

# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

ECTOMICORRIZACIÓN CON HONGOS DE LA SIERRA  
NEVADA, MÉXICO EN EL CRECIMIENTO Y MOVILIZACIÓN  
NUTRIMENTAL DE *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schldl.

CRISTINA ARTEAGA LEÓN

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO 2014

La presente tesis, titulada: **Ectomicorrización con hongos de la Sierra Nevada, México en el crecimiento y movilización nutrimental de *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schldl.** realizada por la alumna **Cristina Arteaga León**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

EDAFOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. DAVID ESPINOSA VICTORIA

ASESOR:



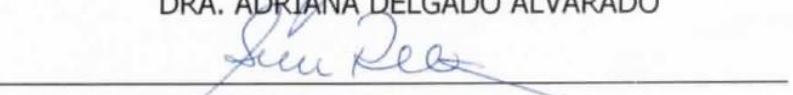
DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUAREZ

ASESORA:



DRA. ADRIANA DELGADO ALVARADO

ASESORA:



DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR:



DR. JESÚS PÉREZ MORENO

Montecillo, Texcoco, México agosto de 2014

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

## **A G R A D E C I M I E N T O S**

A Dios por acompañarme hasta esta parte del sendero caminado.

Agradezco al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, por permitirme moverme en un ambiente de trabajo, entusiasmo y constante búsqueda de conocimientos durante estos cinco años.

Agradezco al Dr. David Espinosa Victoria por aceptar ser mi consejero y de quien siempre recibí palabras de aliento para seguir con el trabajo de tesis, gracias Doctor por soportar a la latosa Cristy.

Así mismo quiero agradecer a los miembros de mi comité tutorial: al Dr. Juan José Almaraz Suarez por su apoyo desde la maestría y ahora en el trabajo doctoral, a la Dra. Adriana Delgado Alvarado por su fuerza de trabajo, siendo una inspiración para mi vida. A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por enseñarme que no hay barreras cuando decides seguir adelante. Al Dr. Jesús Pérez Moreno por ser un regalo de Dios a mi vida.

A la Dra. Magdalena Martínez Reyes (mi gurú) por ser la piedra angular de este trabajo, gracias por su amistad y apoyo incondicional. Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por adoptarme en el Área de Microbiología. A la M.C Juliana Padilla coordinadora del Laboratorio de Fertilidad de Suelos y Química Ambiental por su ayuda en el análisis de mis muestras y a su equipo de trabajo, a la Biol. Greta Hanako Rosas Saito por su amistad, entusiasmo, tiempo y apoyo en el análisis de muestras en microscopia electrónica de barrido. A la Dra. Irma Diaz Aguilar por aceptar ser mi sinodal. Agradezco el apoyo en campo de Don Genaro y Don Andrés por mostrarme el bosque a través de sus enseñanzas. A TODOS Y CADA UNO DE LOS INTEGRANTES DEL Laboratorio de Fijación, Micorrizas y anexos por su apoyo incondicional, desde aquél que apagó la olla por tener que irme para recoger a mis hijas en la escuela, me cedió su lugar, que me prestó un encendedor, me ayudó a cargar, moler y limpiar material, me enseñó como usar determinado instrumento o un programa digital o estadístico, regó mis plantas, etc, etc. Saben que no hubiese podido realizar este trabajo sin su valiosa ayuda, gracias por que durante estos cinco años me sentí muy acompañada y hasta consentida por todos ustedes. Mil gracias!!

A mi pequeña pero gran familia: Jesús, Sara y Montse por ser uno solo cuando se trata de reír o llorar.

## DEDICATORIA

A Dios,  
Hacedor de mis caminos, mi fiel compañía,  
con alegría en mi corazón y profundo agradecimiento.

A mi amada gotita de rocío, por seguir poniendo alas a mis sueños y  
hacerme sentir que Julio es eterno.

A mis amadas hijas que son mi inspiración e ilusión en mi vida.

A mis padres, hermanos, cuñados, sobrinos y suegra con amor.

A mis amigos, todos, por estar en las buenas y en las malas a mi lado.

A la congregación Cristiana Alto Refugio..... Por ser un refugio espiritual  
para mucha almas

**ECTOMICORRIZACIÓN CON HONGOS DE LA SIERRA NEVADA,  
MÉXICO EN EL CRECIMIENTO Y MOVILIZACIÓN NUTRIMENTAL DE  
*Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schldl.**

**Cristina Arteaga León  
Colegio de Postgraduados, 2014**

**RESUMEN**

El comercio internacional de árboles de Navidad está valuado en billones de dólares, y la producción de estos árboles en México es una industria creciente, que produce anualmente alrededor de 900,000 árboles, principalmente de la especie nativa *Pinus ayacahuite*. Para sobrevivir, esta requiere de manera obligada del establecimiento en sus raíces de una simbiosis mutualista conocida como ectomicorriza, la cual incrementa la movilización de nutrientes hacia las plantas. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la inoculación ectomicorrízica en el crecimiento y contenido nutrimental de *P. ayacahuite* con dos hongos ectomicorrízicos comestibles que son ampliamente comercializados en mercados de centro de México (*Helvella lacunosa* y *Hebeloma mesophaeum*). Adicionalmente, de manera comparativa se utilizó como fuente de inóculo ectomicorrízico suelo nativo de un rodal de *P. ayacahuite*. Después de dos años se observó un efecto benéfico en el crecimiento de los árboles, como resultado de la inoculación en términos de peso seco total, así como mayor contenido total de N, P, Mg y Fe. El porcentaje de micorrización de las plantas inoculadas varió de 41 a 59%, dependiendo de la fuente de inóculo. Existió una alta eficiencia en la translocación de Ca y Fe a la parte aérea de las plantas inoculadas independientemente de la fuente de inóculo. Hasta donde conocemos éste es uno de los pocos reportes de movilización de Fe por hongos ectomicorrízicos en gimnospermas. También, se evaluó el efecto de la inoculación con material de los horizontes de fermentación y orgánico, como fuente de inóculo ectomicorrízico, en el crecimiento y contenido nutrimental de *P. ayacahuite* de dos procedencias. Se observó un efecto en la inoculación ectomicorrízica, en una de las procedencias pero no en la otra. Finalmente se presenta una detallada caracterización morfoanatómica de las ectomicorrizas sintetizadas después de dos años, entre las raíces de *P. ayacahuite* y los hongos *H. mesophaeum* s.l., *Thelephora* aff. *terrestris* y *Cenococcum geophilum*. Los resultados generados en el presente trabajo demuestran el gran potencial biotecnológico de la inoculación con los hongos ectomicorrízicos para la producción en vivero de plantas de *P. ayacahuite*.

