicha especie en poblaciones naturales.

**CAPÍTULO I: DIVERSIDAD Y COADAPTACIÓN DE COMUNIDADES
ECTOMICORRÍZICAS EN POBLACIONES CONTRASTANTES DE *Pinus greggii* var.
*australis***

1.1 RESUMEN

La compatibilidad entre hongos micorrizicos y árboles es consecuencia de procesos coevolutivos y una respuesta a presiones de selección. Con el propósito de evaluar la importancia de la coadaptación de asociaciones ectomicorrízicas (ECM) se estimó la diversidad y diferenciación de comunidades ectomicorrízicas en poblaciones naturales de *Pinus greggii* var. *australis* en dos ambientes contrastantes (Zacualpan y Cieneguilla), y en combinaciones recíprocas origen de semilla e inóculo nativo en vivero. Se encontraron 32 morfotipos ECM distintos en las poblaciones naturales, 23 en Zacualpan y 17 en Cieneguilla, con ocho en común. La diversidad de ECM fue mayor en Zacualpan (ambiente más favorable), con una fuerte diferenciación de la otra comunidad. Al inicio del bioensayo dominó el morfotipo *Tomentella* sp. y a los ocho meses *Rhizopogon* sp. La dinámica de colonización de raíces fue más rápida con el huésped u hospedero de Cieneguilla. Al inicio, la diversidad de ECM fue mayor en la asociación simpátrica, pero a los 12 meses después de la siembra, fue mayor en la alopátrica. La diversidad y la diferenciación de la comunidad ECM se redujo con la edad de las plantas, lo que indica un efecto del ambiente en la homogeneización de la composición de comunidades ECM.

Palabras clave: hongos ectomicorrízicos, coevolución, simpatría, alopatría

1.2 ABSTRACT

The compatibility between mycorrhizal fungi and trees is a consequence of coevolutionary processes and a response to selection pressures. In order to evaluate the importance of the co-adaptation of ectomycorrhizal associations (ECM), the diversity and differentiation of ectomycorrhizal communities in natural populations of *Pinus greggii* were recorded and analyzed in natural populations of *Pinus greggii* var. *australis* in 2 contrasting environments (Zacualpan and Cieneguilla), and in reciprocal combinations of seed origin/native inoculum provenance in greenhouse. Thirty-two different ECM morphotypes were found in the natural populations, 23 in Zacualpan and 17 in Cieneguilla with eight in common. ECM diversity was higher in Zacualpan (the most favorable environment), with a strong differentiation from the other community. The dominant morphotypes were *Tomentella* sp. at the beginning of the bioassay, and *Rhizopogon* sp. eight months after sowing, respectively. Root colonization dynamics was faster with the Cieneguilla provenance host. At the beginning, ECM diversity was higher in the sympatric association, however at 12 months after sowing the allopatric association was higher. However, the diversity and differentiation of the ECM community decreased with the age of the trees, indicating an effect of the environment in homogenizing the composition of the ECM community structure.

Key words: ectomycorrhizal fungi, coevolution, sympatry, allopatry

1.3 INTRODUCCIÓN

La simbiosis micorrízica es una de las interacciones mutualistas más importantes en las comunidades naturales (Pérez-Moreno et al., 2020), resultado de la asociación entre especies de hongos y las raíces de plantas superiores, crucial en el funcionamiento de los árboles (Pérez-Moreno y Read, 2004; Quintero-Corrales et al., 2020). Algunas de las especies que participan en estas asociaciones son de tipo generalista y otras de una alta especificidad entre árbol y hongo, lo que es resultado de procesos de coevolución y coadaptación huésped-hospedero resultado de la selección natural en respuesta a ambientales particulares (Ángeles-Argáiz y Garibay-Orijel, 2019; Hoeksema et al., 2009, 2012). La selección natural direccional impuesta en uno de los organismos involucrados en la asociación ocasiona cambios o ajustes en el otro organismo para optimizar los beneficios de la asociación mutualista en el ambiente en que han coexistido, diferenciándose de asociaciones similares las cuales han evolucionado en otras condiciones (Hoeksema, 2010).

La diferenciación de los organismos involucrados en las asociaciones micorrízicas generalmente se manifiesta en forma de adaptación local, la cual ocurre cuando la aptitud media de una población es mayor en su hábitat nativo comparado con su desempeño en uno distinto (Gandon y Michalakis, 2002; Hereford, 2009; Rúa et al., 2018). Por ello, es posible que el hospedero y el huésped con el mismo origen (simpatria) tengan mayor probabilidad de éxito durante el proceso de asociación que aquellos con diferente procedencia (alopatria) (Hoeksema et al., 2013; Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019). La comparación del desempeño de asociaciones simbióticas simpátricas vs. alopátricas permite evaluar el proceso de coadaptación de especies y detectar posibles efectos de

adaptación local en ellas, aunque no siempre es posible observarla (Hereford, 2009). Por ejemplo, en *Pinus radiata* D. Don (Hoeksema et al., 2012) y *P. sylvestris* L. (Downie et al., 2020) se observó una diferenciación en las comunidades micorrízicas de poblaciones naturales, pero no se detectó la presencia de adaptación local en ellas.

El estudio de los procesos de coevolución y coadaptación local es relevante para entender y anticipar posibles cambios en la dinámica y funcionamiento de la asociación por efecto de otros factores, como el cambio climático que existe actualmente (Hoeksema et al., 2012; Tedersoo et al., 2020). El calentamiento global y la fluctuación climática inciden en el hábitat de las especies leñosas y en las comunidades fúngicas asociadas a ellas, lo cual puede alterar de diferentes maneras el funcionamiento y estructura de las comunidades ECM (Ding et al., 2011) por los cambios en temperatura y humedad del suelo, contenido de materia orgánica, concentración de N y P o disponibilidad de agua (Bennett y Classen, 2020; Ding et al., 2011; Tedersoo et al., 2020).

Pinus greggii Engelm. ex Parl. es una especie endémica de México que ha mostrado una fuerte diferenciación genética entre sus poblaciones naturales (López-Upton y Donahue, 1995) con un amplio potencial para adaptarse a condiciones limitantes de humedad (Hernández-Martínez et al., 2007; López-Upton et al., 2004; Parraguirre-Lezama et al., 2002) como resultado de la interacción de diferentes fuerzas evolutivas (Parraguirre-Lezama et al., 2002). Es posible que esta diferenciación genética entre las poblaciones haya ocasionado también, a través de procesos de coadaptación, una diferenciación en las comunidades ectomicorrízicas asociadas a ellas (e.gr., Casique-Valdés et al., 2018 en *P. greggii* var. *greggii*). Sin embargo, la mayoría de los estudios con asociaciones ectomicorrízicas en *P. greggii* (Casique-Valdés et al., 2018; Martínez-Reyes et al., 2012;

Méndez-Neri et al., 2011; Salcido Ruiz et al., 2021) se han enfocado a evaluar los efectos en la planta hospedera o fitobionte, sin considerar el origen de la semilla ni la relación con la comunidad ectomicorrízica y el posible efecto de coadaptación entre ambas. De las dos variedades conocidas de este pino, *P. greggii* Engelm. ex Parl. var. *australis* Donahue & López es la más utilizada en México. Esta variedad crece en ambientes muy contrastante de humedad, temperatura y condiciones edáficas por lo que se han determinado amplias diferencias de crecimiento entre sus procedencias (Hernández-Martínez et al., 2007; López-Upton et al., 2004), por lo que igualmente podrían esperarse diferencias en sus asociaciones ectomicorrízicas.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

1.4.1 Poblaciones naturales muestreadas

Se seleccionaron dos poblaciones naturales de *Pinus greggii* var. *australis* localizadas en condiciones ambientales contrastantes de humedad y altitud (Cuadro 1). La población de Zacualpan, en el estado de Veracruz se encuentra en un sitio de menor altitud y con una mayor precipitación media anual que la población de Cieneguilla, en el estado de Hidalgo.

Cuadro 1. Localización y principales condiciones ambientales de las dos poblaciones de *Pinus greggii* var. *australis* muestreadas.

Localidad	Lat. (N)	Long. (O)	Altitud (m)	TMA ¹ (°C)	PTA ¹ (mm)	Condiciones del suelo					
						Tipo	Ph	N (%)	P (ppm)	K (ppm)	Fe (ppm)
Zacualpan, Ver.	20° 26'	98° 20'	160	12.6	1401.9	Gleys	5.9	0.25	2.8	235	134
Cieneguilla, Hgo.	20° 44'	99° 02'	200	13.4	538.6	Luviss	6.8	0.26	7.02	172	42.6

¹TMA: Temperatura media anual; PTA: Precipitación total anual promedio.

En cada localidad se establecieron cinco sitios de muestreo. El primer sitio se estableció de manera aleatoria en un punto cercano al centro geográfico de la población, con base en el mapa de distribución geográfica conocida de la especie. En ese sitio se identificó el árbol adulto de *P. greggii* más cercano. A partir de ese punto se ubicaron los otros cuatro sitios de muestreo a una distancia de 20 m, en cada una de las direcciones cardinales (N, S, E y O). En cada punto se eligió el árbol adulto más cercano (Figura 1).

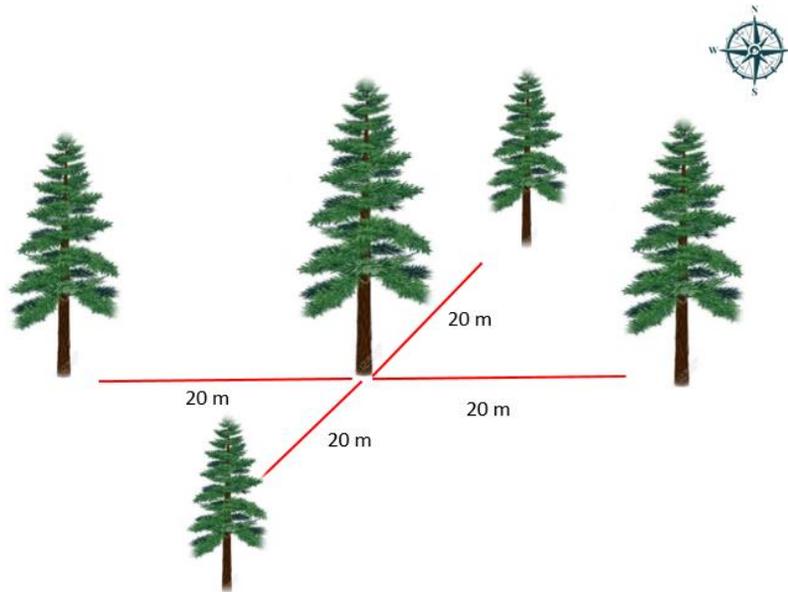


Figura 1. Representación gráfica del método de selección de árboles adultos de *Pinus greggii* var. *australis* en Zacualpan, Veracruz. y Cieneguilla, Hgo. Elaboración propia.

