

# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE LA RAÍZ DE *Pinus pseudostrobus* Y *P. patula* Y ESPECIES ECTOMICORRÍZICAS COMESTIBLES DE *Hebeloma* spp. Y *Laccaria* spp.**

**VIOLETA CARRASCO HERNÁNDEZ**

**T E S I S**

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

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MEXICO**

**2010**

La presente tesis titulada: **Aspectos ecofisiológicos de la raíz de *Pinus pseudostrobus* y *P. patula* y especies ectomicorrízicas comestibles de *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp.**, realizada por la alumna Violeta Carrasco Hernández, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

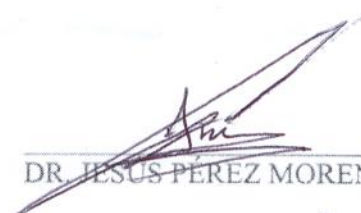
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR


CONSEJERO:

  
DR. VICENTE ESPINOSA HERNÁNDEZ

ASESOR:

  
DR. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESOR:

  
DR. ROBERTO QUINTERO LIZAOLA

ASESORA:

  
DRA. MARGARITA TORRES AQUINO

Montecillo, Texcoco, México, abril 2010

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE LA RAÍZ DE *Pinus pseudostrobus* y  
*P. patula* Y ESPECIES ECTOMICORRÍZICAS COMESTIBLES DE  
*Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp.**

Violeta Carrasco Hernández, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2010

**Resumen**

Un alto porcentaje de mortandad se presenta en pinos que son transplantados de vivero a campo, debido a que no poseen en sus raíces hongos ectomicorrízicos los cuales forman simbiosis obligada con los pinos de forma natural en los bosques. Estos hongos facilitan la absorción de nutrimentos y agua, además de estimular su crecimiento. Debido a la importancia de los hongos ectomicorrízicos, el presente trabajo evaluó el efecto en crecimiento, peso seco, porcentaje de colonización y contenido nutrimental de la inoculación de seis especies ectomicorrízicas comestibles de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* en *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*, en condiciones de invernadero. Las especies inoculadas fueron previamente caracterizadas. Después de 397 días de la siembra se observó un efecto benéfico en el crecimiento de ambos pinos como resultado de la inoculación en términos de peso seco en parte aérea y radical, así como una mayor transferencia de N, P y K. El porcentaje de micorrización en plantas inoculadas con las especies fúngicas varió de 57 % a 90 %. Así mismo se realizó la descripción micromorfológica de las micorrizas presentes en plantas inoculadas. En función de los resultados encontrados y los aspectos ecofisiológicos de las raíces de *Pinus pseudostrobus* y *P. patula* se recomienda la inoculación de ambas especies de pinos con las especies de hongos de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma*.

**Palabras claves:** hongo silvestre, inóculo, micorriza, pinos.

**ECOPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF *Pinus pseudostrobus* AND *P. patula* ROOT  
AND EDIBLE ECTOMYCORRHIZAE SPECIES OF *Hebeloma* spp. y *Laccaria***

**spp.**

Violeta Carrasco Hernández, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2010

**Abstract**

A high percentage of mortality appears in pines that are transplanted from nursery to field, due to the fact that they do not have ectomycorrhizal fungi in their roots which form obligated symbiosis with the pines in natural conditions in the forests. These fungi facilitate the absorption of nutrients and water, and therefore stimulate their growth. Due to the importance of the ectomycorrhizal fungi, the present work evaluated the effect in terms of growth, dry weight, percentage of colonization and nutrimental content as a result of the inoculation of six edible ectomycorrhizal fungi included in the genera *Laccaria* and *Hebeloma* on *Pinus patula* and *P. pseudostrobus* under greenhouse conditions. The inoculated species previously were characterized. 397 days after sowing, it was observed a beneficial effect in terms of growth and dry weight of aerial and radical part, as well as a greater transference of N, P and K of both pines as a result of the inoculation. The percentage of mycorrhization in plants inoculated with the fungi species ranged from 57% to 90%. Also the micromorpholy description of the mycorrhiza presented in plants inoculated was realised. According to these results found and the ecophysiological root of *Pinus pseudostrobus* y *P. patula*, the inoculation of both studied pines is recommended with the fungal species of the genera *Laccaria* and *Hebeloma*.

**Key words:** fungi wild, inoculum, mycorrhiza, pines.

## **DEDICATORIAS**

*A mis padres por darme lo mejor de ellos. A mi Madre, por su trabajo y dedicación brindados para mi formación. A mi Padre por confiar en mí, por su comprensión y apoyo.*

*A mi hermana, por brindarme siempre una palabra de aliento en los momentos más difíciles y por los buenos recuerdos.*

*A mi hermano Gabriel, por los momentos felices de nuestra niñez.*

*A Víctor Manuel Duarte Zaragoza por los gratos momentos que compartimos.*

*Al Dr. Jesús Pérez Moreno por sus sabios consejos, su valiosa amistad y el apoyo brindado en todo momento.*

*Al Dr. Juan José Almaraz Suárez, por brindarme su amistad y confianza.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo en el financiamiento de la maestría, así mismo a todo el pueblo mexicano que con su aporte económico a través de esta institución tuvo la oportunidad de adquirir esta beca.

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

Al Dr. Vicente Espinosa Hernández, por su apoyo y consejos brindados durante mi estancia en el colegio.

Al Dr. Roberto Quintero Lizaola y la Dra. Margarita Torres Aquino por su apoyo brindado en el presente trabajo.

A M.C. Juliana Padilla Cuevas, del Laboratorio de Fertilidad de Suelos, por su asesoramiento en la determinación de Nitrógeno, Fósforo y Potasio.

Al Dr. Jorge Valdez Carrasco, por su amable asesoramiento en la toma de fotografías y en el manejo del programa Adobe Photoshop CS.

A Magdalena Reyes Martínez y Víctor Perea Estrada, por compartir sus conocimientos conmigo.

A mis amigos: Rosalba Argumedo Arguello, Magdalena Martínez Reyes, Víctor Perea Estrada, Ariadna Sánchez López, Ana L. Bautista Olivas, Ruth Sandoval, Gabriela Viveros y Luís Manuel Carrillo López por brindarme su amistad sincera.

# INDICE GENERAL

	<b>Páginas</b>
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
INDICE GENERAL.....	1
INDICE DE CUADROS.....	3
INDICE DE FIGURAS.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Hongos micorrízicos.....	6
2.1.1. Producción de reguladores de crecimiento.....	6
2.1.2. Protección contra enfermedades.....	6
2.2. Definición de micorriza.....	7
2.3. Definición de ectomicorriza.....	10
2.3.1. Descripción del género <i>Hebeloma</i> .....	10
2.3.2. Descripción del género <i>Laccaria</i> .....	12
2.4. Importancia de la ectomicorriza en la propagación de plantas en viveros.....	13
2.5. Criterios de selección de hongos ectomicorrízicos comestibles.....	14
2.6. Hongos ectomicorrízicos en especies forestales.....	15
2.6.1. Descripción de <i>Pinus patula</i> .....	16
2.6.2. Descripción de <i>Pinus pseudostrabus</i> .....	17
III. OBJETIVOS.....	19
3.1 Objetivo general.....	19
3.1.1 Objetivos particulares.....	19
IV. HIPÓTESIS.....	20
4.1 Hipótesis general.....	20
4.1.1 Hipótesis particulares.....	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1. Descripción del experimento.....	21
5.2. Diseño experimental.....	21
5.3. Montaje del experimento.....	22
5.3.1. Identificación y descripción de los hongos de <i>Hebeloma</i> spp. y <i>Laccaria</i> spp. .....	22
5.3.2. Preparación de inóculo.....	22
5.3.3. Dispositivos experimentales.....	23
5.3.4. Desinfección de semilla y tubetes.....	23
5.3.5. Sustrato para la siembra de <i>Pinus</i> sp. ....	24
5.3.6. Siembra e inoculación de <i>Pinus</i> sp. ....	26
5.4. Variables evaluadas.....	26
5.4.1. Conteo de raíces cortas.....	26

5.4.2. Análisis de nutrientes (N, P y K).....	27
5.5. Caracterización micromorfológica de raíces cortas y toma de fotografías.....	28
5.6 Análisis estadístico .....	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
6.1. Descripción de esporomas de <i>Hebeloma</i> spp. y <i>Laccaria</i> spp. ....	30
6.1.1. Descripción de esporomas de <i>Hebeloma</i> spp. ....	30
6.1.2. Descripción de esporomas de <i>Laccaria</i> spp. ....	35
6.2. Caracterización micromorfológica de raíces cortas.....	40
6.2.1. Caracterización micromorfológica de <i>Hebeloma</i> spp.....	40
6.2.2. Caracterización micromorfológica de <i>Laccaria</i> spp.....	47
6.3 Variables evaluadas .....	54
6.3.1 Peso seco.....	54
6.3.2 Colonización micorrízica.....	56
6.3.3 Altura y diámetro .....	58
6.3.4 Contenido nutrimental .....	60
6.3.5 Discusión .....	65
VII. CONCLUSIONES .....	72
VIII. LITERATURA CITADA .....	73



## INDICE DE CUADROS

### Páginas

<b>Cuadro 1.</b> Resultados de la síntesis en cultivos puros de <i>Hebeloma mesophaeum</i> , <i>H. alpinum</i> y <i>H. leucosarx</i> en <i>Pinus virginiana</i> .....	12
<b>Cuadro 2.</b> Género y familias de plantas que forman ectomicorrizas con especies de <i>Laccaria</i> ...	13
<b>Cuadro 3.</b> Combinaciones de especies fúngicas en los tratamientos para <i>Pinus patula</i> y <i>P. pseudostrobus</i> .....	22
<b>Cuadro 4.</b> Comparación de características diagnósticas en <i>Hebeloma leucosarx</i> , <i>H. mesophaeum</i> y <i>H. alpinum</i> .....	32
<b>Cuadro 5.</b> Características diagnósticas de <i>Hebeloma mesophaeum</i> (Arora, 1979).....	33
<b>Cuadro 6.</b> Comparación de las características diagnósticas de las especies de <i>Laccaria proxima</i> , <i>L. laccata</i> y <i>L. bicolor</i> .....	36
<b>Cuadro 7.</b> Comparación de las características diagnósticas de las especies de <i>Laccaria</i> spp., según Mueller, (1992).....	38
<b>Cuadro 8.</b> Características distintivas entre las especies de <i>Hebeloma mesophaeum</i> , <i>H. alpinum</i> , y <i>H. leucosarx</i> de las raíces micorrizadas en <i>Pinus patula</i> y <i>P.pseudostrobus</i> .....	42
<b>Cuadro 9.</b> Características distintivas de <i>Hebeloma mesophaeum</i> de acuerdo a Agerer y Rambold, 2009.....	43
<b>Cuadro 10.</b> Características distintivas entre las especies de <i>Laccaria laccata</i> , <i>L. bicolor</i> y <i>L. proxima</i> de las raíces cortas micorrizadas en <i>Pinus patula</i> y <i>P.pseudostrobus</i> .....	49
<b>Cuadro 11.</b> Características micromorfológicas de las raíces cortas micorrizadas con <i>Laccaria</i> spp., reportados en estudios previos.....	50
<b>Cuadro 12.</b> Porcentaje de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas y muertas.....	57
<b>Cuadro 13.</b> Porcentajes de colonización micorrízica total y por especie fúngica.....	58
<b>Cuadro 14.</b> Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio totales en <i>Pinus patula</i> .....	62
<b>Cuadro 15.</b> Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio totales en <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	63

## INDICE DE FIGURAS

### Páginas

<b>Figura 1.</b> Tipos de micorrizas.....	9
<b>Figura 2.</b> Principales géneros de la familia de las Cortinariáceas.....	11
<b>Figura 3.</b> Distribución natural de <i>Pinus patula</i> en México.....	17
<b>Figura 4.</b> Distribución de <i>Pinus pseudostrobus</i> en México.....	18
<b>Figura 5.</b> Preparación de inóculo.....	25
<b>Figura 6.</b> Fotos taxonómicas de <i>Hebeloma</i> sp.....	34
<b>Figura 7.</b> Fotos taxonómicas de <i>Laccaria</i> sp.....	39
<b>Figura 8.</b> Micromorfología de <i>Hebeloma leucosarx</i> .....	44
<b>Figura 9.</b> Micromorfología de <i>Hebeloma mesophaeum</i> .....	45
<b>Figura 10.</b> Micromorfología de <i>Hebeloma alpinum</i> .....	46
<b>Figura 11.</b> Micromorfología de <i>Laccaria proxima</i> .....	51
<b>Figura 12.</b> Micromorfología de <i>Laccaria laccata</i> .....	52
<b>Figura 13.</b> Micromorfología de <i>Laccaria bicolor</i> .....	53
<b>Figura 14.</b> Peso seco de <i>Pinus patula</i> y <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	55
<b>Figura 15.</b> Altura de <i>Pinus patula</i> y <i>P. pseudostrobus</i> .....	59
<b>Figura 16.</b> <i>Pinus patula</i> y <i>P. pseudostrobus</i> con y sin inoculación.....	64

## I. INTRODUCCIÓN

La explotación de los recursos micológicos de los bosques es un hecho relativamente reciente que tiene una gran importancia económica (Royo *et al.*, 1998). Además, los hongos ectomicorrízicos comestibles, poseen una gran relevancia ecológica debido a su enorme importancia en la estructura y función de los ecosistemas forestales, incluyendo la transferencia de agua y nutrientes hacia los árboles asociados (Pérez-Moreno y Read 2004; Smith y Read, 2008). La utilización de plantas ectomicorrizadas en el sector forestal es de gran interés actualmente desde el punto de vista tanto económico como ecológico al contribuir al mantenimiento del equilibrio biológico natural de las áreas forestales. Adicional a su gran relevancia ecológica, la posibilidad de producir especies de hongos comestibles micorrízicos de importancia económica puede aumentar el interés de los propietarios privados por la reforestación y de esta forma podrían revalorizarse áreas marginales actualmente abandonadas. Sin embargo, a pesar de su gran interés existen aspectos básicos que han recibido escasa atención tales como el efecto de la inoculación sola, y primordialmente simultánea, con especies de hongos ectomicorrízicos comestibles en árboles forestales, principalmente del neotrópico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la inoculación sola o combinada de seis especies de hongos ectomicorrízicos comestibles de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* en el crecimiento y contenido nutrimental de dos pinos de gran importancia económica, *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*. Así mismo se realizó la caracterización de los carpóforos y morfotipos de cada especie fúngica estudiada.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Hongos micorrízicos**

Un hongo micorrízico, es aquel que tiene la capacidad de asociarse y formar una simbiosis, llamada micorriza, con las raíces de una planta (Martínez y Pugnaire, 2009).

En general, los hongos micorrízicos y en particular los ectomicorrízicos, realizan diversas aportaciones positivas a las plantas con las que se asocian, participan en la absorción de agua y nutrientes, ayudan a las plantas a absorber aquellos que son difícilmente aprovechables por los pelos absorbentes de las raíces de las plantas, por lo que las plantas ectomicorrizadas presentan un mayor grado de tolerancia a los suelos con baja fertilidad y a las condiciones de extrema sequedad (Trappe, 1987).

#### **2.1.1. Producción de reguladores de crecimiento**

De acuerdo con Cuesta (2009), los hongos ectomicorrízicos producen diversas hormonas como auxinas, fitoquininas y otros compuestos, que afectan positivamente al desarrollo de la planta micorrizada (movilización de nutrientes, iniciación del crecimiento de las raíces después de la parada invernal, etc.).

#### **2.1.2. Protección contra enfermedades**

Existen diferentes mecanismos por los que pueden llegar a actuar las micorrizas contra los diversos agentes patógenos; en primer lugar se podría considerar que actúan como una barrera física, impidiendo que en el lugar ocupado por ellas se instale cualquier otro agente perjudicial (Españeira *et al.*, 2001). Otro mecanismo es la producción de compuestos fungiestáticos y antibióticos que pueden eliminar al patógeno en caso de que

consiguiera instalarse (Cuesta, 2009). Aunque de acuerdo con Le Tacon (1985) el efecto más importante sea el aumento de la tolerancia de la planta contra los patógenos como consecuencia de los cambios fisiológicos causados por la simbiosis micorrízica en la misma.

Los hongos micorrízicos que acompañan a las diferentes especies forestales varía con la edad de los árboles, las especies fúngicas con mayor interés gastronómico y económico son la *Amanita caesarea*, *Boletus* del grupo *edulis* (*B. edulis*, *B. pinophilus*, *B. reticulatus* y *B. aereus*), *Lactarius deliciosus*, etc. Estas especies aparecen cuando los árboles con las que micorrizan han superado las fases iniciales de su desarrollo. En las fases iniciales los hongos que se pueden encontrar son: *Laccaria bicolor*, *L. laccata*, *Suillus granulatus*, *S. luteus*, *Thelephora terrestris*, diversas especies del genero *Rhizopogon*, etc. (Martínez y Fernández, 1997).

## **2.2. Definición de micorriza**

La micorriza es una asociación mutualista entre los hongos del suelo y raíces de las plantas superiores. El término micorriza (del griego mico=hongo y riza=raíz) “Hongo de la raíz”, fue acuñado por primera vez en 1885 por el botánico alemán Frank, para describir la unión de dos organismos que forman un solo órgano morfológico, en donde existe una retroalimentación de los simbioses (Agarwal y Sah, 2009).

La micorriza le confiere diversos atributos a la planta como la estimulación en crecimiento debido al incremento en absorción de nutrientes, tolerancia de la planta a condiciones adversas y biocontrol de enfermedades de la raíz (Molina *et al.*, 1992).

El establecimiento de la asociación micorrízica provoca cambios estructurales en los participantes (hongo-planta), tal como el desarrollo de la interfase, sitio donde se lleva a cabo el intercambio de nutrimentos en ambas direcciones (Peterson y Bonfante, 1994), así como la formación de las estructuras fúngicas que caracterizan a cada tipo, las cuales se describen a continuación (Nava-Gutiérrez y Hernández-Cuevas, 2003):

**Red de Hartig:** entramado de hifas intrarradicales que rodea a las células corticales formando una especie de laberinto entre células adyacentes. Su función principal es el intercambio de nutrimentos del hongo a la planta y viceversa.

**Manto:** Agregación extrarradical de hifas que producen una capa que cubre la superficie de la raíz, excepto en el ápice. Es una barrera que protege a la planta del ataque de organismos patógenos, en la que se almacena sustancias de reserva y minerales como el N.

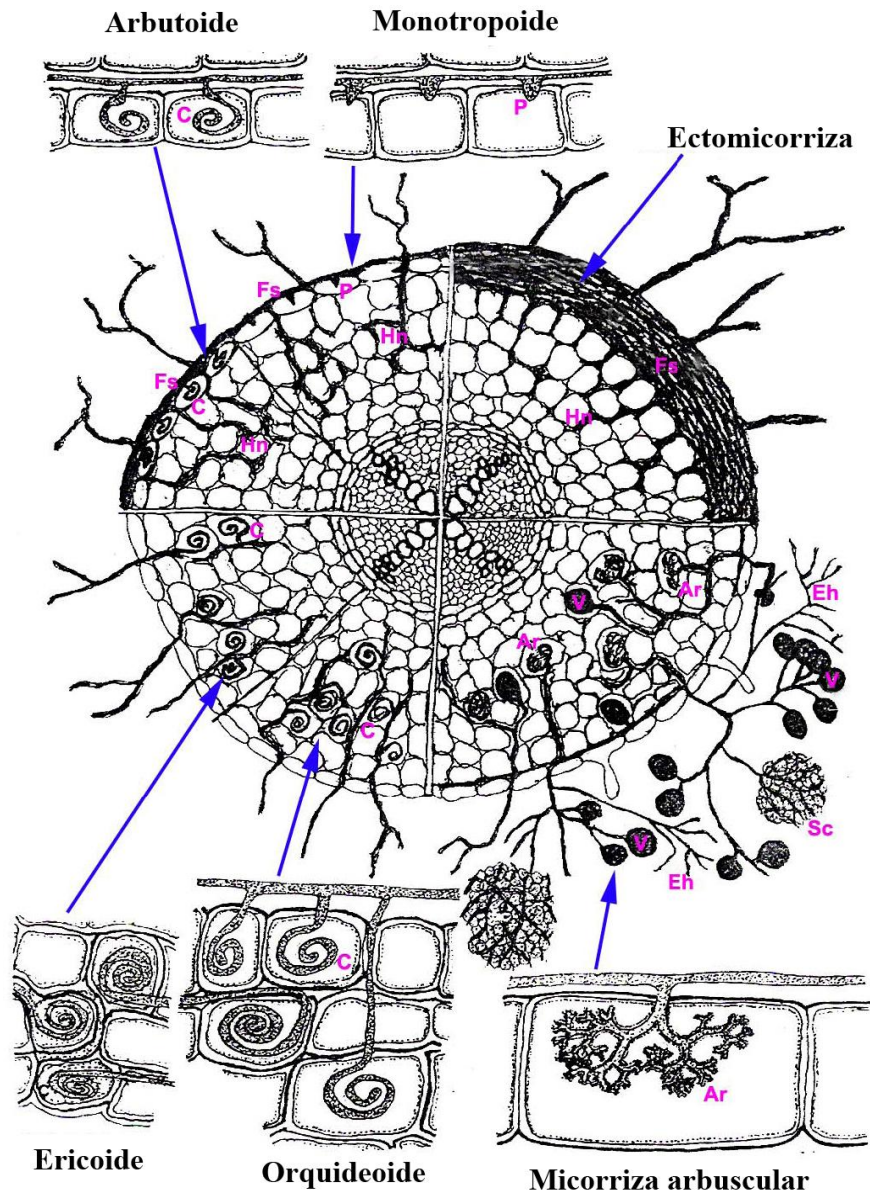
**Vesícula:** ensanchamiento intrarradical o terminal de la hifa que da lugar a una estructura globosa, ubicada inter o intracelularmente. Funciona como sitio de almacenamiento de lípidos de reserva para el desarrollo del hongo.