**Palabras clave:** hongos comestibles ectomicorrizicos, ectomicorriza, pinos nativos de México.

**ECTOMYCORRHIZATION WITH FUNGI FROM SIERRA NEVADA,  
MEXICO ON THE GROWTH AND NUTRIENT MOBILIZATION OF *Pinus  
ayacahuite* Ehrenb. ex Schldl.**

**Cristina Arteaga León**

**Colegio de Postgraduados, 2014**

**ABSTRACT**

The international trade of Christmas trees generates billions of US dollars annually, and the production of such trees in Mexico is a growing industry, delivering approximately 900,000 trees each year that are predominantly of the native species *Pinus ayacahuite*. To survive, this species requires the establishment of a mutual symbiosis in its roots known as ectomycorrhiza, which increases nutrient mobility to the plants. Despite its ecological, physiological and economic importance, no studies have been performed to date with regard to the ectomycorrhizal inoculation effects on the growth and nutritional content of the Mexican Christmas tree, *P. ayacahuite*. In this work, the effect of ectomycorrhizal inoculation on the growth and nutritional content of *P. ayacahuite* was evaluated using two edible ectomycorrhizal fungi widely commercialized in the Central Mexico market (*Helvella lacunosa* and *Hebeloma mesophaeum*). Additionally, native soil from an orchard of *P. ayacahuite* was used as a control ectomycorrhizal inoculum source for comparison. After two years, the inoculation produced a beneficial effect in tree growth in terms of total dry weight and total contents of N, P, Mg and Fe. The mycorrhization percentage of the inoculated plants varied between 41% and 59%, depending on the inoculum source. To our knowledge, this is one of the first reports on Fe mobilization in gymnosperms by ectomycorrhizal fungi. Additionally, the effect of the inoculation with fermentation and organic horizon materials, as a source of ectomycorrhizal fungi, on the growth and nutrient contents of *P. ayacahuite* from two provenances was evaluated. A clear effect of the ectomycorrhizal inoculation was recorded in one of the tree provenances but not in the other. Finally, a detailed morphoanatomical characterization of the ectomycorrhizas synthesized after two years, between *P. ayacahuite* and the fungi *H. mesophaeum* s.l., *Thelephora* aff. *terrestris* y *Cenococcum geophilum* is presented. These findings demonstrate the significant biotechnological potential of inoculation with ectomycorrhizal fungi for the production of *P. ayacahuite* plants in nurseries.

**Keywords:** edible ectomycorrhizal mushrooms, ectomycorrhizal, native pines of Mexico.

## CONTENIDO

	Página
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>DEDICATORIA</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>CONTENIDO</b> .....	vii
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	x
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
1.1 LITERATURA CITADA .....	4
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS</b> .....	6
2.1 Objetivo General .....	6
2.2 Objetivos particulares .....	6
2.2 Hipótesis particulares .....	7
<b>CAPITULO III. DESARROLLO Y CONTENIDO NUTRIMENTAL DEL PINO DE NAVIDAD <i>Pinus ayacahuite</i> Ehrenb. ex Schltdl. INOCULADO CON HONGOS ECTOMICORRIZICOS</b> .....	8
3.1 RESUMEN .....	8
3.2 INTRODUCCION .....	10
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
3.3.1 Material vegetal y preparación de inóculo .....	12
3.3.2 Montaje del experimento e Inoculación .....	13
3.3.3 Variables evaluadas .....	14
3.3.4 Análisis estadístico .....	15
3.4 RESULTADOS .....	15
3.4.1 Crecimiento Vegetal .....	15
3.4.2 Contenido nutrimental .....	16
3.4.3 Relación parte aérea:raíz .....	19
3.4.4 Producción de raíces cortas y colonización .....	22
3.5 DISCUSION .....	25



3.6 CONCLUSIONES .....	32
3.7 LITERATURA CITADA .....	33
<b>CAPITULO IV</b> CRECIMIENTO, MOVILIZACIÓN NUTRIMENTAL Y COLONIZACIÓN DE <i>Pinus ayacahuite</i> DE DOS PROCEDENCIAS, CON PROPÁGULOS ECTOMICORRÍZICOS DE LA SIERRA NEVADA, MÉXICO.....	40
4.1 RESUMEN.....	40
4.2 INTRODUCCIÓN.....	41
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
4.3.1 Material vegetal y preparación de inóculo .....	47
4.3.2 Montaje del experimento e inoculación .....	47
4.3.3 Variables evaluadas .....	49
4.3.4 Análisis estadístico .....	50
4.4 RESULTADOS .....	50
4.4.1 Crecimiento de las plantas .....	50
4.4.2 Contenido nutrimental .....	51
4.4.3 Relación parte aérea:raíz .....	54
4.4.4 Producción de raíces cortas y colonización.....	58
4.5 DISCUSIÓN.....	58
4.6 CONCLUSIONES .....	62
4.7 LITERATURA CITADA .....	63
<b>CAPITULO V</b> CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ANATÓMICA DE LAS ECTOMICORRIZAS DE <i>Pinus ayacahuite</i> CON <i>Hebeloma mesophaeum s.l.</i> , <i>Thelephora aff. terrestris</i> y <i>Cenococcum geophilum</i> .	66
5.1 RESUMEN.....	66
5.2 INTRODUCCIÓN.....	67
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	69
5.3.1 Material vegetal e inóculo .....	69
5.3.2 Montaje del experimento y evaluación de variables .....	70
5.3.3 Caracterización macro y micromorfológica de la ectomicorriza... 71	
5.3.3.1 Microscopia estereoscópica y óptica de campo claro... 71	
5.3.3.2 Microscopia electrónica de barrido .....	71