1.4.2 Obtención de muestras de suelo.

En el árbol elegido de cada sitio de muestreo se tomaron cuatro muestras de suelo, una en cada punto cardinal (N, S, E y O), a una distancia de 2 m del tronco, con un total de 20 muestras por localidad (Figura 2a). Las muestras de suelo se recolectaron en la zona de la rizosfera, en los primeros 20 cm del suelo mineral, con ayuda de una barrena de metal de 20 cm de largo x 5 cm de diámetro (Figura 2b) y una pala (Reverchon et al., 2012). En los mismos puntos de muestreo se tomó con una pala 1.5 kg de suelo adicional por árbol para ser utilizado como fuente de inóculo ectomicorrízico para el bioensayo. Las muestras debidamente etiquetadas fueron almacenadas herméticamente en un cuarto frío (2-4 °C) hasta su utilización para un análisis de morfotipos micorrízicos y como inóculo en el bioensayo.

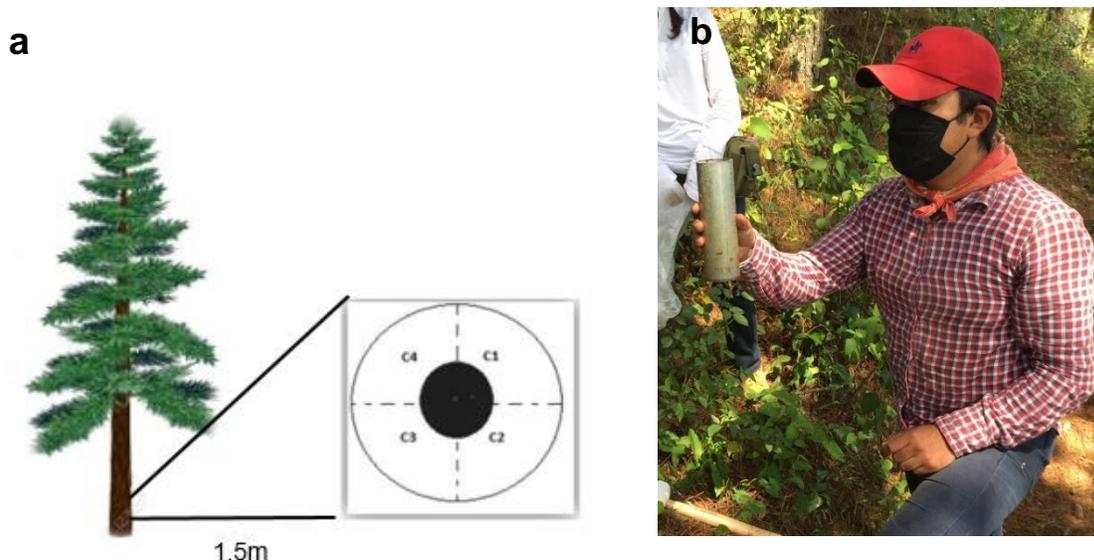


Figura 2. a) Representación gráfica de la técnica de recolección de muestras de suelo en bosques de *Pinus greggii* var. *australis* localizados en Zacualpan, Ver. y Cieneguilla, Hgo. Elaboración propia. b) Fotografía de la barrena metálica utilizada para la obtención de muestras.

1.4.3 Establecimiento del bioensayo

Se estableció un bioensayo de inoculación cruzada en el vivero del Posgrado en Ciencias Forestales del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Estado de México, en octubre 2020. Se utilizó un arreglo factorial 2^3 (ocho tratamientos) en un diseño experimental de parcelas divididas en bloques completos al azar con 5 repeticiones y unidades experimentales (parcelas) de 12 plantas (Figura 3). Los factores de estudio fueron a) “Presencia de inóculo micorrízico”, con dos niveles (con y sin inóculo); b) “Fuente de inóculo”, con dos niveles (Zacualpan y Cieneguilla); y c) “Origen de semilla”, con dos niveles (Zacualpan, y Cieneguilla). El sustrato utilizado en el bioensayo fue una mezcla de arena y corteza compostada en proporción 1:1 en volumen; dicho sustrato se esterilizó con vapor. A este sustrato se le agregó como fuente de inóculo 250 mL de suelo recolectado de cada localidad, de acuerdo con el tratamiento correspondiente, por cada L de sustrato.



Figura 3. Distribución de las parcelas y repeticiones de los tratamientos de Zacualpan y Cieneguilla.

A lo largo del estudio, el término “origen del inóculo nativo” se refirió a la combinación del sustrato con la fuente de inóculo, mientras que “comunidad ECM” y “semilla” utilizó para diferenciar al huésped del hospedero, respectivamente. En el ambiente “con inóculo nativo” se utilizó la combinación del sustrato esterilizado con el suelo natural recolectado después de pasarlo por un tamiz de 1cm^2 , mientras que en el ambiente “sin inóculo” (utilizado como control o referencia para separar el efecto microbiológico del efecto del suelo mineral) se agregó la misma cantidad de sustrato después de ser doblemente esterilizarlo con vapor ($125\text{ }^\circ\text{C}$) durante 6 horas con un periodo de reposo de 48 horas entre ambos. Para evitar la posible contaminación del sustrato con las fuentes de inóculo durante el bioensayo, los cuatro “ambientes” generados por la combinación de los factores “origen del inóculo nativo” y “origen de la semilla” se aislaron por distancia y con

una barrera física. Dentro de cada “ambiente” se ubicaron los dos niveles de “origen de semilla” con las cinco repeticiones asignadas al azar en cada uno de los cinco bloques (Figura 4).

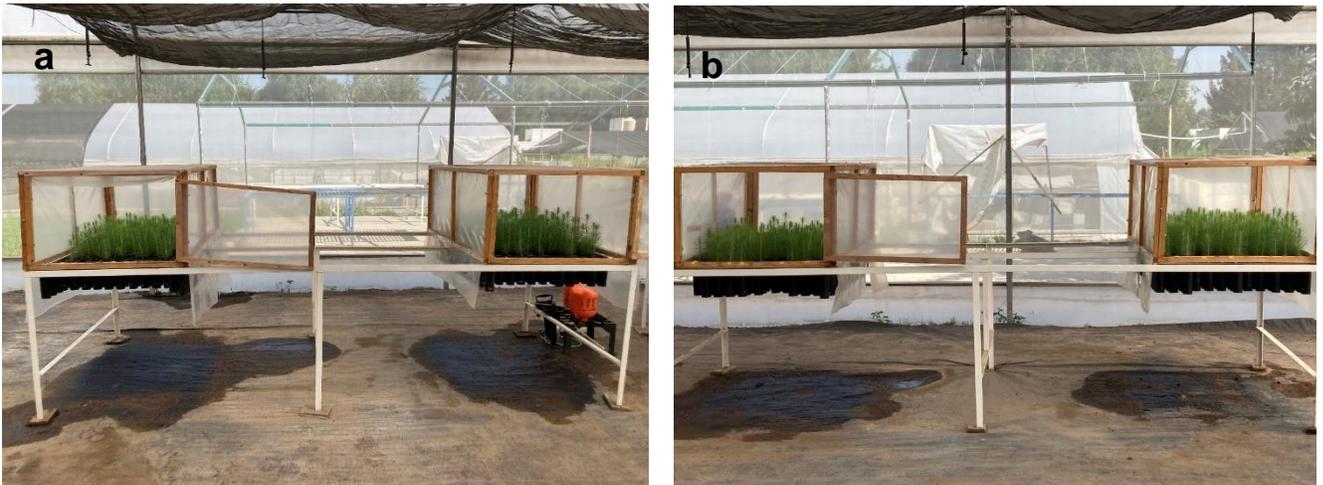


Figura 4. Establecimiento y distribución de los cuatro ambientes en el invernadero localizado en el vivero del Postgrado Forestal. a) Ambientes con inóculo de Zacualpan y b) Cieneguilla. Los ambientes de la izquierda, en ambas fotografías, contienen a las plantas.

En el bioensayo se utilizaron contenedores individuales de plástico de 310 cm³ de capacidad, colocados en rejillas sobre una mesa en el invernadero. Después de colocar el sustrato con su nivel de inóculo, se sembraron de tres a cuatro semillas por envase de la fuente de semilla correspondiente. La semilla utilizada fue obtenida de lotes masales recolectados en años previos en cada localidad, existentes en el banco de germoplasma del Postgrado en Ciencias Forestales.

1.4.4 Evaluación de la comunidad micorrízica en poblaciones naturales y bioensayo

Las muestras de suelo recolectadas de las poblaciones naturales se remojaron durante 24 h para disminuir los agregados, facilitar el tamizado (con una malla de 0.85 mm) y efectuar una recuperación eficiente de las raíces cortas. Las raíces se colocaron en cajas Petri con agua destilada y se observaron bajo microscopio estereoscópico para identificar la presencia de puntas micorrizadas en el sistema radical. Las puntas micorrizadas fueron recolectadas y almacenadas en tubos Eppendorf con una solución alcohol- agua en proporción 1:1 para su conservación.

En el bioensayo se realizaron muestreos de raíces a los 4, 6, 8 y 12 meses a partir de la siembra. En cada ocasión se tomaron al azar tres plantas por unidad experimental (15 por tratamiento). En cada planta se extrajo el sistema radical del contenedor, se enjuagó para separar las partículas del sustrato adheridas y se colocó extendido en un acetato. Las muestras se cubrieron con una toalla de papel húmeda y se almacenaron en una hielera en el cuarto frío. Posteriormente se fotografiaron con una cámara digital Iphone SE a una resolución 326ppi y se incluyó una escala de referencia (Figura 5). Una vez obtenida la foto, las muestras se volvieron a almacenar en el cuarto frío, en un recipiente hermético de plástico, con una toalla de papel húmeda en el interior, con la finalidad de conservar las raíces hasta su procesamiento.



Figura 5. Procesamiento del sistema radical para la observación, recolección y caracterización de puntas micorrizadas.

Las raíces fueron analizadas con un microscopio estereoscópico Leika MZ6 para identificar y separar las raíces colonizadas (rc) por hongos ectomicorrízicos de las no colonizadas (Figura 6a). Las puntas micorrizadas se cuantificaron, se separaron de la raíz y se almacenaron en tubos Eppendorf para su caracterización. Por otro lado, las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software Image-J para cuantificar el número total de raíces cortas (trc). Con estos datos se calculó el porcentaje de raíces colonizadas utilizando la fórmula $rc (\%) = (rc/trc) \times 100$ (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019).