**Enrollamiento hifal:** Crecimiento helicoidal de las hifas dentro de las células corticales. En orquídeas y ericoide se encarga del intercambio de nutrimentos.

**Arbúsculo:** hifas intracelulares altamente ramificadas que dan el aspecto de árboles dentro de las células corticales. Constituye el sitio de intercambio de nutrimentos entre los simbioses.

Considerando las estructuras descritas anteriormente y de acuerdo con el grado de penetración del hongo en la raíz del hospedero, Smith y Read (1990) clasificaron las

micorrizas en (Figura 1): arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutoide, monotropoide, ericoide y orquideoide.



**Figura 1.** Tipos de micorrizas. Ar=arbusculares, C=enrollamiento hifal, Eh=hifa extramatricial, Hn=red de Hartig, Fs=manto, P=protusión, Sc=esclerotia, V=vesículas.  
Fuente: (Agarwal y Sah, 1990).

### **2.3. Definición de ectomicorriza.**

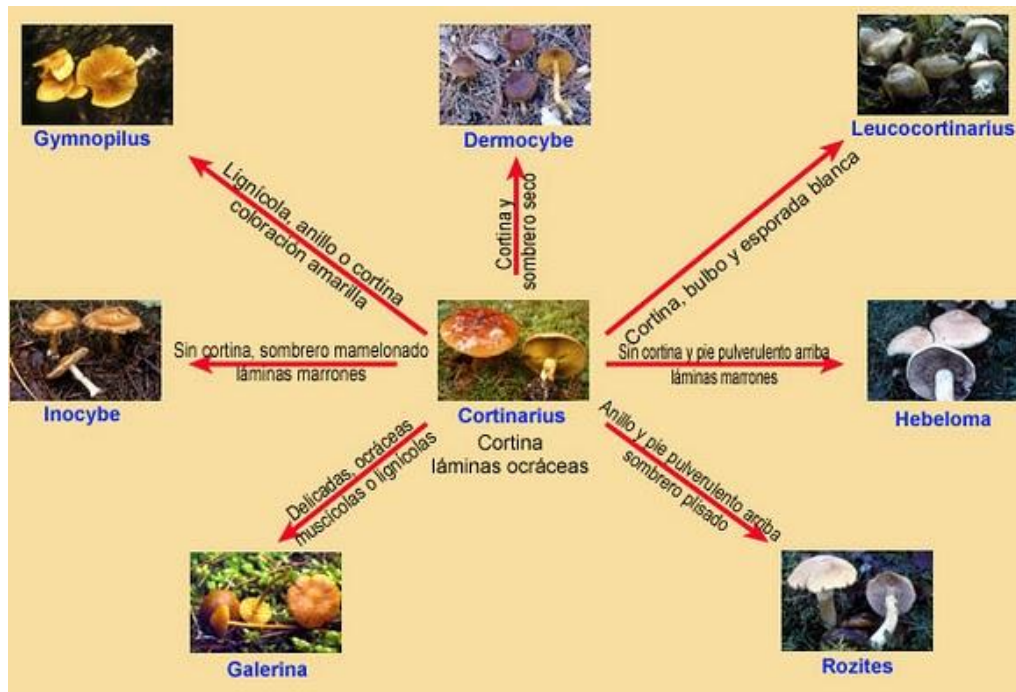
El término de ectomicorriza es una asociación mutualista que se establece entre ciertos grupos de hongos del suelo y algunas plantas que pertenecen a varias familias de coníferas y dicotiledóneas. La ectomicorriza consiste en un sistema de hifas y micelio que conecta a las raíces de las plantas ectomicorrizógenas con las estructuras reproductivas de los hongos (Kong-Luz, 2003). Las raíces con ectomicorriza se caracterizan por la presencia de tres estructuras según Smith y Read (2008) (Figura 1): Manto, Red de Hartig y micelio externo (crecimiento externo de hifas, el cual forma la conexión esencial entre el suelo y los esporocarpos del hongo, formando las ectomicorrizas).

Dos de los géneros de hongos ectomicorrizicos que fueron empleados en este trabajo, fueron *Hebeloma* sp. y *Laccaria* sp., los cuales se adquirieron en el mercado de Ozumba debido a su alta disponibilidad, fácil crecimiento y por reportes previos que señalan los beneficios que pueden traer a las especies forestales.

#### **2.3.1. Descripción del género *Hebeloma***

El género *Hebeloma* sp. pertenece a la familia de las Cortinariáceas (Figura 2), que comprende una gran variedad de setas de esporada ocre, marrón o color óxido (excepcionalmente blanca en *Leucocortinarius*), la mayoría de porte medio a grande y carnosas, con láminas siempre escotadas o libres, pie central y bien desarrollado y cutícula del sombrero seca o viscosa, pero de estructura microscópica filamentosa (García-Bona, 2009).





**Figura 2.** Principales géneros de la familia de las Cortinariáceas  
(Fuente: García-Bona, 2009)

El género *Hebeloma* sp. se encuentra distribuido en norte América, México, hemisferio norte mediterráneo, Europa, Asia y Australia. Durante el período de 1987 a 1997, aproximadamente 70 nombres de especies de *Hebeloma* fueron anexados a la lista del índice micológico. A nivel mundial el número de especies de *Hebeloma* se estima que es de 250 a 600 especies. Cabe mencionar que la mayoría de publicaciones son de *Hebeloma crustuliniforme* y *H. cylindrosporun* (Cairney y Chambers, 1999).

La mayoría de especies de *Hebeloma* son consideradas ectomicorrízicas. En el trabajo realizado por Hacskaylo y Bruchet en 1972 determinaron la capacidad de formación micorrízica de 26 especies de *Hebeloma*, crecido en cultivo puro con *Pinus virginiana*. Dentro del grupo de especies que estudiaron se encuentran *Hebeloma mesophaeum*,

*H. alpinum* y *H. leucosarx*. Los resultados que obtuvieron con respecto a estas tres especies se muestran en el (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Resultados de la síntesis en cultivos puros de *Hebeloma mesophaeum*, *H. alpinum* y *H. leucosarx* en *Pinus virginiana*.

Especie de <i>Hebeloma</i>	Propagación del micelio en el substrato	Conversión de raíces cortas en micorrizas	Penetración micelial de raíces cortas	Habitat natural de la asociación fanerógama
<i>H. mesophaeum</i>	Dos tercios del substrato	Dos tercios del substrato	Mas allá de la primera capa de corteza celular	<i>Salix</i> sp., <i>Betula</i> sp., <i>Alnus</i> sp.
<i>H. alpinum</i>	Solo alrededor del sitio de inoculación	Menos de una tercera parte	Mas allá de la primera capa de corteza celular	<i>Salix retusa</i> , <i>Dryas octopetala</i> , <i>Pinus montana</i> , <i>Ranunculus alpestris</i>
<i>H. leucosarx</i>	Solo alrededor del sitio de inoculación	Menos de una tercera parte	En la primera capa de la corteza celular	<i>Salix aurita</i>

Fuente: (HacsKaylo y Bruchet, 1972)

### 2.3.2. Descripción del género *Laccaria*

El género *Laccaria* es fácilmente definido debido a las características de sus láminas que son anchas, gruesas, separadas y libres e incluso decurrentes, se caracteriza por su color de rosa cárneo y de violáceo más o menos intenso, de esporas esferoides, elipsoides o amigdaliformes y verrugosas o espinosas, micelio a veces coloreado de violeta (Castro-Cerceda y Freire, 1984).

El género *Laccaria* (Agaricales) es cosmopolita, puesto que se encuentra en los cinco continentes. Mueller (1992) reconoce 19 especies para norte América y tentativamente

40 a nivel mundial. Las especies de *Laccaria* forman ectomicorrizas con un amplio rango de huéspedes (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Género y familias de plantas que forman ectomicorrizas con especies de *Laccaria*.

<i>Pinaceae</i>	<i>Dipterocarpaceae</i>	<i>Myrtaceae</i>
<i>Pinus</i>	<i>Dipterocarpus</i>	<i>Eucalyptus</i>
<i>Larix</i>	<i>Fagaceae</i>	<i>Leptospermum</i>
<i>Picea</i>	<i>Betula</i>	<i>Tiliaceae</i>
<i>Pseudotsuga</i>	<i>Fagus</i>	<i>Tilia</i>
<i>Tsuga</i>	<i>Nothofagus</i>	<i>Salicaceae</i>
<i>Abies</i>	<i>Quercus</i>	<i>Salix</i>

Fuente (Mueller, 1992)

#### 2.4. Importancia de la ectomicorriza en la propagación de plantas en viveros

En la mayoría de bosques templados y boreales las especies de árboles presentes forman asociaciones ectomicorrízicas (Jonsson *et al.*, 2001). Estas asociaciones son la principal contribución a la biodiversidad de suelos y al funcionamiento del ecosistema, son reguladores de la productividad y composición en bosques (Smith y Read, 1997). De tal manera, resulta importante integrar a los programas de reforestación, plántulas previamente inoculadas con micorrizas sobre todo en suelos altamente degradados, puesto que la posibilidad de que existan micorrizas en estos tipos de suelos es reducida. Se ha estimado que existen más de 5 000 especies de hongos involucrados en la formación ECM, que pertenecen a Basidiomicetes y Ascomicetes y alrededor de 200 plantas (Agarwal y Sah, 2009).

Algunas especies de hongos ectomicorrízicos pueden ser cultivados en laboratorio para su posterior utilización en micorrizaciones controladas de plantas en vivero, siendo necesario determinar las condiciones y técnicas culturales que permitan la optimización de esta simbiosis hongo-planta. Por ello la adecuada selección de las especies de hongos

micorrízicos como simbioses y su posterior manipulación, tanto en laboratorio como en vivero, pueden ser aspectos claves para lograr con éxito el establecimiento de especies vegetales en campo (Honrubia, *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 2007).

Actualmente la mayoría de las investigaciones sobre inoculación con hongos ectomicorrízicos se basan en dos premisas para su funcionamiento: 1) Cualquier asociación ectomicorrízica en plantas de semillero de árbol es mucho mejor que ninguna asociación. 2) Las especies de hongos ectomicorrízicos son más benéficas en los árboles bajo ciertas condiciones ambientales que otros (Agarwal y Sah, 2009).

## **2.5. Criterios de selección de hongos ectomicorrízicos comestibles**

En México, más de 200 especies de hongos comestibles silvestres son consumidas, de las cuales más de 100 son comercializadas en mercados locales regionales y de mayoristas (Pérez-Moreno *et al.*, 2008).

Para la preparación de inóculo ectomicorrízico, mediante esporocarpos como la realizada en el presente trabajo, se debe contar con grandes cantidades de estos. Una opción viable en la adquisición de especies ectomicorrízicas comestibles es en los diferentes mercados tradicionales de México.

En el mercado Ozumba, Edo. de México existe una gran diversidad de especies fúngicas ectomicorrízicas comestibles. En dicho mercado de acuerdo a estudios realizados por Pérez-Moreno *et al.* (2008) encontraron en mayor abundancia las siguientes especies: *Helvella lacunosa*, *Amanita caesarea complex*, *A. rubescens*, *Boletus edulis complex*, *B. pinophilus complex*, *Cantharellus cibarius*, *Clavulina cinerea*, *Clitocybe gibba*, *Gomphus floccosus*, *Gymnopus dryophilus*, *Hebeloma sp.* *Laccaria laccata*, *L. bicolor*,

*Lactarius salmonicolor*, *Lyophyllum decastes*, *Ramaria sanguinea*, *R. rubrievanescens*, *Russula* cf. *delica*, y *Tricholoma* sp. De los cuales todos son ectomicorrízicos a excepción de *Gymnopus dryophilus*.

## **2.6. Hongos ectomicorrízicos en especies forestales**

La simbiosis ectomicorrízica (ECM) se establece entre unas 3000 especies de plantas y alrededor de 5000 especies de hongos, principalmente basidiomicetos y ascomicetos (Santiago-Martínez *et al.*, 2003). Las especies forestales dependen de la simbiosis ECM, incluyendo pinos, para poder desarrollarse y efectuar sus actividades metabólicas (Meyer, 1973). La presencia de ectomicorrizas es un prerequisite fundamental para el crecimiento normal de las especies de *Pinaceas*. El beneficio de las micorrizas varía con las condiciones ambientales y con la asociación particular de las especies involucradas en la simbiosis mutualista (Bledsoe, 1992).

Se cree que al menos un 3% de las plantas vasculares desarrollan ectomicorrizas, entre las cuales se encuentran especies de gran importancia forestal, en particular todas las de las familias *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae*, *Salicaceae*, etc., y muchos de las familias *Ericaceae*, *Cistaceae*, *Leguminosae*, *Rosaceae*, etc. Existen familias taxonómicas completas, como la de las *Pinaceas*, que son micorrízicas obligadas, no pudiendo subsistir si no se encuentran asociadas a alguna especie fúngica (Cuesta, 2009).

Las plántulas ectomicorrizadas son resistentes al estrés hídrico (Boyd *et al.*, 1986). Por ello, un buen desarrollo de los hongos ectomicorrízicos en las raíces se reflejará en una mayor supervivencia y mejor establecimiento en las plantaciones (Castellano y Molina, 1989). Marx *et al.* (1994), resaltaron la importancia de la inoculación desde el vivero

con hongos ectomicorrízicos seleccionados para mejorar el establecimiento de plantas en campo, en sitios rutinarios o adversos.

Los hongos forestales comestibles que se comercializan son, en su mayor parte, micorrízicos estrictos (Ladrah, 1995), necesitando la existencia de algunas especies forestales en particular (Oria, 1991). Termoshuizen, (1991) reportó la presencia de ectomicorrizas en varias especies de *Pinus*, por lo que se convierten en organismos de alto valor ecológico.

### **2.6.1. Descripción de *Pinus patula***

*Pinus patula* Schiede & Deppe, conocido como pino pátula, pino china u ocote es nativo de América Central. Estos árboles pueden alcanzar de 20 - 40 m de altura y un diámetro de hasta 1 m. En México (Figura 3), se encuentra principalmente en Querétaro, Hidalgo, México, Puebla y Veracruz (Martínez, 1948). La subespecie *tecunumanii* se encuentra distribuida de manera natural desde el sur de México hasta el oeste de Nicaragua (Birks y Barnes, 1990).

El *Pinus patula* por lo general se encuentra distribuido desde regiones cálidas a frescas, con temperaturas máximas y mínimas de 20 a 29 °C y 6 a 12 °C, respectivamente. El *Pinus patula* prospera como una especie exótica en áreas en donde no ocurren heladas y donde la precipitación es de por lo menos 750 mm, la cual ocurre principalmente durante el verano (Gillespie, 1992). Crece con éxito en una gran variedad de suelos, prefiriendo los suelos acídicos profundos y húmedos, usualmente en arcillas arenosas y a elevaciones que van de 1400 a 3200 m sobre el nivel promedio del mar (Webb *et al.*, 1984).



**Figura 3.** Distribución natural de *Pinus patula* en México  
 Fuente: (Gillespie, 1992)

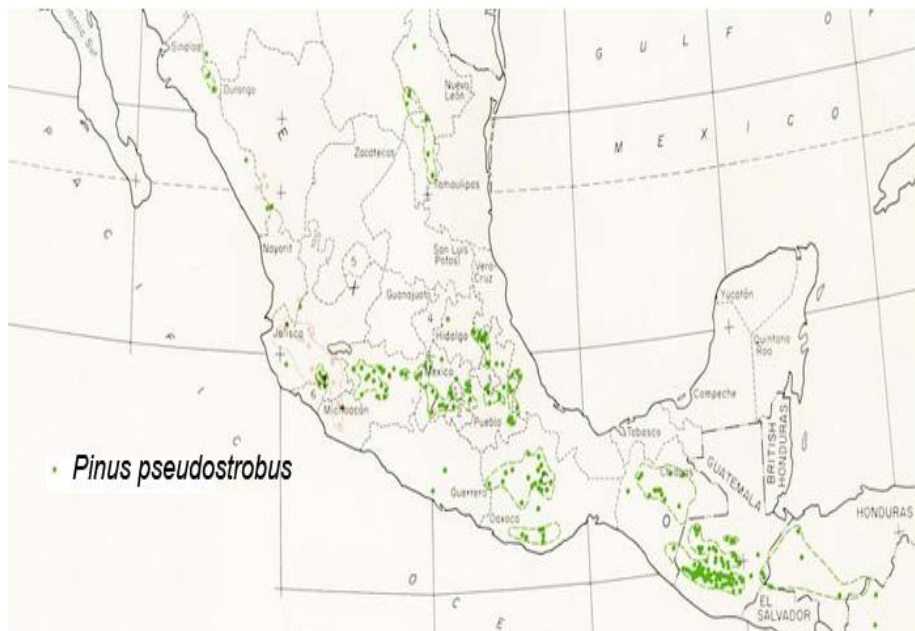
Es probable que *Pinus patula* sea uno de los pinos tropicales de mayor tamaño y de más rápido crecimiento (Gillespie, 1992), esta especie ha sido plantada extensamente fuera de su área de distribución a través de los trópicos y zonas templadas desde la década de 1940, incluyendo el sur de África, el subcontinente de la India, América del Sur y Australia (Wormald, 1975; Ladrach, 1995).

### **2.6.2. Descripción de *Pinus pseudostrabus***

El *Pinus pseudostrabus* se extiende desde las montañas del eje neovolcánico transversal de México hasta el sur de Guatemala, entre 16 ° 20, y 19 58, N y 92° 20, a 100° 35, O. (Viveros-Viveros *et al.*, 2005) (Figura 4). Esta especie está adaptada a climas templado-fríos y cálidos; se localiza en elevaciones de 1600 a 3350 m, con precipitación anual entre 800 y 1500 mm. Los sitios donde se encuentra *Pinus pseudostrabus* se

caracterizan por presentar un intervalo de temperatura anual de  $-9$  a  $40$  °C (López-Upton, 2002).

En México, *Pinus pseudostrobus* es una especie de alta importancia económica por su uso en la producción de madera; aserrada, tablero de partículas, madera para chapa y triplay, celulosa y papel. Es un pino de crecimiento rápido que alcanza alturas de 30 a 40 m, tiene buena forma de tronco y excelente calidad de la madera (López-Upton, 2002).



**Figura 4.** Distribución de *Pinus pseudostrobus* en México  
(Fuente: Critchfield y Little, 1966)



### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Estudiar el efecto de la inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles de los géneros *Hebeloma* y *Laccaria* en el crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus pseudostrobus* y *P. patula*.

#### **3.1.1 Objetivos particulares**

1. Caracterizar morfológicamente las ectomicorrizas establecidas, *Hebeloma mesophaeum*, *H. alpinum*, *H. leucosarx*, así como *Laccaria laccata*, *L. bicolor* y *L. proxima* en raíces de *Pinus pseudostrobus* y *P. patula*.
2. Evaluar el efecto de la inoculación de seis especies de hongos ectomicorrízicos comestibles (*Hebeloma mesophaeum*, *H. alpinum*, *H. leucosarx*, *Laccaria laccata*, *L. bicolor* y *L. proxima*) en el crecimiento (altura, biomasa y diámetro) de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*.
3. Evaluar el efecto de la inoculación de seis especies de hongos ectomicorrízicos comestibles (*Hebeloma mesophaeum*, *H. alpinum*, *H. leucosarx*, *Laccaria laccata*, *L. bicolor* y *L. proxima*) en el contenido nutrimental (N, P y K) de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*.

## IV. HIPÓTESIS

### 4.1 Hipótesis general

La inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles de *Hebeloma* sp. (*H. mesophaeum*, *H. alpinum*, *H. leucosarx*) y *Laccaria* (*L. laccata*, *L. bicolor*, *L. proxima*), presentan un efecto positivo en el crecimiento y contenido nutrimental (N, P, K) de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*.

#### 4.1.1 Hipótesis particulares

1. Los esporomas ectomicorrízicos comestibles de *Hebeloma* sp. (*H. mesophaeum*, *H. alpinum*, *H. leucosarx*) y *Laccaria* (*L. laccata*, *L. bicolor*, *L. proxima*), presentan diferente morfología.
2. La inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles de *Hebeloma* sp. (*H. mesophaeum*, *H. alpinum*, *H. leucosarx*) y *Laccaria* (*L. laccata*, *L. bicolor*, *L. proxima*), presentan un efecto positivo en el crecimiento (altura, biomasa y diámetro) de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*.
3. La inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles de *Hebeloma* sp. (*H. mesophaeum*, *H. alpinum*, *H. leucosarx*) y *Laccaria* (*L. laccata*, *L. bicolor*, *L. proxima*), presentan un mayor contenido nutrimental (N, P y K) en *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Descripción del experimento**

Este experimento se llevó a cabo en un invernadero a cargo del área de microbiología del Colegio de Postgraduados. Consistió en la aplicación de inoculo de hongos comestibles de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* en un sustrato de arena-corteza-suelo (proporción 2:2:1), en los cuales se sembraron dos especies de *Pinus* sp. (*P. pseudostrobus* y *P. patula*). En los diferentes tratamientos establecidos (descritos posteriormente) se consideró para su análisis el efecto de la inoculación sobre el crecimiento y contenido de nutrimentos (N, P, K) en los individuos de *Pinus* sp.

