



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

CULTIVO DEL HONGO COMESTIBLE *Suillus kaibabensis* Thiers. ASOCIADO CON *Pinus greggii* Engelm. EN CAMPO Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

MARÍA DEL ROSARIO CARDOSO VILLANUEVA

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

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2023



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Cultivo del hongo comestible ectomicorrízico *Suillus kaibabensis* Thiers. asociado con *Pinus greggii* Engelm. en campo y seguridad alimentaria**, realizada por la estudiante: **María del Rosario Cardoso Villanueva**, 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. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESOR



DR. JULIÁN DELGADILLO MARTÍNEZ

ASESOR



DR. JUAN JOSÉ ALMARÁZ SUÁREZ

ASESOR



DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR



DR. VÍCTOR MANUEL CETINA ALCALÁ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, mayo de 2023



Esta tesis formó parte del Proyecto **CONACyT-PRONACES FOP07-2021-03 316198**, al cual se agradece su apoyo.



**CULTIVO DEL HONGO COMESTIBLE ECTOMICORRÍZICO *Suillus kaibabensis*
Thiers. ASOCIADO A *Pinus greggii* Engelm. EN CAMPO Y SEGURIDAD
ALIMENTARIA**

**María del Rosario Cardoso Villanueva, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2023**

RESUMEN

México enfrenta problemas que han reducido notablemente su riqueza de especies. Uno de ellos con mayor impacto es la deforestación. Aunque se han desarrollado programas de reforestación, la mayoría no son exitosos. Esto se debe a que, de manera natural, los pinos se relacionan con hongos del suelo benéficos que les proporcionan nutrimentos, agua y protección contra organismos patógenos y a su vez estos hongos, denominados micorrízicos, reciben compuestos derivados de la fotosíntesis. Cuando esta asociación simbiótica sucede, se presenta una modificación de la estructura de las puntas radicales de los árboles formando un tipo de simbiosis denominada ectomicorriza. Existen hongos que además de establecer ectomicorrizas, representan un gran valor para el humano ya que son comestibles. México ocupa el segundo lugar en número de especies de hongos comestibles ectomicorrízicos a nivel mundial, por lo que es de gran importancia la utilización de dicho material genético. En este estudio, que duró 10 años en total, se reporta el cultivo del hongo comestible *Suillus kaibabensis* Thiers. asociado a *Pinus greggii* Engelm. en condiciones de campo. Se logró la producción de esporomas después de 7 años a partir del trasplante a campo, lo que indica la viabilidad de este cultivo y determina un gran potencial para esta especie. Este constituye el primer cultivo de un hongo comestibles ectomicorrízico en el Neotrópico, lo cual es de gran importancia, ya que a nivel el mayor porcentaje de los trabajos dirigidos al cultivo de hongos comestibles ectomicorrízicos se han realizado en el continente europeo y asiático; y la mayoría de ellos sólo a nivel de laboratorio. Las implicaciones de este trabajo tienen repercusión en el desarrollo de la soberanía alimentaria, el desarrollo rural sostenible y la mitigación del cambio climático.

Palabras clave: ectomicorriza, producción de esporomas, recurso micológico, potencial biotecnológico, reforestación, seguridad alimentaria.

CULTIVATION OF THE ECTOMYCORRHIZAL EDIBLE MUSHROOM *Suillus kaibabensis* Thiers. ASSOCIATED WITH *Pinus greggii* Engelm. IN FIELD CONDITIONS AND FOOD SAFETY

**María del Rosario Cardoso Villanueva, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2023**

ABSTRACT

Mexico faces several problems of great importance that have significantly reduced its biodiversity richness. One of these problems with great impact is deforestation. Although reforestation programs have been developed to mitigate this problem, most of them have been unsuccessful. In natural conditions, pines establish symbiotic relationships with some beneficial soil fungi that provide them with nutrients, water, and protection against pathogenic organisms, in turn these fungi receive compounds derived from photosynthesis. When this symbiotic association occurs, the structure of the root tips of the trees is modified, forming the ectomycorrhizal symbiosis. There are fungi that, in addition to establishing ectomycorrhizae, are important for humans since they are edible. Mexico ranks second in international ectomycorrhizal edible mushroom species, so it is of great importance to use this genetic resource. In this study, which lasted 10 years, the edible mushroom *Suillus kaibabensis* Thiers was cultivated. associated with *Pinus greggii* Engelm. under field conditions. The production of sporomes was achieved after 7 years from the transplant to the field, which indicates the viability of this crop and determines a great potential for this species. This constitutes the first cultivation report of an ectomycorrhizal edible fungus in the Neotropics, which is of great importance, since worldwide most of the work related to the cultivation of ectomycorrhizal edible fungi has been carried out in European and Asian countries and most of them only at laboratory level. The implications of this work have an impact on the development, of food sovereignty, sustainable rural development and climate change mitigation.

Key words: ectomycorrhiza, sporome production, mycological resource, biotechnological potential, reforestation, food security.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT, por la beca otorgada para la realización de mi investigación.

Al Colegio de Postgraduados, por darme la oportunidad de desarrollar mis estudios de Doctorado para la generación de conocimiento útil para el campo mexicano.

Al Campus Montecillo, por permitirme realizar las actividades necesarias para cubrir los objetivos de mi trabajo.

Al Postgrado de Edafología, por dejarme ser parte de su lista de alumnos y otorgarme conocimientos fundamentales dentro de mi área de investigación.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno, por su valiosa amistad, por ser una persona admirable que disfruta día a día su vida como científico, por ser un extraordinario maestro y un excelente ser humano, capaz de brindar palabras que convierten momentos de tribulación en oportunidades de aprendizaje.

Al Dr. Julián Delgadillo Martínez, por siempre mostrar apoyo y disponibilidad para realizar las actividades necesarias dentro de la investigación.

Al Dr. Juan José Almaraz Suárez, por el conocimiento compartido durante mis estudios de Postgrado.

Al Dr. Alejandro Alarcón, por su enorme disponibilidad y ayuda fundamental en la realización de esta investigación.

Al Dr. Víctor Manuel Cetina Alcalá, por sus contribuciones a esta investigación y por compartir conocimientos valiosos durante el desarrollo del trabajo.

Al Dr. Marco Polo Carballo Sánchez y la Dra., Elizabeth Hernández Acosta, por sus valiosas aportaciones a la estructura final del trabajo.

A la Dra. Irma Díaz, la Dra. Magdalena Martínez y la Dra. Olivia Ayala, por mostrar siempre interés en las actividades que realizaba y por su enorme apoyo para llevarlas a cabo.

A los alumnos del Laboratorio de Micorrizas, por siempre mostrar empatía y apoyo para las actividades desarrolladas. A Sory, por siempre mostrar enorme disponibilidad y una gran sonrisa.

DEDICATORIA

A mis padres, por haberme dado la oportunidad de vivir y enseñarme que todo se puede lograr poniendo mucho esfuerzo y dedicación. Mami, aunque no estás conmigo físicamente, en mi corazón está una parte de ti que me acompañará para siempre.

A mi esposo, por su gran apoyo y paciencia y por ayudarme a entender que se pueden superar todos los obstáculos para conseguir lo que anhelamos.

A mi pequeño Santiago, por ser un excelente maestro que ha desarrollado mi capacidad para realizar diferentes actividades, por inspirarme a ser una mejor persona y por demostrarme que con una sonrisa, un día de caos se convierte en un extraordinario momento.

A mi pequeño bebé, que será un excelente hermano para Santi y me ayudará a descubrir la capacidad que tengo de amar a dos personitas por igual.

A mis hermanos, sobrinos, cuñados y suegros, por ser una excelente familia y por ayudarme a entender que son indispensables para desarrollar cualquier cosa que se tenga planeada. Su gran apoyo me permitió realizar de la mejor manera mis actividades en el Doctorado.

A mis amigos: Paulina, Natalie, Carlos, Sory, Anaitzi, Uziel, José Luis, por compartir conmigo grandes momentos de alegría y estar junto a mí el tiempo que estuve en el Colegio de Postgraduados.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
LISTAS DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
Objetivo general.....	3
Objetivos específicos.....	3
Hipótesis general.....	3
Hipótesis específicas.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción.....	7
Revisión crítica de literatura.....	8
Historia.....	8
Presente.....	10
Cultivo de hongos hipogeos.....	10
Cultivo de hongos epigeos.....	12
<i>Lyophyllum shimeji</i>	12
<i>Cantharellus</i>	13
<i>Matsutake</i>	13
<i>Porcini</i>	13
<i>Lactarius</i>	14
<i>Amanita caesarea</i>	16
<i>Suillus bovinus</i>	16
Avances en el cultivo de otros hongos comestibles ectomicorrízicos.....	16
Perspectivas futuras.....	24

Conclusiones	27
Agradecimientos	27
CAPÍTULO I. PRODUCCIÓN DEL HONGO COMESTIBLE <i>Suillus kaibabensis</i>	
Thiers. ASOCIADO CON EL PINO NEOTROPICAL <i>Pinus greggii</i> Engelm. EN	
CONDICIONES DE CAMPO	28
1.1 RESUMEN	28
1.2 ABSTRACT.....	29
1.3 INTRODUCCIÓN	30
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS	31
1.4.1 Montaje de ensayo en invernadero	31
1.4.2. Evaluación de productividad.....	32
1.4.3 Colonización ectomicorrízica	32
1.4.4 Identidad de esporomas	33
1.4.5 Crecimiento de árboles.....	33
1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
1.5.1 Productividad de esporomas	34
1.5.2 Localización de esporomas	35
1.5.3 Colonización ectomicorrízica	35
1.5.4 Identidad de esporomas	41
1.5.5 Crecimiento de árboles.....	43
1.6 CONCLUSIONES	44
1.7 AGRADECIMIENTOS.....	45
CONCLUSIONES GENERALES.....	46
LITERATURA CITADA	48

LISTAS DE CUADROS

Cuadro 1. Avance en el cultivo de hongos comestibles ectomicorrízicos en el mundo.....	17
Cuadro 1.1. Producción de esporomas de <i>Suillus kaibabensis</i> Thiers. asociados a <i>Pinus greggii</i> Engelm. en condiciones de campo.	34
Cuadro 1.2. Porcentajes de colonización ectomicorrízica del género <i>Suillus</i> en los árboles de <i>Pinus greggii</i> Engelm.....	37
Cuadro 1.3. Identificación de los morfotipos presentes en la raíz de <i>Pinus greggii</i> , basada en la afinidad filogenética en GenBank.	43
Cuadro 1.4. Datos de crecimiento e índice de robustez en los árboles de <i>Pinus greggii</i> Engelm productores de <i>Suillus kaibabensis</i> Thiers.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Trufas de importancia económica en Europa, Asia y Oceanía. a) *Tuber melanosporum* cultivado en Murcia, España; b) Utilización de perros en la búsqueda de trufas en Murcia, España, en bosques de *Quercus ilex*; c) *T. indicum* en la frontera con Tibet, en Yunnan, China; c) Buscador de trufas (*T. indicum*) perteneciente a la etnia Lisu; d) Empresario francés, vendedor chino y científico mexicano en la frontera con Tibet en Yunnan, China sosteniendo *T. indicum* de alta calidad; e) *Tuber aestivum* cultivado en Nueva Zelanda. 11
- Figura 2.** Trufas y hongos ectomicorrízicos de importancia en mercados internacionales a nivel global. a) Raíz ectomicorrizada de trufa negra (*Tuber melanosporum*) en raíces de encino (*Quercus* sp.); b) Recolecta de *T. melanosporum* en una plantación de *Quercus* en Nueva Zelanda; c) Tajín de la trufa del desierto *Terfezia arenaria* en Marruecos; d) *Tricholoma matsutake* en Yunnan, China; e) *Boletus edulis sensu lato* en Ucrania; f) *Lactarius hatsutake* en Yunnan, China. 15
- Figura 3.** Hongos comestibles ectomicorrízicos con importancia económica. a) *Astraeus hygrometricus* en Tailandia; b-f) Hongos comestibles ectomicorrízicos de México; b) *Tricholoma colposii* de Perote, Veracruz; c) *Lactarius* sect. *deliciosi* en Texcoco, Estado de México; d) *Amanita basii* en Oaxaca, Zimatlán, Oaxaca; e) *Cantharellus cibarius sensu lato*, en Texcoco, Estado de México; e) Interacción internacional entre miembros del grupo mazahua con científico de China en evento internacional de hongos. 26
- Figura 1.1.** Localización de esporomas de *Suillus kaibabensis* alrededor de los árboles productores, de *Pinus greggii*, 6 y 7 años después del trasplante a campo. 35
- Figura 1.2.** Morfotipos recolectados de árboles de *Pinus greggii* de 10 años de edad, mostrando características de *Suillus*, incluyendo la presencia de Rizomorfos (R). a) Morfotipo juvenil mostrando abundante micelio externo (EM) rodeando la raíz ectomicorrizada; b-e) Ectomicorrizas mostrando la abundancia de rizomorfos (R); f) Corte transversal de ectomicorrizas de *P. greggi* mostrando las estructuras características de la simbiosis: micelio externo (EM), manto (M) y red de Hartig (HN). 39

Figura 1.3. Plantas inoculadas con suelo nativo de la zona de estudio y morfotipos observados en las raíces.	40
Figura 1.4. Producción de esporomas de <i>Suillus kaibabensis</i> en árboles de <i>Pinus greggii</i> de 10 años de edad inoculados con dicho hongo. a) Apariencia típica de la producción de esporomas en la base de los árboles; b) Esporoma de <i>S. kaibabensis</i> mostrando en la base de su estípite abundante micelio externo; c) Esporomas de <i>S. kaibabensis</i> mostrando las estructuras características taxonómicas de la especie en campo; d) Método de recolecta de los esporomas para ser pesados y posteriormente herborizados para su identificación; e) Esporas elípticas características de <i>S. kaibabensis</i> ; f) Himenio (H), esporas (S) y basidios (B) de <i>Suillus kaibabensis</i> cultivados en asociación con <i>P. greggii</i>	42

INTRODUCCIÓN GENERAL

Dentro del suelo crece una gran cantidad de microorganismos los cuales realizan funciones fundamentales dentro de los ecosistemas. Las bacterias y hongos son los que se presentan en mayor cantidad y son los responsables de realizar procesos de gran importancia ecofisiológica. Los hongos presentan diferentes tipos de formas de vida, desde los saprófitos, que llevan a cabo la tarea de descomponer la materia orgánica, hasta los que establecen simbiosis asociadas a las raíces de las plantas, denominados micorrízicos, pasando por los hongos parásitos (Gómez-Luna *et al.*, 2012; Córdova-Chávez *et al.*, 2014).