Las puntas de raíces micorrizadas (obtenidas de las muestras en las poblaciones naturales y en el bioensayo) se observaron en un microscopio estereoscópico (20X). Los morfotipos se clasificaron con base en características diagnósticas evaluadas de manera

macroscópica y microscópica. En las primeras se incluyó color; ramificación; estructura externa adicional; presencia/ausencia, color y textura de micelio externo y partículas minerales. Los caracteres microscópicos incluyeron el tipo de hifa (evaluada a través de la extracción y montaje de micelio), la penetración de la Red de Hartig en las células del córtex (en cortes transversales) y la morfología del manto (en cortes longitudinales). Dicha caracterización morfoanatómica de morfotipos se basó en los criterios propuestos en la base de datos “Determination of Ectomicorrhizae” (DEEMY) (www.deemy.de). (Figura 6b).



Figura 6.a) Proceso de limpieza de las raíces cortas y b) caracterización de las puntas micorrizadas de las plantas del bioensayo a partir de las guías de Agerer (1994).

1.4.5 Estimación de la diversidad y diferenciación de la comunidad ectomicorrízica

Con base en el número de morfotipos encontrados por sitio de muestreo en cada localidad se elaboró una curva de rarefacción para conocer si el esfuerzo de muestreo fue suficiente para obtener una estimación de la riqueza, estable y comparable entre localidades. Los índices de diversidad y abundancia se estimaron a partir del conteo de los morfotipos en las muestras obtenidas de las poblaciones naturales y en cada una de las edades de muestreo en las plantas del bioensayo. Se determinó la diversidad α con base en el índice de diversidad de Shannon y el grado de diferenciación utilizando el índice de similitud de Bray-Curtis con el software PAST. Se interpretó el grado de diferenciación entre las comunidades a partir de los valores de similitud; valores cercanos a cero indican mayor diferenciación, mientras aquellos cercanos a uno revelan menor diferenciación.

1.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El porcentaje de plantas micorrizadas (pm) y de raíces colonizadas (rc) por planta en las diferentes edades de muestreo en el bioensayo se analizaron estadísticamente para evaluar el efecto de los factores en estudio y su interacción en la dinámica de micorrización de las plantas. En el análisis no se incluyeron las plantas del tratamiento “sin inóculo” debido a que en dicho tratamiento no se encontró una micorrización significativa (menos de 0.2 % de plantas micorrizadas y 0.03 % de raíces colonizadas) y solo se utilizó como “control” o medio de verificación para corroborar el funcionamiento de la inoculación. En el análisis de varianza se utilizó un modelo de medidas repetidas con el procedimiento MIXED en SAS para la variable transformada con la función ARSIN. En los casos en que se encontró un efecto significativo de un factor, se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey con un valor de $p=0.05$. Para determinar diferencias significativas en el índice de diversidad α se utilizó la prueba de t de Hutcheson.

1.6 RESULTADOS

1.6.1 Diversidad y diferenciación de la comunidad ECM en localidades naturales.

Las curvas de rarefacción (Figura 7) se comportaron de manera asintótica en las dos localidades, con una trayectoria más elevada en Zacualpan, pero con un fuerte traslape en sus intervalos de confianza. En total se identificaron 32 morfotipos de hongos ectomicorrízicos en ambas poblaciones naturales de *P. greggii* (Figura 8a, 8b y Anexo A). En Zacualpan se encontraron 23 morfotipos diferentes, mientras que en Cieneguilla fueron 17.

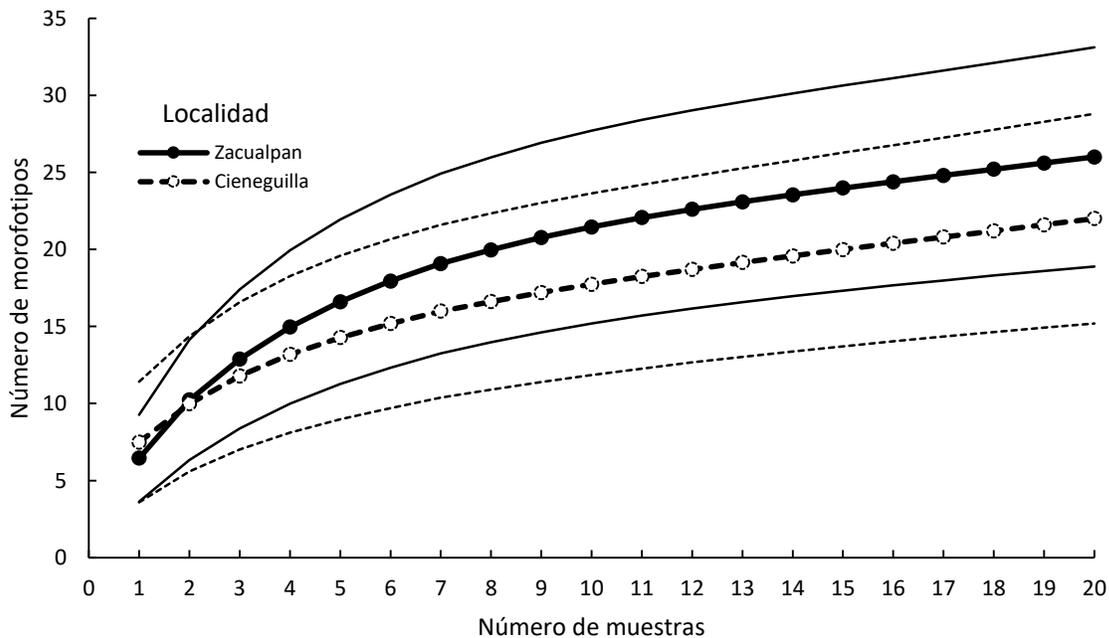


Figura 7. Curvas de rarefacción de los morfotipos recolectados en las poblaciones naturales de *Pinus greggii* var. *australis* de Zacualpan, Ver. y Cieneguilla Hgo., con intervalos de confianza del 95%.



Figura 8a. Morfotipos encontrados en las dos poblaciones naturales de *Pinus greggii* var. *australis* en Zacualpan Ver. y Cieneguilla, Hgo.



Figura 8b. Continuación de los morfotipos encontrados en las dos poblaciones naturales de *Pinus greggii* var. *australis* en Zacualpan Ver. Y Cieneguilla, Hgo.

La comunidad ECM presentó mayor diversidad en la población de Zacualpan que en Cieneguilla, con valores del índice de Shannon de 2.82 ± 0.01 y 1.71 ± 0.01 , respectivamente. Ambas localidades compartieron ocho morfotipos (25%), por lo que Zacualpan posee 15 morfotipos (46.9%) exclusivos y Cieneguilla 9 (28.1%). De acuerdo con lo anterior, el índice de similitud entre las poblaciones, estimado por el índice de Bray-Curtis fue de 0.16, lo cual indica un amplio grado de diferenciación entre las comunidades ECM de las dos poblaciones.

Los morfotipos encontrados mostraron diferencias en la presencia de estructuras como micelio externo, rizomorfos y cordones miceliares (Anexo A), así como en el tipo de manto (Anexo B) y el tipo de hifas (Anexo C). El morfotipo con mayor abundancia relativa fue *Tomentella* sp. (M1), presente en más de 30% de las puntas de raíz micorizadas, especialmente en la localidad de Cieneguilla (Figura 9) y los de menor abundancia fueron *Wilcoxina* sp. (M31) y *Cenococcum geophilum* Fr. (M32), presentes en el 0.2% de las raíces muestreadas, de manera exclusiva en la localidad de Cieneguilla (Figura 9).

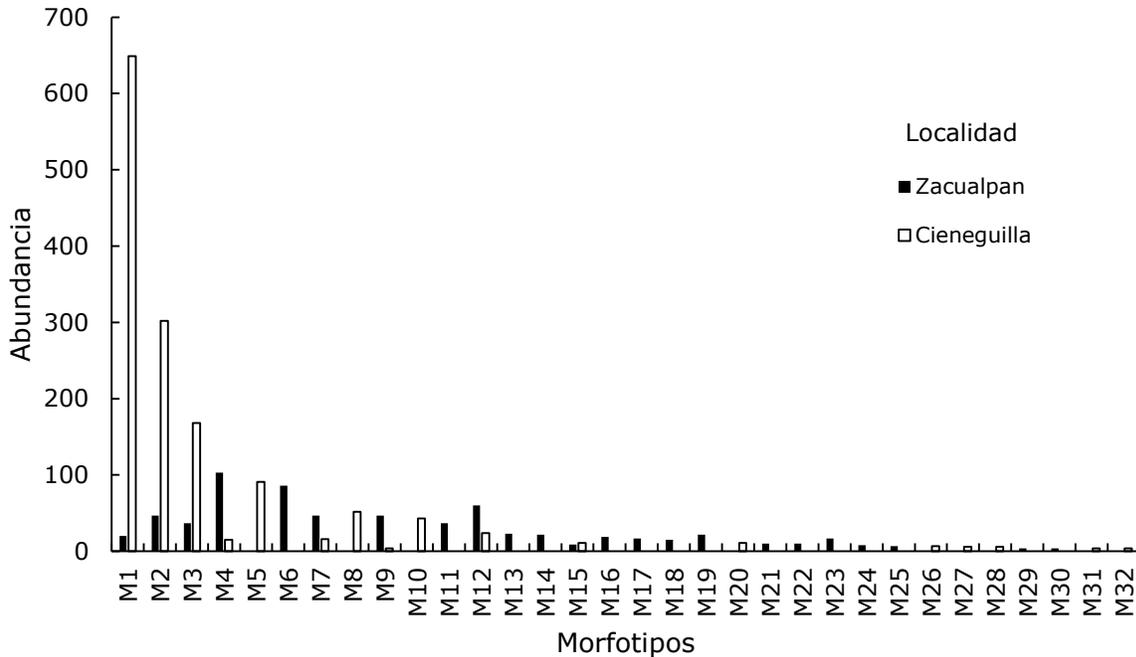


Figura 9. Abundancia de los morfotipos ectomicorrízicos (M) identificados en poblaciones naturales de *Pinus greggii* var. *australis* de Zacualpan, Ver. y Cieneguilla, Hgo.

1.6.2 Dinámica de micorrización y colonización de raíces en vivero

El porcentaje de plantas micorrizadas (pm) fue afectado ($p \leq 0.05$) por el origen de la semilla y de la comunidad ECM, pero no existió interacción significativa entre los dos factores. La edad de la planta también afectó el porcentaje de micorrización (Cuadro 2). Durante los primeros ocho meses, las plantas en con el inóculo nativo de Cieneguilla, mostraron un mayor porcentaje de micorrización que las plantas con inóculo nativo de Zacualpan, aunque a los 12 meses de edad las plantas inoculadas con los dos bancos de inóculo de diferentes procedencias alcanzaron 100 % de plantas micorrizadas (Figura 10a). Así mismo, las plantas de Cieneguilla presentaron mayor porcentaje de micorrización que las de Zacualpan hasta los ocho meses de edad, pero a los 12 meses se igualaron con 100% de plantas micorrizadas (Figura 10b).