5.4 DESCRIPCIÓN DE LAS ECTOMICORRIZAS .....	73
5.4.1 Descripción de la ectomicorriza de <i>Hebeloma</i> aff. <i>mesophaeum</i> con <i>P. ayacahuite</i> .....	73
5.4.2 Descripción de la ectomicorriza de <i>Thelefora</i> aff. <i>terrestris</i> con <i>P. ayacahuite</i> .....	79
5.4.3 Descripción de la ectomicorriza de <i>Cenococcum geophilum</i> con <i>P. ayacahuite</i> .....	87
5.5 LITERATURA CITADA .....	96
<b>CAPITULO VI. CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>104</b>

## INDICE DE CUADROS

Página

<b>Cuadro 3.1.</b> Peso seco, altura y diámetro del tallo de plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> , de dos años de edad, inoculadas o no, con 3 fuentes de inóculo.....	17
<b>Cuadro 3.2.</b> Contenido de N, P, K, Ca y Mg de la parte aérea, raíz y total de plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> de dos años de edad, inoculadas o no, con 3 fuentes de inóculo.....	18
<b>Cuadro 3.3.</b> Contenido de Fe y Mn de plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> , de dos años de edad, inoculadas o no, con 3 fuentes de inóculo.....	20
<b>Cuadro 3.4.</b> Relaciones parte aérea:raíz del peso seco y contenido nutrimental de plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> , de dos años de edad, inoculadas o no, con 3 fuentes de inóculo.....	21
<b>Cuadro 4.1.</b> Peso seco, altura y diámetro de tallo en plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> ; de dos procedencias, de dos años de edad, inoculadas o no con inóculo nativo de una plantación de la Sierra Nevada, México .....	52
<b>Cuadro 4.2.</b> Contenido de macronutrientes en el tejido de plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> , de dos procedencias, el inóculo utilizado fue suelo de una plantación de la Sierra Nevada, México .....	53
<b>Cuadro 4.3.</b> Contenido de los micronutrientes Fe y Mn, y su relación parte aérea:raíz, en plantas de <i>Pinus ayacahuite</i> , de dos procedencias, de dos años de edad, inoculadas o no con inóculo nativo de una plantación de la Sierra Nevada .....	56
<b>Cuadro 4.4.</b> Relaciones parte aérea:raíz del peso seco y contenido de macronutrientes en arboles de <i>Pinus ayacahuite</i> de dos procedencias, de dos años de edad, inoculados o no con inóculo de una plantación de la Sierra Nevada, México.....	57
<b>Cuadro 4.5.</b> Porcentaje de raíces cortas vivas, micorrizadas y muertas en plantas de <i>P. ayacahuite</i> de dos años de edad con diferentes procedencias, como inóculo se utilizó suelo de una plantación de la Sierra Nevada, México.....	59

## INDICE DE FIGURAS

Página

- Figura 3.1.** a) Rodal del pino de Navidad Mexicano *Pinus ayacahuite*, b) Esporomas de *Helvella lacunosa* creciendo en un rodal de *P. ayacahuite*, d) Efecto de la inoculación con esporas de *Hebeloma mesophaeum* en el crecimiento de *P. ayacahuite* después de dos años; plantas inoculadas (derecha), plantas no inoculadas (izquierda), d) Ectomicorriza de *Hebeloma mesophaeum* con *P. ayacahuite*, e) y f) Micrografías tomadas en microscopio de barrido de las ectomicorrizas de *H. mesophaeum* y *H. lacunosa*, mostrando manto (m), red de Hartig (Hn) y micelio externo (em)..... 23
- Figura 3.2.** Número de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas, muertas y total, en plantas de *P. ayacahuite* de dos años de edad, inoculadas y no inoculadas con 3 fuentes de inóculo ... 24
- Figura 4.1** Distribución natural en el norte de México de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw., marcada con área de color negro principalmente en los estados de Chihuahua, Sinaloa, Durango, Nuevo León y Coahuila y en áreas restringidas en los estados de Sonora, Zacatecas, San Luis Potosí, Michoacán y Colima ..... 44
- Figura 4.2** Esquemas diagnósticos de una rama, acículas, estróbilo y semillas de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw. .... 45
- Figura 4.3** Distribución natural en el centro y occidente de México de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw. en los estados de México, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Michoacán, Guerrero, Tlaxcala, Jalisco ..... 46
- Figura 5.1** Vista general y detalles morfológicos y anatómicos de la ectomicorriza de *P. ayacahuite* con *Hebeloma mesophaeum* s.l. a) Vista general de una raíz ectomicorrizada en donde es posible apreciar las abundantes hifas emanantes de color blanquecino surgiendo del manto; es posible apreciar también el color blanquecino a café claro del ápice de la ectomicorriza; b) vista general de una raíz ectomicorrizada simple, con abundantes hifas emanantes a lo largo de toda la ectomicorriza y de su base; c) corte transversal de una raíz ectomicorrizada en donde es posible apreciar, las estructuras típicas de una ectomicorriza las cuales incluyen micelio externo, manto y red de Hartig; d) acercamiento a los espacios

intersticiales de las células corticales, en donde se aprecia con claridad la red de Hartig, así como el manto; e) y f) acercamiento a las fíbulas, estructuras características de Basidiomycetes, en este caso abundantes tanto en el manto como en el micelio externo. La imagen a) fue tomada usando microscopía estereoscópica y las imágenes b) a f), fueron tomadas con microscopía electrónica de barrido..... 78