### **5.2. Diseño experimental**

El diseño experimental se ajustó a un modelo en bloques al azar, donde se establecieron diez tratamientos por cada especie de *Pinus*. Los tratamientos consistieron en inocular a *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*, con diferentes especies de hongos por separado y en combinación de estos (Ver Cuadro 3). Para cada tratamiento estudiado se inocularon diez pinos por especie. Adicionalmente se mantuvieron testigos sin inocular.

**Cuadro 3.** Combinaciones de especies fúngicas en los tratamientos para *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*.

No. de tratamiento	Especie ectomicorrízica	Clave de referencia
1	Sin hongo	Testigo
2	<i>Laccaria laccata</i> (L.l)	L.l
3	<i>Laccaria bicolor</i> (L.b)	L.b
4	<i>Laccaria proxima</i> (L.p)	L.p
5	<i>Hebeloma mesophaeum</i> (H.m)	H.m
6	<i>Hebeloma alpinum</i> (H.a)	H.a
7	<i>Hebeloma leucosarx</i> (H.l)	H.l
8	(L.l)+(L.b)+(L.p) §	3L
9	(H.m)+(H.a)+(H.l) §	3H
10	(L.l)+(L.b)+(L.p)+(H.m)+(H.a)+(H.l) §	3L+3H

§ Ver columna de claves de referencia de tratamientos del 2 al 7.

### 5.3. Montaje del experimento

#### 5.3.1. Identificación y descripción de los hongos de *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp.

Las especies de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* fueron adquiridas en el mercado de Ozumba (Figura 5a), se clasificaron por especie de acuerdo a las principales características macro y microscópicas especificadas por Largent (1973) y Largent *et al.*, (1977). Las especies identificadas fueron: *Laccaria laccata*, *L. bicolor*, *L. proxima*, *Hebeloma mesophaeum*, *H. leucosarx* y *H. alpinum*.

#### 5.3.2. Preparación de inóculo

Debido a que la concentración de esporas se localiza en las láminas del píleo, se cortó el estípite de los carpóforos y se conservaron exclusivamente los píleos (Figura 5 b), los cuales se refrigeraron a 5 °C. Al día siguiente, los píleos se colocaron en un deshidratador tipo charola, modelo L (Figura 5 c), posteriormente fueron deshidratados a

una temperatura de 35 °C, ya que a una mayor temperatura las esporas pierden su viabilidad (Brundrett *et al.*, 1996).

Finalmente los pñeos deshidratados de cada especie se molieron y el inóculo final obtenido se almacenó en viales con capacidad de 1.5 mL a una temperatura de 5 °C (Figura 5 d y e).

### **5.3.3. Dispositivos experimentales**

Los dispositivos consistieron en charolas de 37 cm<sup>2</sup> utilizadas para colocar tubetes de 140 mL a las cuales se les acondicionó en la parte inferior un recipiente colector de agua con cierta inclinación, puesto que se conectó a una manguera que permitió el flujo del agua de riego hacia un recipiente de almacenamiento de mayor capacidad. Por la parte superior de la charola se proyectó la estructura cuadrada colocando un palo de madera de 40 cm en cada esquina del cuadrado y se forro de plástico cada lado, con el objetivo de evitar el esparcimiento de esporas entre tratamientos (Figura 5 f). Cada dispositivo experimental tuvo una capacidad de 30 tubetes de los cuales una mitad correspondió a *Pinus patula* y otra a *P. pseudostrobus*. En total fueron 10 dispositivos experimentales ya que se asignó un dispositivo por tratamiento.

### **5.3.4. Desinfección de semilla y tubetes**

Las semillas utilizadas de *Pinus pseudostrobus* y *P. patula*, procedentes del paraje asarradero viejo, municipio localizado en Coatepec, Veracruz, se remojaron en agua durante 24 h como tratamiento pregerminativo, posteriormente se desinfectaron con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30%, manteniendo las semillas en agitación durante 20

minutos y finalmente se enjuagaron con agua destilada estéril. Los tubetes de plástico negro de 140 mL se lavaron y desinfectaron con alcohol previo a su llenado con el sustrato.

#### **5.3.5. Sustrato para la siembra de *Pinus* sp.**

El sustrato utilizado para la siembra de *Pinus* sp. fue preparado a partir de una mezcla arena-corteza-suelo en proporción 2:2:1, la cual se colocó en costales de manta para su esterilización con vapor de agua durante 24 h. La esterilización del sustrato ha demostrado tener efecto positivo en conjunto con el inoculante sobre el crecimiento de la planta (Guerin *et al.*, 2003). El tezontle utilizado en el experimento en la superficie de la mezcla, también fue esterilizado. La arena de río y el suelo de monte se colectaron en Texcoco y Zoquiapan respectivamente, pertenecientes al Estado de México. La corteza de árbol utilizada, fue traída de un aserradero de Guadalajara.



**Figura 5.** Preparación de inóculo. a. Mercado de Ozumba; b. Corte de estípite de *Hebeloma* sp. ; c. Deshidratador tipo charola, modelo L; d. *Hebeloma* sp. deshidratado e. Viales con píleos deshidratados y molidos; f. Dispositivos experimentales.

### **5.3.6. Siembra e inoculación de *Pinus* sp.**

Se sembraron cinco semillas de *Pinus* sp. por tubete, previamente llenados con el sustrato, dejando en la parte superior un espacio aproximadamente al 80 % del volumen, para la inoculación. Se realizaron dos inoculaciones, cada una con 1.5 g de inóculo. La inoculación consistió en esparcir el inóculo y cubrir con una capa de sustrato. Posteriormente se colocó una capa delgada de tezontle (< 0.5 cm de diámetro). Los tubetes se colocaron en los dispositivos experimentales. La germinación ocurrió, 3 semanas después de la siembra y se aplicó fungicida Captan en proporción de 2 g L<sup>-1</sup>, cada tercer día hasta que el tallo estuvo lignificado a fin de evitar el “damping off” (enfermedad comúnmente ocasionada por un complejo de hongos del suelo donde se encuentran *Phytophthora* spp., *Pythium* spp. y *Fusarium* spp.), (Lin *et al.*, 2002). Las plantas permanecieron en condiciones de invernadero durante 397 días, regándose cada tercer día con agua purificada.

## **5.4. Variables evaluadas**

Los pinos fueron cosechados 397 días después de la siembra, para el análisis del porcentaje de raíces cortas vivas, micorrizadas y muertas, posteriormente fueron secadas para evaluar el peso seco, N, P y K de la parte aérea y radical. Cabe mencionar que antes de la cosecha se efectuaron mediciones de la altura y diámetro del tallo de los pinos.

### **5.4.1. Conteo de raíces cortas**

El cepellón se remojó durante 24 h, posteriormente se retiró la parte aérea del pino y se enjuago cuidadosamente la raíz, la cual fue dividida en tres segmentos, cada uno de



5 cm. Posteriormente se prosiguió a extender la raíz de cada sección y cortar segmentos de 5 cm, de estos se seleccionaron al azar algunos para su posterior conteo en el estereoscopio. Por sección se contaron 200 raíces, por lo que en total se contabilizaron 600 raíces por pino. El procedimiento llevado a cabo fue una modificación de la metodología seguida por Guerin *et al.* (2003). El conteo se realizó 397 días después de la siembra.

#### **5.4.2. Análisis de nutrimentos (N, P y K)**

Las muestras de *Pinus* sp., fueron secadas a 90 °C durante 24 h, se molieron y tamizaron con una malla, No. 40. Previo al análisis de macronutrimentos se realizó la digestión de las muestras, que consistió en pesar 0.1 g de muestra para N y 0.25 g para P, posteriormente se colocaron por separado en tubos de digestión follin Wu.

En el caso de nitrógeno en cada tubo con muestra se colocó 4 mL de ácido sulfúrico-salicílico y se dejó reposar durante 12 h. Al día siguiente se añadió 0.5 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y se colocó en la placa de digestión durante 5 min, posteriormente se dejó enfriar y se adicionó 1.1 g de mezcla catalizadora. Finalmente se digirieron las muestras, hasta que alcanzaron una temperatura de 360 °C. La evaluación de N, se realizó por el método semimicro-kjeldahl (Bremner, 1975).

En los tubos para evaluación de fósforo se adicionó 6 mL de mezcla digestora (ácido nítrico + perclórico en relación 2:1) y se dejaron en reposo durante 12 h, posteriormente se digirieron a una temperatura de 203 °C hasta la aparición de vapores blancos densos característicos del HClO<sub>4</sub>, que dura alrededor de 1 h. Los digestados se transfirieron a

matraces para la determinación de P por colorimetría Olsen y K por fotometría de flama según Chapman y Parker (1986).

### **5.5. Caracterización micromorfológica de raíces cortas y toma de fotografías**

Se analizaron las características morfológicas y anatómicas más comunes de las raíces cortas micorrizadas para cada especie tales como: longitud, diámetro, color, tipo de ramificación, forma de las puntas no ramificadas, textura y anatomía externa del manto de las micorrizas, el procedimiento se realizó con base en el Sistema de información para caracterización y determinación de ectomicorrizas (Agerer y Rambold, 2009)

Las raíces cortas micorrizadas en mejor estado y en las que se observaron las características distintivas para cada especie (longitud, diámetro, color, tipo de ramificación, forma de las puntas no ramificadas, textura) se tomaron fotomicrografías en un estereoscopio Leica EZ4.

Con el objetivo de conocer la anatomía externa del manto se tomó una raíz corta micorrizada por cada especie de hongo estudiada. La raíz se sostuvo de la base con pinzas sobre un portaobjetos, con una aguja de disección se tomó de la punta una capa delgada externa del hongo; posteriormente se colocó una solución fijadora (Melzer) sobre la capa y se cubrió con el portaobjetos. Las preparaciones fueron fotografiadas con un microscopio Leica, modelo ATC 2000 a un aumento de 100x.

De los carpóforos adquiridos en el mercado de Ozumba, se obtuvo la esporada (conjunto o masa de esporas) para cada especie estudiada, colocando el píleo maduro hacia abajo durante 12, después se adicionó una gota de fijador (Melzer) y se cubrió con un

portaobjetos. Finalmente las esporas se fotografiaron con un microscopio Leica, modelo ATC 2000 a un aumento 100x.

### **5.6 Análisis estadístico**

Se realizó análisis de varianza en un diseño completamente aleatorio. Al haber diferencias entre tratamientos para las variables respuestas analizadas se realizaron las prueba de comparación de medias, Tukey con un  $\alpha=0.05$  con el programa Statistical Analysis System (SAS, 1999). El número de repeticiones que se consideró para el análisis estadístico fue de diez en altura y diámetro, y tres para el porcentaje de inoculación y contenido de macronutrientos (N, P, K).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Descripción de esporomas de *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp.

La adquisición de *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. en el mercado de Ozumba se realizó de acuerdo a los géneros requeridos para la investigación, por lo que se prosiguió a su identificación por especie, las cuales resultaron: *Laccaria laccata*, *L. proxima*, *L. bicolor*, en el caso del género *Laccaria* y *Hebeloma mesophaeum*, *H. alpinum* y *H. leucosarx* para *Hebeloma* spp. Posteriormente se realizó la descripción de los esporomas de las especies encontradas.

#### 6.1.1. Descripción de esporomas de *Hebeloma* spp.

A continuación se presentan las descripciones de las especies identificadas de *Hebeloma* spp., previamente identificadas:

a) *Hebeloma leucosarx*. Presentó el píleo plano, con un diámetro de 40–70 mm, de color crema (muy claro), tendiendo a blanquecino (Fig. 6 a). Láminas libres más o menos separadas, con una coloración café ligeramente oscuras. Estípite cilíndrico de 43–65 mm (longitud) y 5–12 mm (ancho), de color crema no homogéneo a lo largo del estípite. Esporas cafés, de forma amigdaliforme, sin ornamentación, con una longitud de 8  $\mu\text{m}$  y 4.8  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 6 b).

Esta especie se caracterizó por el gran tamaño de su píleo y estípite, los cuales presentaron tonos blanquecinos y no homogéneo ya que en algunos ejemplares se observó un círculo café claro en el centro, sobre todo en ejemplares que se encontraban en un estadio maduro. Se distingue de *Hebeloma alpinum* en tamaño y color, puesto que este último es más pequeño y su píleo fue café oscuro. Se diferenció fácilmente de *Hebeloma mesophaeum*, debido a que *H. leucosarx* presenta un píleo plano.

**b) *Hebeloma mesophaeum*.** Presentó el píleo convexo con un diámetro de 30–60 mm, de color café claro tendiendo a crema (Figura 6 c). Láminas libre más o menos separadas, café ligeramente obscuro sobre todo en ejemplares en un estadio maduro. Estípite cilíndrico de 2–6 mm de ancho y una longitud de 35–41 mm, color crema, distribuido mas o menos homogéneo a lo largo del estípite. Esporas de forma amigdaliforme, de color café, con ornamentación punteada y longitud de 8.6  $\mu\text{m}$  y 4.6  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 6 d).

En la vista posterior al píleo; es decir donde se encuentran las láminas se observó un borde que rodea a toda la parte circular, característico de *Hebeloma mesophaeum*. Se distingue de *H. leucosarx* por ser mas pequeño que este último y tener una estructura conspicuamente mas convexa del píleo. Así mismo *Hebeloma mesophaeum* resultó ser mas grande y con una coloración mas clara que *H. alpinum*.

**c) *Hebeloma alpinum*.** Su píleo presentó una coloración café obscuro, de forma convexa y diámetro de 9–25 mm. (Figura 6 e). Láminas libres, más o menos separadas con una coloración café pálido. Estípite cilíndrico de 4–6 mm de ancho y una longitud de 20–25 mm, de color café claro. Esporas amigdaliformes, cafés, sin ornamentación de 8.8  $\mu\text{m}$  (longitud) y 4.7  $\mu\text{m}$  (ancho) (Figura 6 f).

*Hebeloma alpinum* es una de las especies más pequeñas dentro del género *Hebeloma*. Se distingue de *Hebeloma mesophaeum* y *H. leucosarx*, por la coloración más oscura del píleo. En general, en el Cuadro 4. se resumen las características de las especies descritas anteriormente. Así mismo, se resaltan las características distintivas para cada especie, por ejemplo, se observó que *Hebeloma leucosarx* es de forma plana a diferencia de las

otras especies y en el caso de *H. alpinum* es la única con el píleo más oscuro con respecto a *H. mesophaeum* y *H. leucosarx*. En cuanto a *H. mesophaeum* se encontró en un tamaño intermedio entre las otras dos especies. La forma de las esporas es la misma para las tres especies aunque diferencian muy poco en cuanto a su tamaño (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Comparación de características diagnósticas en *Hebeloma leucosarx*, *H. mesophaeum* y *H. alpinum*.

Estructura	Características	<i>H. leucosarx</i>	<i>H. mesophaeum</i>	<i>H. alpinum</i>
Píleo	Forma	<b>plano</b>	convexo	convexo
	Color	blanquecino	crema	<b>café oscuro</b>
	Diámetro (mm)	40 – 70	<b>30 – 60</b>	9 – 25
Estípite	Forma	cilíndrico	cilíndrico	cilíndrico
	Color	crema	crema	crema
	Ancho (mm)	5 – 12	2 – 6	4 – 6
	Longitud (mm)	43 – 65	35 – 41	20 – 25
Laminas	Adherencia	libres	libres	libres
	Color	café oscuro	café oscuro	café oscuro
Esporas	Forma	amigdaliforme	amigdaliforme	amigdaliforme
	Color	café	café	café
	Ornamentación	ninguna	puntada	ninguna
	Longitud (µm)	8	8.6	8.8
	Ancho (µm)	4.8	4.6	4.7

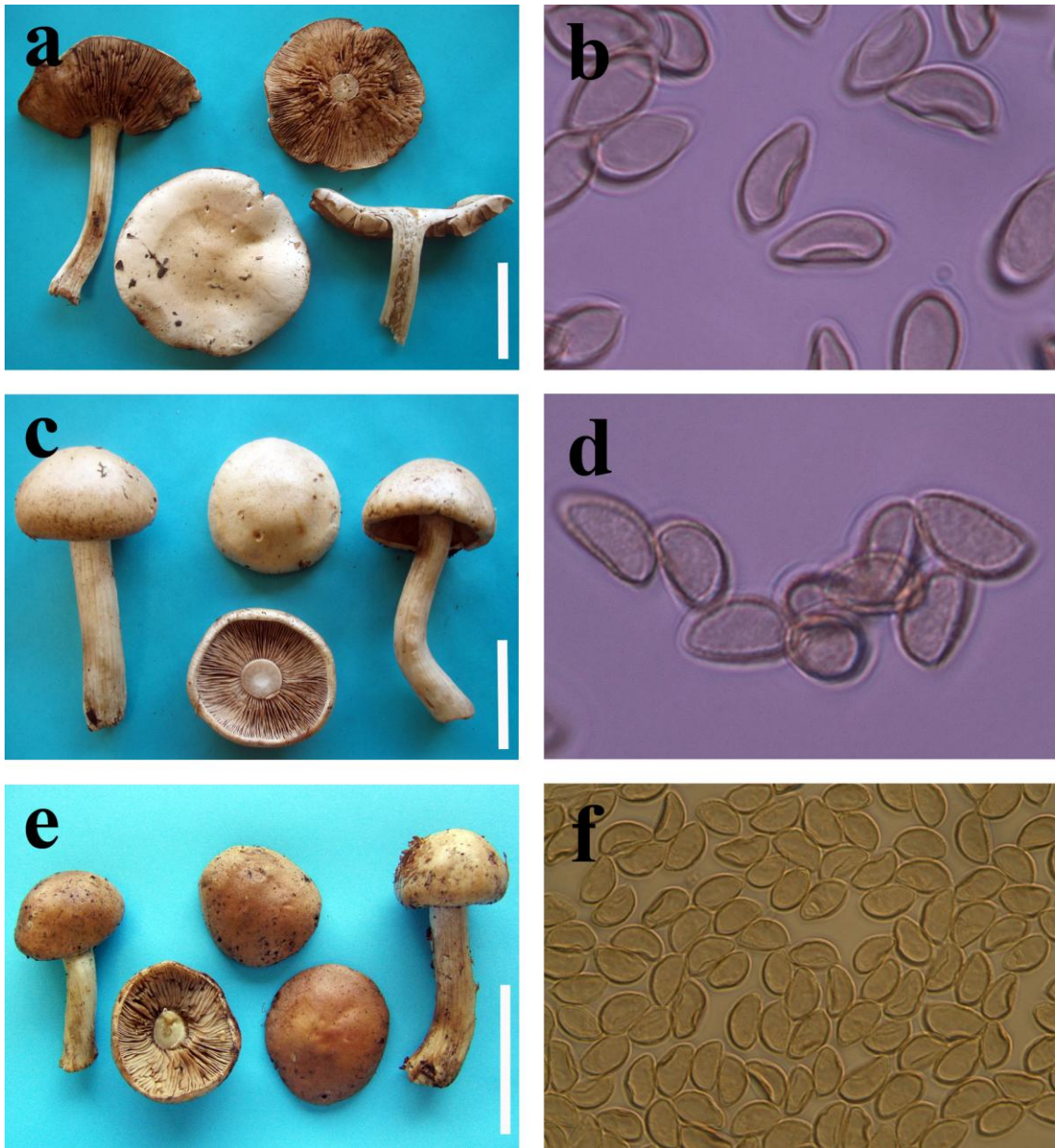
Las letras en negrita en el cuadro corresponden a la característica distintiva para cada especie.

Hasta donde se conoce, a nivel mundial existe muy poca información de las especies de *Hebeloma leucosarx* y *H. alpinum*, especialmente en lo que respecta a su descripción macroscópica (carpóforos). La mayoría de las publicaciones de *Hebeloma* se enfocan en las especies de *H. crustuliniforme* y *H. cylindrosporun* (Cairney y Chambers, 1999). En 1979 Arora, describió los esporomas de las especies de *Hebeloma crustuliniforme*, *H. sinapizans* y *H. mesophaeum*. En 1981, Debaud realizó la síntesis ectomicorrízica, mediante la inoculación de *Dryas octopetala* con *Hebeloma alpinum* y *H. marginatum*.

En cuanto a *Hebeloma mesophaeum* se encuentra bastante información. La descripción realizada en el presente estudio se comparó con la de Arora en 1979 (Cuadro 5), quien describió a *H. mesophaeum* con una ornamentación de las esporas lisa y el estípite con una longitud de hasta 80 mm; características que difieren con las descritas en el presente estudio (Cuadro 5). Las descripciones realizadas de *Hebeloma leucosarx* y *H. alpinum* no se compararon con la de otros autores, puesto que la información existente se enfoca principalmente en las características de estas especies en medios de cultivos como en el trabajo realizado por HacsKaylo y Bruchet en 1972.