Cuadro 2. Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto de la comunidad ECM, la procedencia de la semilla y la edad de la planta en el porcentaje de plantas micorrizadas (pm) y raíces colonizadas (rc) de *Pinus greggii* var. *australis* en el bioensayo

Factor	GL Num	GL Den	Pr>F	
			pm	rc
Comunidad ECM (ECM)	1	16	0.0002	0.2171
Población semilla (Semilla)	1	16	0.0189	0.1044
ECM x Semilla	1	16	0.8347	0.8284
Edad planta	3	48	<0.0001	<0.0001
Edad x ECM	3	48	0.0020	<0.0001
Edad x Semilla	3	48	0.2973	0.4051
Edad x ECM x Semilla	3	48	0.1957	0.3350

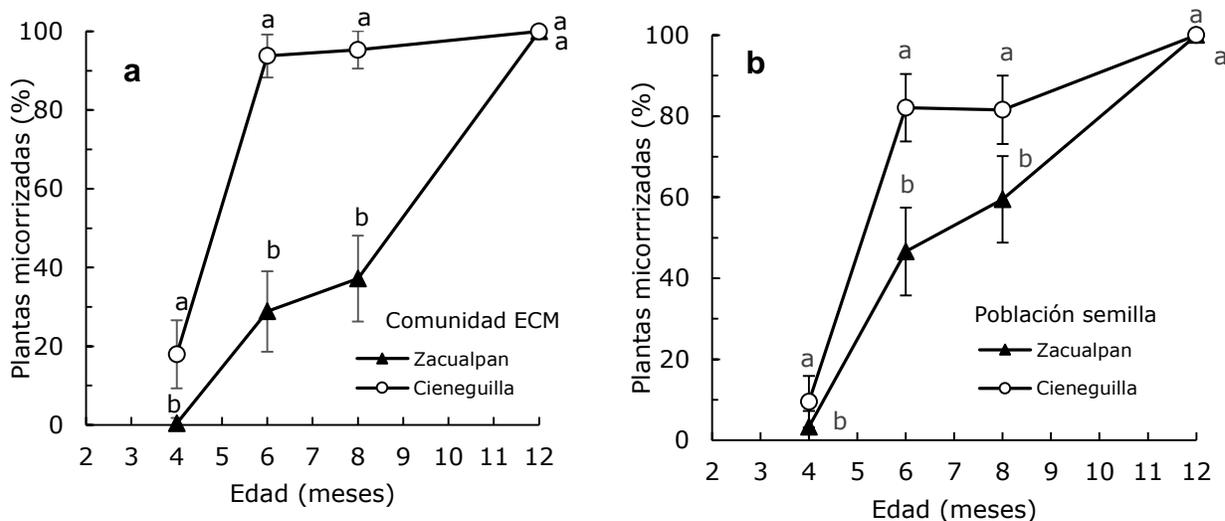


Figura 10. Dinámica del porcentaje de plantas ectomicorrizadas (ECM) de *Pinus greggii* var. *australis* a diferentes edades por el efecto de (a) origen de la comunidad ECM y b) la procedencia de la semilla.

Por otro lado, se encontró un efecto significativo ($p \leq 0.05$) de la edad de la planta y de la interacción entre la comunidad ECM y la edad en el porcentaje de raíces colonizadas

(Cuadro 2), lo cual implica que la comunidad ECM afectó la dinámica de colonización de las raíces durante el periodo de estudio. Sin embargo, no se encontró un efecto significativo de la interacción comunidad ECM x procedencia de semilla. La comunidad ECM de Cieneguilla presentó una mayor velocidad de colonización de raíces que la de Zacualpan en los primeros ocho meses; sin embargo, a los 12 meses la ECM de Zacualpan superó a la de Cieneguilla, con valores de 61.8% y 41.8% de raíces colonizadas, respectivamente (Figura 11).

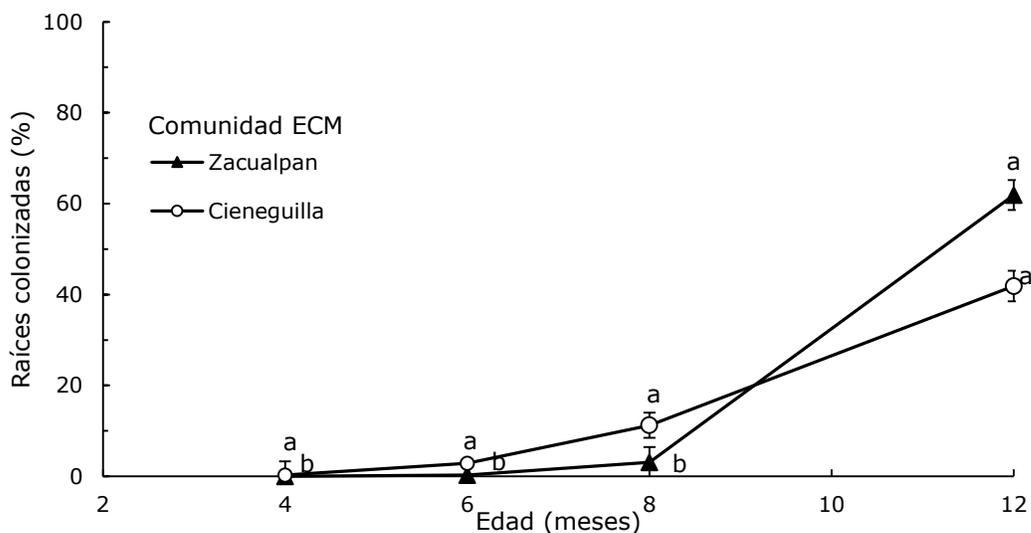


Figura 11. Porcentaje de raíces colonizadas en plantas de *Pinus greggii* var. *australis* de diferentes edades crecidas en inóculos ECM con comunidades alopátricas o simpátricas recolectados en dos poblaciones naturales

1.6.3 Diversidad y diferenciación de morfotipos en plantas de vivero.

En las plantas del bioensayo se identificaron en total ocho morfotipos distintos, cuatro de los cuales (M1, M22, M24 y M32) estaban presentes en las comunidades ECM de las poblaciones naturales de *P. greggii* var. *australis*, mientras los cuatro restantes fueron categorizados como nuevos con los códigos M33-M36 (Figura 12, Anexo A); el morfotipo M33 se identificó como *Rhizopogon* sp.

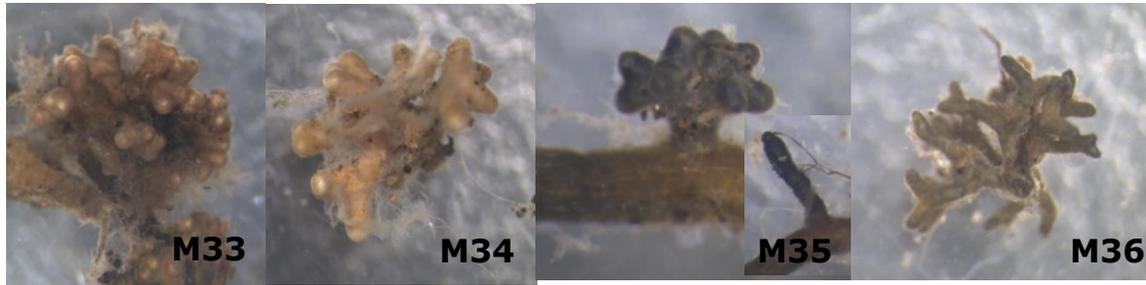


Figura 12. Morfotipos encontrados en las plantas del bioensayo de *P. greggii* var. *australis* en diferentes edades de las plantas y localizadas tanto en asociaciones simpátricas como alopátricas

La presencia y abundancia de los morfotipos varió con la edad de la planta. A los cuatro y seis meses predominaron los morfotipos M32 (*Cenococcum geophilum*) y M22 en todas las combinaciones comunidad ECM-origen de la semilla, pero a partir de los ocho meses fue más abundante el morfotipo M33 (*Rhizopogon* sp.) (Figura 13). El morfotipo M1 fue más abundante en las plantas procedentes de Cieneguilla, mientras que M22 fue más común en las de Zacualpan, especialmente cuando se utilizó el inóculo nativo de Cieneguilla. Los morfotipos restantes (M24, M32, M34, M35 y M36) tuvieron una frecuencia baja en todas las combinaciones inóculo nativo – origen de la semilla a partir de los 6 meses.

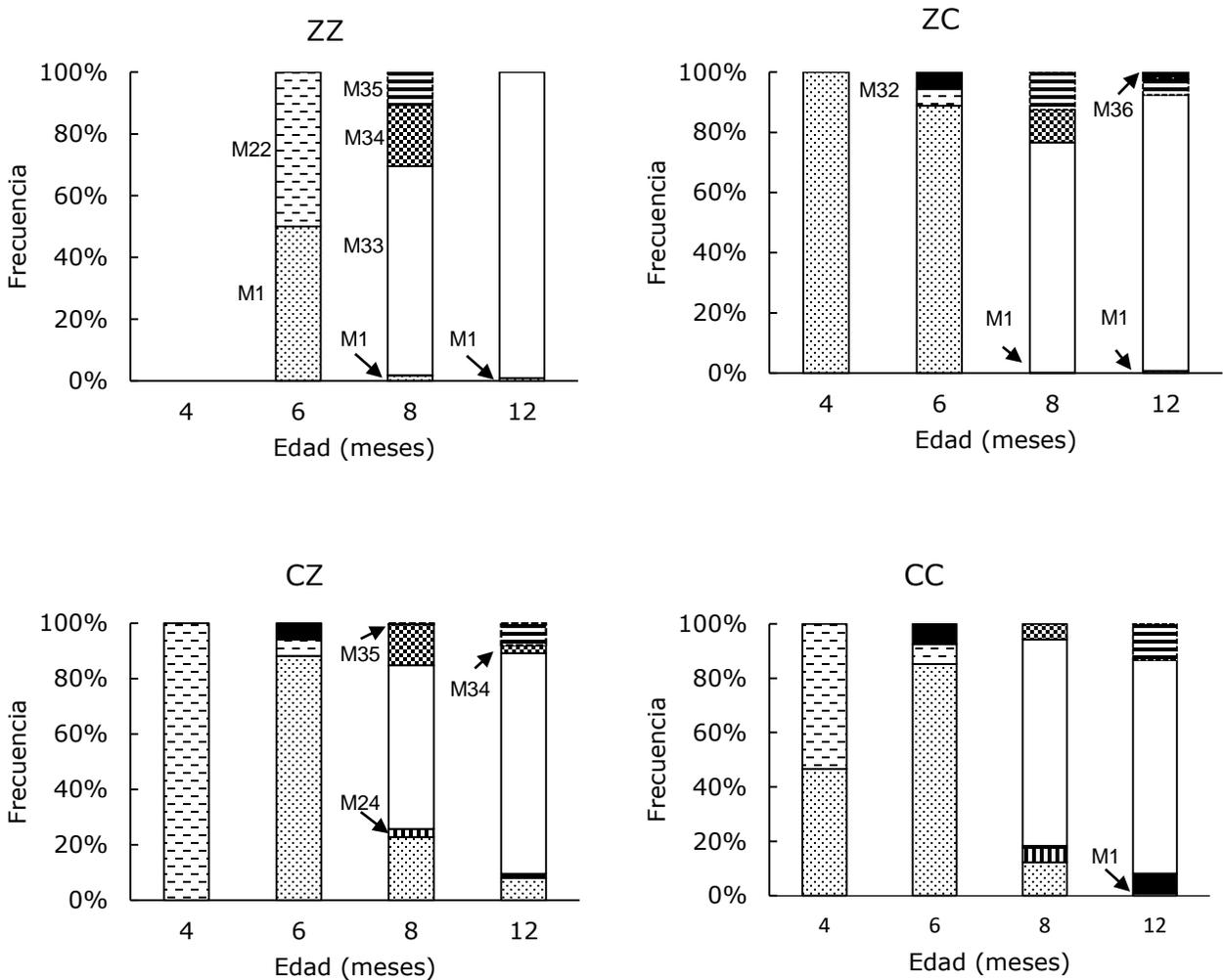


Figura 13. Dinámica de aparición de los morfotipos ECM en plantas del bioensayo de *Pinus greggii* var. *australis* en asociaciones origen del inóculo nativo y de la semilla, simpátricas (ZZ y CC) y alopátricas (ZC y CZ), Z: Zacualpan; C: Cieneguilla.