**Figura 5.2** Vista general y detalles morfológicos y anatómicos de la ectomicorriza de *P. ayacahuite* con *Telephora aff. terrestris*. a) Vista general de dos raíces ectomicorrizadas en donde es posible apreciar los tonos café oscuro de las ectomicorrizas ramificadas, con áreas plateado brillantes, escaso micelio externo y ápices redondeados de tonos más claros; b) vista general de una raíz ectomicorrizada ramificada, en donde se aprecian algunas hifas emanantes surgiendo a partir del manto; c) corte transversal de una raíz ectomicorrizada en donde es posible apreciar, las estructuras típicas de una ectomicorriza las cuales incluyen escaso micelio externo, grueso manto y red de Hartig; d) acercamiento a los espacios intersticiales de las células corticales, en donde se aprecia con claridad la red de Hartig, con su característica forma, así como el manto; e) Arreglo superficial de las hifas externas saliendo del manto, con algunas hifas y f) Acercamiento a una fíbulas, estructuras características de Basidiomycetes, y a la ornamentación de las hifas. La imagen a) fue tomada usando microscopía estereoscópica y las imágenes b) a f), fueron tomadas con microscopía electrónica de barrido..... 86

**Figura 5.3.** Portada de la obra *Systema Mycologicum* de Elias Fries publicada en 1829, en la cual se describe por primera vez el género *Cenococcum* en la páginas 65 y la especie *Cenococcum geophilum* en las páginas 66 y 67..... 88

**Figura 5.4** Vista general y detalles morfológicos y anatómicos de la ectomicorriza de *P. ayacahuite* con *Cenococcum geophilum*. a) Vista general de una raíz ectomicorrizada ramificada dicotómicamente en donde es posible apreciar las abundantes hifas emanantes de color negro surgiendo de la superficie de la ectomicorriza y de su base; b) vista general de una raíz ectomicorrizada ramificada, en donde se aprecian las hifas emanantes surgiendo a partir del manto; c) corte transversal de una raíz ectomicorrizada en donde es posible apreciar el manto y red de Hartig; d) acercamiento a los espacios intersticiales de las células corticales, en donde se aprecia la red de Hartig y un manto delgado; e) Acercamiento a las hifas externas saliendo

del manto, con una clara ornamentación verrucosa y sin fíbulas; y f) Acercamiento a la clara ornamentación verrucosa de las hifas, donde puede apreciarse que las verrugas tienen un tamaño que va desde 0.3  $\mu\text{m}$  hasta 1  $\mu\text{m}$ . La imagen a) fue tomada usando microscopía estereoscópica y las imágenes b) a f), fueron tomadas con microscopía electrónica de barrido.....

93

**Figura 5.5** Vista general y detalles morfológicos y anatómicos de la ectomicorriza de *P. ayacahuite* con *Cenococcum geophilum* y de esclerocios de dicho hongo. a) vista general de una raíz ectomicorrizada simple ramificada dicotómicamente en donde es posible apreciar las abundantes hifas emanantes de color negro surgiendo de la superficie de la ectomicorriza (a la izquierda) y en la parte superior derecha de la imagen un esclerocio de color negro; b) vista general de un esclerocio negro con su morfología esférica característica, con abundantes hifas de color negro asociadas con él, y algunas partículas de suelo de color café claro; c) vista general del esclerocio esférico, de superficie lisa con abundantes hifas asociadas con él; d) corte transversal del esclerocio en donde es posible apreciar un acercamiento a la corteza (parte superior de la imagen) y una médula (parte inferior de la imagen) con células de tamaños contrastantes; e) acercamiento al área de contacto de la corteza y médula del esclerocio; y f) acercamiento al contenido citoplásmico de las células de la médula del esclerocio y a sus paredes engrosadas las cuales van de 1  $\mu\text{m}$  hasta 2  $\mu\text{m}$ . Las imágenes a) y b) fueron tomada usando microscopía estereoscópica y las imágenes c) a f), fueron tomadas con microscopía electrónica de barrido.....

95

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCION GENERAL

Los bosques influyen en diversos procesos ambientales de crucial importancia en el mantenimiento de los sistemas naturales del planeta. Por ejemplo, tienen una conspicua influencia en los ciclos hidrológicos, en la reducción de la erosión del suelo, y en la conservación de una enorme biodiversidad vegetal, animal y microbiana. Además, los bosques son proveedores de belleza escénica invaluable. De este modo, los bosques proveen un conjunto de servicios y beneficios económicos, sociales y culturales a la humanidad (GFR 2010). Sin duda, los bosques juegan un importante papel en el almacenamiento de carbono y en la reducción de gases de efecto invernadero, tales como el CO<sub>2</sub> (Read *et al.* 2009). De acuerdo con la FAO (2006) el almacén total de carbono en los bosques es de alrededor de 638 Gt, cantidad comparable con las 750 Gt de carbono almacenadas en la atmósfera. De esta manera, uno de los factores clave para atenuar el cambio global es el mantenimiento de los bosques. Desafortunadamente, la deforestación incorpora cerca de 5.9 Gt de CO<sub>2</sub> anualmente, algo así como 60% del carbono que es absorbido por los bosques de todo el mundo (Myers-Madeira 2008). La deforestación es un problema que es particularmente alarmante en los países en desarrollo, México incluido dentro de ellos. Por ejemplo en el período de 1990 a 2005, México perdió anualmente un promedio de 318,000 hectáreas de bosque, lo que representa una de las tasas de deforestación más altas del mundo (GFR 2010). Por esta razón una de las prioridades ambientales en la nación es el mantenimiento, o idealmente incremento, de las masas forestales existentes. Sin embargo, una de las paradojas, del mantenimiento de los bosques constituye el reto de la generación de estrategias que originen simultáneamente la conservación ambiental, junto con la producción de empleos y de desarrollo social y económico a las comunidades aledañas a los bosques.