Una de las simbiosis micorrízicas de mayor importancia es la establecida entre hongos pertenecientes a Ascomycota, Basidiomycota y Zygomycota con las raíces de plantas Gimnospermas y Angiospermas. Esta simbiosis se conoce como ectomicorriza y permite el intercambio de nutrientes y agua entre el hongo y la planta (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012).

La ectomicorriza es una simbiosis mutualista que se establece entre más de 20,000 especies de hongos y unas 5,000 especies de plantas (Comandini *et al.*, 2012). Estas plantas tienen amplia distribución, la cual incluye amplias boreales, templadas, subtropicales y tropicales (Smith & Read, 2008). La simbiosis ectomicorrízica regula el reciclaje nutricional en los ecosistemas en los cuales se encuentra. Los hongos ectomicorrízicos son un grupo filogenéticamente diverso, que incluye Basidiomycetes, Ascomycetes y Zygomycetes principalmente incluidos en los órdenes Pezizales, Agaricales, Helotiales, Boletales, y Cantharellales (Tedersoo *et al.*, 2010). Las estructuras diagnósticas de la ectomicorriza son: el manto fúngico, la Red de Hartig y el micelio externo. El micelio externo es una de las estructuras biológicas más interesantes, porque constituye una relación vital entre las raíces de las plantas y el suelo.

En los ecosistemas naturales se presenta una gran diversidad de hongos ectomicorrízicos y muchos de ellos son aptos para el consumo humano, esto ha despertado el interés en su cultivo y representa una fuente de ingresos para los habitantes que viven en áreas aledañas a los bosques. Su recolección con fines comerciales representa un aumento del valor económico de los lugares donde se recolectan. La comestibilidad de los hongos es, actualmente, uno de los criterios de interés en la selección de especies para ser utilizadas en la micorrización y producción de plantas de invernadero destinadas a la reforestación, aforestación o establecimiento de plantaciones (Yun &

Hall, 2004). El cultivo de los hongos comestibles ectomicorrízicos ha constituido todo un reto, debido a la complejidad biótica y abiótica que implica, a diferencia del cultivo de los hongos saprobianos, los cuales constituyen una industria establecida desde hace décadas que produce miles de millones de dólares anualmente. Sin embargo, el cultivo de dichos hongos comestibles ectomicorrízicos es de enorme relevancia por sus implicaciones en la mitigación del cambio climático, el desarrollo forestal sostenible y la soberanía alimentaria (Pérez-Moreno *et al.* 2021).

En este trabajo además de presentar una revisión global de los avances del cultivo de los hongos comestibles ectomicorrízicos, muestra resultados sobre el primer cultivo de un hongo comestible ectomicorrízico en el Neotrópico en condiciones de campo, después de una investigación que duró 10 años en total. Los resultados presentados demuestran la factibilidad de cultivo de los hongos comestibles ectomicorrízicos en el continente americano con especies nativas y de importancia biocultural.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Evaluar la factibilidad de cultivo del hongo comestible ectomicorrízico *Suillus kaibabensis* asociado a *Pinus greggii* en condiciones de campo para contribuir a la seguridad alimentaria de México.

Objetivos específicos

Evaluar la supervivencia de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con el hongo ectomicorrízico comestible *Suillus kaibabensis* al ser transplantado de invernadero a campo.

Evaluar la productividad de esporomas de *Suillus kaibabensis* durante dos años consecutivos para determinar la viabilidad del cultivo en un área originalmente cubierta con matorral xerófilo y con suelos degradados constituidos por tepetates.

Caracterizar las estructuras de la ectomicorriza formada entre *Suillus kaibabensis* y *Pinus greggii* y realizar la identificación molecular de los esporomas producidos en campo.

Hipótesis general

Las plantas de *Pinus greggii* inoculadas con *Suillus kaibabensis* tienen la capacidad de sobrevivir en suelos degradados, constituidos por tepetates, y lograr la producción de esporomas, lo que contribuirá a la mitigación de cambio climático, desarrollo forestal sostenible y seguridad alimentaria.

Hipótesis específicas

Si se inoculan plantas de *Pinus greggii* con *Suillus kaibabensis* y se transplantan a un área con suelos degradados, éstas tienen la capacidad de sobrevivir y crecer en dichas condiciones durante años.

El hongo comestible ectomicorrízico *Suillus kaibabensis* tiene la capacidad de ser cultivado y producir esporomas alrededor de los árboles inoculados de *Pinus greggii* en condiciones de campo, en un área originalmente cubierta con matorral xerófilo y con suelos degradados constituidos por tepetates.

La producción de esporomas de *Suillus kaibabensis* no está directamente relacionada con la colonización ectomicorrízica presente en las raíces de *Pinus greggii*.

REVISIÓN DE LITERATURA

EL CULTIVO DE LOS HONGOS COMESTIBLES ECTOMICORRÍZICOS: HISTORIA, PRESENTE Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Resumen

Algunos hongos además de cumplir una función ecológica en los ecosistemas forestales, son una fuente de alimento nutritivo y que contribuye a la salud humana. Desde la antigüedad, estos hongos han sido valiosos en la vida cotidiana del ser humano, dados los beneficios que proporcionan al ser consumidos. Algunos hongos presentan características que los convierten en fuente de ingredientes en la gastronomía mundial, como es el caso de las trufas, que son hongos pertenecientes al género *Tuber*. Dada la gran demanda que tienen estos hongos a nivel internacional, su producción natural en los bosques, no es suficiente para satisfacerla, por lo que se han desarrollado metodologías que permiten su cultivo. Otros géneros de hongos comercializados en mercados internacionales son aquellas especies pertenecientes a los géneros *Rhizopogon*, *Lactarius*, *Cantharellus*, *Lyophyllum*, *Tricholoma*, *Boletus*, *Amanita* y *Suillus*. Todas estas especies forman relaciones simbióticas con las raíces de árboles de importancia forestal, denominadas ectomicorrízicas, lo cual origina que su cultivo sea más complejo en comparación con los hongos saprobios. El presente capítulo presenta una revisión relacionada con el cultivo de hongos comestibles ectomicorrízicos a nivel mundial, para conocer el grado de avance de los cultivos, el cual puede ser desde nivel *in vitro*, síntesis de micorriza hasta producción de esporomas en condiciones naturales. Los mayores avances se han efectuado con las trufas en Europa y con otros hongos en el sureste asiático. Dado que México ocupa el segundo lugar en diversidad de hongos comestibles silvestres, existe una urgente necesidad de efectuar investigaciones e innovaciones a nivel de campo, especies valiosas tanto para la gastronomía como para la medicina, ya que esto puede originar un gran desarrollo económico, ambiental y sociocultural de este recurso forestal no maderable, contribuyendo a su vez, con la conservación forestal sostenible.

Palabras clave: conservación forestal, hongos, síntesis de micorriza, cultivo, desarrollo sostenible, seguridad alimentaria.

Abstract

Some fungi, in addition to fulfilling an ecological function of paramount importance in forest ecosystems, are a source of nutritious food that contributes to human health. Since ancient times, these mushrooms have been important in the daily life of human beings due to the benefits they provide when consumed. Some mushrooms have characteristics that make them important ingredients in world gastronomy, such as truffles, which are mushrooms belonging to *Tuber* genus. Due to the great demand that these mushrooms have internationally, their natural production in the forests is not enough to satisfy the existing international demand, so different methodologies have been developed that allow their cultivation. Other genera of enormously important mushrooms in international markets are species belonging to the genera *Rhizopogon*, *Lactarius*, *Cantharellus*, *Lyophyllum*, *Tricholoma*, *Boletus*, *Amanita* and *Suillus*. All these species form symbiotic relationships with the roots of trees of forest importance called ectomycorrhizal, which originates that their cultivation is more complex compared to that of saprobe fungi. In the present work a review related to the cultivation of ectomycorrhizal edible fungi worldwide is presented, to know its degree of progress in the most important species in international markets, which goes from *in vitro* level, mycorrhizal synthesis to sporome production in natural conditions. The greatest advances have been made with truffles in Europe and with other mushrooms in Southeast Asia. Given that Mexico ranks second in diversity of wild edible mushrooms, there is an urgent need to carry out research and innovations at the field level of important species for both gastronomy and medicine, since this can lead to important economic, environmental development and sociocultural aspects of this important non-timber forest resource, simultaneously contributing to sustainable forest conservation in the country.

Keywords: forest conservation, ectomycorrhizal fungi, mycorrhizal synthesis, cultivation, sustainable development, food security.

Introducción

En los ecosistemas forestales existen diversos microorganismos importantes ecológica y económicamente. El suelo alberga un gran número de microorganismos que desempeñan un papel fundamental para el funcionamiento de los ecosistemas forestales (Carrasco-Hernández *et al.*, 2010). Numerosas especies de hongos establecen una relación simbiótica llamada micorriza, con las raíces de las plantas; uno de los tipos más importantes es la ectomicorriza, la cual se establece entre más de 20,000 especies de hongos y unas 5,000 especies de plantas gimnospermas y angiospermas (Comandini *et al.*, 2012). La asociación ectomicorrízica es fundamental en ecosistemas forestales ya que regula el reciclaje nutrimental (Tedersoo *et al.*, 2010). Al establecerse, se facilita la absorción de nutrimentos por la planta, dado que se mejora la absorción de nutrimentos inorgánicos y se permite la absorción de los nutrimentos orgánicos (Read & Pérez-Moreno, 2003). También se ha observado que se puede presentar una protección a altas concentraciones de metales pesados y a patógenos (Camargo-Ricalde *et al.*, 2012; Sell *et al.*, 2005; Szuba, 2015). Por otra parte, los hongos obtienen protección física por parte de la raíz, además de que se produce una translocación de compuestos carbonados de la planta hacia el hongo. Se ha encontrado que existe una fracción importante de asimilados fotosintéticos transferida a los hongos ectomicorrízicos, y ésta puede llegar hasta 30% en el caso de plántulas (Buscardo *et al.*, 2009). La colonización micorrízica está directamente relacionada con la supervivencia y el crecimiento de los árboles que presentan esta asociación (Mestre *et al.*, 2011).

Dentro de los ecosistemas naturales que no están perturbados, la asociación ectomicorrízica además de proporcionar a la planta hospedera una manera más eficaz de utilizar el agua y los nutrimentos del suelo, se aumenta su competitividad y, por lo tanto, un incremento en su supervivencia en el ecosistema, en comparación con otras plantas que no presentan la asociación. De igual forma, la micorriza proporciona a las plantas una mayor capacidad de resistencia y tolerancia al estrés ambiental, tanto de tipo biótico como abiótico (Zulueta *et al.*, 2007; Reisa *et al.*, 2012).

En ecosistemas naturales se presenta una gran diversidad de hongos ectomicorrízicos, de los cuales un numeroso grupo de especies son aptos para el consumo humano y representan una fuente de ingresos para los habitantes de áreas aledañas a los bosques. Los hongos ectomicorrízicos son productos no maderables valiosos dentro de los bosques, su recolección con fines comerciales

representa un aumento del valor económico de los bosques donde se colectan y proporcionan ingresos a los recolectores y a los comerciantes locales (Pérez-Moreno *et al.*, 2010). Por esta razón, la comestibilidad de los hongos es una característica que actualmente es un criterio de selección de especies para generar programas de micorrización en la producción de árboles en vivero para reforestaciones (Yun & Hall, 2004).

El cultivo de hongos ectomicorrízicos, dada la compleja naturaleza de la simbiosis, es una tarea que requiere tiempo y dedicación. Aunque, dentro del mercado internacional, en su mayoría se encuentran a la venta hongos saprófitos como *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* y *Pleurotus ostreatus*, en la actualidad, el cultivo de los hongos comestibles ectomicorrízicos ha comenzado a extenderse siendo el cultivo del género *Tuber* el más abundante (Wang & Chen, 2014; Pérez-Moreno *et al.*, 2020). Desde hace siglos ha existido el interés por lograr el cultivo de hongos para el consumo humano, dado que constituyen un alimento que aporta una gran cantidad de nutrimentos y que puede contrarrestar numerosas enfermedades (Pérez-Moreno & Martínez-Reyes, 2014).