**Cuadro 5.** Características diagnósticas de *Hebeloma mesophaeum* (Arora, 1979).

Estructura	Característica	<i>Hebeloma mesophaeum</i>
Píleo	Forma	convexo.
	Color	café a un oscuro café rojizo en el centro.
Estípite	Diámetro (mm)	20.5 – 6.5
	Forma	± cilíndrico
	Color	café
	Ancho (mm)	-----
Laminas	Longitud (mm)	80
	Adherencia	libres
Esporas	Color	café
	Forma	elipsoide
	Color	café
	Ornamentación	lisa
	Longitud (µm)	8 – 10
	Ancho (µm)	5 – 6



**Figura 6.** Fotos taxonómicas de *Hebeloma* sp. : a. Esporoma de *H. leucosarx*; b. Esporas de *H. leucosarx* a 100x; c. Esporoma de *H. mesophaeum*; d. Esporas de *H. mesophaeum* a 100 x; e. Esporoma de *H. alpinum*; f. Esporas de *H. alpinum* a 100x. Las barras blancas en la figura a, c y e corresponden a 4 mm.



### 6.1.2. Descripción de esporomas de *Laccaria* spp.

Las especies de *Laccaria*, identificadas, se describen a continuación:

**a) *Laccaria proxima*.** Su píleo fue plano, con un diámetro aproximado de 20–60 mm, de coloración tendiendo a vino (Figura 7 a). Láminas libres, de color rosa pálido. Estípite cilíndrico de 20–80 mm de longitud y 3.6–9.3 mm de ancho, de color vino ligeramente más oscuro que el píleo. Esporas globosas y cafés, de diámetro aproximado a 5  $\mu$ m, con ornamentación aparentemente nodulosa.

*Laccaria proxima* es una especie que se caracterizó por ser mayor en tamaño con respecto a *L. laccata* y *L. bicolor*, así mismo al poseer un píleo mas grande, las láminas se encontraron mas separadas que en otras especies, lo que se observó claramente en una esporada.

**b) *Laccaria laccata*.** Píleo convexo con un diámetro de 10–40 mm, de color vino (Figura 7 c). Estípite cilíndrico de 3–3.5 mm de ancho y 20–50 mm de longitud, color vino ligeramente más oscuro que el píleo. Láminas libres de color rosa pálido. Esporas de forma globosa, con un diámetro de 5.2  $\mu$ m y ornamentación nodulosa (Figura 7 d).

*Laccaria laccata* es una especie de tamaño intermedio comparada con *L. proxima* y *L. bicolor*; se distingue de esta ultima en que el color vino del estípite es homogéneo y no tiene una coloración color violeta en la parte basal (Cuadro 6).

**d) *Laccaria bicolor*.** Píleo convexo, color vino y diámetro de 8–20 mm (Figura 7 e). Estípite de forma cilíndrica, color vino y violeta en la parte basal, de 2.4–6.8 mm de ancho y 35–65 mm de longitud. Láminas libres de color rosa pálido. Esporas globosas

con un diámetro de 5.5  $\mu\text{m}$ , cafés y ornamentación espinosa (Figura 7 f). Se distingue de *Laccaria proxima* y *L. bicolor*, por ser la especie más pequeña que las anteriores, además de que tiene una coloración color violeta en la parte basal (Cuadro 6).

De manera general, en el Cuadro 6 se comparan las características de las tres especies descritas anteriormente. En dicho cuadro se observa que la especie de mayor tamaño es *Laccaria proxima*, seguido por *L. laccata* y *L. bicolor*. Así mismo otra característica para identificar más fácilmente *L. bicolor* es su coloración violeta en la parte basal del estípite. Por lo tanto *Laccaria laccata* se distingue de *L. proxima* y *L. bicolor* en ser de tamaño regular entre estas dos especies y por no tener la coloración violeta en el estípite.

**Cuadro 6.** Comparación de las características diagnósticas de las especies de *Laccaria proxima*, *L. laccata* y *L. bicolor* en el material estudiado del presente trabajo.

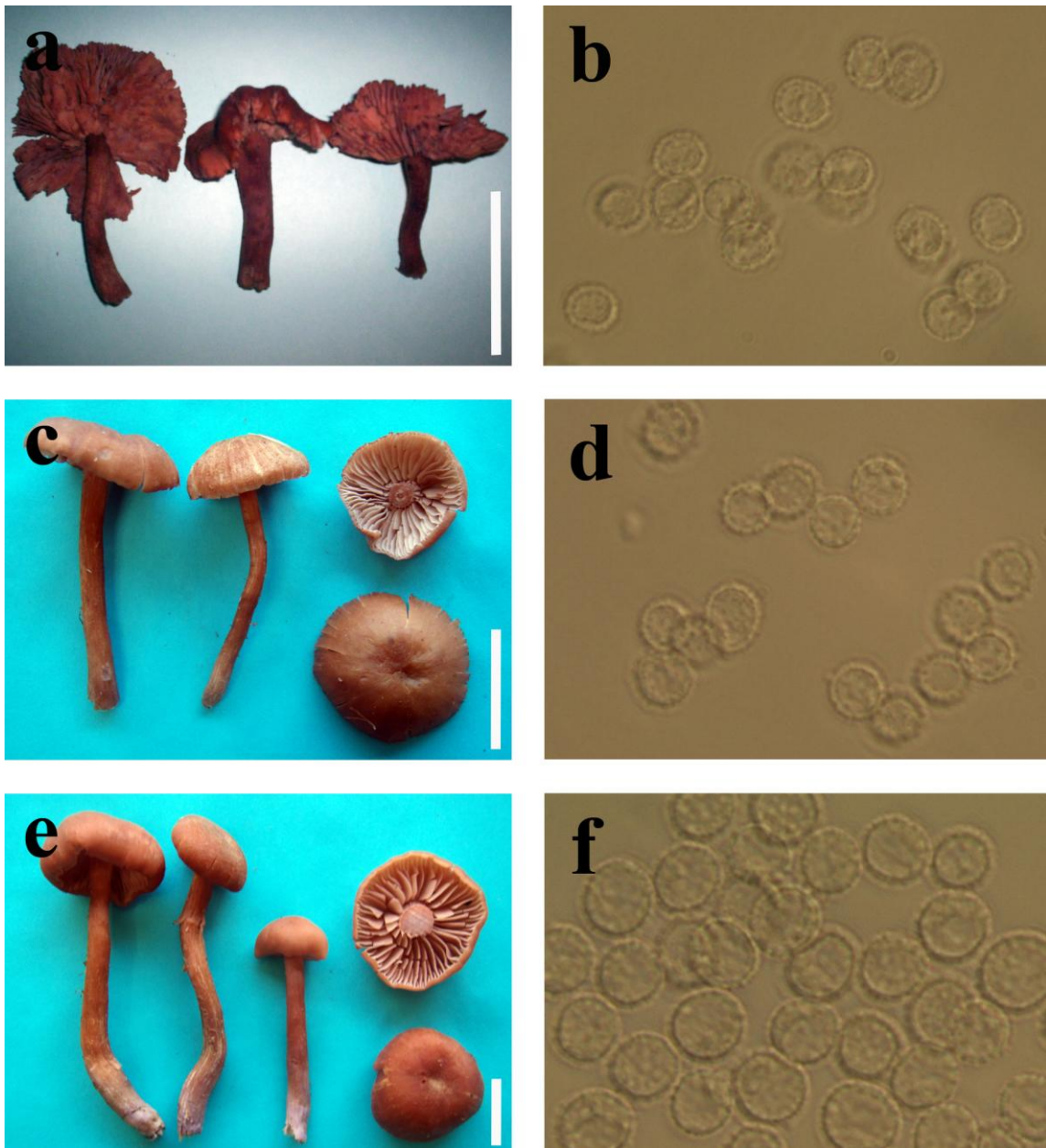
Estructura	Características	<i>Laccaria proxima</i>	<i>Laccaria laccata</i>	<i>Laccaria bicolor</i>
Píleo	Forma	plano	convexo	convexo
	Color	vino	vino	vino
	Diámetro (mm.)	<b>20 – 60</b>	<b>10 – 40</b>	<b>8 – 20</b>
Estípite	Forma	cilíndrico	cilíndrico	cilíndrico
	Color	<b>vino</b>	<b>vino</b>	<b>vino y violeta en la parte basal</b>
	Ancho (mm)	3.6 – 9.3	3 – 3.5	2.4 – 6.8
	Longitud (mm)	<b>20 – 80</b>	<b>20 – 50</b>	<b>35 – 65</b>
Laminas	Adherencia	libres	libres	libres
	Color	rosa	rosa	rosa
Esporas	Forma	globosa	globosa	globosa
	Color	café	café	café
	Ornamentación	nodulosa	nodulosa	espinosa
	Diámetro ( $\mu\text{m}$ )	5.2	5.9	5.5

Las letras en negrita en el cuadro corresponden a las principales características distintivas de cada especie.

Las características de las tres especies de *Laccaria* descritas (Cuadro 6) coinciden con la descripción realizada por Muller en 1992, a excepción de la forma del estípite y espora (Cuadro 7). La percepción diferente con respecto al estípite se debe posiblemente a que los hongos no fueron colectados directamente en campo, teniendo una estructura del estípite incompleta. En cuanto a las esporas se podría decir que tienden a ser más globosas que elipsoides; pues la relación ancho-longitud es mínima de acuerdo a las mediciones de Mueller (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Comparación de las características diagnósticas de las especies de *Laccaria* spp., según Mueller, (1992).

Estructura	Característica	<i>L. proxima</i>	<i>L. laccata</i>	<i>L. bicolor</i>
Píleo	Forma	acampanado a convexo, llega a ser plano a levantado, algunas veces deprimido	obtuso a convexo, a menudo llega a ser plano o deprimido	convexo a plano, frecuentemente deprimido
	Color	rojizo a marrón anaranjado	anaranjado-marrón cuando está fresco y al final este se oscurece	rosáceo como el de la carne fresca
Estípites	Diámetro (mm)	15 – 70	10 – 45	8 – 70
	Forma	subclavado, en ocasiones levemente bulboso	undiferenciado a subclavado	subclavado o levemente bulboso
	Color	rojo oscuro	anaranjado-marrón cuando está fresco y al final este se oscurece	de tierra o un rojo marrón más oscuro
	Ancho (mm)	3 – 10	-----	-----
	Longitud (mm)	24 – 72	20-65	23 – 85
	Cutícula	-----	-----	Fibrosa
Laminas	Adherencia	distante o libre	distante, raramente decurrente	distante o libre
	Color	rosáceo de la carne	llegan a ser levemente vinaceos con la edad	ligeramente vinaceo, del color descolorado de la carne fresca
Esporas	Forma	elipsoide	globosa a subglobosa, ocasionalmente elipsoide	subglobosa a ampliamente elipsoide, ocasionalmente globosa
	Color	-----	-----	-----
	Ornamentación	equinulada	equinulada	equinulada
	Longitud (µm)	7 – 9	7.5 – 10	8 – 11
	Ancho (µm)	6 – 8	7 – 10	7 – 9



**Figura 7.** Fotos taxonómicas de *Laccaria* sp.; a. Esporoma de *L. proxima*; b. Esporas de *L. proxima* a 100 x; c. Esporoma de *L. laccata*; d. Esporas de *L. laccata* a 100 x; e. Esporoma de *L. bicolor*; f. Esporas de *L. bicolor* a 100 x. Las barras blancas en la figura corresponden a 2mm, 4 mm y 9 mm en incisos e, d y a, respectivamente.

## **6.2. Caracterización micromorfológica de raíces cortas**

Las siguientes descripciones corresponden a las características de las raíces cortas micorrizadas por las especies de: *Laccaria laccata*, *L. bicolor*, *L. proxima*, *Hebeloma mesophaeum*, *H. alpinum*, y *H. leucosarx*, que se presentaron debido a la previa inoculación con dichas especies ectomicorrízicas. Cabe mencionar que no se observaron diferencias morfológicas en sus características distintivas (longitud, diámetro, color, tipo de ramificación, forma de las puntas no ramificadas, textura y anatomía externa del manto) de las raíces cortas entre *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*, por lo que se generalizó las descripciones para ambas especies.

### **6.2.1. Caracterización micromorfológica de *Hebeloma* spp.**

A continuación se presenta la caracterización micromorfológicas realizada a las raíces cortas de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*, inoculadas con *Hebeloma* spp.:

**a) *Hebeloma leucosarx*.** La micorriza presentó un tipo de ramificación en su mayoría ausente y raramente dicotómica (Figura 8 a), con una longitud aproximada de 1 – 9 mm y un diámetro de 0.3 mm (Figura 8 e), no presentó rizomorfos, las puntas no ramificadas eran de tipo moniliformes (Figura 8 c) y cilíndricas de color café claro, siendo mas oscura la base que la punta (Figura 8 b), las que estaban en un estadio mas joven tenían la punta blanca (Figura 8 c). En su etapa adulta la base (10 mm) fue mayor que el ápice (2 mm) (Figura 8 d). El tipo de manto en la superficie fue liso (Figura 8 e), su anatomía en la capa externa resultó plectenquimatoso (Figura 8 g). Macromorfológicamente se observaron hifas emanantes abundantes, de color blanco y en algunas partes café (Figura 8 h).

**b) *Hebeloma mesophaeum*.** Las raíces micorrizadas, presentaron un tipo de ramificación dicotómica o ausente (Figura 9 a y b), con una longitud de las puntas no ramificadas de 1–4 mm y 0.2 mm de diámetro (Figura 9 c). La forma de las terminaciones fue recta y cilíndrica en la punta, de color café y en algunas partes blanco, sin rizomorfos (Figura 9 f). La base fue mayor (1 a 2 mm) que el ápice (0.5 a 1.4 mm) (Figura 9 c). Se observaron hifas emanantes abundantes (Figura 9 d). El manto en la superficie fue densamente algodonoso (Figura 9 e) y anatomía de su capa externa, plectenquimatoso (Figura 9 g). Macromorfológicamente se observaron hifas emanantes abundantes de color blanco (Figura 9 h).

**c) *Hebeloma alpinum*.** La micorriza en su mayoría presentó un tipo de ramificación ausente (Figura 10 a) o dicotómica y raramente tetrapodial (Figura 10 b), la forma de las puntas no ramificadas fueron rectas con terminaciones cilíndricas, de 1–5 mm de longitud y 0.2 mm de diámetro (Figura 10 h), sin rizomorfos. En su etapa temprana tenía una coloración café, siendo mas oscura la base que la punta (Figura 10 c y d), con el tiempo se alargó y se tornó café oscuro, en cuanto a la punta el color café claro posteriormente se volvió blanco puro. En la mayoría de los casos, en su etapa adulta la base (3 mm) fue de mayor tamaño que el ápice (1 mm) (Figura 10 a y e). El tipo de manto en la superficie fue liso (Figura 10 f) y la anatomía de la capa externa fue plectenquimatoso (Figura 10 g). Se observó la presencia de hifas emanantes abundantes. Macromorfológicamente se apreciaron de color blanco y en puntos el color café de la base de la micorriza (Figura 10 h).

De forma general, en el cuadro 8 se resumen las características de las especies descritas anteriormente. Se observa que *Hebeloma leucosarx* fue la especie con raíces cortas de mayor longitud seguida de *Hebeloma mesophaeum* y *H. alpinum*. Además de que en la mayoría de las ocasiones presentó tipos de ramificación ausentes y en menor proporción dicotómicas, caso contrario para *Hebeloma alpinum*. En cuanto a *H. mesophaeum* fue fácil identificarlo debido a su textura del manto algodonosa y un tamaño intermedio con respecto a *Hebeloma alpinum* y *H. leucosarx*.

**Cuadro 8.** Características distintivas entre las especies de *Hebeloma mesophaeum*, *H. alpinum*, y *H. leucosarx* de las raíces micorrizadas en *Pinus patula* y *P.pseudostrobus*.

Características	<i>H. leucosarx</i>	<i>H. mesophaeum</i>	<i>H. alpinum</i>
Longitud (mm)	<b>1- 10</b>	<b>1-4</b>	<b>1-5</b>
Diámetro (mm)	0.3	0.2	0.2
Proporción (base-ápice) en mm.	base >ápice <b>7 &gt; 3</b>	base >ápice <b>2 &gt; 1.4</b>	base >ápice <b>3 &gt; 1</b>
Tipo de ramificación	<b>ausente</b> o dicotómica	<b>dicotómica o ausente</b> en la misma proporción	<b>dicotómica, ausente o tetrapodial</b>
Forma de las puntas no ramificadas	<b>moniliformes</b> y cilíndricas	recta con terminaciones cilíndricas	recta con terminaciones cilíndricas
Textura del manto	liso	<b>algodonoso</b>	liso
Color del ápice (en estadio juvenil)	blanco	café	café
Color del ápice (en estadio maduro)	<b>café claro</b>	blanco	blanco
Anatomía en la capa externa del manto	plectenquimatoso	plectenquimatoso	plectenquimatoso

Las letras en negrita en el cuadro, corresponden a las principales características distintivas de cada especie.

En el cuadro 9, se muestran las características de *Hebeloma mesophaeum* en raíces cortas de acuerdo a las descritas por Agerer y Rambold, (2009). Al comparar dichas



características con las del cuadro 8, se observa diferencia con respecto a la longitud y el tipo de textura del manto. En cuanto a las especies de *Hebeloma leucosarx* y *H. alpinum*, hasta donde se conoce, no se encontró información de sus características en raíces cortas.

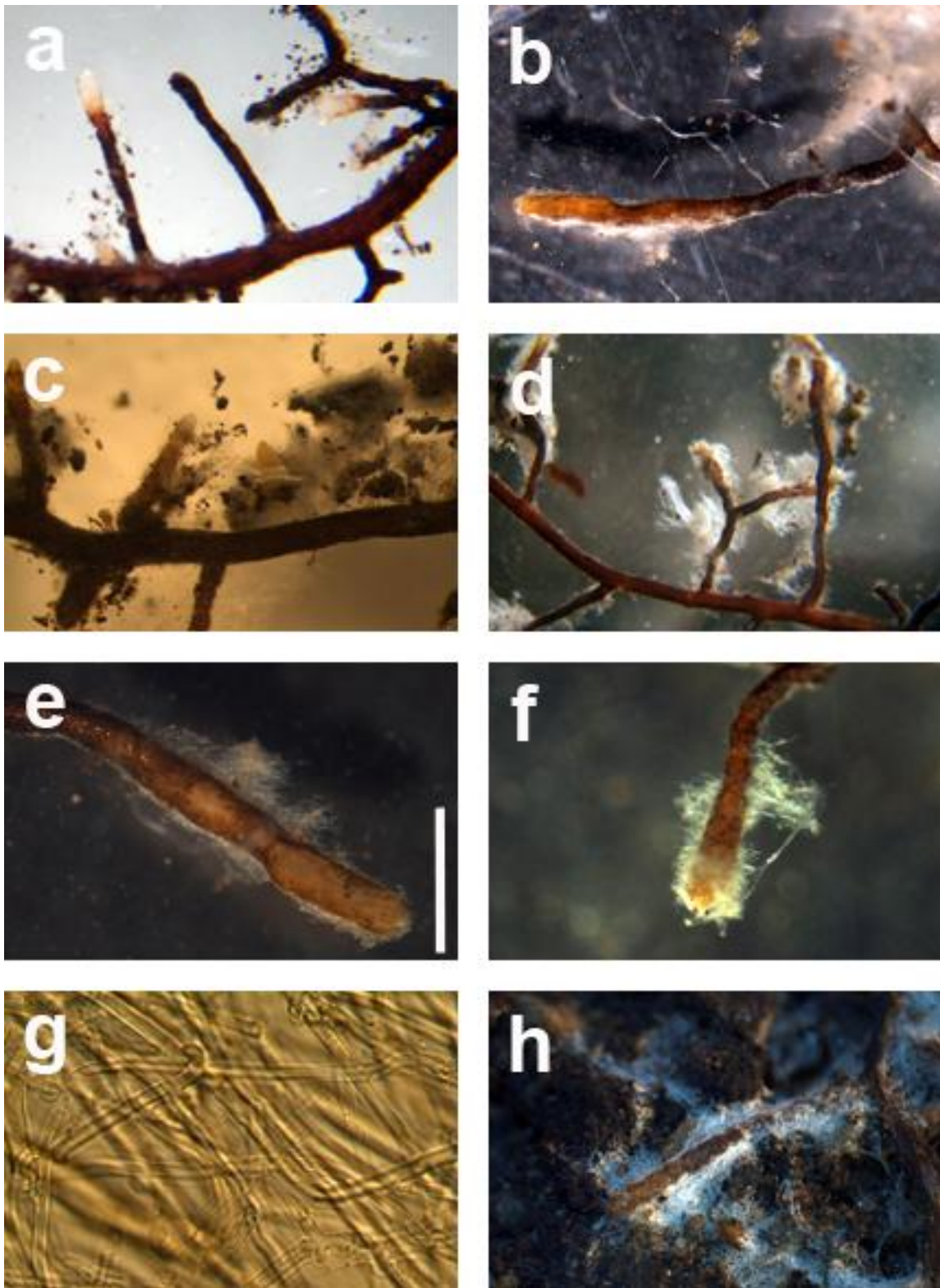
**Cuadro 9.** Características distintivas de *Hebeloma mesophaeum* de acuerdo a Agerer y Rambold, 2009.