Debido a los cambios en la abundancia de morfotipos en las raíces colonizadas, la diversidad α se redujo con la edad en todas las combinaciones comunidad ECM-origen de la semilla, de 0.83 a los ocho meses a 0.50 a los 12 meses (Cuadro 3). El efecto del origen de la comunidad ECM y de la semilla fue más notorio a los 12 meses, con mayor índice de diversidad asociado a la comunidad ECM de Cieneguilla (0.75 ± 0.01) que de Zacualpan (0.23 ± 0.01), al igual que en el caso del origen de la semilla (0.56 ± 0.01 vs

0.46 ±0.01). También se encontró un efecto significativo de la interacción origen de la comunidad ECM y de la semilla sustrato-semilla en la diversidad de morfotipos en las raíces colonizadas, con una mayor diversidad en la asociación simpátrica que en la alopátrica a los ocho meses (0.92 ±0.01 vs 0.72 ±0.02), pero a la inversa a los 12 meses (0.44 ±0.01 vs 0.59 ±0.01) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Índice de diversidad de Shannon de los morfotipos encontrados en las raíces colonizadas a los ocho y 12 meses de edad en plantas de *Pinus greggii* var. *australis* (bioensayo en vivero) en relación con el origen del inóculo nativo del sustrato

Edad (meses)	Comunidad ECM		Origen semilla		Tipo de asociación	
	Z	C	Z	C	Simpátrica	Alopátrica
8	0.82±0.01a	0.80±0.01a	0.88±0.02a	0.88±0.01a	0.92±0.01a	0.72±0.02b
12	0.23±0.01b	0.75±0.01a	0.46±0.01b	0.56±0.01a	0.44±0.01b	0.59±0.01a

La diferenciación de las comunidades ECM en las raíces colonizadas también se redujo con la edad de la planta (Cuadro 4). En relación con el origen de la comunidad ECM, el índice de similitud aumentó de 0.69 a los ocho meses a 0.83 a los 12 meses y en relación con el origen de la semilla, de 0.50 a 0.91. Algo similar ocurrió al comparar las asociaciones simpátricas y alopátricas, en donde el índice de similitud aumentó de 0.49 a 0.94 entre los ocho y 12 meses de edad de las plantas.

Cuadro 4. Índices de similitud de Bray-Curtis de la comunidad ECM estimados entre los orígenes de ECM, origen de semilla y tipo de asociación (simpátrica y alopátrica) a los ocho y 12 meses de edad en las plantas de *Pinus greggii* var. *australis* del bioensayo

Edad (meses)	Índice de similitud		
	Origen ECM	Origen semilla	Tipo de asociación
	Z vs. C	Z vs. C	Sim vs. Alo
8	0.69	0.50	0.49
12	0.83	0.91	0.94

1.7 DISCUSIÓN

1.7.1 Diversidad y diferenciación de la comunidad ECM en poblaciones naturales.

El comportamiento asintótico de las curvas de rarefacción y el traslape de sus intervalos de confianza indican que el esfuerzo de muestreo fue suficiente (Ding et al., 2011; Huang et al., 2012) en las dos poblaciones y que no existen diferencias significativas entre las localidades (Reverchon et al., 2012) en el número estimado de morfotipos. El número de morfotipos y los índices de diversidad encontrados en estas poblaciones naturales de *Pinus greggii* son diferentes a los registrados en poblaciones naturales de otras especies de *Pinus*, como *P. patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. (Baeza-Guzmán et al., 2021), *P. montezumae* Lamb. (Reverchon et al., 2012) y *P. mugo* Antonio Turra (Huang et al., 2012) lo cual reafirma la importancia del factor “ambiente” en la expresión génica y aptitud de los morfotipos (Craig et al., 2016; Hoeksema et al., 2012; Rúa et al., 2018).

Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el índice de diversidad de la comunidad ECM en las dos poblaciones naturales, con una mayor diversidad en la población de Zacualpan; además, se encontró un elevado grado de diferenciación entre ellas, con 75% de morfotipos exclusivos a una u otra población, resultado posiblemente de la divergencia ambiental y aislamiento geográfico de estas poblaciones de *Pinus greggii* var. *australis*, como se ha demostrado en *P. radiata* y otras especies de coníferas (Hoeksema et al., 2012).

Las diferencias climáticas como precipitación y temperatura (Craig et al., 2016; Ishida et al., 2007; Rosinger et al., 2018), tipo y estado nutrimental de suelo (Ishida, et al., 2007),

pH (Goldmann et al., 2015), humedad (Rosinger et al., 2018), relación C/N (Goldmann et al., 2015), calidad y profundidad de hojarasca (Ishida et al., 2007, Craig et al., 2016) y los niveles de luz ambiental (Craig et al., 2016) pueden influir en la diversidad y diferenciación de la estructura de comunidades ECM de las poblaciones de *P. greggii*, de manera similar a lo ocurrido en otras especies (Hoeksema et al., 2012, Rosinger et al., 2018). Al parecer, las condiciones ambientales más favorables en la localidad de Zacualpan conllevan a una mayor diversidad de morfotipos (Castaño et al., 2018), lo cual confiere ventaja en bosques maduros, donde existen condiciones competitivas (Ishida et al., 2007). Por otro lado, la menor diversidad de morfotipos en un sitio como Cieneguilla, con condiciones ambientales más restrictivas, especialmente en términos de humedad, temperatura y calidad del suelo, pudiera estar reflejando condiciones de estrés y una mayor presión de selección en la comunidad ECM, que conduce a la predominancia de un menor número de morfotipos.

Los diferentes factores y presiones de selección en las dos localidades también ayudan a explicar la diferenciación encontrada en las dos comunidades ECM naturales, mayor a la encontrada por Reverchon et al. (2012) en poblaciones naturales de *P. montezumae*. En este caso, la diferenciación de las comunidades ECM pudiera estar asociada a una respuesta adaptativa de los morfotipos a las condiciones del sitio y/o características del hospedero (Ding et al., 2011; Casique-Valdez et al., 2018).

1.7.2 Colonización de raíces por la comunidad ECM en plantas de vivero.

La mayor velocidad de colonización de raíces y micorrización de plantas por efecto de la comunidad ECM y procedencia de la semilla de Cieneguilla en los primeros ocho meses

del bioensayo refleja diferencias adaptativas a nivel de la comunidad ECM y del hospedero, asociadas con las condiciones ambientales de las localidades. Es común que en sitios con ambientes limitantes las especies desarrollen como mecanismos de supervivencia estrategias de tipo ruderal para colonizar el área (Ding et al., 2011; Lofgren et al., 2018). La mayor velocidad de colonización de la comunidad ECM de Cieneguilla se asocia con la capacidad de invasión que poseen algunos morfotipos para colonizar plántulas a partir de hifas (Ding et al., 2011; Peay et al., 2010). Cabe resaltar que el presente estudio es el primero en aportar información sobre la relación entre la dinámica de colonización y diferencias adaptativas, debido a que comúnmente en los estudios de las ectomicorrizas en vivero se ha estimado únicamente el porcentaje de colonización en una sola evaluación (Martínez-Reyes et al., 2012; Barroetaveña et al., 2016; Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019).

Sin embargo, la velocidad de colonización y micorrización de la comunidad ECM de Zacualpan aumentó rápidamente después de los ocho meses. Este comportamiento se asocia con el aumento en biomasa del hospedero, lo cual le permite tener una mayor inversión de carbono para establecer simbiosis con especies fúngicas de exploración larga, que son características de sitios húmedos como Zacualpan (Castaño et al., 2018), las cuales pueden estar presentes dentro del banco de inóculo ECM en forma de estructuras de resistencia como esporas, micelio o esclerocios y no necesariamente como morfotipos.

1.7.3 Diversidad y diferenciación de la comunidad ECM en plantas de vivero.

Generalmente, el ambiente suele ser un factor que influye en la interacción huésped (G_{Hu}) x hospedero (G_{Ho}), situación que se manifestó en la diversidad y diferenciación de las comunidades ECM en las poblaciones naturales muestreadas. Sin embargo, las plantas en el bioensayo fueron sometidas a un mismo ambiente favorable de temperatura y disponibilidad de humedad. Es posible, por lo tanto, que estas condiciones ambientales similares moldearan la interacción fitobionte-micobionte (Ishida, et al., 2007) en el bioensayo, modificando el efecto del origen del huésped y hospedero en la diversidad y diferenciación de la comunidad ECM detectada en las plantas de *Pinus greggii* en el vivero.

Durante los primeros meses del bioensayo se observaron principalmente morfotipos registrados en poblaciones naturales, lo cual se ha observado en otros estudios (Huang et al., 2012; Reverchon et al., 2012, Baeza-Guzmán et al., 2020), e indica un efecto de la presencia y frecuencia de especies ectomicorrízicas en forma de hifas en el inóculo nativo que fácilmente se propagan y colonizan nuevas raíces. La alta frecuencia de M32- *C. geophilum* y M22 en todas las combinaciones inóculo nativo-semilla refleja la naturaleza de estos morfotipos como especies de estadio temprano por su capacidad de colonizar rápidamente al hospedero (Bahram et al., 2013; Almaraz Llamas et al., 2020). La presencia de nuevos morfotipos de estadio tardío a partir de los ocho meses, como M33- *Rhizopogon* sp., marca una etapa de surgimiento de especies provenientes de la comunidad de propágulos resistentes (CPR). (Kjøller y Bruns, 2003). Estos morfotipos no fueron detectados en las muestras de raíces micorrizadas recolectadas en las

poblaciones naturales, debido a que se encontraban formando parte del banco de inóculo como estructuras de resistencia como ha sido reportado en estudios previos (Rusca et al., 2006; Bahram et al., 2013).