Frente a esta problemática, una de las actividades que ha generado gran interés, en países desarrollados y en desarrollo, particularmente en las últimas décadas, es el establecimiento de plantaciones con fines de producción de árboles de Navidad. Esta es una actividad que a nivel internacional está valuada en billones de dólares. Por ejemplo, en Estados Unidos de Norteamérica 35 millones de hogares anualmente decoran sus casas en la época de Navidad con árboles cosechados de plantaciones (USDA 2014). Se ha estimado que una cifra todavía mayor, 50 millones de árboles constituyen la demanda en los países europeos, especialmente en Gran Bretaña, Alemania, Francia y Austria. Estos árboles, son producidos esencialmente en plantaciones establecidas en Europa Central y Occidental (Chastagner y Benson 2000). Las especies usadas a nivel internacional como árboles de Navidad son pinos (*Pinus* spp.) y abetos (*Abies* y *Picea*), incluyendo principalmente: *Abies fraseri* (Pursh) Poir, *Abies balsamea* (L.) Mill, *Abies procera* Rehder, *Abies grandis* (Dougl. ex D. Don) Lindl., *Abies concolor* (Gordon) Lindley ex. Hildebr., *Abies alba* Mill., *Abies nordmanniana* (Steven) Spach, *Abies pinsapo* Boiss, *Picea pungens* Engelm, *Picea glauca* (Moench) Voss, *Picea abies* (L.) H. Karst, *Pinus strobus* L., *Pinus sylvestris* L. y *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco.

Todas estas especies requieren en condiciones naturales de manera obligada del establecimiento de una simbiosis en sus raíces conocida como ectomicorriza, la cual se establece entre hongos y plantas (Smith y Read 2008). La ectomicorriza se desarrolla entre más de 2000 especies vegetales, dentro de las que se incluyen árboles y arbustos de los grupos de gimnospermas y angiospermas, a los cuales se les denomina fitobiontes; y más de 20,000 especies de hongos, principalmente incluidos en los grupos Basidiomycetes y Ascomycetes (Rinaldi *et al.* 2008; Comandini *et al.* 2012). Los hongos cubren a las raíces formando una estructura conocida como manto, y a partir de ahí penetran los espacios intersticiales de las células corticales de la raíz; y hacia afuera las hifas



establecen redes miceliales las cuales pueden extenderse hasta 300 metros de longitud, constituyendo una de las más fascinantes estructuras del mundo vivo conocidas como micelio externo (Pérez-Moreno y Read 2004). La ectomicorriza es fundamental para la supervivencia de las plantas asociadas debido a su enorme importancia en la translocación nutrimental y en la protección en contra de microorganismos patógenos (Read y Pérez-Moreno 2003). Debido a que los árboles de Navidad son producidos en plantaciones, es esencial la comprensión de los simbioses ectomicorrízicos asociados con dichos árboles y el desarrollo biotecnológico de formas de producción amigables con el ambiente que involucren la inoculación con los hongos nativos apropiados, para reducir su tiempo de estancia en vivero, y su crecimiento óptimo cuando son trasplantadas, con la consecuente reducción de costos de producción. Sin embargo, en términos generales existen pocos estudios a nivel internacional sobre estos aspectos.

En el caso específico de México, los principales estados productores de árboles de Navidad son: Estado de México, Guanajuato, Distrito Federal, Coahuila, Veracruz, Durango, Michoacán y Puebla. Las especies que son principalmente utilizadas en México incluyen pinos, dentro de los que se incluyen primordialmente *Pinus ayacahuite*, denominado comúnmente pino blanco o pino vikingo, *P. greggii* conocido como pino prieto y *P. cembroides* llamado también pino piñonero; abetos, entre ellos *Abies religiosa* (oyamel) y algunas especies de *Picea* y *Pseudotsuga* denominados pinabetes (CONAFOR 2014). Una de las especies de mayor importancia es *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schltdl. Caracterizada por ser endémica de Mesoamérica y es altamente cotizada en diversas partes de México y Centroamérica, tanto por su uso ornamental, como por su madera, y sus usos medicinales y veterinarios (Musálem y Ramírez-Luis, 2003). Como todas las especies de pinos, *P. ayacahuite* requiere de manera obligada del establecimiento de la ectomicorriza para poder sobrevivir en condiciones naturales. Sin embargo, a pesar de su enorme

importancia ecológica y económica, a la fecha solo existe un estudio de los simbiontes asociados naturalmente con *P. ayacahuite*. Flores y Honrubia (2005) efectuaron la síntesis de la ectomicorriza, en germoplasma guatemalteco, de este árbol y *Lactarius indigo*, un Basidiomycete comestible de un atractivo color azul, caracterizado por su capacidad para generar látex en cualquier parte del esporoma. El presente estudio se desarrolló con la finalidad de contribuir a la generación de conocimiento relacionado con aspectos básicos y aplicados de la simbiosis ectomicorrízica en el árbol de Navidad Mexicano *P. ayacahuite*. El trabajo está dividido en tres capítulos experimentales. En el primero se evaluó la influencia de la colonización ectomicorrízica con dos especies de hongos comestibles procedentes de la Sierra Nevada, México, en el crecimiento y contenido nutrimental de *P. ayacahuite*. En el segundo capítulo se evaluó la respuesta diferencial a la inoculación ectomicorrízica en germoplasma vegetal de dos procedencias. Finalmente, en el tercer capítulo se efectuó una caracterización morfoanatómica de las ectomicorrizas sintetizadas después de dos años, entre raíces de *P. ayacahuite* y los hongos *Hebeloma mesophaeum s.l.*, *Thelephora aff. terrestris* y *Cenococcum geophilum*. Esta caracterización incluyó la descripción con microscopía electrónica de barrido.