Características	<i>Hebeloma mesophaeum</i>
Longitud (mm)	10
Diámetro (mm)	0.3 – 0.5
Tipo de ramificación	dicotómica
Forma de las puntas no ramificadas	recta a inclinada
Textura del manto	liso y plateado
Color del ápice (en estadio juvenil)	de blanco a café
Color del ápice (en estadio maduro)	café
Anatomía en la capa externa del manto	plectenquimatoso

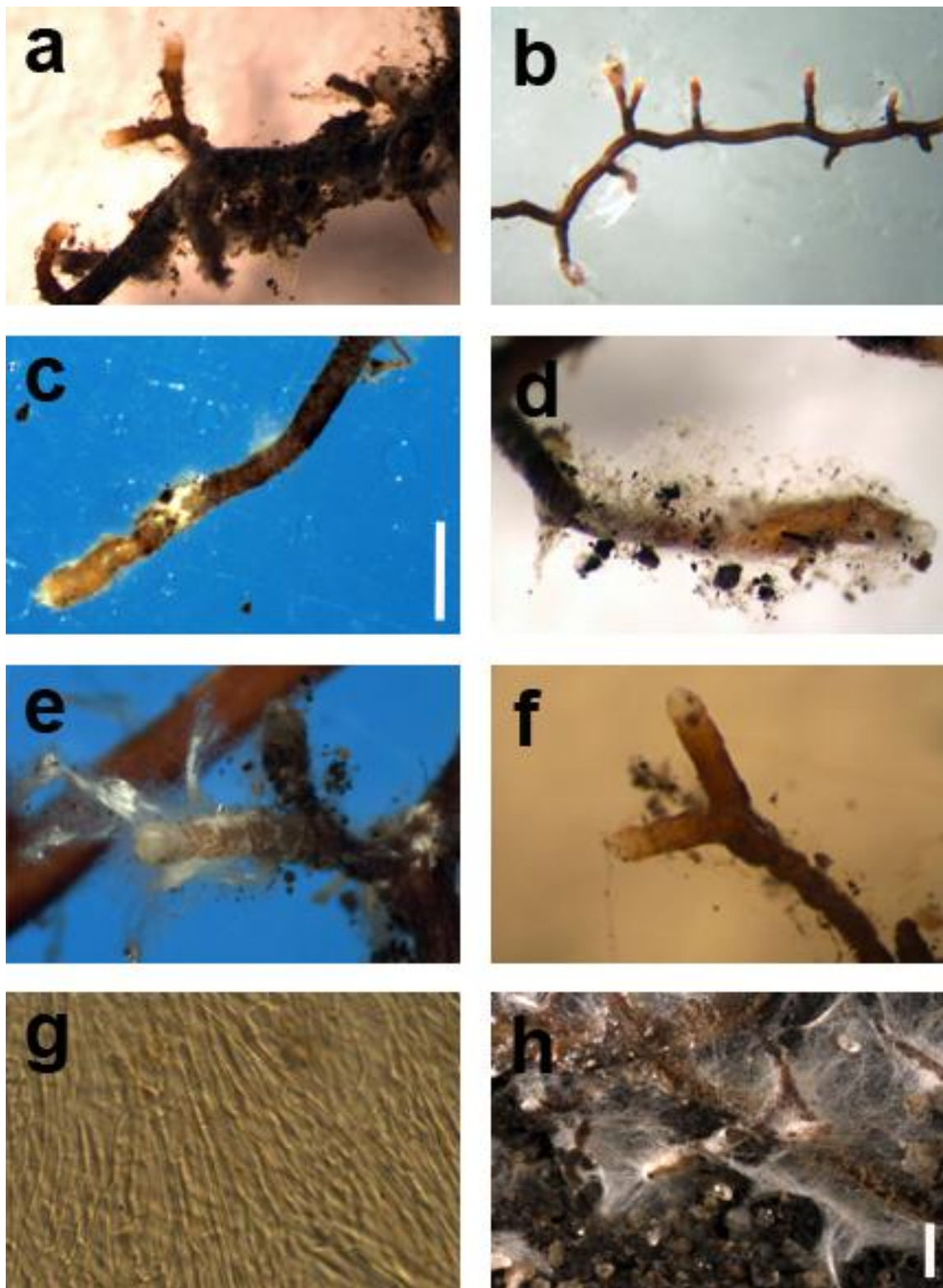
**Figura 8.** Micromorfología de las raíces ectomicorizadas de *Hebeloma leucosarx* con *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* a. Ramificación ausente en estadio joven; b. Raíz en estadio adulto; c. Puntas no ramificadas de tipo moniliformes; d. Micorrizas adultas; e y f. Tipo de manto en la superficie. La barra blanca corresponde a 2 mm; g. Anatomía de la capa externa del manto; h. Vista macroscópica en tubete.

**Figura 9.** Micromorfología de las raíces ectomicorizadas de *Hebeloma mesophaeum* con *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* a. *H. mesophaeum* en estadio joven; b. Tipo de ramificaciones (dicotómicas y ausentes); c. *H. mesophaeum* en estadio adulto. La barra blanca corresponde a 1 mm; d. Hifas emanantes; e. Tipo de manto en la superficie; f. Raíz corta en un estadio adulto; g. Manto plectenquimatoso y h. Vista macroscópica en tubete. La barra blanca corresponde a 1 mm.

**Figura 10.** Micromorfología de las raíces ectomicorizadas de *Hebeloma alpinum* con *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* a. Ramificación ausente; b. Ramificación tetrapodial; c y d. *Hebeloma alpinum* en estadio joven; e. Micorriza adulta; f. Tipo de manto en la superficie; g. Anatomía de la capa externa del manto; h. Vista macroscópica en tubete. Las barras blancas en inciso b y h corresponden a 2 mm y 4 mm, respectivamente.



**Figura 8.** Micromorfología de *Hebeloma leucosarx*. (Ver página 43)



**Figura 9.** Micromorfología de *Hebeloma mesophaeum* (Ver página 43).



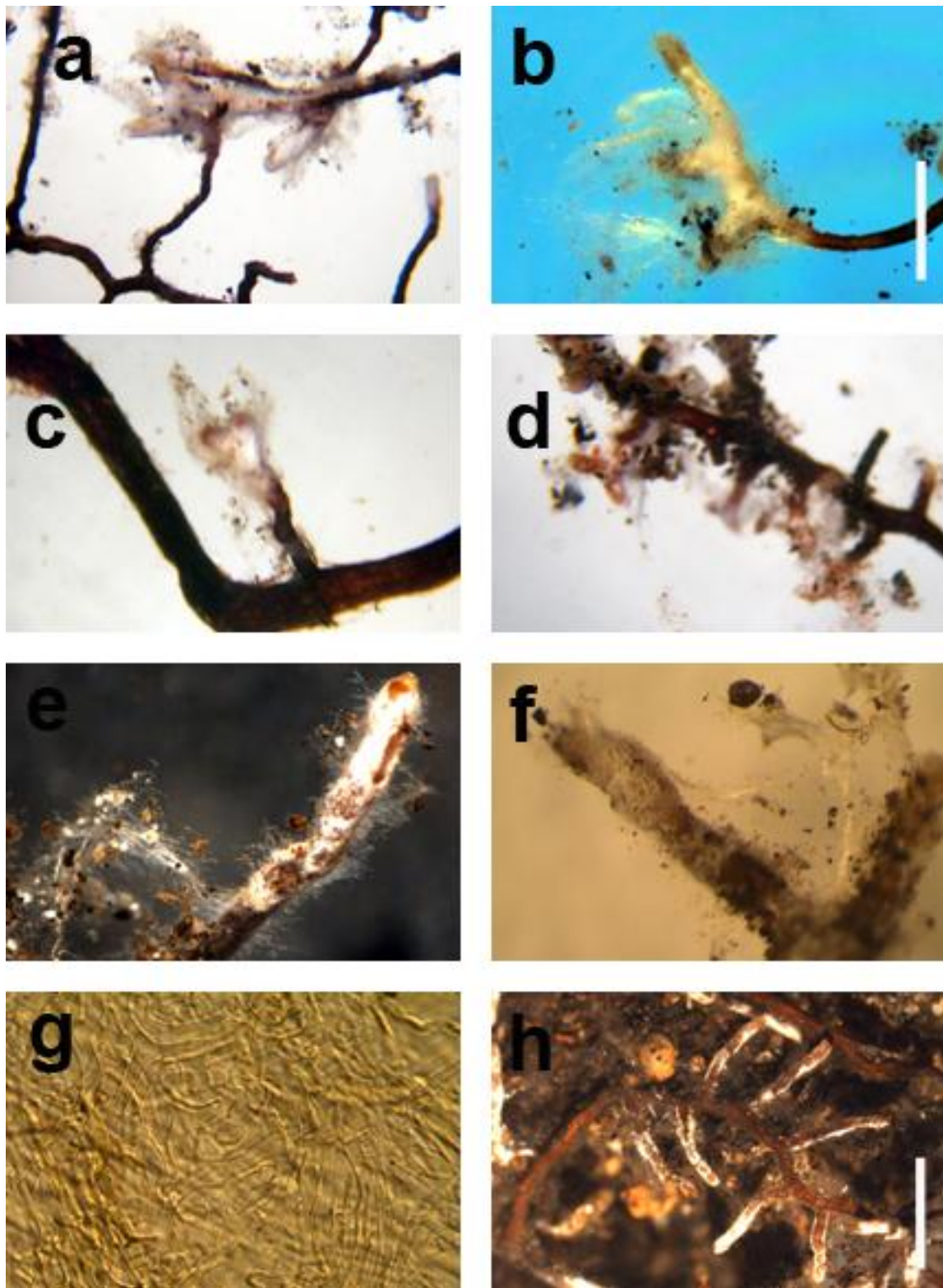


Figura 10. Micromorfología de *Hebeloma alpinum* (Ver página 43).

### 6.2.2. Caracterización micromorfológica de *Laccaria* spp.

A continuación se presenta la caracterización micromorfológica realizada a las raíces cortas de las especies de *Pinus*, con *Laccaria proxima*, *L. laccata* y *L. bicolor*:

**a) *Laccaria proxima*.** La micorriza presentó un tipo de ramificación en su mayoría ausente y en menor proporción dicotómica, con una longitud de 1 a 8 mm y 0.2 mm de diámetro (Figura 11 a), la morfología de las puntas no ramificadas fueron sinuosas o inclinadas (Figura 11 c). De jóvenes presentaban una coloración café claro distribuido homogéneamente (Figura 11 d), por el contrario con el tiempo se va diferenciado la base de un color café oscuro y la punta café claro (Figura 11 e), con la terminación cilíndrica (Figura 11 f). En su etapa adulta la base es de 2-7 mm, fue mayor que el ápice (0.7 a 2.2 mm). El tipo de manto en la superficie era liso (Figura 11 b), su anatomía fue plectenquimatoso (Figura 11 g). Macromorfológicamente, se apreciaron estructuras alargadas de las hifas, color café y blanco en la punta (Figura 11 h).

**b) *Laccaria laccata*.** Raíces micorrizadas de 2 a 6 mm de longitud y hasta 0.5 mm de diámetro (Figura 12 a), con un tipo de ramificación ausente o dicotómica (Figura 12 b) en la misma proporción, con superficie lisa, sin rizomorfos (Figura 12 f), las puntas no ramificadas presentaron formas moniliformes (estrangulamiento entre la parte mas vieja y la más joven) e hinchadas en la punta (Figura 12 c). Las raíces micorrizadas poseían la base de color café oscuro y los ápices fueron blancos cuando jóvenes (Figura 12 d) y posteriormente se tornaron de color crema o café claro (Figura 12 e). El ápice fue ligeramente mas largo que la base en la mayoría de las ocasiones; ya que este fue de 0.1 a 0.4 mm mas largo que la base. El color de la superficie del manto no se encontró

distribuido homogéneamente, ya que en general era brillante, en algunas áreas fue plateado, y en áreas muy localizadas tenía partículas de suelo (Figura 12 f). Las hifas de la capa externa del manto presentaron un arreglo plectenquimatoso (Figura 12 g). Macromorfológicamente se apreciaron hifas gelatinosas blanquecinas o más frecuentemente café claro amarillentas (Figura 12 h).

**c) *Laccaria bicolor*.** Raíces micorrizadas con ramificaciones en su mayoría dicotómicas y en menor abundancia ausente (Figura 13 a), de 1 – 4.5 mm de longitud y 0.3 mm de diámetro, sin rizomorfos y superficie lisa (Figura 13 c). Las puntas no ramificadas de jóvenes estaban estranguladas entre la parte mas vieja y la más joven o rectas, de color café claro, tendiendo a naranja (Figura 13 d); se observó que en este estadio la base tiene una longitud apenas perceptible de 0.2 mm y el ápice de 0.6 mm (Figura 13 c), con el tiempo se tornan café rojizo con algunos puntos plateados (Figura 13 e), la base de la micorriza permaneció café oscuro en sus diferentes etapas. Las hifas de la capa externa del manto presentó un arreglo plectenquimatoso (Figura 13 f). Macromorfológicamente se apreciaron hifas gelatinosas de color café rojizo (Figura 13 g). Los primordios que se observaron en tubetes de *L. bicolor* presentaron una coloración rosa claro y en la base tonos violáceos (Figura 13 h).

En el cuadro 10 se comparan las características de las tres especies de *Laccaria* spp. descritas anteriormente. Cabe destacar que las raíces cortas de *Laccaria proxima* fueron las de mayor longitud, a diferencia de *L. bicolor*, esta última se distinguió principalmente por su coloración del manto café anaranjado en su etapa adulta además de que la mayor proporción de raíces cortas presentaron un tipo de ramificación

dicotómica. Sin embargo, la proporción de ramificaciones dicotómicas y ausentes es casi igual en *Laccaria laccata*.

**Cuadro 10.** Características distintivas entre las especies de *Laccaria laccata*, *L. bicolor* y *L. proxima* de las raíces cortas micorrizadas en *Pinus patula* y *P.pseudostrobus*, después de 397 días de la siembra e inoculación.

Características	<i>Laccaria proxima</i>	<i>Laccaria laccata</i>	<i>Laccaria bicolor</i>
Longitud (mm)	<b>1 - 8</b>	<b>2 -6</b>	<b>1 - 4.5</b>
Diámetro (mm)	0.02	0.5	0.03
Proporción (base-ápice) en mm.	base >ápice	base < ápice	base >ápice
Tipo de ramificación	<b>7 base &gt; 0.7 ápice</b> en su mayoría <b>ausente</b> y en menor proporción dicotómica	<b>1.6 &lt; 1.8</b> <b>ausente o dicotómica</b> en la misma proporción	<b>3 &gt; 2</b> en su mayoría <b>dicotómicas</b> y en menor proporción ausentes
Forma de las puntas no ramificadas	<b>sinuosas o inclinadas</b>	<b>moniliformes</b>	<b>Recto</b> o moniliformes
Textura del manto	liso	liso	Liso
Color del ápice (en estadio juvenil)	café claro	blanco	café claro
Color del ápice (en estadio maduro)	<b>café claro</b> y la base del ápice café oscuro	<b>crema</b> o café claro y en algunas áreas <b>puntos plateados</b>	<b>café claro (tendiendo a naranja)</b> con algunos puntos plateados
Anatomía en la capa externa del manto	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso

Las letras en negrita en el cuadro corresponden a las principales características distintivas de cada especie.

En general, las características de las tres especies de *Laccaria* descritas en el presente trabajo coinciden con las de Agerer y Rambold (2009). Sin embargo, se observan diferencias en cuanto a las mediciones del diámetro, tipo de ramificación para *L. laccata* y en el tipo de textura del manto en *Laccaria bicolor* (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Características micromorfológicas de las raíces cortas micorrizadas con *Laccaria* spp., reportados en estudios previos.

Características	<i>Laccaria proxima</i> (Agerer y Rambold, 2009)	<i>Laccaria laccata</i> (Mohan et al., 1993)	<i>Laccaria bicolor</i> (Santiago et al., 2003)
Longitud (mm)	8	5.5	2.5 – 3.6
Diámetro (mm)	0.6	0.6	0.4
Tipo de ramificación	dicotómica	en su mayoría dicotómica y raramente mono-, tri- y tetrapodial	Simple a dicotómica
Forma de las puntas no ramificadas	sinuoso a inclinado	ligeramente tortuoso	-----
Textura del manto	liso y brillante	-----	Granulosa y con brillo metálico
Color del ápice (en estadio juvenil)	de blanco a café	blanco	café clara
Color del ápice (en estadio maduro)	café rojizo	naranja claro a marrón grisáceo	naranja café
Anatomía en la capa externa del manto	plectenquimatoso	prosenquimatoso	plectenquimatoso

**Figura 11.** Micromorfología de las raíces ectomicorrizadas de *Laccaria proxima* con *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* a. Ramificación dicotómica y ausente; b. Acercamiento a la punta de la raíz corta micorrizada; c. Morfología de las puntas no ramificadas; d. Micorrizas jóvenes; e. Micorriza adulta; f. Micorriza con punta cilíndrica; g. Manto plectenquimatoso; h. *Laccaria proxima* vista en la superficie del tubete. Las barras blancas en incisos b y d corresponden a 1 mm, 1.5 mm en h y 4 mm en a.

**Figura 12.** Micromorfología de las raíces ectomicorrizadas de *Laccaria laccata* con *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* a. Micorrizas adultas; b. Micorriza dicotómica; c. puntas estranguladas y en forma de rosario; d. Micorrizas jóvenes; e. Micorriza adulta; f. Superficie del manto brillante con áreas plateadas; g. Manto plectenquimatoso; h. Hifas gelatinosas. Las barras blancas corresponden a 2 mm, 4 mm y 1.5 mm en los incisos a, b y h, respectivamente.

**Figura 13.** Micromorfología de las raíces ectomicorrizadas de *Laccaria bicolor* con *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* a. Ramificaciones dicotómicas; b. Micorrizas jóvenes; c. Tipo de superficie; d. puntas no ramificadas estranguladas; e. Micorriza con puntos plateados; f. Manto plectenquimatoso; g. Vista de *Laccaria proxima* en vivo; h. Primordio de *Laccaria bicolor*. Las barras blancas corresponden a 1 mm en inciso c y g, 1.5 mm en h.