La mayor abundancia de *Tomentella* sp. en plantas de Cieneguilla se relaciona con la afinidad de la especie a hospederos que se distribuyen en sitios limitantes como el de esa localidad (Casique-Valdez et al., 2018, mientras que la mayor abundancia de M22 en plantas de Zacualpan pudiera ser una estrategia del hospedero para establecer simbiosis micorrízica sin invertir grandes cantidades de C. A pesar de que se desconoce la identidad de M22, su color oscuro, asociado a una elevada concentración de melanina (Almaraz-Llamas et al., 2019), se relaciona con una menor necesidad de C (Castaño et al., 2018; Casique-Valdéz et al., 2018). La dinámica de reemplazo de los morfotipos M1 y M22, presentes en los primeros meses de crecimiento, por los morfotipos M24, M32, M34, M35 y M36 a partir de los 6 meses, son consecuencia de la etapa de sucesión de las especies fúngicas (Ishida et al., 2007; Castaño et al., 2018), posiblemente por el desarrollo de la planta (Dejene et al., 2017). Dicho proceso se ha atribuido a un cambio en la disponibilidad de N y P (Baeza-Guzmán et al., 2021) o a la modificación en la relación C/N (Castaño et al., 2018).

Los índices de diversidad en plantas de vivero de *Pinus greggii* var. *australis* son similares a los registrados en estudios previos en otras especies de pino, como en *P. patula* (Baeza-Guzmán et al., 2021) y *P. mugo* (Huang et al., 2012). La mayor diversidad asociada al origen Cieneguilla, al comparar el origen del huésped (ECM) y del hospedero a los 12 meses, pudiera deberse a una mayor plasticidad que poseen algunas especies

fúngicas y vegetales por establecerse naturalmente en sitios restrictivos (Almaraz-Llamas et al., 2019; Reyes-Matamoros y Martínez-Moreno, 2001).

A los ocho meses la asociación simpátrica huésped/hospedero presentó mayor diversidad de ECM que la alopátrica, con una diferenciación moderada (índice de similitud de 0.49). Estos datos proporcionan indicios de una predisposición genética a asociarse con los huéspedes de su ambiente natural local (Huang et al., 2012), que refleja la presencia de procesos coevolutivos que pueden conducir a mecanismos de adaptación local (Rodríguez-Gutiérrez et al., 2019; Rúa et al., 2018). Sin embargo, la reducción de la diversidad y diferenciación a los 12 meses permite observar un efecto del ambiente del bioensayo en la interacción huésped/hospedero ($G_{Hue} \times G_{Ho} \times A$) en relación con el origen de ambos y su relación simpátrica o alopátrica.

Las condiciones del bioensayo permitieron observar dos etapas en la dinámica de la asociación micorrízica con cambios en la diversidad y diferenciación de las comunidades ECM. En la primera etapa se manifestó un cierto grado de coadaptación huésped/hospedero, con una mayor diversidad promedio (indicios de mayor afinidad) en las asociaciones simpátricas que alopátricas. En la segunda etapa, después de los ocho meses, se observó un proceso de aclimatación y homogeneización al ambiente de crecimiento en el bioensayo, que redujo la diversidad global y la diferenciación de las comunidades ECM en las asociaciones simpátricas y alopátricas. Por lo tanto, al paso del tiempo las comunidades ECM podrían tener la capacidad de expresarse como morfotipos como consecuencia de modificaciones ambientales. Sin embargo, las condiciones adversas que propicia el cambio climático podrían reducir la diversidad ECM

y posiblemente especies fúngicas de importancia ecológica para los bosques podrían reducir su frecuencia e incluso desaparecer

1.8 CONCLUSIONES

Los resultados del estudio mostraron evidencias de coadaptación huésped/hospedero de la comunidad ECM existente en poblaciones naturales de *Pinus greggii* var. *australis*. La composición de la comunidad ectomicorrizas difirió en poblaciones naturales de este pino con condiciones ambientales contrastantes, con un alto grado de diferenciación entre ellas y una mayor diversidad de ECM en la localidad con condiciones ambientales más favorables de humedad, temperatura y fertilidad del suelo, lo que refleja el efecto de diferentes presiones de selección en ellas. La dinámica de colonización de raíces y micorrización de las plantas en vivero fue afectada por el origen del huésped (ECM) y del hospedero (planta), con una mayor tasa de micorrización asociada al origen con ambiente más restrictivo.

En los primeros seis meses se encontró una alta frecuencia de morfotipos de estadio temprano como *Tomentella* sp. y posteriormente, al aumentar la biomasa del hospedero, la aparición de morfotipos de estadio tardío como *Rhizopogon* sp. Durante los primeros ocho meses de crecimiento de las plantas se presentaron evidencias de la coadaptación huésped/hospedero, con una mayor afinidad local entre ellos que se manifestó en una mayor diversidad de ECM en la asociación simpátrica que en la alopátrica y un moderado grado de diferenciación de la comunidad ECM en ellas. Sin embargo, con el paso del tiempo, las condiciones homogéneas de crecimiento en el bioensayo ocasionaron una reducción en la diversidad y diferenciación de las comunidades ECM en las plantas, lo cual, a nivel ecosistema implica posibilidades de ajuste al cambio climático, pero la posible ausencia de especies fúngicas de importancia ecológica para los ecosistemas forestales.

CONCLUSIÓN GENERAL

La exposición de los ecosistemas forestales a factores climáticos y antropogénicos, ha provocado la disminución y aislamiento de las poblaciones de especies forestales con importancia ecológica, social y económica como *P. greggii* var. *asutralis*. En el presente estudio se observó que las diferentes condiciones ambientales en las cuales se distribuyen las poblaciones naturales de *P. greggii* var. *australis* seleccionadas, demostraron haber propiciado una alta diferenciación en la composición de las comunidades ectomicorrízicas y se presenciaron evidencias de coadaptación hospedero/huésped.

En el estudio de las poblaciones naturales, la localidad bajo condiciones ambientales más favorables de humedad, temperatura y fertilidad, reportó mayor diversidad de hongos ECM, sin embargo, el huésped y hospedero proveniente de la localidad con condiciones restrictivas, mostró incidencia sobre el porcentaje de colonización de raíces y plantas de vivero.

Por otro lado, las plantas de vivero mostraron una alta frecuencia de morfotipos *Tomentella* sp. a los seis meses, mientras que a los ocho, la dinámica de aparición de los morfotipos cambio, siendo el morfotipo *Rhizopogon* sp. el que tuvo mayor presencia.

Cabe destacar la presencia de coadaptación a los ocho meses de crecimiento de las plantas, dicha afinidad local se reflejó en una mayor diversidad en la comunidad ECM en la asociación simpátrica y que en la alopátrica, así como un moderado grado de diferenciación de la comunidad ECM en ellas.

Sin embargo, se reportó una reducción en la diversidad y diferenciación de las comunidades ECM en las plantas de vivero a través del tiempo, lo cual se relaciona con las condiciones homogéneas del ambiente de crecimiento. A mayor escala, los cambios climáticos como el calentamiento global y la migración de especies a sitios bajo condiciones distintas a las de su origen, podrían desencadenar una reducción en la diversidad y diferenciación de las comunidades ectomicorrízicas, lo cual provocaría un cambio en la dinámica de establecimiento de especies forestales y fúngicas, así como en sus beneficios mutuos resultantes de la simbiosis mutualista a la que están sujetos.

LITERATURA CITADA

- Almaraz Llamas, A., Pérez-Moreno, J., Torres-Aquino, M., Carcaño-Montiel, M. G., & Hernández Ríos, I. 2020. *Cenococcum geophilum* y su asociación con *Pinus maximartinezii* árbol nativo de México en peligro de extinción. *Scientia Fungorum*, vol. 49, pp. 1-8 . <https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1222>
- Ángeles-Argáiz, R., & Garibay-Orijel, R. 2019. La evolución de la simbiosis ectomicorrízica desde la perspectiva genómica. *Scientia Fungorum*, vol. 49, pp. 1–16. <https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1247>
- Bahram, M., Kõljalg, U., Kohout, P., Mirshahvaladi, S., & Tedersoo, L. 2013. Ectomycorrhizal fungi of exotic pine plantations in relation to native host trees in Iran: Evidence of host range expansion by local symbionts to distantly related host taxa. *Mycorrhiza*, vol. 23, no.1, pp.11–19. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0445-z>
- Barroetaveña, C., Bassani, V. N., Monges, J. I., & Rajchenberg, M. 2016. Comportamiento a campo de *Pinus ponderosa* inoculado con hongos ectomicorrízicos plantado en pastizales de estepa en Patagonia Andina, Argentina. *Bosque*, vol. 37, no.2, pp. 307–316. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002016000200009>
- Bennett, A. E., & Classen, A. T. 2020. Climate change influences mycorrhizal fungal–plant interactions, but conclusions are limited by geographical study bias. *Ecology*, vol. 101, no.4, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1002/ecy.2978>
- Brundrett, M.C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, vol, 154, no. 134, pp.275-304.
- Carney, J.W.G. 2000. Evolution of mycorrhiza systemas *Naturwissenschaften*, vol. 87, pp. 467-475.
- Cairney, J.W.G. 2012. Extramatrical mycelia of ectomycorrhizal fungi as moderators of carbon dynamics in forest soil. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 47, pp. 198-208.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J.J, Quintero-Lizaola, R. y Torres-Aquino, M. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, vol.1, no. 4, pp. 567-577.
- Casique-Valdés, R., Mendoza-Villarreal, R., Galindo-García, F., González-Morales, S., & Sánchez-Peña, S. 2018. Improved parameters of *Pinus greggii* seedling growth and health after inoculation with ectomycorrhizal fungi. *Southern Forests*, vol. 81, no.1, pp. 23–30. <https://doi.org/10.2989/20702620.2018.1474415>
- Castaño, C., Lindahl, B. D., Alday, J. G., Hagenbo, A., Martínez de Aragón, J., Parladé, J., Pera, J., & Bonet, J. A. 2018. Soil microclimate changes affect soil fungal communities in a Mediterranean pine forest. *New Phytologist*, vol. 220, no. 4,