En el presente trabajo se presenta un panorama del cultivo de hongos comestibles ectomicorrízicos, desde los trabajos iniciales en donde se logró la síntesis de las ectomicorrizas a nivel experimental (que es la formación de las ectomicorrizas en las raíces de las plantas inoculadas) hasta el cultivo en plantaciones forestales. Es trascendente conocer los avances para continuar desarrollando técnicas que permitan el cultivo de nuevas especies con valor comercial, así como lograr su producción a gran escala, lo cual puede potenciar el desarrollo económico, sociocultural y la conservación forestal, por los altos precios de dichos hongos en los mercados internacionales.

Revisión crítica de literatura

Historia

Un conjunto de culturas alrededor del mundo se ha interesado por los hongos, ya que se han considerado como elementos especiales, misteriosos y cargados de algún poder especial. Se tienen registros que indican que desde la prehistoria pudo presentarse el consumo de hongos, ya que se encuentran representados en algunas pinturas rupestres (Pérez-Moreno *et al.*, 2020). El primer cultivo de hongos apareció en China, siendo el hongo Shiitake (*Lentinula edodes*) el primero en ser cultivado. El registro escrito más antiguo del cultivo de dicho hongo fue efectuado en

Longquan, en 1209, al cortar con hachas troncos de árboles que ya lo producían y propagarlo en las mismas áreas forestales (Miles & Chang, 2004). En la actualidad, existe un enorme interés por cultivar los hongos comestibles, dado que se han comprobado que son alimentos funcionales, es decir, que poseen valiosas propiedades nutritivas y que contribuyen a la salud humana. El cultivo de los hongos saprobios constituye una industria valuada en miles de millones de dólares anualmente (Pérez-Moreno *et al.*, 2021).

En lo que respecta al grupo trófico de los hongos comestibles ectomicorrízicos, desde hace siglos ha existido también un gran interés por su cultivo. Aunque éstos pueden ser cosechados en los bosques naturales, por diversas razones en algunos casos, su producción ha disminuido, debido a diferentes factores incluyendo el cambio climático. De igual manera algunas especies de hongos, dada su importancia en la gastronomía, no pueden satisfacer la demanda si solo se producen de manera natural. Los precios que llegan a alcanzar algunas especies en los mercados internacionales son muy altos y su comercio anual varía de 167 millones de dólares a 1.67 miles de millones de dólares a nivel global, dependiendo de las especies (Pérez-Moreno *et al.*, 2021). El cultivo de las trufas, pertenecientes al género *Tuber* constituye actualmente una industria establecida principalmente en países europeos, incluyendo España, Italia y Francia, siendo la trufa negra (*Tuber melanosporum*) la más cultivada en asociación con encinos (principalmente *Quercus ilex*) de manera comercial desde la década de los 1970's (Hall *et al.*, 2009). Importantes avances han sido alcanzados también en el cultivo de otros hongos ectomicorrízicos de enorme valor comercial, principalmente pertenecientes a los géneros *Cantharellus*, *Tricholoma*, *Rhizopogon*, *Lactarius*, *Lyophyllum* y *Terfezia*, los cuales se describirán en la siguiente sección.

Conforme ha transcurrido el tiempo, las formas para cultivar los hongos de interés ha ido evolucionando, desde la elaboración de inóculos basados en esporas, la producción de plántulas micorrizadas que hacen más fácil la propagación entre los árboles de interés, hasta la aparición de nuevas tecnologías que facilitan la producción de esporomas a diferentes niveles. En la actualidad se realizan innovaciones que incluyen un grupo de microorganismos igual de importantes, como son las bacterias, dado que se ha observado que algunas especies de dicho grupo microbiano tiene la capacidad de promover el crecimiento y la producción de hongos ectomicorrízicos. Esta información es importante ya que la utilización de estas bacterias representa una alternativa en los

cultivos de mayor importancia a nivel internacional como es el caso de *Tuber melanosporum* (Frey-Klett *et al.*, 2007; Wang & Chen, 2014).

Presente

Cultivo de hongos hipogeos

Trufas

Los hongos del género *Tuber*, pertenecientes a los Ascomicetos, desarrollan sus ascocarpos de manera subterránea. Dentro de este género se encuentran 10 especies que son de alto valor comercial y culinario, destacando: *T. melanosporum*, *T. magnatum*, *T. aestivum* (= *T. uncinatum*), *T. indicum*, *T. macrosporum*, *T. mesentericum*, *T. borchii* y *T. brumale*, las cuales son comercializadas a nivel internacional, es su mayoría en los mercados de Europa, mientras que *T. gibbosum* y *T. oregonense* en los mercados de Norte América. De estas especies sólo *Tuber melanosporum* y *T. aestivum* son cultivadas a grandes escalas comerciales, principalmente en España, Francia e Italia, mientras que *T. borchii*, *T. brumale*, y *T. indicum* han sido cultivadas a una escala menor (Zambonelli *et al.*, 2016; Wang & Chen, 2014). Además del interés en las trufas que se comercializan a nivel internacional, ha surgido el interés por cultivar especies características de ciertas regiones del mundo, que pueden representar un cultivo potencial en el que resultarían beneficiadas las comunidades locales donde se cultiven. Por ejemplo, Kinoshita *et al.* (2018) reportaron la síntesis de micorriza en laboratorio de tres hongos del género *Tuber*: *T. japonicum* asociado a *Pinus densiflora* y *Quercus acutissima*, *T. longispinosum* asociado a *Quercus serrata* y *T. himalayense*, asociado a *Pinus densiflora* y *Quercus acutissima*, la cual constituye la primera fase para el cultivo de los hongos ectomicorrízicos. Es importante mencionar que el cultivo y comercialización de trufas ha sido exitoso por las interacciones entre tomadores de decisiones, empresarios, científicos y productores (Figura 1; Figura 2 a y b).



Figura 1. Trufas de importancia económica en Europa, Asia y Oceanía. a) *Tuber melanosporum* cultivado en Murcia, España; b) Utilización de perros en la búsqueda de trufas en Murcia, España, en bosques de *Quercus ilex*; c) *T. indicum* en la frontera con Tibet, en Yunnan, China; c) Buscador de trufas (*T. indicum*) perteneciente a la etnia Lisu; d) Empresario francés, vendedor chino y científico mexicano en la frontera con Tibet en Yunnan, China sosteniendo *T. indicum* de alta calidad; e) *Tuber aestivum* cultivado en Nueva Zelanda.

Trufas del desierto

Las trufas del desierto son hongos que pertenecen a los géneros *Terfezia*, *Tirmania* y *Leucangium*, y son consumidas en el norte de África y en Oriente Medio. Estos hongos pueden formar tanto ectomicorrizas como, endomicorrizas y ectendomicorrizas con plantas pertenecientes a la familia *Cistaceae* en diferentes condiciones. Se ha logrado el cultivo *in vitro* y plantaciones establecidas en España en donde se ha obtenido una producción de 50 a 70 kg ha⁻¹ hasta 300 kg ha⁻¹, lo que indica el gran potencial del cultivo de estos hongos (Morte *et al.*, 2008; Wang & Chen, 2014) (Figura 1.2 c).

Shoro

El hongo *Rhizopogon roseolus* es conocido como “shoro”, es un hongo delicado que ha sido recolectado en Japón y China desde hace 200 años. Dado que la producción natural se ha visto disminuida desde principios de los 1990’s, se comenzó su cultivo y se ha logrado el establecimiento de un número pequeño de plantaciones. En Nueva Zelanda se utilizaron pinos micorrizados con esporas de especies de *Rhizopogon* provenientes de Europa y en donde se ha logrado la producción de hongos de dicha especie. Al realizar algunos estudios utilizando PCR se logró observar que las especies de *Rhizopogon* que se encuentran con frecuencia en Nueva Zelanda pertenecen al subgénero *Roseoli* y se reporta como *Rhizopogon roseolus* (Wang & Chen, 2014). En Japón se ha logrado la inoculación con esporas y cultivos de micelio en plántulas, logrando la formación de esporomas en pruebas de campo (Shimomura, 2013).

Cultivo de hongos epigeos

Los hongos epigeos, a diferencia de los hipogeos, desarrollan sus esporomas por encima del nivel del suelo. Comparado con el cultivo de trufas, el cultivo de hongos epigeos resulta ser más difícil y con menor grado de éxito. Los cultivos de *Lactarius deliciosus* en Francia y Nueva Zelanda, *Lactarius hatsutake* en China y *Lyophyllum shimeji* en Japón, son los que han tenido mayor éxito.

Lyophyllum shimeji

En Japón y China *L. shimeji* es considerado un manjar, llegando a ser tan importante como el matsutake en algunas regiones de Japón. Se ha logrado la producción de esporomas de forma artificial en plántulas micorrizadas, y de igual manera se ha conseguido la producción al inocular

plántulas y establecerlas a cielo abierto o en invernaderos. En China y Japón se han utilizado plántulas de *Pinus radiata*, *P. densiflora* y *Picea alba* para lograr la formación de micorrizas. (Wang & Chen, 2014; Yamada *et al.*, 2017).

Cantharellus

Cantharellus cibarius es una de las especies de hongos comestibles ectomicorrízicos más populares. El cultivo de esta especie ha resultado difícil dado que es dependiente de la presencia de algunas bacterias, las cuales permiten la formación de esporomas (Wang & Chen, 2014). Yamada *et al.* (2017) reportaron la producción de esporomas de *Cantharellus cibarius* a partir de micorriza producida *in vitro* e inoculada en plántulas en condiciones de invernadero (Yamada *et al.*, 2017). En cuanto al cultivo de *Cantharellus anzutake*, una especie nativa de Japón, se ha logrado cultivar micelio a partir de puntas micorrizadas, además de establecer experimentos en invernadero con plantas de *Pinus pinaster* y *Quercus serrata* inoculadas con el hongo, de lo que se ha logrado obtener la producción de esporomas (Ogawa, *et al.*, 2019; Yamada, 2022).

Matsutake

El matsutake, *Tricholoma matsutake*, es una de las especies más apreciada en Japón, dado que su producción natural ha disminuido drásticamente, ha surgido el interés de llevar a cabo su cultivo. Se han realizado trabajos en Japón y Corea de los que se ha reportado la producción *in vitro* y la formación de micorrizas *in situ*. En Corea, de igual manera se ha establecido la producción mediante la micorrización de plántulas de *Pinus pinaster* (Wang & Chen, 2014; Yamanaka *et al.* 2020) (Figura 2 d).

Porcini

El grupo Porcini está constituido por las especies *Boletus edulis*, *Boletus aereus*, *Boletus aestivalis*, *Boletus pinophilus* y *Boletus reticulatus*. *Boletus edulis* es uno de los hongos comestibles más valorados, contabilizando de 200 a 100 toneladas consumidas anualmente, sin embargo, este consumo depende de su recolección en bosque naturales. Dada la importancia, se ha intentado la producción a escala de laboratorio produciendo plantas micorrizadas, no obstante, se ha reportado que las plantas ectomicorrizadas colapsan al transferirse del medio de cultivo al suelo. En España se ha logrado la reproducción de semillas de *Cistus* micorrizadas con hongos del grupo porcini,

esto a nivel *in vitro*. Y se han producido esporomas en *Cistus* en plantaciones después de 3 años de plantadas (Wang & Chen, 2014; Mediavilla *et al.*, 2016) (Figura 2 e).

Lactarius

El primer trabajo en donde se logró la producción de *Lactarius deliciosus*, fue en el establecimiento de plántulas micorrizadas de *Pinus pinaster*. Posteriormente se logró el cultivo comercial en Nueva Zelanda con la misma especie de hongo, pero establecida en plantaciones de *Pinus radiata*. En este sitio se ha logrado el establecimiento en cientos de hectáreas y la producción de esporomas cada año, actualmente se realizan diferentes tipos de manejo como la irrigación o la adición de materia orgánica para observar si existe un incremento en la producción de esporomas (Guerin-Laguette *et al.*, 2014).

Por otra parte, en China, se ha logrado el establecimiento de *Lactarius hatsutake* en plántulas micorrizadas de *Pinus massoniana*, obteniendo la producción de 3 a 4 años después de su inoculación y se ha obtenido una cantidad de hasta 670 kg ha⁻¹. De igual manera se ha presentado producción de esporomas en contenedores, por ejemplo: *L. deliciosus* en *Pinus sylvestris* y *L. akahatsu* en *P. densiflora*. Aunque ha sido exitosa la producción *in vitro* de plantas micorrizadas con *L. sanguifluus*, a la fecha no existe un buen desarrollo en plantaciones (Wang & Chen, 2014). En Japón, se han realizado trabajos del género *Lactarius* en la sección *Deliciosi*, las especies que comprenden esta sección son: *L. akahatsu*, *L. hatsudake*, *L. laeticolor* y *L. subindigo*. Endo *et al.* (2019), lograron el cultivo de micelio a partir de puntas micorrizadas (Figura 1.2. f).



Figura 2. Trufas y hongos ectomicorrízicos de importancia en mercados internacionales a nivel global. a) Raíz ectomicorrizada de trufa negra (*Tuber melanosporum*) en raíces de encino (*Quercus* sp.); b) Recolecta de *T. melanosporum* en una plantación de *Quercus* en Nueva Zelanda; c) Tajín de la trufa del desierto *Terfezia arenaria* en Marruecos; d) *Tricholoma matsutake* en Yunnan, China; e) *Boletus edulis sensu lato* en Ucrania; f) *Lactarius hatsutake* en Yunnan, China.