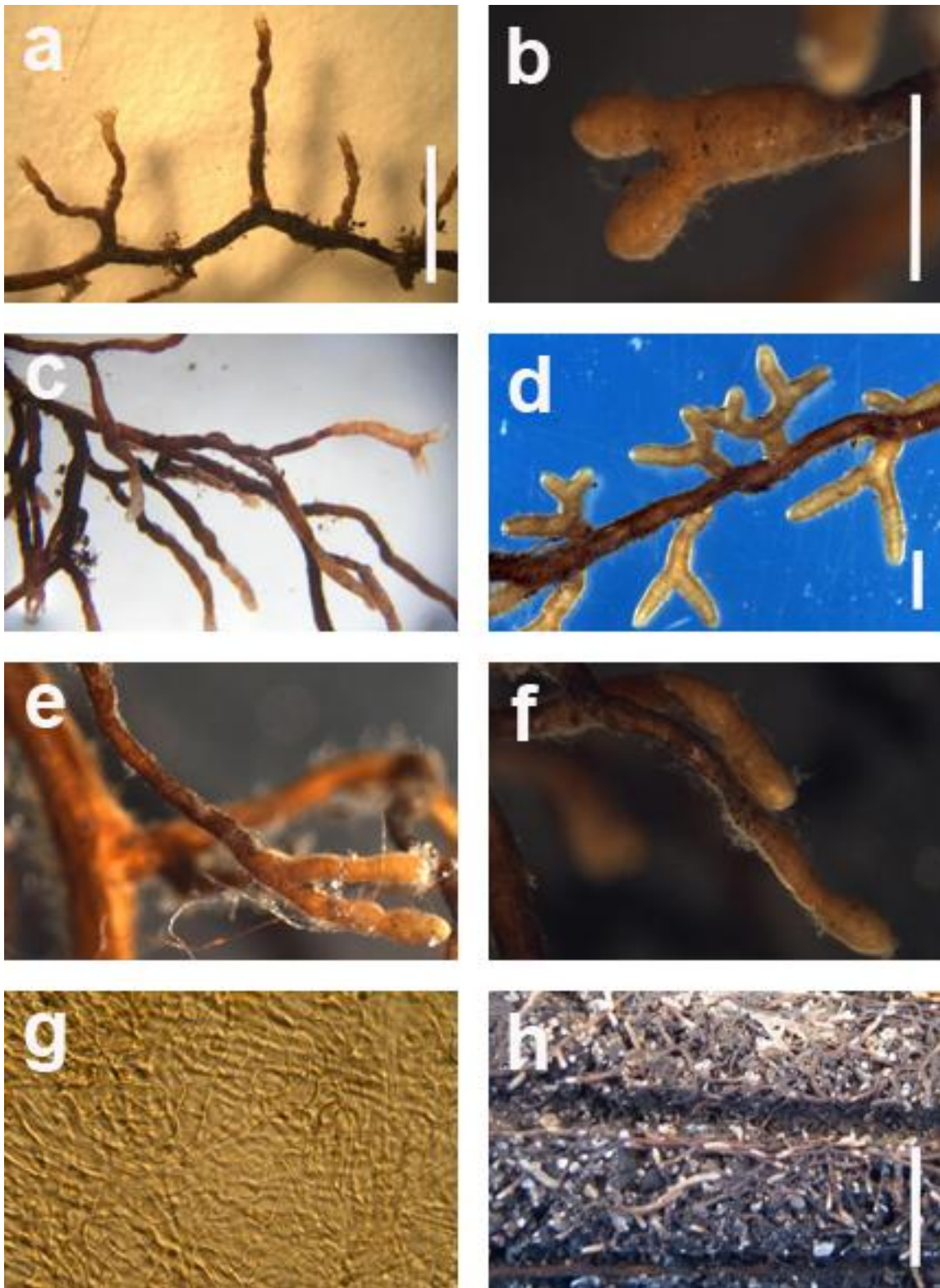
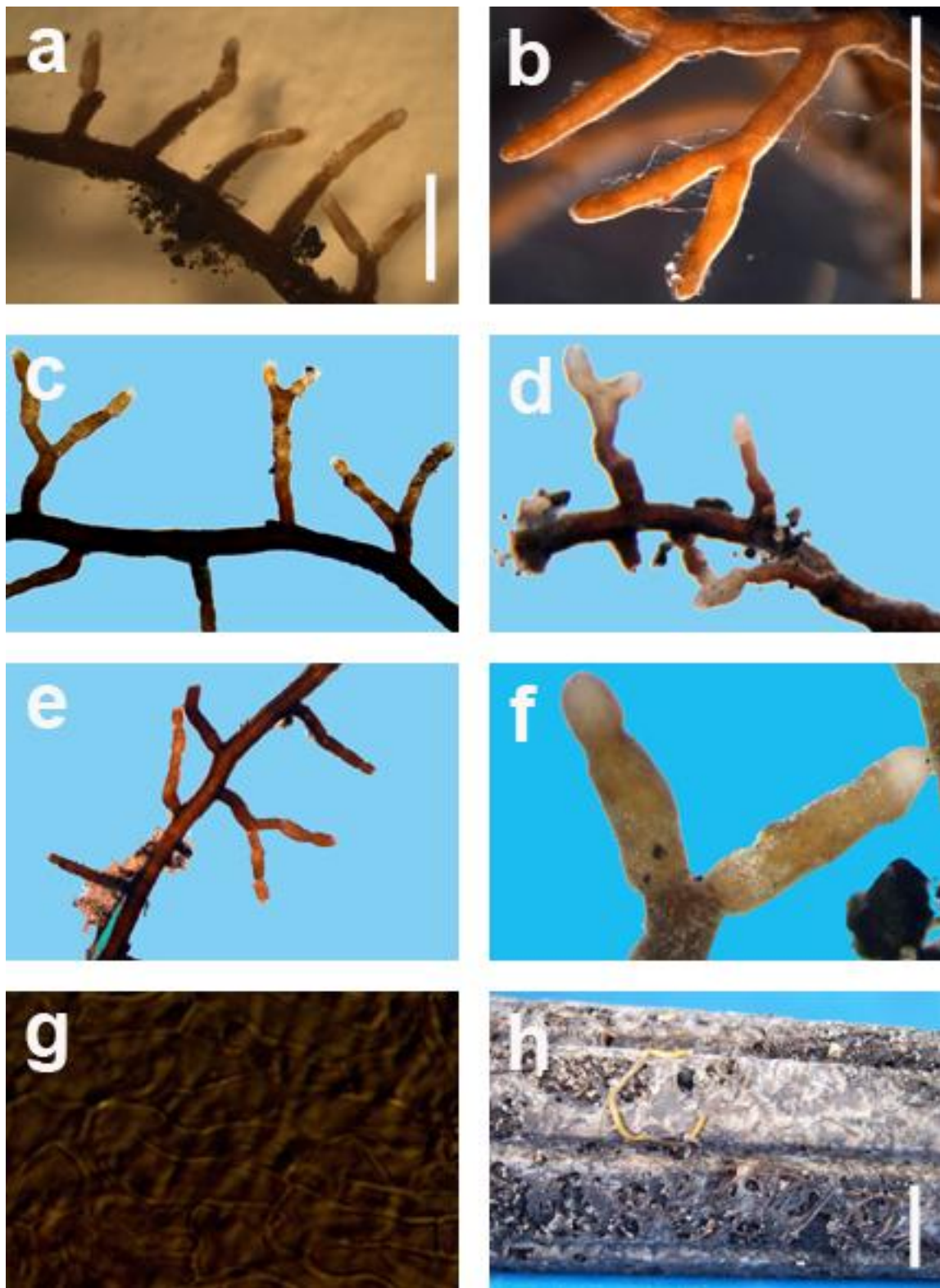


Figura 11. Micromorfología de *Laccaria proxima* (Ver página 50).



**Figura 12.** Micromorfología de *Laccaria laccata* (Ver página 50).



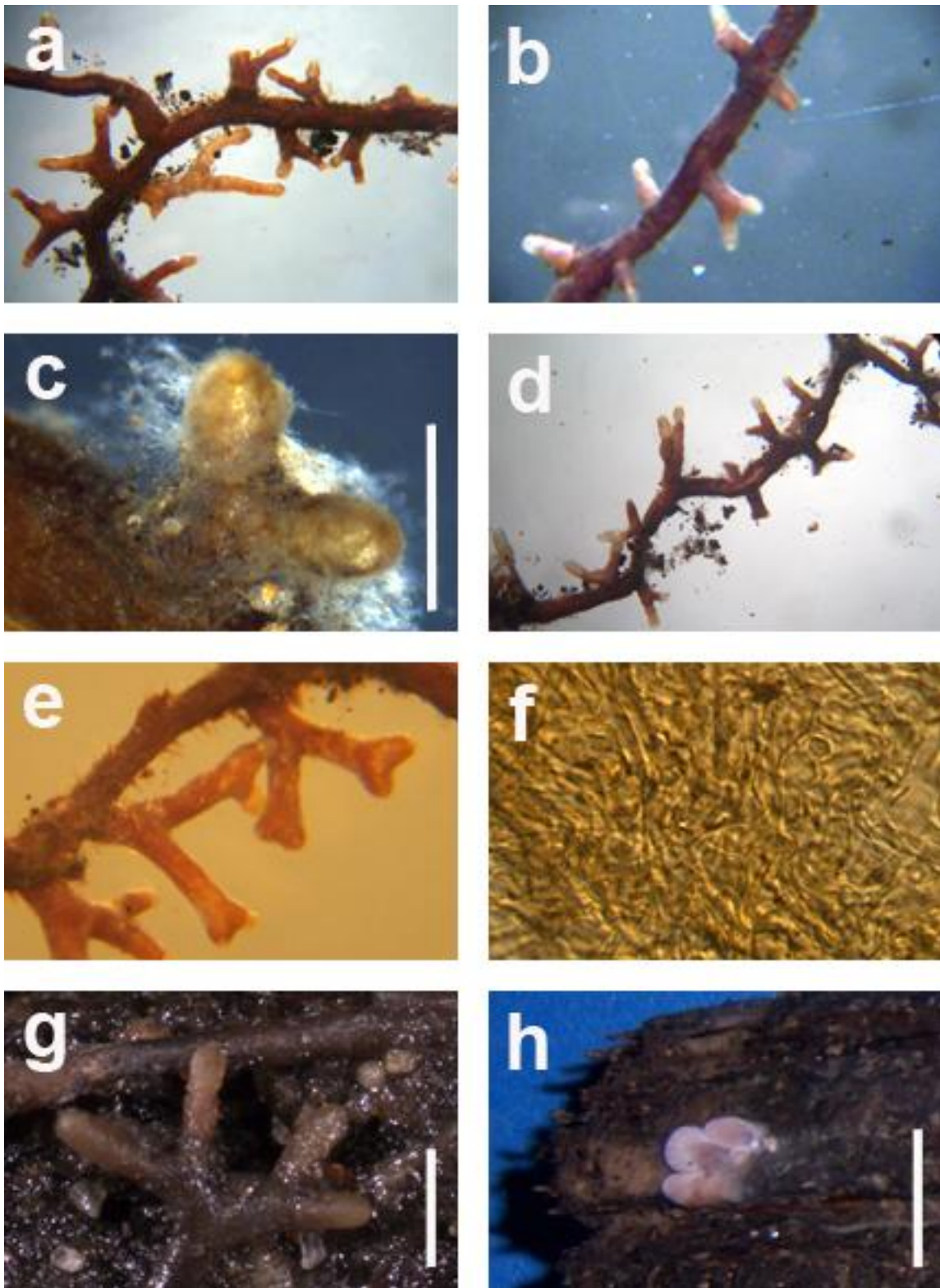


Figura 13. Micromorfología de *Laccaria bicolor* (Ver página 50).

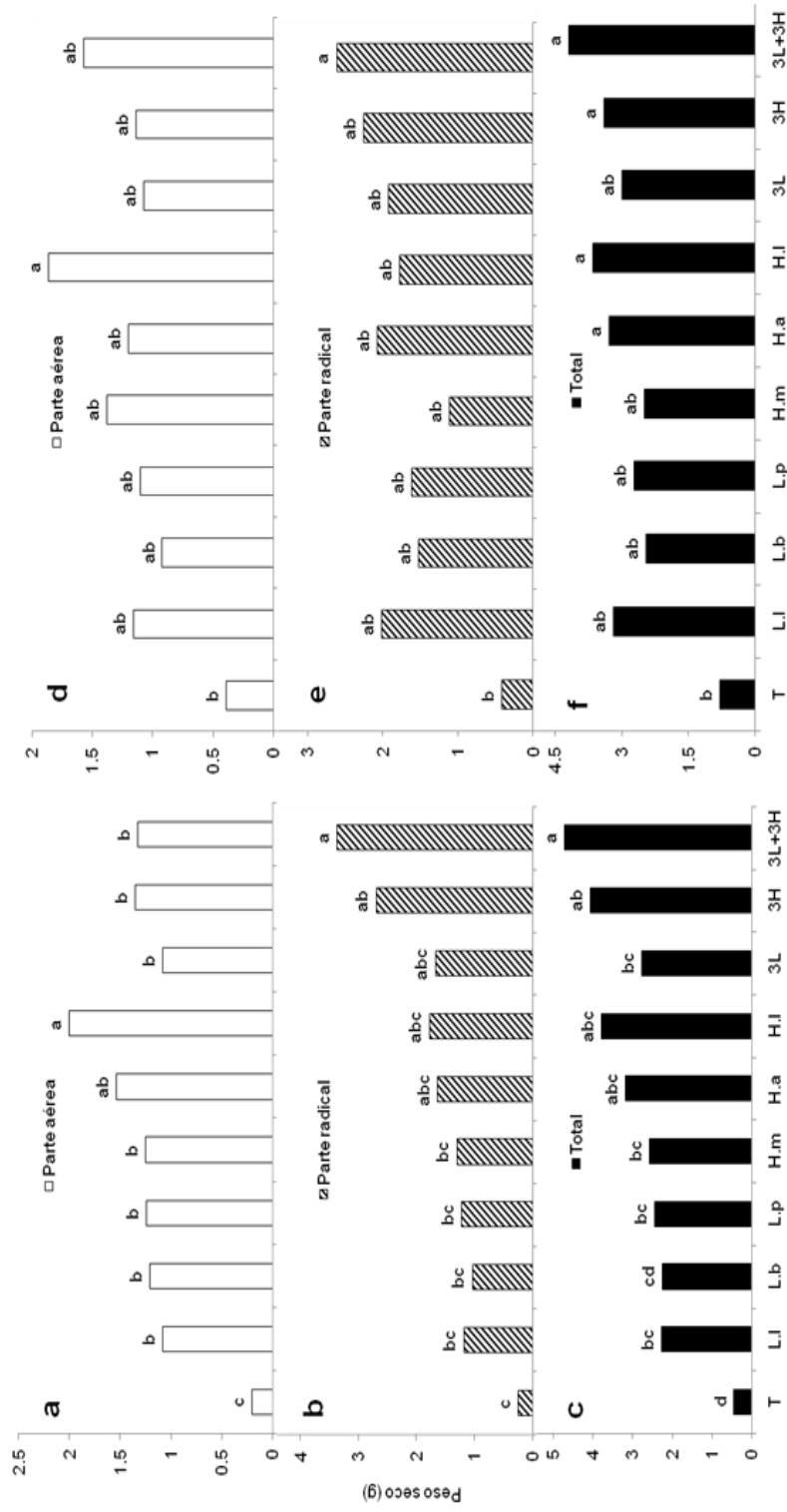
### 6.3 Variables evaluadas

Las variables evaluadas en los pinos cosechados a los 397 días fueron: peso seco, altura, diámetro, contenido nutrimental (N, P, K), porcentaje de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas y muertas, así como la diversidad fúngica en los tratamientos inoculados con mas de una especie fúngica. La simbología utilizada para cada tratamientos se específica en el Cuadro 3.

#### 6.3.1 Peso seco

En general, el peso seco aéreo, radical y total fue mayor en plantas inoculadas en comparación con plantas no inoculadas para ambas especies de *Pinus*, independientemente de la especie de hongo involucrado (Figura 14). En el caso de *Pinus patula* se observó el mayor peso seco de la parte aérea en las plantas inoculadas con *Hebeloma leucosarx* en comparación con las plantas inoculadas con las otras especies de hongos (Figura 14 a). Una tendencia distinta se observó en el peso seco de la raíz y total de *Pinus patula*, en donde los mayores valores fueron registrados en plantas inoculadas con las tres especies de *Laccaria* y *Hebeloma* simultáneamente (Figura 14 b y c).

A diferencia de lo observado en *Pinus patula*, en el caso de *P. pseudostrobus* no existieron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), tanto en parte aérea, radical y total entre las plantas inoculadas con las diferentes especies de hongo (Figura 14 d, e y f). Sin embargo, existieron diferencias numéricas importantes en algunos casos entre plantas inoculadas con *Hebeloma* en comparación con las inoculadas con *Laccaria*, por ejemplo la parte aérea de plantas inoculadas con *Hebeloma leucosarx* fue 1.86 veces mayor que la parte aérea de plantas inoculadas con *Laccaria bicolor* (Figura 14 e).



**Figura 14.** Peso seco de *Pinus patula* (a, b, c) y *Pinus pseudostrobus* (d, e, f), 397 días después de la siembra inoculados con 6 especies de hongos ectomicorrizicos de los géneros *Hebeloma* y *Laccaria*. Valores con la misma letra en la parte superior de las barras, para cada variable en cada pino, son iguales según Tukey ( $p=0.05$ )  $n=3$ . Las abreviaturas de las figuras en el eje de las abscisas corresponden a las señaladas en el Cuadro 3.

### 6.3.2 Colonización micorrízica

La colonización micorrízica solo se observó en plantas inoculadas con alguna especie de hongo. En términos generales los valores de colonización micorrízica fueron superiores a 50 % para la mayoría de los tratamientos inoculados (Cuadro 12). En *Pinus patula* el valor más alto en porcentaje de colonización (90.3 %), se encontró en pinos inoculados simultáneamente con las tres especies de *Laccaria* (Cuadro 12). En el caso de *Pinus pseudostrobus*, el valor con el máximo porcentaje de colonización se encontró en la inoculación de *Laccaria proxima* (Cuadro 12). Sin embargo, en *Pinus pseudostrobus* también se observaron valores muy altos de colonización cuando se inoculó con *Laccaria laccata* y en la inoculación simultánea con las tres especies de *Laccaria* (Cuadro 13). Los valores de raíces muertas para ambas especies de *Pinus*, variaron de 2 a 19 %, dependiendo de las especies de hongos involucrados (Cuadro 12).

En el caso de las plantas de *Pinus patula* que fueron inoculadas simultáneamente con las tres especies de *Hebeloma*, se observó que predominó la colonización por *H. leucosarx* y *H. alpinum*, sobre *H. mesophaeum*. En el caso de *Pinus pseudostrobus*, inoculados con las tres especies de *Hebeloma*, la colonización con *H. alpinum*, se encontró en mayor porcentaje ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a *H. leucosarx*, no encontrándose morfotipos de *H. mesophaeum* (Cuadro 13).

En el caso de la inoculación simultánea con las tres especies de *Laccaria*, en ambas especies de *Pinus* se observó en mayor porcentaje ( $p \leq 0.05$ ), la colonización por *Laccaria proxima* seguida por *L. laccata* y *L. bicolor* en el caso de *Pinus patula*. En *P. pseudostrobus* no se encontró ningún morfotipo de *Laccaria laccata* (Cuadro 13).

Finalmente en la inoculación simultánea con las tres especies de *Laccaria* y *Hebeloma*; las únicas especies que se encontraron fueron las del género *Hebeloma*. En *Pinus patula*, se observaron los valores mas altos para *H. leucosarx* y *H. alpinum* (Cuadro 13). Una tendencia similar se observó en *Pinus pseudostrobus*, a excepción de que en este pino no se encontraron morfotipos de *H. mesophaeum* (Cuadro 13).

**Cuadro 12.** Porcentaje de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas y muertas, 397 días después de la siembra en *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* inoculados con seis hongos ectomicorrízicos de los géneros *Hebeloma* y *Laccaria*.

Tratamientos	Vivas		Muertas
	Micorrizadas	No micorrizadas	
	%		
<i>Pinus patula</i>			
Sin hongo (Testigo)	0 d	97.7 a	2.3 b
<i>Laccaria laccata</i> (Ll)	71.8 ab	23.2 cd	5.0 ab
<i>Laccaria bicolor</i> (Lb)	84.9 ab	13.5 d	1.7 b
<i>Laccaria proxima</i> (Lp)	70.7 ab	26.1 cd	3.2 b
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	30.9 cd	65.8 b	3.3 b
<i>Hebeloma alpinum</i> (Ha)	52.7 bc	44.1 bc	3.1 b
<i>Hebeloma leucosarx</i> (Hl)	57.7 abc	22.8 cd	19.4 a
Ll+Lb+Lp (3L)	90.3 a	5.9 d	3.8 b
Hm+Ha+Hl (3H)	78.0 ab	14.7 cd	7.3 ab
3L+3H	78.3 ab	10.7 d	11.0 ab
<i>Pinus pseudostrobus</i>			
Sin hongo (Testigo)	0 c	94.9 a	5.0 a
<i>Laccaria laccata</i> (Ll)	83.2 a	11.7 c	5.1 a
<i>Laccaria bicolor</i> (Lb)	61.4 ab	29.9 bc	8.7 a
<i>Laccaria proxima</i> (Lp)	89.6 a	6.7 c	3.6 a
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	40.4 b	46.8 b	12.8 a
<i>Hebeloma alpinum</i> (Ha)	51.7 b	36.2 bc	12.0 a
<i>Hebeloma leucosarx</i> (Hl)	63.6 ab	25.4 bc	11.0 a
Ll+Lb+Lp (3L)	88.8 a	8.0 c	3.2 a
Hm+Ha+Hl (3H)	85.5 a	10.7 c	3.9 a
3L+3H	63.0 ab	33.5 bc	3.5 a

Valores en la misma columna con la misma letra son iguales según Tukey ( $p=0.05$ ).  $n=3$ .

**Cuadro 13.** Porcentajes de colonización micorrízica total y por especie fúngica, según características morfoanatómicas en los tratamientos en los que se inoculó simultáneamente más de una especie fúngica en *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*, 397 días después de la siembra.

Tratamiento <sup>¶</sup>	Colonización micorrízica			
	<i>Pinus patula</i>		<i>Pinus pseudostrobus</i>	
	Total	Por especie <sup>§</sup>	Total	Por especie <sup>§</sup>
	%			
3H	78.0	50.1 a (H.l) 4.8 b (H.m) 23.1 ab (H.a)	85.5	13.2 b (H.l) 0 b(H.m) 72.3 a (H.a)
3L	90.3	73.1 a (L.p) 10.2 b (L.l) 7 b (L.b)	88.8	88.3 a (L.p) 0 b (L.l) 0.5 b (L.b)
3L+3H	78.3	39.6 a (H.l) 0.43 b (H.m) 38.3 a (H.a) 0b (L.p) 0b (L.l) 0b (L.b)	63.0	28.9 a (H.l) 0 b (H.m) 34.1 a(H.a) 0 b (L.p) 0 b (L.l) 0 b (L.b)

¶ = Las abreviaturas de los tratamientos corresponden a las mostradas en el Cuadro 3.

§ = Los valores indican los porcentajes que corresponden a la colonización de cada especie fúngica, según la caracterización morfoanatómica correspondiente. Las abreviaturas entre paréntesis corresponden a las especies fúngicas señaladas en el Cuadro 3.