## 1.1 LITERATURA CITADA

Chastagner GA, Benson DM (2000). The Christmas tree: Traditions, production, and diseases. Online. Plant Health Progress. Department of Plant Pathology, Washington State University, Puyallup, WA

Comandini O, Rinaldi AC, Kuyper TW (2012) Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity: a continuous challenge. pp. 165-200. In: Pagano M (ed). Mycorrhiza: occurrence in natural and restored environments. Nova Science Publishers, Inc. Nueva York, EUA

CONAFOR (2004) Los árboles de Navidad. Comisión Nacional Forestal, México, D.F

- FAO (2006) Global Forest Resources Assessment 2005. Progress towards sustainable forest management. FAO Forestry paper 147. Roma, Italia
- Flores R, Díaz G, Honrubia M (2005) Mycorrhizal synthesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. with five Neotropical pine species. *Mycorrhiza* 15:563-570
- GFR (2010) *Global Forest Resources Assessment 2010*, Main report, FAO Forestry Paper 163. Roma, Italia
- Musálem MA, Ramírez LA (2003) Monografía de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Chapingo, estado de México
- Myers-Madeira EC (2008) Policies to reduce emissions from deforestation and degradation (redd) in developing countries. Resources for the Future. Washington, D.C
- Pérez-Moreno J, Read DJ (2004) Los hongos ectomicorrízicos lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29:239-247
- Read JD, Pérez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - A journey towards relevant? *New Phytologist* 157: 475-492
- Read DJ, Freer-Smith PH, Morison JIL, Hanley N, West CC, Snowdon P (eds) (2009) Combating climate change – a role for UK forests. An assessment of the potential of the UK's trees and woodlands to mitigate and adapt to climate change. The synthesis report. The Stationery Office, Edinburgh
- Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW (2008) Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33:1–45
- Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis. 3a edición. Academic Press, Londres
- USDA (2014) United States Department of Agriculture. 2014. Christmas Tree Production. Washington, D.C

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 2.1 Objetivo General

Contribuir al conocimiento de la simbiosis ectomicorrízica establecida con *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schltld. en México, tendiente a incrementar el conocimientos de sus micobiontes nativos y a su aplicación biotecnológica en la producción de plantas en vivero.

#### 2.2 Objetivos particulares

- Evaluar la influencia de la inoculación de dos hongos comestibles ectomicorrízicos y del material de los horizontes de fermentación y orgánico, procedentes de la Sierra Nevada, en el crecimiento y movilización nutrimental de *P. ayacahuite*.
- Evaluar la influencia de la ectomicorrización con suelo nativo de una plantación de *P. ayacahuite* de la Sierra Nevada, en el crecimiento y contenido nutrimental de germoplasma vegetal de dos procedencias.
- Caracterizar las micorrizas sintetizadas después de dos años entre las raíces de *P. ayacahuite* y *Hebeloma mesophaeum* s.l., *Thelephora* aff. *terrestris* y *Cenococcum geophilum*.

### 2.3 Hipótesis particulares

- La inoculación con hongos comestibles ectomicorrízicos, y con materiales de los horizontes de fermentación y orgánico origina un mayor crecimiento y movilización de macro- y micronutrientes en *P. ayacahuite*.
- Existe un efecto diferencial de las distintas procedencias de genotipos de *P. ayacahuite*, en el efecto benéfico de la ectomicorrización originada por la inoculación con suelo forestal, en términos de crecimiento y contenido nutricional.
- Las características diagnósticas morfoanatómicas de las ectomicorrizas formadas por *P. ayacahuite* con los micobiontes *Hebeloma mesophaeum* s.l., *Thelephora* aff. *terrestris* y *Cenococcum geophilum* son consistentes con las conocidas con otros fitobiontes a nivel internacional.

## CAPITULO III

### DESARROLLO Y CONTENIDO NUTRIMENTAL DEL PINO DE NAVIDAD *Pinus ayacahuite* Ehrenb. Ex Schltdl. INOCULADO CON HONGOS ECTOMICORRÍZICOS

#### 3.1 RESUMEN

El comercio internacional de árboles de Navidad está valuado en billones de dólares anualmente. Además, esta actividad tiene un impacto positivo social, económico y ambiental particularmente en países en vías de desarrollo los cuales usualmente tienen altas tasas de deforestación como México, al contribuir en la activación de los trabajos locales, ayudando en el secuestro de carbono, recarga de mantos acuíferos así como la reducción de la erosión del suelo. La producción de dichos árboles en México es una industria creciente, que produce anualmente alrededor de 900,000 árboles, principalmente del árbol nativo *Pinus ayacahuite*. Para sobrevivir, esta especie requiere de manera obligada del establecimiento en sus raíces de una simbiosis mutualista conocida como ectomicorriza, la cual incrementa la movilización de nutrientes hacia las plantas. Sin embargo, a pesar de su importancia ecológica, fisiológica y económica, a la fecha no se han efectuado estudios relacionados con los efectos de la inoculación ectomicorrízica en el crecimiento y contenido nutrimental del árbol de Navidad mexicano, *Pinus ayacahuite*. Dado que uno de los criterios de selección de hongos ectomicorrízicos que recientemente ha cobrado importancia a nivel internacional es la comestibilidad, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la inoculación ectomicorrízica en el crecimiento y contenido nutrimental de *P. ayacahuite* con dos hongos ectomicorrízicos comestibles que son ampliamente comercializados en

mercados de centro de México (*Helvella lacunosa* y *Hebeloma mesophaeum*). Adicionalmente, de manera comparativa se utilizó como fuente de inóculo ectomicorrízico suelo nativo de un rodal de *P. ayacahuite*. Después de dos años se observó un efecto benéfico en el crecimiento de los árboles, como resultado de la inoculación en términos de peso seco total, así como mayor contenido total de N, P, Mg y Fe. El porcentaje de micorrización de las plantas inoculadas varió de 41 a 59%, dependiendo de la fuente de inóculo. Adicionalmente, existió una alta eficiencia en la traslocación de Ca y Fe a la parte aérea de las plantas inoculadas independientemente de la fuente de inóculo. Hasta donde conocemos éste es uno de los primeros reportes de movilización de Fe por hongos ectomicorrízicos en gimnospermas. Los resultados encontrados demuestran el gran potencial biotecnológico de la inoculación con los hongos ectomicorrízicos comestibles *H. lacunosa* y *H. mesophaeum* para la producción en vivero de plantas de *P. ayacahuite*.