pp.1211–1221. <https://doi.org/10.1111/nph.15205>

- Craig, A. J., Woods, S., & Hoeksema, J. D. 2016. Influences of host plant identity and disturbance on spatial structure and community composition of ectomycorrhizal fungi in a northern Mississippi uplands ecosystem. *Fungal Ecology*, vol. 24, pp. 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.08.007>
- Dejene, T., Oria-de-Rueda, J. A., & Martín-Pinto, P. 2017. Fungal diversity and succession following stand development in *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. plantations in Ethiopia. *Forest Ecology and Management*, vol. 395, pp. 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.03.032>
- Ding, Q., Liang, Y., Legendre, P., He, X. hua, Pei, K. quan, Du, X. jun, & Ma, K. ping. 2011. Diversity and composition of ectomycorrhizal community on seedling roots: The role of host preference and soil origin. *Mycorrhiza*, vol. 21, no. 8, pp. 669–680. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0374-2>
- Downie, J., Silvertown, J., Cavers, S., & Ennos, R. 2020. Heritable genetic variation but no local adaptation in a pine-ectomycorrhizal interaction. *Mycorrhiza*, vol. 30, no. 2, pp.185–195. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00941-3>
- García-García, R., Gómez-Guerrero, A., López-Upton, J. y Vargas-Hernández, J.J. 2003. Composición isotópica de Carbono y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm, en vivero. *Agrociencia*, vol. 37, no. 5, pp. 467-475.
- Gandon, S., & Michalakis, Y. 2002. Local adaptation, evolutionary potential and host-parasite coevolution: Interactions between migration, mutation, population size and generation time. *Journal of Evolutionary Biology*, vol. 15, no.3, pp. 451–462. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00402.x>
- Goldmann, K., Schöning, I., Buscot, F., & Wubet, T. 2015. Forest management type influences diversity and community composition of soil fungi across temperate forest ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 6:1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01300>
- Granados-Sánchez, D., López-Ríos, G.F. y Hernández-García, M.A. 2007. Ecología y Silvicultura en Bosques Templados. *Revista Chamingo Serie Ciencia Forestales y del Ambiente*, vol.13, no. 1, pp. 67-83.
- Hereford, J. 2009. A quantitative survey of local adaptation and fitness trade-offs. *The American Naturalist*, vol. 173, no.5, pp. 579–588. <https://doi.org/10.1086/597611>
- Hernández-Martínez, J., López Upton, J., Vargas Hernández, J. J., & Jasso Mata, J. 2007. Zonas semilleras de *Pinus greggii* var. *australis* en Hidalgo, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 30, no. 3, pp. 241–249.
- Hoeksema, J. D., Forde, S. E., Hoeksema, J. D., & Forde, S. E. 2013. A Meta-Analysis of factors affecting local adaptation between interacting species. *The American Naturalist*, vol. 171, no. 3, pp. 275–290. <https://doi.org/10.1086/527496>

- Hoeksema, J. D., Hernandez, J. V., Rogers, D. L., Mendoza, L. L., & Thompson, J. N. 2012. Geographic divergence in a species-rich symbiosis: Interactions between Monterey pines and ectomycorrhizal fungi. *Ecology*, vol. 93, no. 10, pp. 2274–2285. <https://doi.org/10.1890/11-1715.1>
- Hoeksema, J. D., Piculell, B. J., & Thompson, J. N. 2009. Within-population genetic variability in mycorrhizal interactions. *Communicative and Integrative Biology*, vol. 2, no. 2, pp.110–112. <https://doi.org/10.4161/cib.7714>
- Hoeksema, J. 2010. Ongoing coevolution in mycorrhizal interactions. *New Phytologist*, vol. 187, pp. 286-300. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03305.x>
- Huang, J., Nara, K., Lian, C., Zong, K., Peng, K., Xue, S., & Shen, Z. 2012. Ectomycorrhizal fungal communities associated with Masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.) in Pb-Zn mine sites of central south China. *Mycorrhiza*, vol, 22, no. 8, pp. 589–602. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0436-0>
- Ishida, T. A., Nara, K., & Hogetsu, T. 2007. Host effects on ectomycorrhizal fungal communities insight from eight host species in mixed conifer–broadleaf forests. *New Phytologist*, vol. 174, pp. 430–440.
- Kjøller, R., & Bruns, T. D. 2003. *Rhizopogon* spore bank communities within and among California pine forests. *Mycology*, vol. 95, no. 4, pp. 603–613. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833064>
- Lezama, C.P., Vargas-Hernández, J.J., Ramírez-Vallejo, P., Azpíroz-Rivero, H.S y Jasso-Mata, J. 2002. Estructura de la diversidad genética en poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm., *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 25, no. 3, pp. 279-287.
- López-Gutiérrez, A., Pérez-Moreno, J., Hernández-Santiago, F. Uscanga-Mortera, E., García-Esteva, A., Cetina-Alcalá, V.M., Cardoso-Villanueva, M. del R. y Xoconostle-Cázares, B. 2018. Nutrient mobilization, growth and field survival of *Pinus pringlei* inoculated with three ectomycorrhizal mushrooms, *Botanical Sciences*, vol. 96, no. 2, pp. 286. doi: 10.17129/botsci.1239. Doi: 10.17129/botsci.1239.
- López-Upton, J., & Donahue, J. K. 1995. Seed production of *Pinus greggii* Engelm. in natural stands in Mexico. *Tree Planters' Notes*, vol. 46, no.3, pp. 86–92.
- López-Upton, J., Ramírez-Herrera, C., Plascencia-Escalante, O., & Jasso-Mata, J. 2004. Variation in growth of different populations from the two varieties of *Pinus greggii*. *Agrociencia*, vol. 38, no. 4, pp. 457–464.
- Martínez-Reyes, M., Pérez-Moreno, J., Villarreal-Ruiz, L., Ferrera-Cerrato, R., Xoconostle-Cázares, B., Vargas-Hernández, J. J., & Honrubia-García, M. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, vol.18, no.2, pp.183–192. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2010.11.112>

- Méndez-Neri, M., Pérez-Moreno, J., Quintero-Lizaola, R., Hernández-Acosta, E., & Lara-Herrera, A. (2011). Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana*, vol. 29, pp.73–81.
- Ning, C., Mueller, G.M., Egerton-Warburton, L., Xiang, W. & Yan, W. 2019. Host Phylogenetic Relatedness and Soil Nutrients Shape Ectomycorrhizal Community Composition in Native and Exotic Pine Plantations. *Forests*, vol. 10, no. 263, pp. 1-18.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAO. 2020. Evaluación de los recursos forestales mundiales: principales resultados. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca8753es>.
- Parraguirre-Lezama, C., Vargas-Hernández, J. J., Ramírez-Vallejo, P., Azpíroz-Rivero, H. S., & Mata-Jasso, J. 2002. Estructura de la diversidad Genética en poblaciones naturales de *Pinus greggii* Engelm. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 25, no. 3, pp. 279–287.
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., & Bruns, T. D. 2010. Rethinking ectomycorrhizal succession: are root density and hyphal exploration types drivers of spatial and temporal zonation? *Fungal Ecology*, vol. 4, no. 3, pp. 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2010.09.010>
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Hernández-Santiago, F. y Ortíz-López, I. 2020. Climate change, Biotechnology and Mexican Neotropical Edible Ectomycorrhizal Mushrooms. En Pérez-Moreno, J., Guerin-Laguet, A., Flores-Arzú, R., & Qiang Yu, F. (Eds.), *Mushrooms ,Humans and Nature in a Changing World* (pp.61-99). Cham, Switzerland:Springer.
- Quintero-Corrales, C., Ángeles-Argáiz, R., Jaramillo-Correa, J. P., Piñero, D., Garibay-Orijel, R., & Mastretta-Yanes, A. 2020. Allopatric instead of parapatric divergence in an ectomycorrhizal fungus (*Laccaria trichodermophora*) in tropical sky-islands. *Fungal Ecology*, vol. 47, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2020.100966>
- Rentería-Chávez, M. C., Pérez-Moreno, J., Cetina-Alcalá, V.M., Ferrera-Cerrato, R., Xoconostle-Cázares, B. 2007. Nutrient transfer and growth of *Pinus greggii* Engelm. inoculated with edible ectomycorrhizal mushrooms in two substrates, *Revista Argentina de Microbiología*. doi: 10.1016/j.ram.2016.06.004.
- Reverchon, F., del Ortega-Larrocea, M. del P. y Pérez-Moreno, J. 2010. Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associates with *Pinus montezumae* across a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, México, *Canadian Journal of Forest Research*, vol. 40, no. 6, pp. 1165-1174. doi: 10.1139/X10-062.
- Reverchon, F., del Pilar Ortega-Larrocea, M., Bonilla-Rosso, G., & Pérez-Moreno, J. 2012. Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forests. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 80, no. 2, pp. 479–487.

<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01314.x>

Reyes-Matamoros, J. M., & Martínez-Moreno, D. 2001. La plasticidad de las plantas. *Elementos*, vol. 41, no. 17, pp. 39–43. <https://www.redalyc.org/pdf/294/29404901.pdf%0Ahttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:La+plasticidad+de+las+plantas#0>

Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacob-Cervantes, V., Pérez-Moreno, J., Del Pilar Ortega-Larrocea, M., & Arellano-Torres, E. 2019. Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, vol., 90, pp. 1–12. <https://doi.org/10.22201/IB.20078706E.2019.90.2868>

Rosinger, C., Sandén, H., Matthews, B., Mayer, M., & Godbold, D. L. 2018. Patterns in ectomycorrhizal diversity, community composition, and exploration types in European beech, pine, and spruce forests. *Forests*, vol. 9, no. 8. <https://doi.org/10.3390/f9080445>

Rúa, M. A., Lamit, L. J., Gehring, C., Antunes, P. M., Hoeksema, J. D., Zabinski, C., Karst, J., Burns, C., & Woods, M. J. 2018. Accounting for local adaptation in ectomycorrhizas: a call to track geographical origin of plants, fungi, and soils in experiments. *Mycorrhiza*, vol. 28, pp. 187–195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00572-017-0811-y>

Rusca, T. A., Kennedy, P. G., & Bruns, T. D. 2006. The effect of different pine hosts on the sampling of *Rhizopogon* spore banks in five Eastern Sierra Nevada forests. *New Phytologist*, vol. 170, no. 3, pp. 551–560. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01689.x>

Salcido Ruiz, S., Prieto Ruíz, J. Á., García Rodríguez, J. L., Santana Aispuro, E., & Chávez Simental, J. A. 2021. *Pinus greggii* Engelm.: Respuesta a la inoculación micorrízica controlada y a la fertilización en vivero. *Agrociencia*, vol 55, no. 3, pp. 273–290. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v55i3.2419>

[Smith, S.E. & Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. \(3a Ed.\), Elsevier, U.S.A. 189 pp.](#)

Strullu-Derrien, C., André Selosse, M., Kenrick, P. & Martin, F.M. 2018. The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. *New Phytologist*, vol. 220, pp. 1012-1030

Tedersoo, L., Bahram, M., & Zobel, M. 2020. How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science*, vol. 367, no 6480, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1126/science.aba1223>

Tomao, A., Bonet, J.A., Castaño, C. & de- Miguel, S. 2020. How does forest management affect fungal diversity and community composition? Current knowledge and future perspectives for the conservation of forest fungi. *Forest Ecology and Management*, vol. 457, pp. 1-15.