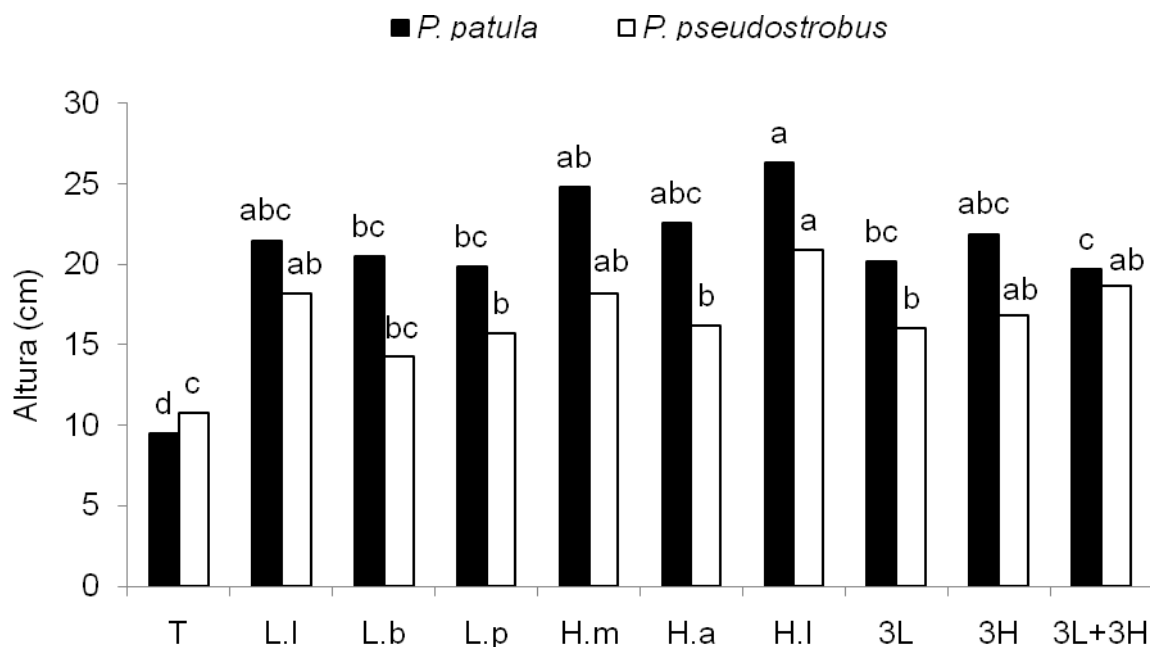
Valores en la misma columna dentro de cada tratamiento con la misma letra son iguales según Tukey ( $p=0.05$ ).  $n=3$ .

### 6.3.3 Altura y diámetro

La altura de *Pinus patula* inoculados con cualquier especie de hongo fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) que las observadas en plantas no inoculadas (Figura 15 y 16). Una tendencia similar se observó en *Pinus pseudostrobus*, a excepción de las plantas inoculadas con *Laccaria bicolor* (Figura 15). En ambas especies de pinos los valores máximos en alturas se registraron en plantas inoculadas con *Hebeloma leucosarx* (Figura 15).



Ambas especies de *Pinus* tuvieron mayor ( $p \leq 0.05$ ) diámetro de tallo cuando fueron inoculadas en comparación con plantas no inoculadas, independientemente de la especie de hongo involucrado (datos no mostrados). Los valores del diámetro del tallo variaron de 2.2 a 3.3 mm en plantas inoculadas y de 1.5 a 2.2 mm en plantas no inoculadas. Sin embargo, no existieron diferencias ( $p \leq 0.05$ ) entre pinos inoculados con las diferentes especies de hongos.



**Figura 15.** Altura de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* 397 días después de la siembra. Valores con la misma letra en la parte superior de las barras, para cada pino, son iguales según Tukey ( $p=0.05$ ).  $n= 10$ . Las abreviaturas en el eje de las abscisas corresponden a las señaladas en el Cuadro 3.

#### 6.3.4 Contenido nutrimental

En *Pinus patula* se observó en términos generales una mayor concentración de N, P y K total en plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas (Cuadro 14). Una tendencia diferente se encontró en *Pinus pseudostrobus*, debido a que en la mayoría de los tratamientos inoculados con alguna especie fúngica no existió diferencia ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a las plantas no inoculadas (Cuadro 15).

El contenido total de N, P y K en *Pinus patula* que fueron inoculados con al menos una especie fúngica fue generalmente superior en los tratamientos inoculados con especies fúngicas con respecto a las plantas no inoculadas (Cuadro 14). El N total de *Pinus patula*, en las plantas no inoculadas fue menor ( $p \leq 0.05$ ), con respecto a las plantas inoculadas con cualquier especie fúngica a excepción de *Hebeloma mesophaeum* (Cuadro 14). Una tendencia similar se encontró en K, debido a que se encontró diferencia estadística entre las plantas no inoculadas y las inoculadas, independientemente de la especie fúngica. En cuanto al P total de *Pinus patula*, se observó que las plantas no inoculadas y la inoculación simultánea con las tres especies de *Laccaria* tuvieron diferente efecto ( $p \leq 0.05$ ) con respecto a los tratamientos restantes (Cuadro 14). En el caso de *Pinus patula* los valores más altos en concentración de K se registraron en parte aérea. En términos generales, los tratamientos con mayor valor de N, P y K total en *Pinus patula*, fueron las plantas inoculadas simultáneamente con las tres especies de *Hebeloma* y en 3L+3H (Cuadro 14).

En el caso de *Pinus pseudostrobus*, en términos generales existieron diferencias en el N, P y K total solo para algunos de los tratamientos de plantas inoculadas en relación a las

no inoculadas. Tal fue el caso principalmente de las plantas inoculadas con *Hebeloma leucosarx* y con 3H o 3L+3H (Cuadro 15). La acumulación de N total en *Pinus pseudostrobus* fue mayor ( $p \leq 0.05$ ) en *H. leucosarx*, *L. laccata* y en 3L+3H, con respecto a las plantas no inoculadas (Cuadro 15). En el caso del fósforo total en *Pinus pseudostrobus*, se observó una diferencia significativa entre las plantas no inoculadas con respecto a las plantas inoculadas con *H. leucosarx*, *H. alpinum* y en los tratamientos 3H y 3L+3H. La mayor concentración de N se encontró en la parte radical, en comparación a la parte aérea, mientras que una tendencia contraria se observó en el caso de K (Cuadro 15).

**Cuadro 14.** Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio totales en *Pinus patula*, inoculados con seis especies de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma*, 397 días después de la siembra.

	N			P			K		
	P.a	P.r	Total	P.a	P.r	Total	P.a	P.r	Total
Testigo	3.03 c	1.77 b	4.80 b	0 e	0.02 c	0.02 e	1.75 c	1.18 c	2.93 c
<i>L. laccata</i> (L.l)	8.39 ab	9.07 ab	17.47 a	0.76 bcd	0.48 bc	1.23 cd	4.85 bc	2.75 bc	7.60 b
<i>L. bicolor</i> (L.b)	7.75 ab	6.43 ab	14.17 a	1.21 a	0.83 b	2.04 ab	7.62 ab	6.12 a	13.74 a
<i>L. proxima</i> (L.p)	8.18 ab	7.73 ab	15.92 a	0.99 abc	0.62 bc	1.61 bc	8.18 ab	3.93 abc	12.11 a
<i>H. mesophaeum</i> (H.m)	6.36 bc	7.49 ab	13.84 ab	0.49 d	0.53 bc	1.02 cd	9.35 a	2.76 bc	12.10 a
<i>H. alpinum</i> (H.a)	10.19 a	9.68 ab	19.86 a	0.77 bcd	0.33 bc	1.10 cd	7.10 ab	2.63 bc	9.73 ab
<i>H. leucosarx</i> (H.l)	9.02 ab	8.74 ab	17.75 a	1 abc	0.72 bc	1.72 bc	7.41 ab	2.68 bc	10.09 ab
L.l+L.b+L.p (3L)	7.69 ab	9.05 ab	16.74 a	0.54 d	0.17 bc	0.71 de	6.07 ab	4.02 abc	10.09 ab
H.m+H.a+H.l (3H)	7.98 ab	14.09 a	22.07 a	1.08 ab	1.63 a	2.71 a	8.39 a	1.63 bc	10.02 ab
3L+3H	6.9 ab	14.17 a	21.07 a	0.66 cd	1.69 a	2.35 ab	9.02 a	4.39 ab	13.40 a

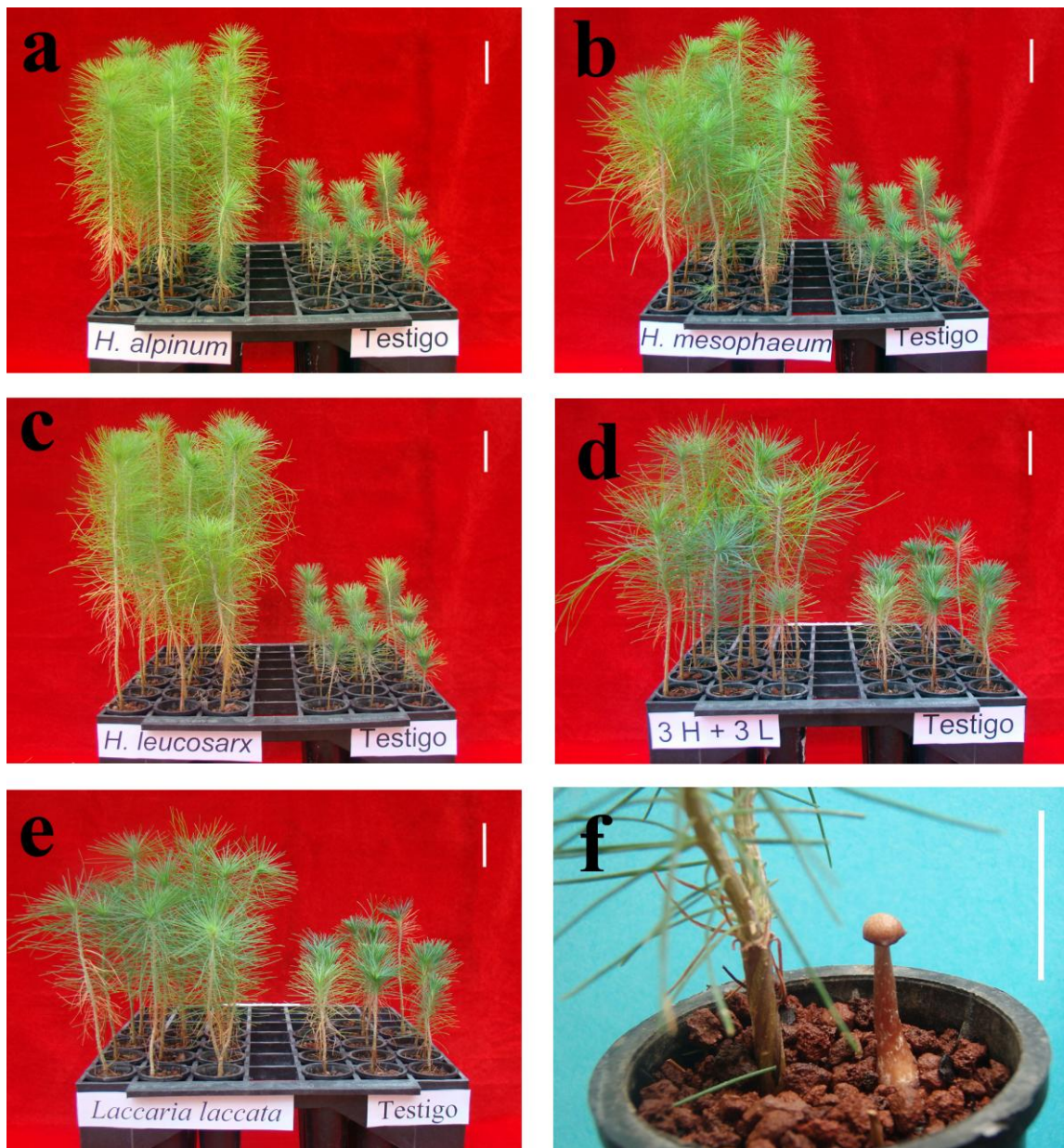
-----mg-----

Valores en la misma columna con la misma letra son iguales según Tukey ( $p=0.05$ ).  $n=3$ . P.a = parte aérea y P.r= parte radical.

**Cuadro 15.** Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio totales en *Pinus pseudostrabus*, inoculados con seis especies de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma*, 397 días después de la siembra.

	N			P			K		
	P.a	P.r	Total	P.a	P.r	Total	P.a	P.r	Total
Testigo	3.13 b	2.86 b	5.99 b	0.15 c	0.04 c	0.19 c	2.43 b	1.30 b	3.74 b
<i>L. laccata</i> (L.l)	9.30 ab	13.96 a	23.24 a	0.58 bc	0.81 abc	1.39 abc	5.68 ab	2.23 ab	7.91 ab
<i>L. bicolor</i> (L.b)	6.93 ab	10.09 ab	17.02 ab	0.47 bc	0.46 bc	0.92 bc	5.63 ab	3.21 ab	8.85 ab
<i>L. proxima</i> (L.p)	8.60 ab	9.91 ab	18.51 ab	0.55 bc	0.82 abc	1.37 abc	7.28 ab	3.25 ab	10.53 ab
<i>H. mesophaeum</i> (H.m)	10.88 ab	10.62 ab	19.16 ab	0.55 bc	0.67 abc	1.22 bc	8.4 ab	3.13 ab	11.53 ab
<i>H. alpinum</i> (H.a)	7.32 ab	10.21 ab	17.53 ab	1.08 abc	1.05 ab	2.12 ab	6.36 ab	2.5 ab	8.86 ab
<i>H. leucosarx</i> (H.l)	15.99 a	11.41 ab	27.41 a	1.86 a	1.07 ab	2.93 a	12.27 a	2.49 ab	14.77 a
L.l+L.b+L.p (3L)	6.63 ab	12.18 ab	18.82 ab	0.43 bc	0.97 abc	1.39 abc	6.63 ab	5.03 a	11.66 ab
H.m+H.a+H.l (3H)	7.05 ab	10.62 ab	17.67 ab	1.36 ab	1.13 ab	2.49 ab	10.57 a	3.62 ab	14.19 a
3L+3H	9.24 ab	14.17 a	23.41 a	0.79 abc	1.57 a	2.36 ab	7.68 ab	3.41 ab	11.09 ab

Valores en la misma columna con la misma letra son iguales según Tukey ( $p=0.05$ ).  $n=3$ . P.a = parte aérea y P.r= parte radical



**Figura 16.** *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* con y sin inoculación (Testigo) de *Hebeloma* y *Laccaria*. a. *Pinus patula* con *Hebeloma alpinum*; b. *Pinus patula* con *Hebeloma mesophaeum*; c. *Pinus patula* con *Hebeloma leucosarx*; d. *Pinus pseudostrobus* con la inoculación simultánea de las tres especies de *Hebeloma* y *Laccaria*; e. *Pinus pseudostrobus* con *Laccaria laccata*; f. Esporocarpio de *Laccaria laccata* en *Pinus patula*. Las barras blancas en los incisos a, b, c, d y e, corresponden a 4 cm, y 2cm en inciso f.

### 6.3.5 Discusión

Diversas investigaciones han demostrado un efecto benéfico, en términos de crecimiento y supervivencia de la micorrización controlada de planta de vivero y establecidas en repoblaciones o revegetaciones experimentales (Smith y Read, 2008). Dentro de estas se encuentran especies de los géneros *Hebeloma* y *Laccaria*, como por ejemplo la inoculación de *Pinus pinaster* con *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata* (Pera y Parladé, 2005) y *Laccaria bicolor* (Perrin *et al.*, 1994; Parladé *et al.*, 1997; Parladé *et al.*, 1999; Pera y Parladé, 2005). También se ha probado la eficacia micorrízica de *Laccaria bicolor* en *Pseudotsuga menziesii* (Parladé y Álvarez, 1993; Parladé *et al.*, 1997; Parladé *et al.*, 1999) y de *Hebeloma crustuliniforme* (Rincón *et al.*, 2001) y *Laccaria bicolor* (Parladé *et al.*, 1997; Rincón *et al.*, 2001) en *Pinus pinea* L. Perea *et al.*, (2009), inocularon *Pinus patula* Schl. et Cham y *Pinus hartwegii* Lindl con *Hebeloma* spp., *Laccaria* spp. y *Clavulina* aff. *Cinerea* y observaron un efecto benéfico en términos de peso seco, altura, diámetro del tallo y contenido de N y P.

Los pinos en condiciones naturales se encuentran asociados con una gran diversidad de especies fúngicas, por lo que diversos trabajos se han enfocado en la inoculación simultánea con mas de una especie de hongo, observando efectos positivos en términos de crecimiento, transferencia nutrimental y supervivencia en campo (Parladé y Álvarez 1993; Sudhakara-Reddy y Natarajan, 1997; Parladé *et al.*, 1999; Jonsson *et al.*, 2001; Iwanki *et al.*, 2006; Turgaman *et al.*, 2006; Chávez *et al.*, 2009). Sudhakara-Reddy y Natarajan (1997), evaluaron la eficacia de la coinoculación de *Laccaria laccata* y *Telephora terrestris* en *Pinus patula* en condiciones de invernadero. Dichos autores

encontraron un efecto sinérgico en el peso seco de la parte aérea como resultado de la inoculación simultánea con dichos hongos. Una tendencia diferente se observó en el presente trabajo, ya que en términos generales, cuando se inocularon simultáneamente las tres especies de *Laccaria* o de *Hebeloma* se registraron pesos secos totales similares a los encontrados con la inoculación individual de las especies de *Laccaria* o *Hebeloma* en *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*. Por esta razón podemos afirmar que en el presente estudio no se encontró un efecto sinérgico como consecuencia de la inoculación simultánea de diferentes hongos. Un caso especial se observó cuando se inoculó simultáneamente con las tres especies de *Laccaria* y *Hebeloma* en *Pinus patula*. En este caso, el peso seco total fue igual que cuando se inocularon con *Hebeloma alpinum* o *H. leucosarx*, pero superior a cualquiera de las especies de *Laccaria* inoculado individualmente. Es de interés mencionar que en *Pinus patula* inoculado simultáneamente con las tres especies de *Laccaria* y *Hebeloma*, se observó una colonización dominada por *Hebeloma leucosarx* y *H. alpinum*, y la ausencia de colonización por *Laccaria*. Por esta razón el efecto benéfico, en términos de crecimiento, en dicho tratamiento podría atribuirse exclusivamente a las especies de *Hebeloma* inoculadas, dado que según la caracterización micromorfológica efectuada, las especies de *Hebeloma* presentaron una mayor infectividad al competir con *Laccaria*. En el presente trabajo, cuando se inoculó simultáneamente con las especies de un mismo género, en este caso las tres especies de *Laccaria* y por otro lado las de *Hebeloma*, se observaron altos porcentajes de colonización los cuales variaron de 63 a 90 %. Un caso de especial interés está constituido por *Hebeloma alpinum*, dado que esta especie cuando fue inoculada sola presentó porcentajes de colonización relativamente bajos, de



alrededor de 50 %. Sin embargo, cuando esta especie fue inoculada simultáneamente con *Hebeloma leucosarx* y *H. mesophaeum* en *Pinus pseudostrobus* fue altamente competitiva. El mismo caso se presentó en las plantas inoculadas simultáneamente con las tres especies de *Laccaria* y *Hebeloma* en *Pinus pseudostrobus*. Una tendencia diferente se observó en *Pinus patula*, debido a que en esta especie, predominó la colonización por *Hebeloma leucosarx* en las plantas inoculadas con 3L y 3L+3H. En cuanto a la inoculación simultánea de las tres especies de *Laccaria*, se observó el predominio de la colonización de *L. proxima* en ambas especies de pinos. Jonsson *et al.*, (2001), reportaron una mayor colonización cuando se inoculó más de una especie ectomicorrízica en raíces de *Pinus sylvestris* y *Betula pendula*. De acuerdo a Parladé y Álvarez (1993) en la inoculación de diversas especies fúngicas en una raíz, el nivel de colonización de cada especie depende de la agresividad del hongo más que de la cantidad de inóculo. Entendiéndose por agresividad como la mayor capacidad de colonización sobre otras especies fúngicas. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio se observó que dentro del género *Laccaria*, la especie con mayor agresividad fue *L. proxima* y dentro del género *Hebeloma*, *H. leucosarx* y *H. alpinum* fueron las especies más agresivas.

En términos generales la inoculación con los dos géneros de hongos ectomicorrízicos estudiados originaron colonizaciones altas en las dos especies de *Pinus* evaluadas. Los valores más altos de colonización micorrízica se encontraron en especies del género *Laccaria*, como por ejemplo de 90 % 89 % y 83% para plantas inoculadas con Lp, 3L y L1 respectivamente en *P. pseudostrobus* y de 90 % en la inoculación con 3L para *P. patula*. Valores más altos han sido reportados por Jonsson *et al.*, (2001), quien

registró colonizaciones de 95 a 99 % en *Pinus sylvestris* inoculados con *Laccaria bicolor*. En contraste, Rincón *et al.*, (2001) registraron colonizaciones menores, de 11 a 40 % al inocular *Pinus pinea* con *Laccaria laccata*. Del mismo modo Sudhakara-Reddy y Natarajan (1997) encontraron colonizaciones también menores a los encontrados en el presente trabajo, de alrededor de 60% al inocular *Pinus patula* con *Laccaria laccata*.