Amanita caesarea

El hongo del César, antiguamente incluido en una sola especie denominada *Amanita caesarea*, actualmente se conoce que en realidad es un complejo de especies incluidas en *Amanita* section *caesarea*, cuya distribución incluye principalmente Norteamérica, Europa y Asia Oriental. Este complejo de especies, son ectomicorrízicas con *Quercus* y *Pinus* principalmente y altamente cotizadas en mercados internacionales. En España, se han realizado estudios que relacionan el efecto de fuentes de carbono y nitrógeno, el pH y la temperatura en cultivos *in vitro* en asociaciones de *Amanita caesarea* con *Quercus suber* y *Castanea sativa*. De manera similar en Japón se ha logrado la síntesis de ectomicorriza con 3 especies de este complejo. Este es el primer paso para la producción de esporomas de este hongo en plantaciones de árboles (Endo *et al.*, 2012; Wang & Chen, 2014).

Suillus bovinus

El género *Suillus* presenta un gran número de hongos ectomicorrízicos que llaman la atención por su comestibilidad. En un estudio realizado en China se logró la síntesis de la micorriza en el establecimiento de *Pinus massoniana* con *Suillus bovinus* (Sun *et al.*, 2019).

Avances en el cultivo de otros hongos comestibles ectomicorrízicos

A nivel mundial se han desarrollado diversos trabajos relacionados con inicios, en distintas etapas, en el cultivo de diversos hongos comestibles ectomicorrízicos. Aunque algunos [por ejemplo, *Astraeus hygrometricus* (Figura 3 a)] solo se han quedado a nivel de laboratorio, existen muchos casos de éxito que han permitido la producción de esporomas a nivel de campo, y de la que se realiza su comercialización (Cuadro 1).

Cuadro 1. Avance en el cultivo de hongos comestibles ectomicorrízicos en el mundo.

Especie cultivada	Grado de avance	Países	Referencia
<i>Amanita caesaroides</i>	En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio.	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
<i>Austreus hygrometricus</i>	En campo: manejo forestal, inoculación con cultivos de micelio o esporas. En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio, inoculación con esporas y micorrización.	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
<i>Boletus edulis</i>	En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
<i>Boletus fragrans</i>	En laboratorio: Síntesis de micorriza con plantas de la familia Cistaceae.	Portugal	Albuquerque-Martins <i>et al.</i> , 2019
<i>Boletus reticulatus</i>	En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
<i>Cantharellus anzutake</i>	En campo: establecimiento de plantas micorrizadas en invernadero y producción de esporomas asociados a <i>Quercus serrata</i> y <i>Pinus densiflora</i> . En laboratorio: Cultivo de micelio	Japón	Ogawa <i>et al.</i> , 2018 Ogawa <i>et al.</i> 2019 Yamada, 2022

Especie cultivada	Grado de avance	Países	Referencia
<i>Cantharellus cibarius</i>	<p>En campo: plantación de plántulas micorrizadas.</p> <p>En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio.</p>	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
<i>Entoloma sepium</i>	<p>En campo: inoculación con cultivos de micelio o esporas.</p> <p>En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio.</p>	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
<i>Hebeloma leucosarx</i>	<p>En campo: Inoculación con esporas, síntesis de micorriza y producción de esporomas asociadas a <i>Pinus greggii</i>, en condiciones de invernadero</p>	México	Villegas-Olivera <i>et al.</i> , 2017
<i>Laccaria bicolor</i>	<p>En campo: Inoculación con esporas, síntesis de micorriza y producción de esporomas asociadas a <i>Pinus greggii</i>, en condiciones de invernadero</p>	México	Villegas-Olivera <i>et al.</i> , 2017
<i>Lactarius akahatsu</i>	<p>En campo: formación de</p>	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017

Espece cultivada	Grado de avance	Países	Referencia
	<p>esporoma asociado a <i>Pinus densiflora</i>.</p> <p>En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio, síntesis de micorriza <i>in vitro</i> asociada con <i>Pinus densiflora</i>, cultivo de micelio a partir de puntas micorrizadas asociadas a <i>Pinus thunbergii</i></p>		<p>Yamada <i>et al.</i>, 2001a</p> <p>Yamada <i>et al.</i>, 2001b</p> <p>Endo <i>et al.</i> 2019</p>
<i>Lactarius deliciosus</i>	<p>En campo: Producción de esporomas en plantaciones de <i>Pinus radiata</i></p> <p>En laboratorio: Síntesis de micorriza con plantas de la familia Cistaceae, cultivo de micelio y síntesis de micorriza asociada a <i>Pinus radiata</i>.</p>	<p>Nueva Zelanda</p> <p>Portugal</p> <p>Chile</p>	<p>Guerin-Laguette <i>et al.</i>, 2014</p> <p>Albuquerque-Martins <i>et al.</i>, 2019</p> <p>Pereira <i>et al.</i>, 2014</p>
<i>Lactarius hatsudake</i>	<p>En campo: manejo forestal, formación de primordio asociado a <i>Pinus densiflora</i>.</p> <p>En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio, síntesis de micorriza <i>in vitro</i> asociada con <i>Pinus densiflora</i>, cultivo de micelio a partir de puntas micorrizadas</p>	Japón	<p>Yamada <i>et al.</i>, 2017</p> <p>Yamada <i>et al.</i>, 2001a</p> <p>Yamada <i>et al.</i>, 2001b</p> <p>Endo <i>et al.</i>, 2019</p>

Especie cultivada	Grado de avance	Países	Referencia
	asociadas a <i>Pinus thunbergii</i> .		
<i>Lactarius laeticolor</i>	En laboratorio: cultivo de micelio a partir de puntas micorrizadas asociadas a <i>Abies firma</i>	Japón	Endo <i>et al.</i> , 2019
<i>Lactarius subindigo</i>	En laboratorio: cultivo de micelio a partir de puntas micorrizadas asociadas a <i>Tsuga diversifolia</i>	Japón	Endo <i>et al.</i> , 2019
<i>Lactarius tottoriensis</i>	En laboratorio: cultivo de micelio a partir de puntas micorrizadas asociadas a <i>Abies veitchii</i>	Japón	Endo <i>et al.</i> , 2019
<i>Lactarius volemus</i>	En campo: manejo forestal.	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
<i>Lyophyllum semitale</i>	En laboratorio: Síntesis de micorriza <i>in vitro</i> asociada con <i>Pinus densiflora</i>	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2001
<i>Lyophyllum shimeji</i>	En campo: inoculación y establecimiento de la asociación micorrízica.	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017 Yamada <i>et al.</i> , 2001
	En laboratorio: Síntesis de micorriza <i>in vitro</i> asociada con <i>Pinus densiflora</i>		
<i>Ramaria botrytis</i>	En campo: manejo forestal.	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017

Espece cultivada	Grado de avance	Países	Referencia
	En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio.		
<i>Rhizophogon luteolus</i>	En laboratorio: cultivo de micelio <i>in vitro</i> asociado a <i>Pinus radiata</i>	Chile	García-Rodríguez <i>et al.</i> , 2017
<i>Rhizophogon roseolus</i>	En campo: Inoculación con esporas y cultivos de micelio en pruebas de campo.	Japón	Shimomura, 2013
<i>Rhizophogon rubescens</i>	En campo: formación de esporoma asociado a <i>Pinus densiflora</i> .	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2001a Yamada <i>et al.</i> , 2001b
	En laboratorio: Síntesis de micorriza <i>in vitro</i> asociada con <i>Pinus densiflora</i>		
<i>Sarcodon aspratus</i>	En campo: manejo forestal.	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
	En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio.		
<i>Suillus bovinus</i>	En campo: manejo forestal, inoculación con cultivos de micelio o esporas.	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
	En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio, inoculación con esporas y micorrización, síntesis de micorriza en laboratorio con	China	Sun <i>et al.</i> , 2019. Yamada <i>et al.</i> , 2001

Especie cultivada	Grado de avance	Países	Referencia
	<i>Pinus massoniana</i> , síntesis de micorriza in vitro asociada con <i>Pinus densiflora</i>		
<i>Suillus luteus</i>	En campo formación de primordio asociado a <i>Pinus densiflora</i> .	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
	En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio, inoculación con esporas y micorrización, síntesis de micorriza <i>in vitro</i> asociada con <i>Pinus densiflora</i> , , cultivo de micelio <i>in vitro</i> asociado a <i>Pinus radiata</i>		Yamada <i>et al.</i> , 2001a Yamada <i>et al.</i> , 2001(II)
		Chile	García-Rodríguez <i>et al.</i> , 2017
<i>Suillus granulatus</i>	En campo: formación de primordio asociado a <i>Pinus densiflora</i> .	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2001a Yamada <i>et al.</i> , 2001b
	En laboratorio: Síntesis de micorriza <i>in vitro</i> asociada con <i>Pinus densiflora</i> , cultivo de micelio <i>in vitro</i> asociado a <i>Pinus radiata</i>	Chile	García-Rodríguez <i>et al.</i> , 2017
<i>Suillus grevillei</i>	En campo: manejo forestal, plantación de plántulas micorrizadas, inoculación con	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017

Espece cultivada	Grado de avance	Países	Referencia
	cultivos de micelio o esporas. En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio, inoculación con esporas y micorrización.		
<i>Tricholoma bakamatsutake</i>	En campo: manejo forestal, inoculación con cultivos de micelio o esporas.	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
<i>Tricholoma equestre</i>	En laboratorio: Síntesis de micorriza con plantas de la familia Cistaceae.	Portugal	Albuquerque-Martins <i>et al.</i> , 2019
<i>Tricholoma flavovirens</i>	En campo: Formación de primordio asociado a <i>Pinus densiflora</i> . En laboratorio: Síntesis de micorriza <i>in vitro</i> asociada con <i>Pinus densiflora</i> .	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2001a Yamada <i>et al.</i> , 2001b)
<i>Tricholoma portentosum</i>	En campo: Plantación de plántulas micorrizadas, formación de esporoma asociado a <i>Pinus densiflora</i> . En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio, síntesis de micorriza con plantas de la familia Cistaceae, Síntesis de micorriza <i>in vitro</i>	Japón Portugal	Yamada <i>et al.</i> , 2017 Albuquerque-Martins <i>et al.</i> , 2019 Yamada <i>et al.</i> , 2001a Yamada <i>et al.</i> , 2001b

Especie cultivada	Grado de avance	Países	Referencia
	asociada con <i>Pinus densiflora</i>		
<i>Tricholoma saponaceum</i>	En campo: formación de esporoma asociado a <i>Pinus densiflora</i> .	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2001a Yamada <i>et al.</i> , 2001b
	En laboratorio: Síntesis de micorriza <i>in vitro</i> asociada con <i>Pinus densiflora</i>		
<i>Tuber indicum</i>	En campo: manejo forestal, inoculación con cultivos de micelio o esporas.	Japón	Yamada <i>et al.</i> , 2017
	En laboratorio: micorrización <i>in vitro</i> con cultivos de micelio.		
<i>Tuber himalayense</i>	En laboratorio: Síntesis de micorriza con <i>Pinus densiflora</i> y <i>Quercus acutissima</i>	Japón	Kinoshita <i>et al.</i> , 2018
<i>Tuber japonicum</i>	En laboratorio: Síntesis de micorriza con <i>Pinus densiflora</i> y <i>Quercus acutissima</i> .	Japón	Kinoshita <i>et al.</i> , 2018
<i>Tuber longispinosum</i>	Laboratorio: Síntesis de micorriza con <i>Quercus serrata</i>	Japón	Kinoshita <i>et al.</i> , 2018

Perspectivas futuras

El cultivo de hongos ectomicorrízicos comestibles representa a futuro, una industria de enorme importancia a nivel mundial. Existen especies de este grupo de hongos que tienen importancia a

nivel internacional, y también existen especies cuya importancia es regional. Por lo que las investigaciones con ambos grupos de especies son relevantes y dependen de las condiciones socioculturales y económicas de cada región del planeta.

Debido a su complejidad, existe un gran número de trabajos que se encuentran en la fase exploratoria a nivel de laboratorio o a nivel de producción en invernadero, dado que la producción en campo depende de diversos factores como la temperatura, la humedad o la competencia con otras especies ectomicorrízicas presentes y la presencia de la estructura del microbioma en los suelos de los sitios donde se establecen las plantaciones. Se debe de continuar con los estudios a nivel de campo para lograr abastecer la demanda que pudiera generarse de algunas especies de hongos de interés ya sea regional o en los mercados internacionales.

A pesar de que México, ocupa el segundo lugar a nivel mundial de hongos comestibles silvestres, la mayoría de los estudios relacionados con el cultivo de los hongos comestibles ectomicorrízicos se ha desarrollado en Europa o en Asia Oriental, por lo que debe ser una prioridad el desarrollo de investigaciones en nuestro país. Estos estudios deben incluir tanto el estudio de los hongos comestibles ectomicorrízicos con alto valor en el mercado internacional, como aquellos que son importantes a nivel nacional y regional, dada la profunda riqueza micológica y la enorme micofilia existente en México (Figura 3. b-f). Realizando estas investigaciones se generarían enormes beneficios económicos, revalorización de la identidad micogastronómica nacional, reducción de pobreza, mejoramiento de la salud, desarrollo rural sostenible y contribuiría a la soberanía alimentaria de la Nación.