**Palabras clave:** morfoanatomía, esclerocios, hongos comestibles ectomicorrízicos.

### 3.2 INTRODUCCION

La producción de árboles de Navidad es una industria valuada anualmente en billones de dólares a nivel mundial. Las demandas de Europa y de Estados Unidos de Norteamérica de dichos árboles, son de alrededor de 50 y 35 millones por año, respectivamente (NCTA 2014; FAO 2013; Whiskey y Carthy 2006). Esta actividad favorece la reactivación económica en las áreas en donde se desarrolla, debido a la generación de empleos [tan sólo Estados Unidos genera alrededor de 100,000 empleos anualmente según USDA (2014)], además de contribuir a la captura de carbono, la recarga de los mantos acuíferos, la reducción de la erosión del suelo y la conservación de la biodiversidad, especialmente en áreas degradadas. A nivel mundial las coníferas más utilizadas como árboles de Navidad son especies de los géneros *Abies*, *Pinus* y *Pseudotsuga*. Todas estas especies arbóreas requieren de manera obligada de una asociación mutualista que se establece entre hongos y las raíces de los árboles para poder sobrevivir, denominada ectomicorriza. La ectomicorriza incrementa la absorción de agua y nutrientes, orgánicos e inorgánicos, de los árboles asociados, al constituir una extensión de la raíz y explorar un mayor volumen de suelo, mientras tanto los hongos asociados reciben carbono de sus plantas hospedadoras (Pérez-Moreno y Read 2000; Read y Pérez-Moreno 2003). Así mismo, la simbiosis ectomicorrizica proporciona protección a la planta contra patógenos y mayor tolerancia a condiciones de estrés, tales como: trasplante, sequía, altas temperaturas y presencia de metales pesados (Smith y Read 2008; Barroetaveña *et al.* 2012). Uno de los criterios que ha cobrado actualmente primordial interés a nivel internacional en la selección de hongos ectomicorrízicos a utilizarse en la inoculación de árboles forestales es su comestibilidad (Guerin-Laguet *et al.* 2014; Wan *et al.* 2014).

Dada su importancia económica, social y ambiental, la producción de árboles de Navidad actualmente, es una actividad significativa en países



en desarrollo con problemas sociales, económicos y de alta deforestación como México. En consecuencia la generación de plantaciones de árboles de Navidad en el país ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. Sin embargo, la demanda nacional está lejos de ser cubierta por la producción en plantaciones domésticas. En México, se consumen alrededor de 1.8 millones de árboles de Navidad al año, mientras que la producción doméstica anual varía de 700 a 900 mil árboles, por lo que el país importa alrededor de un millón de árboles por año, principalmente de Estados Unidos (CONAFOR 2013). Además de la pérdida de derrama económica local y regional que implica, la importación de dichos árboles conlleva un riesgo fitosanitario para México, lo cual es particularmente riesgoso debido a que la nación es un importante reservorio genético de especies forestales a nivel internacional. Por ejemplo, se conoce que México alberga la mayor diversidad de especies de pinos y encinos nativos a nivel mundial, con 72 taxa y 150 especies de *Pinus* y *Quercus*, respectivamente (Perry 1991; Valencia 2004). Además, se han registrado más de 40% de los géneros de hongos conocidos a nivel mundial (Pérez-Moreno *et al.* 2014). La principal especie utilizada como árbol de Navidad en la nación, es la especie nativa *Pinus ayacahuite* (CONAFOR 2013). A pesar de su gran importancia económica, ecológica y cultural, los estudios relacionados con la influencia de la inoculación ectomicorrízica en el crecimiento del árbol de Navidad mexicano, *P. ayacahuite* ha recibido escasa atención. A la fecha no existe un estudio donde se evalúe la influencia de la inoculación con hongos ectomicorrízicos nativos en la transferencia nutrimental de éstos árboles. En el presente trabajo se evaluó la influencia de la inoculación con *Helvella lacunosa* y *Hebeloma mesophaeum*, dos hongos comestibles ectomicorrízicos ampliamente consumidos y comercializados en el centro de México, en el crecimiento y contenido nutrimental (N, P, K, Ca, Mg, Mn y Fe) del árbol de Navidad mexicano. De manera comparativa se evaluó también el efecto de la

inoculación en el crecimiento y contenido nutrimental utilizando como inóculo suelo nativo de un rodal de *P. ayacahuite*.

### 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.3.1 Material vegetal y preparación de inóculo

Para la obtención de las semillas, se recolectaron estróbilos de un rodal de *Pinus ayacahuite* (Fig. 3.1a), localizado en la Sierra Nevada, Municipio de Texcoco, Estado de México, los cuales fueron secados a temperatura ambiente. Una vez obtenidas las semillas, se colocaron en un recipiente con agua durante 24 horas, cambiando el agua cada 7 horas para permitir su oxigenación. Después, las semillas se esterilizaron superficialmente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 20 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril en condiciones asépticas. Posteriormente, las semillas fueron sembradas en charolas de crecimiento que contenían arena y piedra volcánica (tezontle) estéril.

Paralelamente, se recolectaron esporomas de los hongos ectomicorrízicos *Helvella lacunosa* (Fig. 3.1b) y *Hebeloma mesophaeum* en el mismo rodal de donde se recolectaron los estróbilos. Se cortaron los estípites de dichos esporomas, para separarlos de sus píleos. Esto debido a que los píleos son las estructuras que contienen las esporas. Los píleos así obtenidos fueron secados a 35 °C durante 48 h. Una vez secos, éstos fueron molidos y pasados a través de un tamiz con una apertura de 1.19 mm. Los inóculos adquiridos mediante el proceso anterior se almacenaron a 5 °C hasta su utilización. De manera simultánea, se recolectó material de los horizontes de fermentación (F) y orgánico (O) del mismo rodal de *Pinus ayacahuite*, donde se recolectaron los estróbilos. Este material, utilizado como fuente de inóculo ectomicorrízico, denominado de aquí en adelante

“suelo nativo” fue tamizado para la homogenización del tamaño de partículas y almacenado también a 5 °C, hasta su utilización.