Zulueta-Rodríguez, R., Hernández-Montiel, L.G., Murillo-Amador, B., Rueda-Puente, E.O., Lara-Capistrán, L., Troyo-Diéguez E. y Córdoba-Matson, M.V. 2015. Effecto of hydropriming and biopriming on seed germination and growth of two mexican fir tree species in danger of extinction. *Forests*, vol. 6, pp. 3109-3122.

ANEXOS

Anexo A. Caracterización morfo-anatómica de los morfotipos identificados en poblaciones naturales de *Pinus greggii* y plantas del bioensayo en vivero.

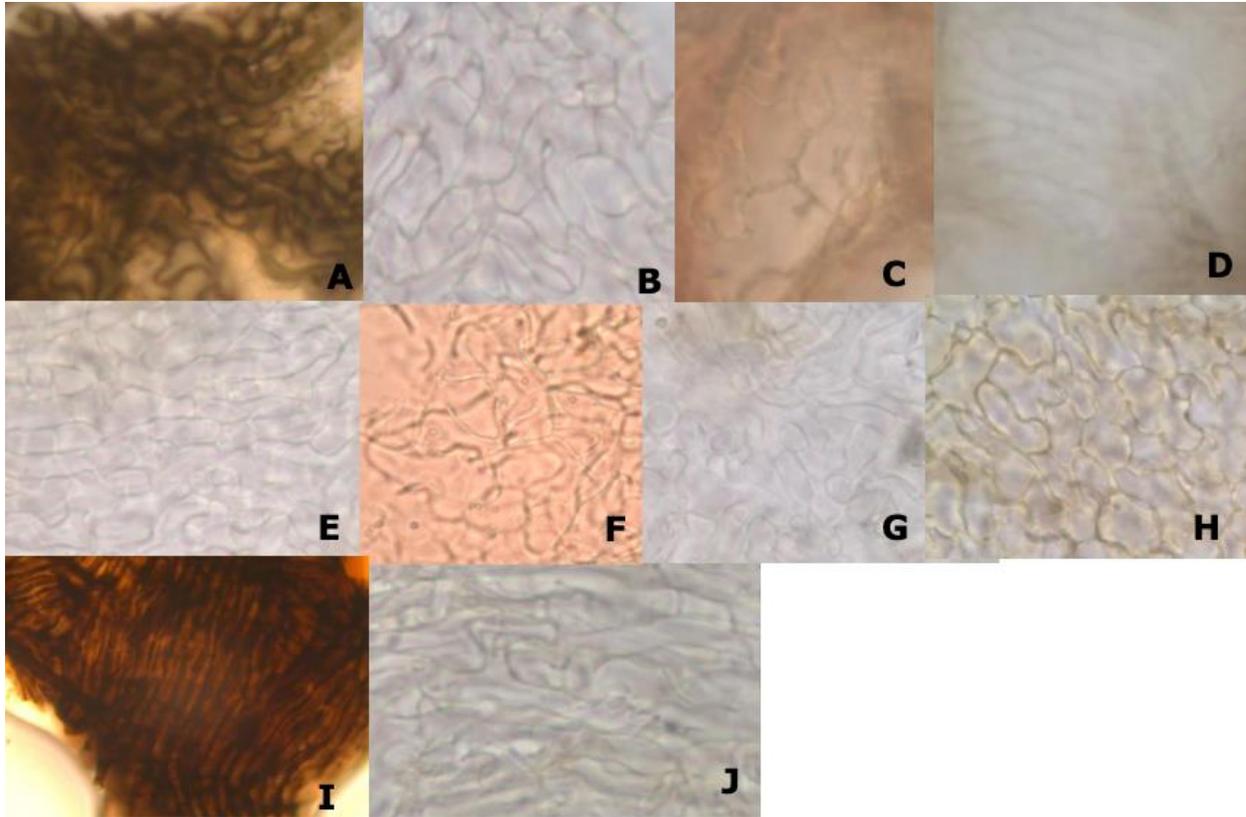
Morfo tipo	Color	Ramificación	Forma de la Punta	Estructura externa adicional	Micelio Externo			Partículas minerales	Tipo de hifas	Manto	Red de Hartig (capas)
					Presencia/Ausencia	Color	Textura				
M1	Negro	Dicotómica	Recta cilíndrica	Nd	P	Blanco	Lanosa	No	Con fíbula	Pseudoparenquimatoso (tipo M)	2
M2	Negro	Dicotómica	Recta inflada	Nd	P	Amarillo	Lanosa	P	Con fíbula	Pseudoparenquimatoso (tipo H)	3
M3	Parduzco	Monopodial pinnada	Sinuosa cilíndrica	Nd	A	-	-	No	Con fíbula	Plectenquimatoso	2
M4	Parduzco	Dicotómica	Recta inflada	Nd	P	Café oscuro	Ganulosa	P	Con fíbula	Pseudoparenquimatoso (tipo H)	1
M5	Café	Dicotómica	Recta inflada	Nd	P	Blanco	Lisa	No	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo L)	2 a 3
M6	Grisáceo	Dicotómica	Recta inflada	Nd	P	Blanco	Lisa	P	Con fíbula	Pseudoparenquimatoso (tipo H)	2
M7	Café oscuro	Pinnada	Recta inflada	Cordón miceliar	P	Blanco	Lisa	No	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo H)	2
M8	Negro	Dicotómica	Doblada inflada	Nd	P	Blanco	Lisa	P	Septada	Plectenquimatoso (tipo A)	3
M9	Negro	Pinnada	Sinuosa inflada	Nd	P	Blanco	Lisa	P	Con fíbula	Pseudoparenquimatoso (Tipo E)	1
M10	Negro	Dicotómica	Doblada inflada	Nd	P	Blanco	Lisa	No	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo M)	2
M11	Café oscuro	Pinnada	Doblada inflada	Nd	P	Blanco	Lisa	No	Fíbula	Pseudoparenquimatoso (tipo H)	2
M12	Grisáceo	Dicotómica	Sinuosa inflada	Nd	P	Blanco	Granuloso	P	Fíbula	Pseudoplectenquimatoso (tipo M)	2
M13	Café	Pinnada irregular	Sinuosa recta	Nd	P	Blanco	Liso	No	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo Q)	2 a 3

Morfo tipo	Color	Ramificación	Forma de la Punta	Estructura externa adicional	Micelio Externo			Partículas minerales	Tipo de hifas	Manto	Red de Hartig (capas)
					Presencia/Ausencia	Color	Textura				
M14	Café	Dicotómica	Sinuosa inflada	Nd	P	Blanco	Algodonosa	No	Fíbula	Pseudoparenquimatoso (tipo H)	2 a 3
M15	Café oscuro	Dicotómica	Recta cilíndrica	Nd	A	-	-	No	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo M)	2 a 3
M16	Café oscuro	Pinnada	Recta inflada	Nd	A	-	-	No	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo D)	2 a 3
M17	Parduzco	Dicotómica	Doblada inflada	Nd	P	Blanco	Lisa	No	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo M)	2
M18	Anaranjado	Dicotómica	Doblada inflada	Nd	P	Blanco	Lisa	No	Septada	Plectenquimatoso (tipo R)	3
M19	Café oscuro	Dicotómica	Doblada inflada	Nd	P	Blanco	Lisa	No	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo M)	2 a 3
M20	Negro	Dicotómica	Sinuosa cilíndrica	Nd	P	Blanco	Lisa	No	Septada	Pseudoplectenquimatoso (tipo H)	2 a 3
M21	Café oscuro	Pinnada irregular	Sinuosa cilíndrica	Nd	P	Blanco	Lisa	No	Septada	Pseudoplectenquimatoso (tipo H)	2
M22	Negro	Dicotómica	Doblada cilíndrica	Nd	P	Blanco	Algodonosa	No	Septada	Plectenquimatoso (tipo B)	2
M23	Violeta	Dicotómica	Recta cilíndrica	Nd	P	Blanco	Lisa	No	Septada	Pseudoplectenquimatoso (tipo H)	1 a 2
M24	Verduzco	Dicotómica	Doblada	Nd	P	Blanco	Granulosa	No	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo E)	2 a 3
M25	Café oscuro	Monopodial	Recta cilíndrica	Nd	P	Blanco	Lisa	No	Fíbula	Pseudoparenquimatoso (tipo H)	2 a 3
M26	Anaranjado	Dicotómica	Doblada cilíndrica	Nd	P	Blanco	Fibrosa	P	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo H)	2
M27	Café oscuro	Monopodial	Recta cilíndrica	Nd	P	Blanco	Lisa	Si	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo H)	2
M28	Café oscuro	Pinnada monopodial	Doblada cilíndrica	Nd	A	-	-	No	Septada	Pseudoparenquimatoso	2
M29	Café oscuro	Pinnada monopodial	Doblada inflada	Nd	P	Blanco	Lanosa	No	Septada	Pseudoparenquimatoso	2
M30	Café	Pinnada irregular	Tortuosa cilíndrica	Nd	P	Blanco	Lisa	No	Septada	Pseudoparenquimatoso	2
M31	Café oscuro	Pinnada	Recta cilíndrica	Nd	A	-	-	No	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo M)	2

Morfo tipo	Color	Ramificación	Forma de la Punta	Estructura externa adicional	Micelio Externo			Partículas minerales	Tipo de hifas	Manto	Red de Hartig (capas)
					Presencia/Ausencia	Color	Textura				
M32	Negro	Dicotómica	Recta cilíndrica	Rizomorfo	-	Blanco	Granulosa	No	Septada	Plectenquimatoso (tipo G)	2
*M33	Café oscuro	Dicotómica	Doblada inflada	Cordón miceliar	P	Blanco-púrpura	Granulosa	P	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo M)	3
*M34	Anaranjado	Dicotómica	Doblada inflada	Nd	P	Blanco	Lanosa	No	Septada	Plectenquimatoso (tipo B)	2-3
*M35	Azulado	Coraloide	Doblada inflada	Cordón miceliar	P	Blanco	Fibrosa	P	Septada	Pseudoparenquimatoso (tipo M)	2
*M36	Café oscuro	Coraloide	Doblada inflada	Cordón miceliar	P	Blanco	Lanosa	P	Septada	Plectenquimatoso (tipo B)	2-3

El símbolo * indica los morfotipos encontrados exclusivamente en las plantas del bioensayo en vivero, la letra "A"= Ausente, "P"=presente, "Nd"=no detectada, y "No"=no observada

Anexo B. Tipos de manto externo identificados en los morfotipos encontrados en la investigación.



Anexo C. Tipo de hifas identificadas en los morfotipos encontrados. A) Hifa con fíbula identificada en M1-*Tomentella* sp. y B) Hifa con septo identificada en M32-*Cenococcum geophilum*.