Figura 3. Hongos comestibles ectomicorrízicos con importancia económica. a) *Astraeus hygrometricus* en Tailandia; b-f) Hongos comestibles ectomicorrízicos de México; b) *Tricholoma colposii* de Perote, Veracruz; c) *Lactarius* sect. *deliciosi* en Texcoco, Estado de México; d) *Amanita basii* en Oaxaca, Zimatlán, Oaxaca; e) *Cantharellus cibarius sensu lato*, en Texcoco, Estado de México; e) Interacción internacional entre miembros del grupo mazahua con científico de China en evento internacional de hongos.

Conclusiones

El cultivo de hongos comestibles ectomicorrízicos a nivel mundial desde hace tiempo ha adquirido un gran interés dados los beneficios que se producen al ser consumidos. Sin embargo, debido a que su producción depende de la asociación que establece con algunas especies forestales, el desarrollo de una tecnología que permita su producción a gran escala ha sido difícil, se debe continuar con el diseño de metodologías que permitan el cultivo de una manera eficiente. En México, se debe continuar con investigaciones e innovaciones relacionadas con el cultivo de especies de hongos comestibles ectomicorrízicos, aprovechando que el país ocupa el segundo lugar de este grupo de hongos a nivel mundial, lo que constituye un enorme reservorio genético. Lo anterior permitirá la conservación, manejo y aprovechamiento de especies forestales en el país, contribuyendo al desarrollo sostenible y la soberanía alimentaria.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Proyecto CONACyT-PRONACES FOP07-2021-03 316198. Se agradece a Mario Honrubia García de la Universidad de Murcia, España, a Alexis Guerin-Laguet de *Myco-Tree* en Christchurch, Nueva Zelanda, a Fuqiang Yu del *Kunming Institute of Botany-Chinese Academy of Sciences* en Kunming, China y a Lahsen Khabar de la *Mohammed V University* en Rabat, Marruecos las facilidades brindadas para el acceso a las plantaciones y recolecta de trufas y hongos comestibles ectomicorrízicos mostrados en las imágenes autoría del Profesor Consejero de esta tesis.

CAPÍTULO I. PRODUCCIÓN DEL HONGO COMESTIBLE *Suillus kaibabensis* Thiers. ASOCIADO CON EL PINO NEOTROPICAL *Pinus greggii* Engelm. EN CONDICIONES DE CAMPO

1.1 RESUMEN

El cultivo de los hongos comestibles saprobios constituye una industria a nivel mundial que genera miles de millones de dólares anualmente. En contraste, el cultivo de los hongos comestibles ectomicorrízicos constituye un gran reto a nivel global, dada su complejidad ecosistémica y el desarrollo de trabajos a largo plazo. En este trabajo, que duró 10 años en total, se presenta información del cultivo exitoso en campo del hongo comestible ectomicorrízico *Suillus kaibabensis* asociado con *Pinus greggii*. En un área sin uso forestal, que originalmente fue un matorral xerófilo y actualmente es un área degradada con suelos del tipo de los tepetates, se sembraron 16 árboles de 3 años de edad con porcentajes de colonización ectomicorrízica de 90-100% del hongo comestible en estudio. Después de 7 años de su trasplante a campo, 50% de los árboles ectomicorrizados presentaron producciones de 44 y 55 esporomas, respectivamente en los años 2020 y 2021, respectivamente. El análisis de caracterización morfoanatómica demostró la presencia de ectomicorrizas morfo-anatómicamente correspondientes al género *Suillus*, y la identificación de *Suillus kaibabensis* fue confirmada con análisis molecular utilizando el gen nrITS en los esporomas producidos. Este registro constituye el primer cultivo de un hongo comestible ectomicorrízico en el Neotrópico y demuestra la factibilidad del cultivo de dicho grupo de hongos en esta región biogeográfica.

Palabras clave: cultivo de hongos ectomicorrízicos, reforestación, colonización ectomicorrízica, esporomas, calidad de planta, programas de reforestación.

1.2 ABSTRACT

The cultivation of saprobe edible mushrooms constitutes an industry that generates thousands of millions of dollars annually. In contrast, the cultivation of ectomycorrhizal edible mushrooms constitutes a great challenge at a global level, given its biological complexity and the development of long-term experimentation. In this work that lasted 10 years in total, information on the successful cultivation in the field of the edible ectomycorrhizal mushroom *Suillus kaibabensis* associated with *Pinus greggii* is presented. In an area without forest use, which was originally a xeric scrubland and is currently an area with degraded soils with the presence of *tepetates*, 16 3-year-old trees were planted with percentages of ectomycorrhizal colonization of 90-100% of the edible fungus under study. Seven years after its transplant to the field, 50% of the ectomycorrhized trees presented productions of 44 and 55 sporomes, in the years 2020 and 2021, respectively. The morphoanatomical characterization analysis demonstrated the presence of ectomycorrhizae morpho-anatomically corresponding to the genus *Suillus*, and the molecular identification of *Suillus kaibabensis* was confirmed with molecular analysis using the nrITS gene in the produced sporomes. This record constitutes the first cultivation of an edible ectomycorrhizal mushroom in the Neotropics and demonstrates the feasibility of culturing this group of fungi in this biogeographic region.

Keywords: cultivation of ectomycorrhizal fungi, reforestation, ectomycorrhizal colonization, sporomes, plant quality, reforestation programs.

1.3 INTRODUCCIÓN

En México, la deforestación constituye un problema de enorme relevancia y aunque se ha intentado contrarrestar con programas de reforestación, la mayoría de éstos no son exitosos, ya que la supervivencia de los árboles depende de una simbiosis obligada denominada micorriza (Heras-Marcial *et al.*, 2023; Pérez-Moreno *et al.* 2020). Los pinos que se utilizan en programas de reforestación se asocian de manera natural con algunos hongos presentes en el suelo y forman una asociación simbiótica llamada específicamente ectomicorriza, la origina modificaciones morfoanatómicas en las raíces de los árboles para poder efectuar intercambio de nutrimentos y agua (Comandini *et al.*, 2012; Pérez-Moreno *et al.*, 2010). Los hongos ectomicorrízicos mejoran las condiciones nutrimentales de sus plantas hospederas, lo que incrementa las probabilidades de establecimiento de plantaciones y supervivencia en campo, además de que son un componente esencial en la mayoría de las comunidades forestales (Mestre *et al.*, 2011; Tedersoo *et al.*, 2006).

Pinus greggii Engelm. es una especie endémica de México que tiene una gran importancia ecológica y económica, además presenta un gran potencial de adaptación a condiciones limitantes de humedad. Debido a estas razones es ampliamente utilizada en programas de reforestación para la recuperación de suelos degradados (Castro-Garibay *et al.* 2022; Ramírez- Herrera, Vargas-Hernández, & López-Upton, 2005). Por otra parte, algunas de las especies de hongos ectomicorrízicos son comestibles y tienen importancia en mercados internacionales. Las especies del género *Suillus* se asocian de manera natural con los pinos. *Suillus kaibabensis* es un hongo ectomicorrízico comestible ampliamente consumido y comercializado en el centro de México, en donde posee una gran importancia biocultural como alimento. La inoculación de árboles destinados a reforestaciones incrementa su supervivencia en campo, de 10% en árboles no inoculados a 80% en árboles inoculados. Esto coadyuva a la mitigación de cambio climático dado que los árboles capturan gases de efecto invernadero, principalmente CO₂, contribuyen a la recarga de mantos acuíferos y puede generar una producción de hongos comestibles que representaría un desarrollo económico de la región donde se establecen (Pérez-Moreno *et al.*, 2010; Yun & Hall, 2004). En la actualidad, no existen registros de cultivo de hongos comestibles ectomicorrízicos en el Neotrópico. Esto debido a que la formación de esporomas es un fenómeno complejo que incluye, la producción de plantas ectomicorrizadas en invernadero, el trasplante de dichos árboles a campo y el mantenimiento del experimento en investigaciones a largo plazo. Adicionalmente, dicha

formación de esporomas depende tanto de la colonización ectomicorrízica presente en las raíces de las plantas, la etapa de crecimiento del árbol, así como de las condiciones ambientales (Sun *et al.* 2019).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la factibilidad de cultivo del hongo comestible *Suillus kaibabensis* Thiers. asociado a *Pinus greggii* Engelm. Aunque el experimento lleva en total 10 años, este trabajo evalúa los resultados a partir del año 7 establecido en un área sin uso forestal, que originalmente fue un matorral xerófilo y actualmente es un área degradada cubierta de suelos denominados tepetates, en Texcoco, estado de México, ubicado en la parte central del estado de México, México.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en dos etapas: i) la primera tuvo una duración de 3 años y consistió en la producción de plantas de *Pinus greggii* ectomicorrizadas con *Suillus kaibabensis* en invernadero durante 2 años y en vivero durante 1 año; y ii) la segunda tuvo una duración de 7 años, que consistió en la selección de plantas con ectomicorrizaciones de 90 a 100%, su trasplante a campo y su mantenimiento (incluyendo riegos, podas de malezas, apertura de brechas rompe fuegos, etc.) durante 7 años dentro del Parque Nacional Molino de Flores (19.514317 N, -98.844169 O), Texcoco, Estado de México, ubicado en el Centro de México. Esta área originalmente fue un matorral xerófilo y actualmente es un área con suelos degradados y presencia de tepetates (Tudela *et al.*, 2011).

1.4.1 Montaje de ensayo en invernadero

Las semillas de *Pinus greggii* se esterilizaron con peróxido de hidrógeno a 30%. Se utilizaron tubetes de 140 mL y se llenaron con sustrato que consistía de una mezcla de arena-corteza- suelo forestal en una proporción 2:2:1 el cual se esterilizó previamente con vapor de agua. Se colocaron cinco semillas por tubete a una profundidad aproximada de 0.5 cm. A cada planta se le inoculó con 10^6 a 10^8 esporas de *Suillus kaibabensis*. Se aplicó un riego con Captan en proporción de 2 g L⁻¹ cada tercer día hasta que el tallo estuvo lignificado. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero 2 años, con riegos cada tercer día. Posteriormente, se mantuvieron en condiciones de vivero, durante 1 año. Dada la conocida variación en la ectomicorrización, durante ensayos previos, en total se produjeron 200 plantas, con este protocolo. El inóculo de *Suillus kaibabensis*

se produjo utilizando ejemplares fúngicos adquiridos en el mercado de Ozumba, Estado de México. Se utilizaron exclusivamente los himenios de los hongos, los cuales fueron deshidratados a una temperatura de 35 °C y posteriormente se molieron. El inóculo se conservó en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL a una temperatura de 5 °C hasta su utilización.

De las 200 plantas producidas, se seleccionaron 20 plantas con los mayores porcentajes de colonización, los cuales variaron de 90 a 100%. Estas plantas fueron trasplantadas a condiciones de campo, y se tuvo un porcentaje de supervivencia en campo de 80%. Dichas plantas ectomicorrizadas fueron mantenidas en condiciones de campo durante 7 años, cuando se observó la producción de esporomas de *Suillus kaibabensis*, la especie de hongo ectomicorrízico originalmente inoculada.

1.4.2. Evaluación de productividad

La producción de esporomas de *Suillus kaibabensis* en los árboles de *Pinus greggii* evaluada ocurrió en el año 7 y el año 8 de su trasplante a campo. Durante estos años se realizaron revisiones semanales alrededor de los árboles durante la época de lluvias (julio-octubre de 2020 y 2021). Los esporomas localizados, se contabilizaron y se pesaron en fresco. Se determinó también la altura y el diámetro del píleo, posteriormente se dejaron secar a una temperatura de 35°C para obtener su peso seco. Además, se realizó una medición para señalar la distancia a la que se localizaron con respecto a la parte central del tallo del árbol.

1.4.3 Colonización ectomicorrízica

La colonización ectomicorrízica se evaluó realizando un muestreo alrededor de cada árbol, recolectándose 4 segmentos de raíz de 25 cm de longitud, en cuatro puntos diferentes, a una distancia de 20 cm con respecto al tallo del árbol, siguiendo una modificación de las técnicas propuestas por Guerin-Laguette *et al.* (2014) para evaluar la colonización ectomicorrízica. Estos segmentos de raíces fueron colocados en bolsas de plástico herméticas y se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis en el laboratorio. En el laboratorio las muestras fueron evaluadas utilizando un microscopio estereoscópico, efectuando una caracterización morfoanatómica de las ectomicorrizas presentes siguiendo las técnicas propuestas por DEEMY (2023). Se separaron aquellas puntas ectomicorrizadas cuyas características morfoanatómicas correspondieron a *Suillus*

de las pertenecientes a otros hongos ectomicorrízicos, con la finalidad de determinar los porcentajes de micorrización por *Suillus*.

Con la finalidad de comprobar que *Suillus kaibabensis* no estuviera presente en el banco de inóculo de la zona de estudio, se tomaron muestras de suelo de 45 puntos paralelos, a una distancia de 5 metros de cada árbol plantado, y se estableció un ensayo en invernadero, en donde por cada punto se colocó un tubete, que contenía el suelo colectado en cada uno de los 45 puntos en campo, y se sembraron dos semillas de *Pinus greggii* para evaluar o descartar la posibilidad de colonización ectomicorrízica por *Suillus* en los árboles evaluados.