Diversas investigaciones han reportado el incremento del contenido de N y P en plantas, debido a la inoculación con hongos ectomicorrízicos (Tibbett y Sanders, 2002; Read y Pérez-Moreno, 2003; Turjaman *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2007). En el presente trabajo el contenido de N, P y K fue mucho mayor en plantas de *Pinus patula* inoculadas en comparación con las no inoculadas, independientemente de la especie de hongo empleado. Tibbet y Sanders (2002), registraron una transferencia de 12 % de N y 8 % de P en plantas de *Salix* sp. micorrizadas con *Hebeloma* spp., comparadas con solo un 7% de N y 1% de P cuando las plantas no fueron inoculadas. Bandou *et al.*, (2006) encontraron mayor concentración de K en plantas de *Coccoloba uvifera* L. inoculadas con *Scleroderma bermudense* en comparación con las plantas no inoculadas. La mayor transferencia de N, P y K en plantas inoculadas con hongos ectomicorrízicos en comparación con plantas no inoculadas puede ser explicada en función de la habilidad de las hifas fúngicas para explotar parches de recursos, debido a su innata plasticidad fisiológica y morfológica, lo cual permite una exploración extensiva y una rápida colonización de los parches de recursos en el suelo (Pérez-Moreno y Read, 2004). Por otra parte los hongos simbioses ectomicorrízicos de la planta, liberan cantidades significativas de enzimas como quitinasas, fosfatasas y proteasas (Tibbet y Sanders, 2002). Esto permite que los residuos orgánicos sean aprovechados directamente para la

obtención de N y P (Pérez-Moreno y Read (2001a, 2001b, 2004)). Hasta donde conocemos el efecto de algunas de las especies estudiadas en el presente trabajo (específicamente *L. proxima*, *H. leucosarx* y *H. alpinum*), sobre el crecimiento y contenido nutrimental de pinos no había sido estudiado. Sin embargo, se ha estudiado con profundidad los mecanismos de transferencia de N, en otras especies de *Hebeloma*, principalmente *H. cylindrosporum* (Marmeisse *et al.*, 2004; Guidot *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se observó la fructificación de *Laccaria laccata*, un año y medio después de la inoculación y adicionalmente se observaron primordios de *Laccaria bicolor* en los tratamientos en los que se aplicó este hongo. La fructificación de especies ectomicorrízicas en condiciones artificiales es un fenómeno complejo, debido al conjunto de requerimientos muy específicos de factores físicos, nutrimentales y bióticos además de la necesidad en la mayoría de los casos de la planta huésped (Debaud y Gay, 1987; Godbout y Fortín, 1990; Ohta, 1998; Kaneko y Sagara, 2002). Dichas condiciones son específicas para cada especie fúngica y con frecuencia no son conocidas con profundidad. En cuanto al género *Laccaria* existen reportes previos de fructificación como es el caso del trabajo realizado por Massicotte *et al.*, (2005), al lograr la fructificación de *Laccaria laccata*, asociado con *Pinus sylvestris*; sin embargo, bajo las mismas condiciones de cultivo al inocular *Pinus resinosa* con *Laccaria bicolor* solo se presentaron primordios, 50 días después de la inoculación. En relación a la fructificación de especies del género *Hebeloma*, diversas investigaciones han reportado dicho fenómeno. Debaud *et al.*, (1981), lograron la síntesis micorrízica entre *Dryas octopetala* L. y *Hebeloma alpinum* (Favre) Brucher y *H. marginatum* (Favre) Brucher, los cuales

fructificaron después de ocho meses en cultivo. Debaud y Gay (1987) reportaron la fructificación de *Hebeloma cylindrosporum* asociado con *Pinus pinaster*, 1.5 meses después de la inoculación, sin embargo en las mismas condiciones de cultivo, este hongo no completó su ciclo de vida en la ausencia de la planta huésped y solo produjo primordios o cuerpos fructíferos inmaduros. Sin embargo, Ohta, (1998) logró la producción de cuerpos fructíferos de *Hebeloma radicosum* y *Hebeloma* sp. en medio de cultivo, reportando los nutrimentos que promueven el crecimiento micelial y la producción de cuerpos fructíferos para estas dos especies. En el presente trabajo, año y medio después de la inoculación no se encontraron, fructificaciones de *Hebeloma*, a pesar de observar micelio externo abundante en los tratamientos inoculados con esta especie.

En función de lo encontrado en la presente investigación, resultaría interesante determinar si la longitud de la hifas está relacionado con una mayor capacidad de captación de nutrientes y otros factores benéficos para el pino; debido a que en la presente investigación *Hebeloma leucosarx* presentó morfotipos e hifas de mayor longitud comparado con *Hebeloma alpinum* y *H. mesophaeum*. Por otro lado sería importante conocer si la mayor longitud de hifas y raíces cortas está relacionado con la mayor agresividad de la especie fúngica sobre otras. Debido a que en la inoculación simultánea de las tres especies de *Laccaria*, predominó *Laccaria proxima*, siendo ésta la que presentó mayor longitud de morfotipos e hifas con respecto a *Laccaria laccata* y *L. bicolor*.

Es importante señalar que en términos generales las diferencias observadas, para todas las variables analizadas en relación al efecto de la inoculación con especies de *Hebeloma*

y *Laccaria* fueron más evidentes para *Pinus patula* que para *P. pseudostrobus*. Esto probablemente estuvo vinculado con el crecimiento mas lento que tiene *Pinus pseudostrobus* en comparación con *Pinus patula*. En función de los resultados encontrados se considera de alto potencial la utilización de *Hebeloma leucosarx* y *Laccaria proxima* en programas de inoculación para *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*, en vivero. Aunque en menor grado, las otras especies estudiadas también serán recomendables para inocular dichas especies de árboles.

## VII. CONCLUSIONES

- Existieron diferencias morfológicas entre las especies de un mismo género; aunque poco perceptibles en sus estadios jóvenes. Las características distintivas son más notorias en su etapa adulta.
- Hubo un efecto positivo en crecimiento, contenido nutrimental y porcentaje de ectomicorrización en pinos inoculados comparado con los no inoculados.
- Las especies del género *Hebeloma* posiblemente inhibieron el crecimiento de las especies de *Laccaria* en los pinos en los que se inocularon simultáneamente las tres especies de *Laccaria* y *Hebeloma*.
- En términos generales el mejor tratamiento en las variables evaluadas fueron en los pinos inoculados con *Hebeloma leucosarx*.

## VIII. LITERATURA CITADA

Agarwal P., and P. Sah. (2009). Ecological importance of ectomycorrhizae in world forest ecosystems. *Nature and Science* 7(2): 107–116.

Agerer, R. and G. Rambold. (2009). DEEMY – An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. München, Germany. (<http://www.deemy.de/>) (Fecha de consulta: 10 de Julio del 2009).

Arora D. (1979). *Mushrooms demystified*. Ed. Ten Speed Press Berkeley. Berkeley, California. 355–356 pp.

Bandou E., F. Lebailly, F. Muller, M. Dulormne, A. Toribio, J. Chabrol, R. Courtecuise, C. Plenchette, Y. Prin, R. Duponnois, M. Thiao, S. Sylla, B. Dreyfus and A. M. Bâ (2006). The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. *Mycorrhiza* 16: 559–565.

Birks, J. S. and R. D. Barnes. (1990). Provenance variation in *Pinus caribaea*, *P. oocarpa*, and *P. patula* ssp. *tecunumanii*. Tropical Forestry Pap. 21. Oxford, UK: Oxford Forestry Institute, Department of Plant Science. 40 pp.

Bledsoe, C. S. (1992). Physiological ecology of ectomycorrhizae: implications and field application. In: Allen M. (ed.), *Mycorrhizal functioning*. Chapman & Hall, Nueva York. 424–437 pp.

Boyd, R., R. T. Furbank and D. J. Read. (1986). Ectomycorrhizae and water relation of trees. In: Gianinazzi-Pearson V., S. Gianinazzi (eds.). *Physiological and Genetical Aspect of Mycorrhizae: Proceedings of the 1st. European Symposium on Mycorrhizae*,

July 1-5, 1985, Dijon, France. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 217–222 pp.

Bremner, J. M. (1975). Total nitrogen, In. C. A. Black (ed.) Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9: 1149-1178. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.

Brundrett M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and N. Malajczuk. (1996). Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph. 305 pp.

Cairney, J. W. G. and S. M. Chambers. (1999). Ectomycorrhizae fungi: key genera in profile. Ed. Springer. Berlin. 369 pp.

Castellano, M., and R. Molina. (1989). "Mycorrhizae". In: Landis, T., R. Tinus, S. McDonald, J. Barnett. The Container Tree Nursery Manual, vol. 5. Agric. Handbk. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service: 101–167 pp.

Castro-Cerceda, M. L. y L. Freire. (1984). Estudio autoecológico y taxonómico del género *Laccaria* Bk. & Br. en Galicia. Universidad de Murcia. Anales de biología 1: 11–13.

Chapman, H. D. y F. P. Parker. (1986). Métodos de análisis para suelos, plantas y agua. Ed. Trillas, 5ª. Reimpresión. México, D. F. 195 pp.

Chávez D. M., G. C. Pereira y A. H. Machuca. (2009). Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. Bosque 30 (1): 4–9.

Critchfield, B. W. and L. E. Little. (1966). Geographic distribution of the pines of the world. U.S.D.A. Forest Service, Miscellaneous Publication. 991 pp.  
<http://www.conifers.org/pi/pin/pseudostrobus.htm> (Fecha de consulta: 25 de Noviembre 2009)



- Cuesta, J. (2009). Ecología de los hongos (2a parte) hongos micorrízicos. [http://www.forestales.net/archivos/forestal/pdfs%2024/ecologia\\_hongos\\_2.html](http://www.forestales.net/archivos/forestal/pdfs%2024/ecologia_hongos_2.html) (Fecha de consulta: 25 de Noviembre del 2009).
- Debaud J.C. y G. Gay. (1987). In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytologist* 105: 429–435.
- Debaud, J. C. (1981). Étude des ectomycorrhizes de *Dryas octopetala* obtention de synthèses mycorrhiziennes et de carpophores d'*Hebeloma alpinum* et *H. marginatum*. *Canadian Journal of Botany* 59 (6):1014–1020.
- Espiñeira, M. F., C. Barragán y A. Casares. (2001). Uso de hongos ectomicorrízicos en la recuperación arbórea de escombreras procedentes de minas de carbón. III Congreso Forestal Español Granada 2001.
- García-Bona, L. M. (2009). Curso de iniciación a la micología. Sociedad de ciencias naturales. <http://sites.google.com/site/goros1624/> (Fecha de consulta: 25 de Noviembre del 2009).
- Gillespie, A. J.R. (1992). *Pinus patula* Schiede and Deppe. Patula pine. SO-ITF-SM-54. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 5 pp.
- Godbout C. & J.A. Fortin. (1990). Cultural control of basidiome formation in *Laccaria bicolor* with container-grown white pine seedlings. *Mycological Research* 94(8): 1051–1058.
- Guerin L. A., S. Conventi, G. Ruiz, C. Plassard and D. Mousain. (2003). The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest

soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of a rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza* 13: 17–25.

Guidot A., M.C. Verner, J.C. Debaud and R. Marmeisse. (2005). Intraspecific variation in use of different organic nitrogen sources by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza* 15: 167–177.

HacsKaylo, E., and G. Bruchet. (1972). *Hebelomas* as mycorrhizal fungi. *Bull. Torrey Bot. Club* 99: 17–20.

Honrubia, M., P. Torres, G. Díaz y A. Cano. (1992). Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA. 47 pp.

Iwanski M., M. Rudawska and T. Leski. (2006). Mycorrhizal associations of nursery grown Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings in Poland. *Annals of forest science* 63(7): 715–723.

Jonsson L. M., D. A. Nilsson and O. Zachrisson. (2001). Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos* 93: 353–364.

Kaneko A. and N. Sagara. (2002). Responses of *Hebeloma radicosum* fruit-bodies to light and gravity: negatively gravitropic and nonphototropic growth. *Mycoscience* 43: 7–13.

Kong-Luz A. (2003). Clasificación de los hongos ectomicorrizógenos. In: Estrada-Torres, A. y M. G. Santiago-Martínez. (2003). Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Universidad Autónoma de Tlaxcala. pp. 11–26.

- Ladrach, W. E. (1995). Comparisons between provenances and sources of fourteen conifers in the Colombian Andes after five years. Res. Rep. 102. Cali, Colombia: Cartón de Colombia S.A. 13 pp.
- Largent, D. L. (1973). How to identify mushrooms to genus I: Macroscopic features. Mad River Press Inc. Eureka, California. 86 pp.
- Largent, D. L., D. Johnson and R. Watling. (1977). How to identify mushrooms to genus III: Microscopic features. Mad River Press Inc. Eureka, California. 148 pp.
- Le Tacon, F. (1985). Las micorrizas, una cooperación entre plantas y hongos. Mundo científico 49(5): 776–784.
- Lin, T. C., K. T. Cheng and J.W. Huang. (2002). Effect of clove and its major component on control of rhizoctonia damping-off of cabbage seedlings. Plant Pathology Bull 11:189–198.
- López-Upton J., (2002). *Pinus pseudostrobus* Lindl. In: Vozzo JA (ed) Tropical tree seed manual. U.S.D.A. Forest Service. 636–638 pp.
- Marmeisse R, A. Guidot, G. Gay, R. Lambilliotte, H. Sentenac, J. P. Combier, D. Melayah, L. Fraissiner-Tacher and J. C. Debaud. (2004). *Hebeloma cylindrosporum*- a model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. New Phytologist 163: 481–498.
- Martínez, L. B. y F. I. Pugnaire. (2009). Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. Ecosistemas 18 (2): 44–54.

Martínez, Maximino. (1948). Los pinos mexicanos. 2a ed. [Lugar de publicación desconocida]. México: Ediciones Botas. 368 pp.

Martínez, P. F. y M. Fernandez. (1997). Producción de especies fúngicas en masas de *Pinus sylvestris* L. de diferentes edades. Actas Congreso Forestal Hispano Luso. IRATI. Pamplona.

Marx, D. H., J. L. Ruehle, and C. E. Cordell. (1994). Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. In: Techniques for Mycorrhizal Research: Methods in Microbiology. Norris, J. R., D. Read, and A. K. Varma (eds). Academic Press, London. 383–411 pp.

Massicotte H.B., L.H. Melville and R.L. Peterson. (2005). Building a basidiocarp: a case study of *Laccaria* spp. fruitbodies in the extraradical mycelium of *Pinus* ectomycorrhizas. *Mycologist* 19: 141–149.

Meyer, F. H. (1973). "Distribution of ectomycorrhiza in native and man made forest". In: Marks, G. C., T. T. Kozlowsky (eds.), *Ectomycorrhizae, their ecology and physiology*. *Academic Press*, New York. 87–105 pp.

Mohan V., K. Natarajan and K. Ingleby. (1993). Anatomical studies on ectomycorrhizas. II. The ectomycorrhizas produced by *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata* and *Suillus brevipes* on *Pinus patula*. *Mycorrhiza* 3: 43–49.

Molina, R., H. Massicotte and J. M. Trappe. (1992). Specific phenomena in mycorrhizal symbiosis; Community ecological consequences and practical implications. In:

Mycorrhizal functioning an integrative plant fungi process. Ed. My Allen. Chapman and Hall, New York. 357–423 pp.

Müeller T., M. Avolio, M. Olivi, M. Benjdia, E. Rikirsch, A. Kasaras, M. Fitz, M. Chalot and D. Wipf. (2007). Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: The *Hebeloma cylindrosporum- Pinus pinaster* model. *Phytochemistry* 68: 41–51.

Mueller, G. M. (1992). Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the Continental United States and Canada, with Discussions on Extralimital Taxa and Descriptions of Extant Types. *Fieldiana: Botany, n.s.*, 30. Chicago: Field Museum of Natural History. 158 pp.

([http://www.fieldmuseum.org/research\\_collections/botany/botany\\_sites/fungi/mushroom.html](http://www.fieldmuseum.org/research_collections/botany/botany_sites/fungi/mushroom.html)). (Fecha de consulta: 02 de Diciembre del 2009).

Nava-Gutiérrez, Y. y L. Hernández-Cuevas (2003). Aspectos generales de la asociación micorrízica. In: Estrada-Torres, A. y M. G. Santiago-Martínez. (2003). Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Universidad Autónoma de Tlaxcala. México. 1–10 pp.

Ohta A. (1998). Fruit-body production of two ectomycorrhizal fungi in the genus *Hebeloma* in pure culture. *Mycoscience* 39: 15–19.

Oria, J.A. (1991). Bases para la selvicultura y ordenación de montes productores de hongos micorrizógenos comestibles. *Montes* 26: 48–55.

Parladé, J. and I. F. Álvarez. (1993). Coinoculation of aseptically grown Douglas-fir with pairs of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 3: 93–96.

- Parladé J., J. Pera and I. F. Álvarez. (1997). La mycorrhization controlée du Douglas dans le nord de l'Espagne: premières résultats en plantation. *Revue Forestière Française* 49: 163–173.
- Parladé J., I. F. Álvarez and J. Pera. (1999). Coinoculation of containerized Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings with the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* and *Rhizopogon spp.* *Mycorrhiza* 8: 189–195.
- Paul L. R., B. K. Chapman and C.P. Chanway. (2007). Nitrogen fixation associated with *Suillus tomentosus* tuberculate ectomycorrhizae on *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Annals of Botany* 99: 1101–1109.
- Pera J. y J. Parladé. (2005). Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de plantas destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales* 14(3): 419–433.
- Perea-Estrada, V. M, J. Pérez-Moreno, L. Villareal Ruiz, A. Trinidad Santos, M. L. de la I. de Bauer, V. M. Cetina Alcalá y L. Tijerina Chávez. (2009). Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32(2): 93–102.
- Pereira G., J. Herrera, A. Machuca y M. Sánchez. (2007). Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrízicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque* 28 (3): 215–219.
- Pérez-Moreno J. and D. J. Read. (2001a). Exploitation of pollen by mycorrhizal mycelial systems with special reference to nutrient recycling in boreal forests. *Proceedings of the Royal Society of London* 268: 1329–1335.

- Pérez-Moreno J. and D. J. Read. (2001b). Nutrient transfer from soil nematodes to plants: A direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. *Plant Cell and Environment* 24: 1219–1226.
- Pérez-Moreno J. y D. J. Read. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29 (5): 239–247.
- Pérez-Moreno, J., M. Martínez-Reyes, A. Yesca-Pérez, A. Delgado-Alvarado y B. Xoconostle-Cázares. (2008). Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany* 62(3): 425–436.
- Perrin R., J. Pera and J. Parladé. (1994). Réceptivité des sols forestiers à l'association ectomycorrhizienne. Application à la définition de la compétence écologique de souches sélectionnées. *Acta Botanica Gallica* 141 (4): 541–545.
- Peterson R. L. y P. Bonfante. (1994). Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. In: Robson A. D., L. K. Abbott, N. Malajczuk (eds.). *Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 79-88 pp.
- Read D. J. and J. Pérez-Moreno. (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance?. *New Phytologist* 157: 475–492.
- Rincón A., I. F. Alvarez and J. Pera. (2001). Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11: 265–271.
- Royo, P., R. Fischer y M. Fernández. (1998). Síntesis micorrizica de *Lactarius deliciosus* Fr. y *Pinus sylvestris* L. *Investigación Agraria.: Sistema y Recursos Forestales* 7 (1 y 2): 85–93.

Santiago-Martínez, G., A. Estrada-Torres, L. Varela, y T. Herrera. (2003). Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de un cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia* 37: 575–584.

SAS Institute (1999). SAS User's Guide, ver. 8e. SAS Institute Inc., Cary, N.C. USA.

Smith, S. E and D. J. Read. (1990). Uptake, translocation and transfer of nutrients in mycorrhizal symbioses. In: Smith, S. E y D. J. Read (eds), *Mycorrhizal Symbiosis* Academic Press. 379–408 pp.

Smith, S. E. and D. J. Read, (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego and London.

Smith, S. E. and D. J. Read. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York, USA. 606 pp.

Sudhakara-Reddy, M. and K. Natarajan. (1997). Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Myrorrhiza* 7: 133-138.

Termoshuizen, A. J. (1991). Decline of carpophores of mycorrhizal fungi in stands of *Pinus sylvestris*. *Landbouw universiteit te Wageningen*: 53–74.

Tibbett M. and F. E. Sanders. (2002). Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany* 89: 783–789.

Trappe, J. M. (1987). Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: Safir, J.R. (Ed.), *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. CRC Press, Boca Raton, USA. 5–25 pp.



Turjaman M., Y. Tamai, H. Segah, S. H. Limin, M. Osaki and K. Tawaraya (2006). Increase in early growth and nutrient uptake of *Shorea seminis* seedlings inoculated with two ectomycorrhizal fungi. *Journal of Tropical Forest Science* 18(4): 243–249.

Viveros-Viveros H., C. Sáenz-Romero, J. López Upton y J. J. Vargas-Hernández. (2005). Variación genética altitudinal en el crecimiento de plantas de *Pinus pseudostrabus* Lindl. en campo. *Agrociencia* 39: 575–587.

Webb, D. B., P. J. Wood, J. P. Smith and G. S. Henmen. (1984). A guide to species selection for tropical and subtropical plantations. *Tropical Forestry* 15. Oxford, UK: Department of Forestry, Commonwealth Forestry Institute. 342 pp.

Wormald, T. J. (1975). *Pinus patula*. *Tropical Forestry* 7. Oxford, UK: Department of Forestry, Commonwealth Forestry Institute. 212 pp.