1.4.4 Identidad de esporomas

Se realizó una caracterización macro y micromorfológica, que incluyó análisis microscópico de las estructuras de los esporomas recolectados. Se realizaron cortes tanto del píleo con del estípite para identificar las estructuras de importancia y realizar su medición. Las estructuras evaluadas fueron: basidiosporas, cistidios, queilocistidios, basidios, células centrales, pileipellis y estipitipellis. Se efectuaron al menos 30 evaluaciones de cada estructura microscópica. Los cortes y las mediciones se efectuaron en el microscopio óptico. Posteriormente, se efectuó una caracterización molecular y una comparación con las secuencias existentes en la base de datos de GenBank, siguiendo los protocolos descritos por los autores previamente, evaluando el marcador nrITS (e.g., Ayala-Vásquez *et al.*, 2022; de la Fuente *et al.*, 2023; Pérez-Moreno *et al.*, 2023; Martínez-Reyes *et al.*, 2023)

1.4.5 Crecimiento de árboles

Durante la investigación se determinó la altura y el diámetro de tallo de los árboles de estudio para evaluar su crecimiento, además se calculó el índice de robustez para determinar la calidad de los árboles (Sáenz *et al.*, 2014).

1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.5.1 Productividad de esporomas

Se presentó producción de *Suillus kaibabensis* en 8 de los 16 árboles de estudio (Figura 1.1.). En el año 2021 se presentó un mayor número de esporomas, el peso promedio de los esporomas en ambos años fueron similares 10.49 y 10.25 g en 2020 y 2021, respectivamente. Interesantemente, solo uno de los árboles marcado con el número 14, produjo esporomas en los dos años; sin embargo, este árbol produjo el doble de esporomas en el año 2021 (Cuadro 1.1). Guerin-Laguette *et al.* (2020) reportó de manera similar, un incremento en la producción de esporomas a lo largo del tiempo. Dicho autor encontró que a partir del sexto año del establecimiento de la plantación, los árboles de *Pinus radiata* produjeron mayor cantidad de esporomas de *Lactarius deliciosus*. En el presente trabajo, será interesante registrar qué ocurre con la producción de los árboles que a la fecha no produjeron esporomas, y con aquellos que solo produjeron esporomas en uno de los dos años evaluados.

Cuadro 1.1. Producción de esporomas de *Suillus kaibabensis* Thiers. asociados a *Pinus greggii* Engelm. en condiciones de campo.

No. de árbol*	Producción 2020		Producción 2021	
	No. de esporomas	Peso fresco (g)	No. de esporomas	Peso fresco (g)
2	4	42.8	0	0
3	2	10.1	0	0
4	4	122.22	0	0
7	28	202.17	0	0
8	0	0.00	3	31.46
11	0	0.00	2	48.28
14	6	84.17	11	133.2
16	0	0.00	36	320.57
Total	44	461.46	52	533.51

* Lo árboles números 1,5,6,9,10,12,13 y 15 a la fecha no han producido esporomas, a pesar de presentar ectomicorrizas con características morfoanatómicas del género *Suillus*, cuyos porcentajes de colonización se muestran en el Cuadro 2.2.

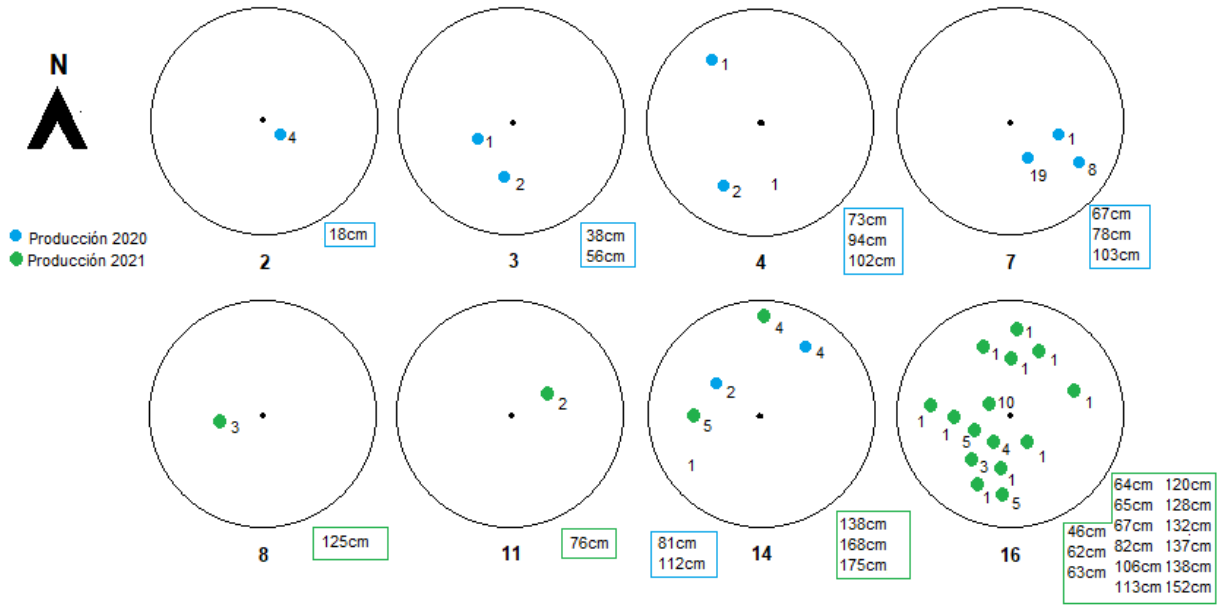


Figura 1.1. Localización de esporomas de *Suillus kaibabensis* alrededor de los árboles productores, de *Pinus greggii*, 6 y 7 años después del trasplante a campo.

1.5.2 Localización de esporomas

Además del número de esporomas producido en el área basal de cada árbol se evaluó la distancia a la que crecieron, con respecto al centro del tallo de los árboles. Dado que esto podría ser un indicador del crecimiento radial del hongo debajo del suelo. Estas distancias presentaron una amplia variación. La distancia menor a la que aparecieron esporomas fue de 18 cm, mientras que la mayor fue de 175 cm. Solo en el árbol 14 se pudo observar el incremento de distancia a la que crecían los esporomas con respecto al año de producción, dado que fue el único árbol que presentó producción los dos años. Se pudo notar un incremento en la distancia a la que crecen los esporomas ya que en el año 2020 la mayor distancia fue de 112 cm, mientras que para el año 2021 fue de 175 cm (figura 1.2).

1.5.3 Colonización ectomicorrízica

La evaluación de la colonización ectomicorrízica permitió identificar mediante una caracterización morfoanatómica la presencia de morfotipos característicos del género *Suillus*. Los morfotipos presentaron una ramificación dicotómica con las puntas redondeadas. En estados juveniles las puntas ectomicorrizadas presentaron un color amarillo blanquecino y en estados más maduros naranja a marrón. Se observó micelio blanco abundante en su superficie. El manto presentó una

buena visibilidad con una textura algodonosa y se observaron hifas de exploración emanando de este. Adicionalmente, en los estadios maduros de las ectomicorrizas, siempre se observó la presencia de rizomorfos (Figura 2.2.). En el corte transversal se observaron células corticales ovaladas y cilíndricas, la red Hartig se extendió entre una o dos filas de las células de la epidermis (Figura 2.2). La presencia de rizomorfos ha sido reportada previamente en diversas especies de *Suillus* formando asociaciones ectomicorrízicas con árboles del género *Pinus*, incluyendo *S. bovinus*, *S. collinitus*, *S. plorans*, *S. sibiricus* y *S. variegatus* (DEEMY, 2023).

Los porcentajes de colonización indicaron la presencia de morfotipos del género *Suillus* en todos los árboles de estudio. En términos generales, se observaron altos porcentajes de colonización en la mayoría de árboles productores, con promedios que variaron de 35 a 95%. Sin embargo, el árbol 11 a pesar de presentar una colonización baja (15%) produjo esporomas (Cuadro 1.2.). Lo anterior indica que *Suillus kaibabensis* Thiers. tiene la capacidad de formar esporomas aún en árboles con bajos porcentajes de colonización, lo que le permite establecerse y asociarse con las raíces de las plantas para lograr su crecimiento y reproducción.

Cuadro 1.2. Porcentajes de colonización ectomicorrízica del género *Suillus* en los árboles de *Pinus greggii* Engelm.

No. de árbol	Productor de esporomas	Colonización ectomicorrízica con características morfoanatómicas del género <i>Suillus</i> (%)				Colonización promedio
		Norte	Sur	Este	Oeste	
1	No	100	100	60	100	90
2	Si	20	80	60	20	45
3	Si	100	100	40	100	85
4	Si	80	80	80	100	85
5	No	40	20	0	0	15
6	No	100	80	100	100	95
7	Si	100	80	100	100	95
8	Si	100	0	60	20	45
9	No	100	80	80	100	90
10	No	0	40	40	60	35
11	Si	20	0	40	0	15
12	No	20	100	80	60	65
13	No	60	80	80	80	75
14	Si	100	80	100	100	95
15	No	20	20	60	0	25
16	Si	60	20	20	40	35
Colonización promedio		63.75	60.0	62.5	61.3	

Aunque la totalidad de árboles de estudio presentó colonización ectomicorrízica característica de *Suillus*, no todos los árboles han producido a la fecha esporomas. Esto podría explicarse en términos de variaciones microclimáticas de factores ambientales, tales como la temperatura y la humedad ambiental. Previamente, Sun *et al.* (2019) reportaron en un estudio de *Suillus bovinus* asociado a *Pinus massoniana*, que existe una correlación entre la temperatura y la precipitación pluvial con la producción de esporomas. Estos autores señalaron al mismo tiempo que cuando existe un incremento de estas variables ambientales se aumenta la producción de esporomas. Interesantemente, estos autores señalaron que existe una relación entre la etapa fenológica de crecimiento del árbol con la producción de esporomas, indicando que los esporomas se formaron durante la etapa de elongación de los brotes, la etapa de crecimiento de los brotes y el periodo de crecimiento vegetativo. Es importante mencionar, que la comprensión de los procesos fisiológicos,

ecológicos, bioquímicos y genéticos que pueden estar involucrados en la relación ectomicorrízica, para que la producción en campo se efectúe, se encuentran en etapas tempranas de estudio, tal y como ha sido mencionado por Yamada *et al.* (2017). Dada la presencia de ectomicorrizas de *Suillus* en todos los árboles de estudio se podría elucubrar que, a futuro, existe la posibilidad de que se produzcan esporomas, en aquellos árboles que a la fecha no han producido. Solo el muestreo sistemático los próximos años, demostrará la validez o invalidez de esta hipótesis.

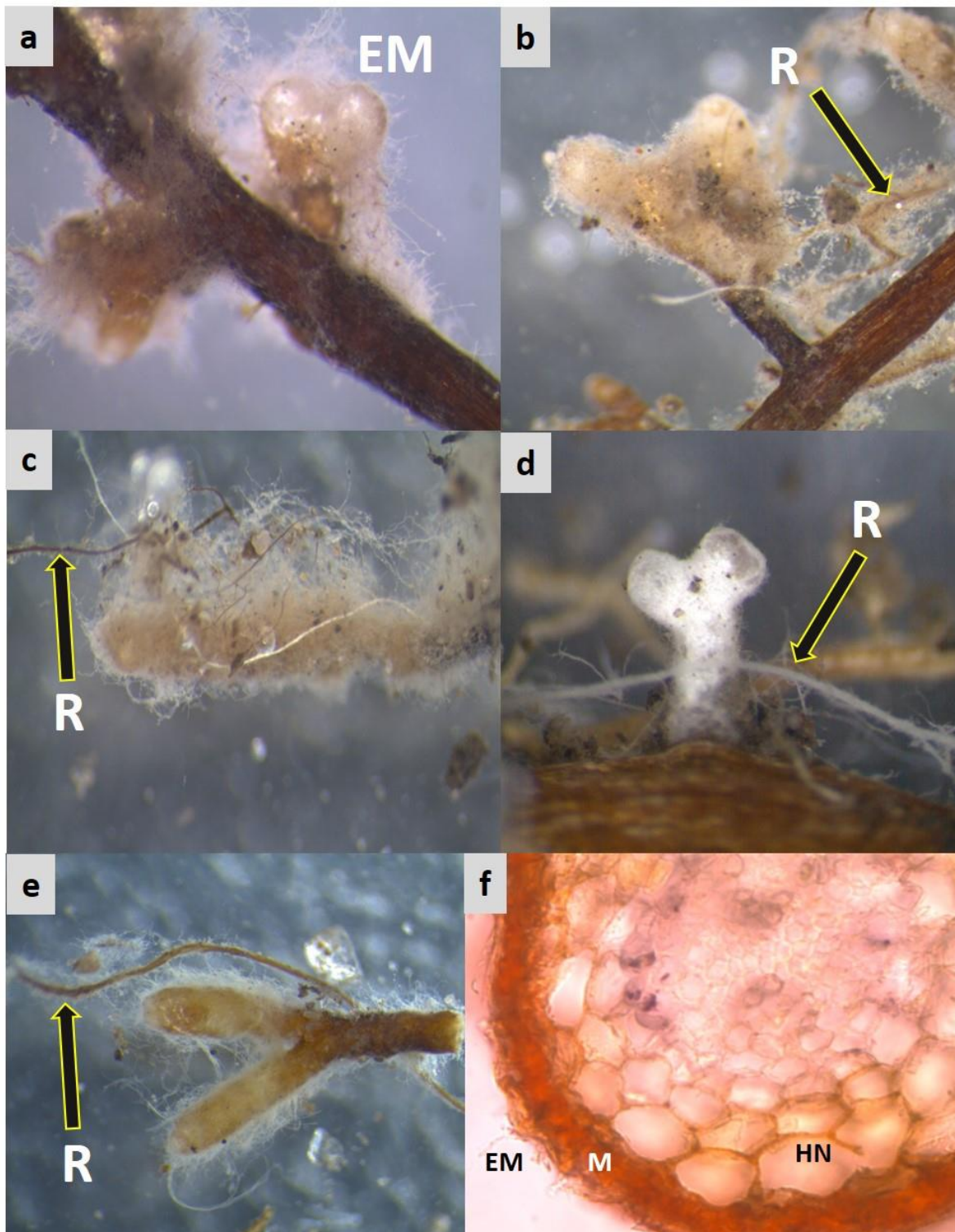


Figura 1.2. Morfotipos recolectados de árboles de *Pinus greggii* de 10 años de edad, mostrando características de *Suillus*, incluyendo la presencia de Rizomorfos (R). a) Morfotipo juvenil mostrando abundante micelio externo (EM) rodeando la raíz ectomicorrizada; b-e) Ectomicorrizas mostrando la abundancia de rizomorfos (R); f) Corte transversal de ectomicorrizas de *P. greggii* mostrando las estructuras características de la simbiosis: micelio externo (EM), manto (M) y red de Hartig (HN).

Por otra parte, la evaluación de colonización ectomicorrízica de las plantas de *Pinus greggii* establecidas en el ensayo de invernadero con muestras de suelo de 45 puntos, paralelos a los árboles plantados, permitió descartar la posibilidad de que *Suillus kaibabensis* se encuentre de manera natural en el banco de inóculo de la zona de estudio, ya que tal y como se esperaba, no se observaron estructuras ectomicorrízicas con características morfoanatómicas afines al género *Suillus* en ninguna de las 45 plantas inoculadas con dicho suelo (Figura 1.3).

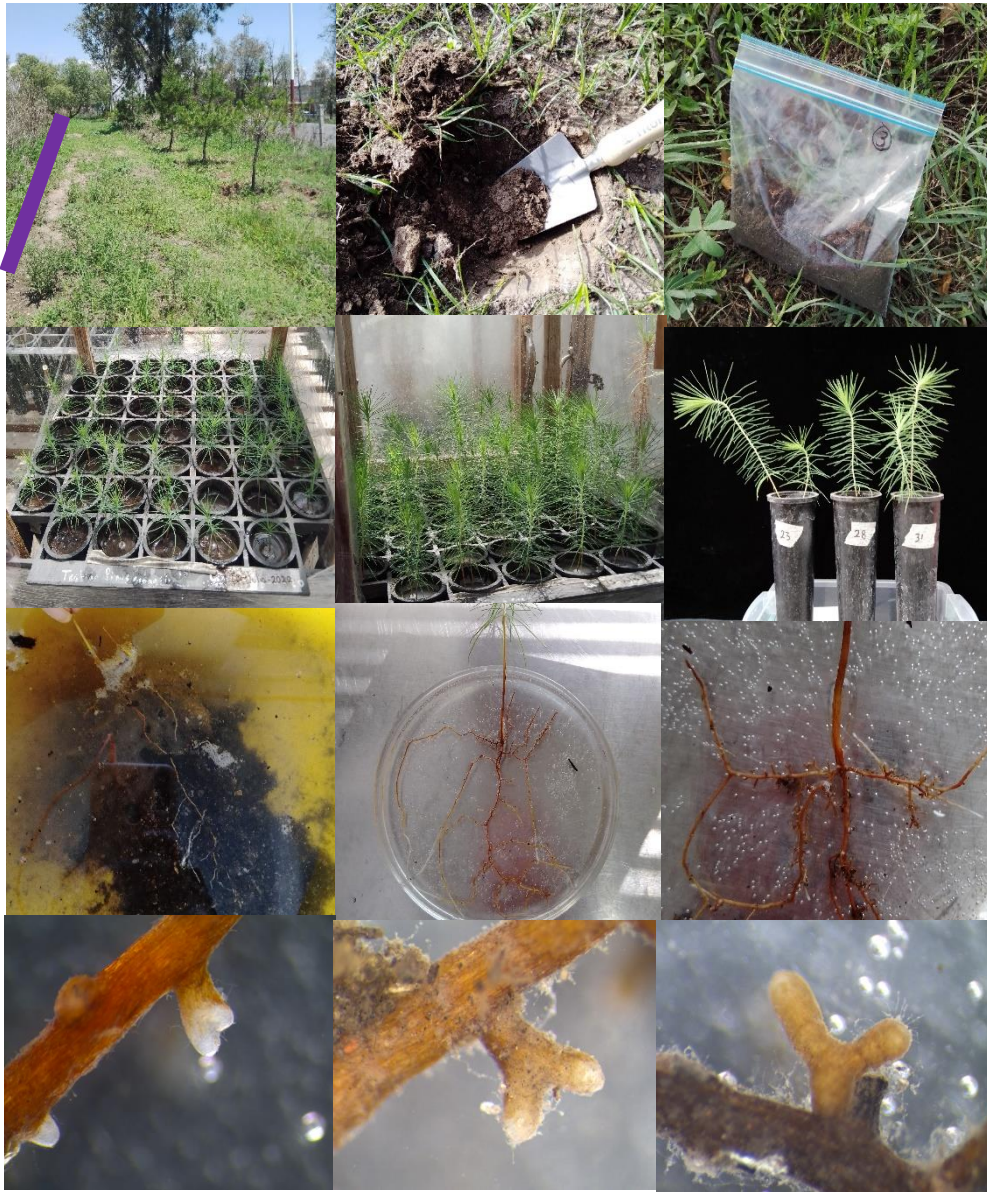


Figura 1.3. Plantas inoculadas con suelo nativo de la zona de estudio y morfotipos observados en las raíces.

1.5.4 Identidad de esporomas

Las características de los esporomas que se registraron correspondieron a las reportadas para *Suillus kaibabensis* Thiers. La descripción macroscópica de dichos esporomas se presenta a continuación:

Píleo de 38-90 mm convexo a plano-convexo; color anaranjado pálido a anaranjado marrón, superficie víscida, margen entero. Himenio adherido, poros de 0.3-0.7 mm de circulares a irregulares de color amarillo sin cambio de color al corte. Tubos de 6-5 mm concoloros con los poros. Contexto de 8-17 mm blanquecino sin cambios de coloración al corte. Estípite de 48-60x9.13 mm cilíndrico a subclavado color blanquecino con glándulas anaranjadas a marrón canela, sin cambio de coloración al maltratarse. Sabor dulce-ácido. Sin olor (Figura 1.4.).

Basidiosporas hialinas a color amarillo pálido en KOH, marrón en reactivo de Melzer, de elipsoides a cilíndricas, lisas, con abundantes gúttulas (7-) 8-12 (13) x 3-4 μm ; Basidios de 3 a 4 esporas, clavados, hialinos en KOH, (18-) 20-24 (26) x 5-7 μm ; Cistidios hialinos en KOH (21-) 23-24 (25) x 4-6 μm ; Queilocistidios clavados, café oscuro en KOH y más oscuros con reactivo de Melzer, (22-) 27-48 (49) x 4-8 μm ; Células centrales hialinas en KOH, 4-6 μm ; Pileipellis con ixotricoderma hialino a café pálido en KOH, gelatinoso, hifas de 5-10 μm ; Stipitipellis gelatinoso, café pálido en KOH, hifas de 5-6 μm (Figura 1.4.).

Estos ejemplares se observaron asociados a *Pinus greggii*. Presentaron un hábito de solitario a gregario. La mayor cantidad de esporomas se presentó en el mes de septiembre. Se realizó una extracción de ADN para obtener la secuencia utilizando LSU (Subunidad grande ribosomal, región amplificada con el primer LROR y LR5) e ITS (Espaciador Transcrito Interno que es una región amplificada con el primer ITS4-ITS5). La identidad taxonómica del ejemplar de estudio presentó una afinidad filogenética de 99% comparada con secuencias de *Suillus kaibabensis* existentes en el GenBank (Cuadro 1.3.).



Figura 1.4. Producción de esporas de *Suillus kaibabensis* en árboles de *Pinus greggii* de 10 años de edad inoculados con dicho hongo. a) Apariencia típica de la producción de esporas en la base de los árboles; b) Esporoma de *S. kaibabensis* mostrando en la base de su estúpito abundante micelio externo; c) Esporomas de *S. kaibabensis* mostrando las estructuras características taxonómicas de la especie en campo; d) Método de recolecta de los esporomas para ser pesados y posteriormente herborizados para su identificación; e) Esporas elípticas características de *S. kaibabensis*; f) Himenio (H), esporas (S) y basidios (B) de *Suillus kaibabensis* cultivados en asociación con *P. greggii*.

Cuadro 1.3. Identificación de los morfotipos presentes en la raíz de *Pinus greggii*, basada en la afinidad filogenética en GenBank.

GenBank ^a	Especies	e	%Id	Coincidencias en NCBI	GenBank ^b
OQ474973	<i>Suillus kaibabensis</i>	0	99.8	<i>Suillus kaibabensis</i>	KX213775
		0	99.7	<i>Suillus kaibabensis</i>	KX213769
		0	99.7	<i>Suillus kaibabensis</i>	M1437058
		0	99.7	<i>Suillus kaibabensis</i>	KX230511

GenBank ^a: número de acceso en GenBank de la secuencia generada en el trabajo, e: probabilidad de error en la identificación, % Id: porcentaje de similitud entre las secuencias. GenBank ^b: número de acceso en GenBank de las secuencias más similares a la muestra de este trabajo.

1.5.5 Crecimiento de árboles

Conforme se ha evaluado el crecimiento de los árboles de estudio se ha observado un incremento tanto de su altura como de su diámetro de tallo. El promedio de altura de los árboles productores es de 322.5 cm. En cuanto al índice de robustez, todos los árboles productores presentan valores menores a seis, esto indica una resistencia de la planta a la desecación por el viento (Cuadro 1.4.). Al ser árboles robustos, bajos y gruesos presentan una mejor adaptación a sitios con limitación de humedad (Sáenz *et al.*, 2014).

Cuadro 1.4. Datos de crecimiento e índice de robustez en los árboles de *Pinus greggii* Engelm productores de *Suillus kaibabensis* Thiers.

No. de árbol	Primera medición (octubre 2019)			Séptima medición (octubre 2022)			Incremento de altura (cm)
	D.T (mm)	Altura (cm)	Índice de robustez	D.T (mm)	Altura (cm)	Índice de robustez	
1	30.0	113	3.76	77.42	218	2.81	105
2	27.6	134	4.85	48.09	103	2.14	-31*
3	39.6	196	4.94	82.75	445	5.37	249
4	57.4	280	4.87	111.41	439	3.94	159
5	59.9	270	4.50	113.02	459	4.06	189
6	38.7	136	3.51	57.5	183	3.18	47
7	55.4	146	2.63	99.96	345	3.45	199
8	51.8	167	3.22	88.18	318	3.60	151
9	36.7	134	3.65	63.28	168	2.65	34
10	40.8	152	3.72	81.93	443	5.40	291
11	34.7	150	4.32	80.89	242	2.99	92
12	13.5	90	6.66	33.04	158	4.78	68
13	32.7	121	3.70	74.53	234	3.13	113
14	44.8	176	3.92	73.71	313	4.24	137
15	20.5	133	6.48	52.2	175	3.35	42
16	34.7	214	6.16	79.52	375	4.715	161

* El incremento de altura presenta un valor negativo dado que la parte superior del árbol se secó en el transcurso de la investigación y la séptima medición toma en cuenta la altura de la rama más larga. D.T: diámetro de tallo.

D.T: Diámetro de tallo

1.6 CONCLUSIONES

Se demuestra que *Suillus kaibabensis* en asociación con *Pinus greggii* tiene la capacidad de formar esporomas en condiciones de campo, en un área que fue un matorral xerófilo y que tiene suelos degradados, dominados por tepetates, cuando se asocia al pino neotropical, *Pinus greggii*. Esto es de gran importancia como elemento a tomarse en cuenta en programas de reforestación dado que adicionalmente, la inoculación con dicho hongo origina un porcentaje de supervivencia de 80% de

los árboles plantados. Por otra parte, la producción de *Suillus kaibabensis*, al ser una especie comestible, puede contribuir al desarrollo forestal sostenible desde las perspectivas ambientales, socioculturales y económicas de las áreas de estudio.

1.7 AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto CONACyT-PRONACES FOP07-2021-03 316198. El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada para realizar sus estudios de Doctorado. Se agradece a la Dra. Beatriz Elena Madrigal, responsable del área de estudio, por su invaluable apoyo para desarrollar la presente investigación, durante toda la duración de la misma.

CONCLUSIONES GENERALES

Se realizó el primer cultivo de un hongo comestible ectomicorrízico en el Neotrópico asociado a un pino nativo de México en condiciones de campo.

Suillus kaibabensis mantuvo la persistencia de morfotipos en las raíces de *Pinus greggii* en todos los árboles que lograron sobrevivir después de 7 años del trasplante a campo. Sin embargo, no todos los árboles que sobrevivieron presentaron producción de esporomas. Debido a que los árboles no productores de esporomas poseen ectomicorrizas características de *Suillus*, existe la posibilidad de que dicha producción se pueda registrar en años posteriores.

La colonización ectomicorrízica no determina la producción de esporomas, dado que se observó que en árboles con porcentajes bajos de colonización se registró producción de esporomas y, por el contrario, los árboles con altos porcentajes de colonización, tuvieron producciones bajas o nulas de esporomas, por lo que se requiere del estudio de una mayor cantidad de factores bióticos y abióticos para comprender los factores disparadores de la formación de esporomas de *Suillus kaibabensis*.

La localización de los esporomas alrededor de los árboles permitió observar que a través del tiempo se incrementa la distancia a la que aparecen con respecto al tallo del árbol, esto indica una mayor exploración del micelio dentro del suelo.

Es un gran reto incrementar la supervivencia en campo de plantas reforestadas en México. Esto se puede lograr con plantas micorrizadas desde invernadero. *Suillus kaibabensis* tiene un gran potencial como fuente de inóculo en los programas de reforestación, aforestación o establecimiento de plantaciones.

Este trabajo demuestra que es factible el cultivo del hongo ectomicorrízico comestible *Suillus kaibabensis* en campo, lo que representa una fuente de alimento para las personas que viven en áreas aledañas a la zona de plantación y tiene un impacto económico y alimenticio, lo cual influye de manera favorable en la seguridad alimentaria.

A nivel mundial, la mayoría de estudios relacionados con el cultivo de hongos se ha realizado en Europa y Asia Oriental; principalmente estos trabajos incluyen las etapas de laboratorio, invernadero y muy pocos han logrado la producción en campo. Es importante que, en México,

dado que ocupa el segundo lugar en diversidad de hongos comestibles silvestres a nivel mundial, se continúe con las investigaciones del cultivo de los hongos comestibles ectomicorrízicos, dadas sus implicaciones en la mitigación del cambio climático, el desarrollo rural sostenible y la seguridad alimentaria al utilizar un recurso genético de enorme valor como alimento, con propiedades nutraceuticas y que incrementa la supervivencia de los árboles en campo, a pesar de que estas investigaciones solo son posibles a largo plazo.

LITERATURA CITADA

- Albuquerque-Martins, R., Carvalho, P., Miranda, D., Goncalves, M. T., Portugal, A. 2019. Edible ectomycorrhizal fungi and Cistaceae. A study on compatibility and fungal ecological strategies. *PLoS ONE*.14: e0226849. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226849>
- Ayala-Vásquez, O., Martínez-Reyes, M., de la Fuente, J. I., Martínez-González, C. R., Flores, A. L., Hernández-Santiago, F., Pérez-Moreno, J. 2022. *Tricholoma colposii* (Tricholomataceae, Basidiomycota), a new edible species of matsutake fungi from eastern Mexico with economic and biocultural importance. *Phytotaxa* 542: 24-34.
- Buscardo, E., Rodríguez-Echeverría, S., De Angelis, P., Freitas, H. 2009. Comunidades de hongos ectomicorrízicos en ambientes propensos al fuego: compañeros esenciales para el restablecimiento de pinares mediterráneos. *Ecosistemas* 18:55-63.
- Camargo-Ricalde, S. L., Montaña, N. M, De la Rosa-Mera, C. J., Montaña S. A. 2012. Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria* 13:1-19.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J. J., Quintero-Lizaola, R., Torres-Aquino, M. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4:567-577.
- Castro-Garibay S. L., Villegas-Monter A., López-Upton J., Sandoval-Villa M., Arévalo-Galarza L. 2022. Effective protocol to increase the percentage of grafting success of *Pinus greggii* Engelm. var. *australis* Donahue et López. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 28: 225-240. doi: 10.5154/r.rchscfa.2021.03.014
- Comandini, O., Rinaldi, A., Kuyper, T. W. 2012. Fungal diversity: a continuous challenge. In: Mycorrhiza: Occurrence in Natural and Restored Environments. Nova Science Pub Inc. UK. pp. 165-200.
- de la Fuente, J. I., Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Ayala-Vásquez, O., Martínez-González, C. R., Aguirre-Acosta, E. 2023. *Elaphomyces readii* (Elaphomycetaceae, Eurotiomycetes), a new medicinal species of hypogeous fungus with biocultural importance from Mexico. *Phytotaxa* 594: 241-250.
- DEEMY. 2023. An Information System for Characterization and DEtermination of EctoMYcorrhizae. Ludwig-Maximilians-Universität München and SNSB – Botanische Staatssammlung München, München, Germany, 2023. [<http://deemy.de/> accessed on May 14, 2023].
- Endo, N., Yamamoto, T., Sugawara, R., Sotome, K., Maekawa, N., Nakagiri, A. 2019. Characterization of Japanese *Lactarius* section *deliciosi* ectomycorrhizae: Toward the use of mycorrhizae for taxonomy and expansion of available cultures. *Mycoscience* <https://doi.org/10.1016/j.myc.2020.06.002>
- García-Rodríguez, J. L., Pérez-Moreno, J., Ríos-Leal, D., Saez-Delgado, P., Atala-Bianchi, C., Sánchez-Olate, M., Pereira-Cancino, G. 2017. *In vitro* growth of ectomycorrhizal fungi

- associated with *Pinus radiata* plantations in Chile. *Revista Fitotecnia Mexicana* 40: 415-423.
- Guerin-Laguette A., Cummings N., Butler R. C., Willows, A., Hesom-Williams N. Li, S., Wang Y. 2014. *Lactarius deliciosus* and *Pinus radiata* in New Zealand: towards the development of innovative gourmet mushroom orchards. *Mycorrhiza* 24:511-523. doi: 10.1007/s00572-014-0570-y
- Guerin-Laguette A., Buttler R., Wang Y. 2020. Advances in the Cultivation of *Lactarius deliciosus* (Saffron Milk Cap) in New Zealand. In *Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World, Perspectives from Ecological, Agricultural and Social Sciences*, Cham, Switzerland. Springer. 141-161.
- Heras-Marcial M., Aldrete, A., Gómez-Guerrero, A., Rodríguez-Trejo D. A. 2023. Influence of fertilization on survival and growth of *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. under nursery and field conditions. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 29: doi: <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2022.03.019>
- Kinoshita, A., Obase, K., Yamanaka, T. 2018. Ectomycorrhizae formed by three Japanese truffle species (*Tuber japonicum*, *T. longispinosum*, and *T. himalayense*) on indigenous oak and pine species. *Mycorrhiza* 28:679–690. <https://doi.org/10.1007/s00572-018-0860-x>
- Martínez-Reyes, M., Carrera-Martínez, A., de la Fuente, J. I., Ríos-García, U., Ortiz-López, I., Ayala-Vásquez, O. 2023. *Xerocomellus perezmorenoi* (Boletaceae, Boletales), a new edible species from Mexico. *Phytotaxa* 584: DOI:10.11646/phytotaxa.584.2.3
- Mestre, M. C., Rosa, C. A., Safar, S.V.B. Libkind, D., Fontenla, S. B. 2011. Yeast communities associated with the bulk-soil, rhizosphere and ectomycorrhizosphere of a *Nothofagus pumilio* forest in northwestern Patagonia, Argentina. *Microbiology Ecology*. 78:531–541.
- Ogawa W., Endo N., Takeda Y., Kodaira M., Fukuda M., Yamada A. 2018. Efficient establishment of pure cultures of yellow chanterelle *Cantharellus anzutake* from ectomycorrhizal root tips, and morphological characteristics of ectomycorrhizae and cultured mycelium. *Mycoscience* 60:45-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.myc.2018.08.003>
- Ogawa, W., Takeda, Y., Endo, N., Yamashita, S., Tkayama, T., Fukuda, M., Yamada, A. 2019. Repeated fruiting of Japanese golden chanterelle in pot culture with host seedlings. *Mycorrhiza* 29:519-530.. <https://doi.org/10.1007/s00572-019-00908-z>
- Pereira, G., Campos, J. L., Chávez, D., Anabalón, L., Arriagada, C. 2014. Caracterización del crecimiento micelial del hongo ectomicorrízico *Lactarius aff. deliciosus* y su simbiosis con plántulas de *Pinus radiata*. *Revista de Ciencias Forestales – Quebracho* 22:30-39.
- Pérez-Moreno, J., Lorenzana, A. F., Carrasco-Hernández, V., Yescas-Pérez, A. 2010. Los Hongos Comestibles Silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. Montecillo, Texcoco, Estado de México: Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACyT. 167p.
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Hernández-Santiago, F., and Ortiz-Lopez, I. Climate change, biotechnology and Mexican Neotropical Edible Ectomycorrhizal Mushrooms . In

- Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World, Perspectives from Ecological, Agricultural and Social Sciences, Cham, Switzerland. Springer, 2020; 61-100p.
- Pérez-Moreno, J., Guerin-Laguette, A., Rinaldi, A. C., Yu, F-Q., Verbeken, A., Hernández-Santiago, F., Martínez-Reyes, M. 2021. Edible mycorrhizal fungi of the world: What is their role in forest sustainability, food security, biocultural conservation and climate change? *Plants People Planet* 3:471–490.
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Martínez-González, C. R., Ramírez-Carbajal, E. Carrera-Martínez, A., de la Fuente, J. I., Olvera-Noriega, J. W., Ayala-Vásquez, O. 2023. Two new species of *Chrogomphus* (Gomphidiaceae, Boletales) with biocultural importance in the Tlahuica-Pjiekakjoo culture from Central Mexico. *Phytotaxa* 579: 289-298.
- Ramírez-Herrera C., Vargas-Hernández J. J., and López- Upton J. 2005. Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. *Acta Botánica Mexicana* 72: 1–16. doi: 10.21829/abm72.2005.997
- Reisa, F. S., Ferreira, C.F.R., Martinsb, A. 2012. Effect of the mycorrhizal symbiosis time in the antioxidant activity of fungi and *Pinus pinaster* roots, stems and leaves. *Industrial Crops and Products* 35:211– 216.
- Sáenz R. J. T., Muñoz F. H., Pérez D., C. M. Á., Rueda S., A. and Hernández R. J. 2014. Calidad de planta de tres especies de pino en el vivero “Morelia”, estado de Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 5: 98-111.
- Sell, J., Kayser, A., Schulin, R., Brunner, I., 2005. Contribution of ectomycorrhizal fungi to cadmium uptake of poplars and willows from a heavily polluted soil. *Plant Soil* 277:245–253.
- Shimomura, N. 2013. Cultivation of gourmet mushroom Shouro (*Rhizopogon roseolus*). Business meeting of Tottori University in Tokyo. [<http://www.cjrd.tottori-u.ac.jp/> consultado el 18 de mayo del 2023).
- Smith, S. E., Read, D. J. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Third edition. Academic Press, New York, USA. (3a Ed.), pp. 349–385.
- Sun, X., Feng, W., Li, M., Shi, J., Ding, G. 2019. Phenology and cultivation of *Suillus bovinus*, an edible mycorrhizal fungus, in a *Pinus massoniana* plantation. *Canadian Journal of Forest Research* 49: 960-968.
- Szuba, A. 2015. Ectomycorrhiza of *Populus*. *Forest Ecology and Management* 347:156–169.
- Tedersoo, L., May, T. W., Smith, M. E. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza* 20:217-63.
- Tudela M. J. W., Martínez D. M. A., Valdivia A. R., Romo L. J. L., Portillo V., M., Rangel G., R. V.2011. Valoración económica de los beneficios de un programa de recuperación y conservación en el Parque Nacional Molino de Flores, México. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*17: 231-244.

- Villegas-Olivera, J. A., Pérez-Moreno, J., Mata, G., Almaraz-Suárez, J. J., Ojeda-Trejo, E., Espinosa-Hernández, V. 2017. Type of light and formation of basidiomata of two species of edible ectomycorrhizal mushrooms associated with neo-tropical pines and the description of basidiomata development. *Revista Fitotecnia Mexicana* 40: 405-413.
- Wang, Y., Chen, Y. L. 2014. Recent advances in cultivation of edible mycorrhizal mushrooms. In: Solaiman, Z., Abbott, L., Varma, A. (eds) *Mycorrhizal fungi: use in sustainable agriculture and land restoration. Soil Biology*, vol 41. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-45370-4_23
- Yamada, A., Ogura, T., Ohmasa, M. 2001a. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza* 11:59–66.
- Yamada, A., Ogura, T., Ohmasa, M. 2001b. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis II. Morphology of mycorrhizas in open-pot soil. *Mycorrhiza* 11:67–81. DOI: 10.1007/s005720000093
- Yamada, A., Furukawa, H., Yamanaka, T. 2017. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms in Japan. *Revista Fitotecnia Mexicana* 40:379-389.
- Yamada, A. 2022. Cultivation studies of edible ectomycorrhizal mushrooms: successful establishment of ectomycorrhizal associations *in vitro* and efficient production of fruiting bodies. *Mycoscience* 63: MYC589. doi: 10.47371/mycosci.2022.08.004
- Yun, W., Hall, I. R. 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany* 82:1063-1073. DOI: 10.1139/b04-051.
- Zulueta, R. R., Trejo, A. D., Trigos, L. A. 2007. El maravilloso mundo de los Hongos. Universidad Veracruzana. Xalapa Veracruz. México. 179 p.