### 3.3.2 Montaje del experimento e Inoculación

Una vez germinadas las plántulas de *Pinus ayacahuite*, se trasplantaron a tubetes de plástico de 140 cm<sup>3</sup>. Estos contenían como sustrato, una mezcla de arena de río, corteza de pino molida y suelo forestal, en proporción 2:2:1. El sustrato fue previamente esterilizado con vapor de agua a 125 °C durante 3 horas, se dejó reposar durante dos días y al cuarto día se esterilizó por segunda ocasión a la misma temperatura durante dos horas. Los tubetes se llenaron en su base con una capa de tezontle estéril y el resto con sustrato estéril.

La inoculación de propágulos ectomicorrízicos se llevó a cabo durante el trasplante de las plántulas, aplicando una dosis de 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup> esporas por planta de *Helvella lacunosa*, *Hebeloma mesophaeum* y 30 cm<sup>3</sup> de suelo nativo. La dosis de esporas de *H. lacunosa* y *H. mesophaeum* se aplicaron en dos partes, la primera durante el transplante y la segunda 90 días después. Para incorporar dichos inóculos se realizó un orificio en el sustrato cerca del tallo de las plantas. En cuanto a la inoculación de las plantas con suelo nativo, los tubetes fueron llenados por capas de material estéril (excepto el inóculo): en la base se colocó una capa de tezontle, posteriormente una capa de sustrato, encima de la cual se colocó una capa del inóculo de suelo nativo, sobre la que se agregó nuevamente una capa de sustrato y finalmente una capa de tezontle; los volúmenes de éstos materiales fueron de aproximadamente 15, 40, 30, 40, y 15 cm<sup>3</sup>, respectivamente. Adicionalmente, se trasplantaron plantas a las cuales no se les adicionó ningún inóculo. Existieron entonces, en total 4 tratamientos: i) plantas inoculadas con *H. lacunosa*, ii) plantas inoculadas con *H. mesophaeum*; iii) plantas inoculadas con suelo nativo y iv) plantas no inoculadas. Cada tratamiento tuvo 15 unidades experimentales, cada una consistente en una planta, por lo que se tuvieron en total 60 plantas, en un

diseño experimental completamente al azar. Con el fin de prevenir el “damping-off” en las plantas, en el riego se aplicó Captan, en una solución de 2.5g/L cada tercer día hasta la lignificación de los tallos. Posteriormente las plantas recibieron riego sin Captan cada tercer día durante los siguientes 720 días.

### **3.3.3 Variables evaluadas**

El diámetro de la base del tallo y la altura fueron evaluados en todas las plantas, 720 días después de la siembra. En ese momento, se evaluó también, la colonización ectomicorrízica para lo cual se realizó un muestreo destructivo de tres plantas seleccionadas aleatoriamente de cada tratamiento. Para ello, se separó la parte aérea de éstas 3 plantas de sus respectivas raíces. Las raíces fueron divididas en tres segmentos correspondientes a la parte superior, media y baja del cepellón, cada una de ellas ocupando un volumen aproximado de 47 cm<sup>3</sup> de sustrato. Estas raíces se lavaron bajo el chorro de agua corriente, empleado tres tamices de 1.19, 0.180 y 0.050 mm de diámetro de abertura, para coleccionar el mayor número de raíces cortas. El conteo de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas y muertas se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico Motic SMZ-143. El porcentaje de colonización se obtuvo calculando la proporción de raíces finas ectomicorrizadas en relación al número total de raíces finas de cada planta. Para comprobar la existencia de raíces ectomicorrizadas se efectuaron cortes transversales detectando la presencia de manto, red de Hartig y micelio externo. Se tomaron fotografías de éstas estructuras mediante un microscopio Olympus BX51. La evaluación del peso seco de la parte aérea y de la raíz fue efectuada de manera destructiva en quince plantas. La parte aérea de la planta, así como el total de la raíz fueron deshidratadas a 70 °C por 48 horas y después pesadas en una balanza. Posteriormente, se realizó el análisis nutrimental de los macro y micronutrientes: N, P, K, Ca, Mg, Mn y Fe tanto de la parte

aérea como radical de tres plantas de cada tratamiento aleatoriamente seleccionadas El N se determinó por el método semimicro-Kjeldahl (Bremner 1975); el P total, según el método de Allen *et al.* (1997); el K, mediante extracción con acetato de amonio por fotometría de llama, y el Ca, Mg, Fe, y Mn mediante absorción en un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian, Spectra-AA220).

### **3.3.4 Análisis estadístico**

Para las variables, de crecimiento, peso seco de la parte aérea y raíz, así como del contenido nutrimental, se realizó un análisis de varianza y se hizo una comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el programa Statistical Analysis System (SAS 2002). Los datos de porcentaje de colonización ectomicorrízica fueron transformados a raíz cuadrada, para cumplir con los criterios de normalidad.

## **3. 4 RESULTADOS**

### **3.4.1 Crecimiento Vegetal**

Se observó un mayor peso seco de la parte aérea y peso seco total en plantas inoculadas con esporas de *Helvella lacunosa* en comparación con las plantas inoculadas con suelo nativo o las plantas que no fueron inoculadas (Cuadro 3.1). Una tendencia similar se observó solo en el caso del peso seco total para plantas inoculadas con *H. mesophaeum* en comparación con plantas no inoculadas. En contraste, no existieron diferencias en el peso seco de la raíz entre las plantas inoculadas y no inoculadas. En lo que se refiere a la altura de las plantas, independientemente de la fuente de inóculo utilizado existió mayor altura en las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas (Fig. 3.1c y

Cuadro 3.1). Una tendencia opuesta se observó en el diámetro del tallo en donde no existieron diferencias entre tratamientos (Cuadro 3. 1).

### 3.4.2 Contenido nutrimental

**Macronutrientes.** En el caso de la parte aérea se observó un mayor contenido de N, P, Ca y Mg en las plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas, independientemente de la fuente de inóculo (Cuadro 3.2). Por el contrario una tendencia opuesta se observó en la raíz, en donde no existieron diferencias en los valores de N, P, Ca y Mg en las plantas inoculadas o no inoculadas. En el caso de K en raíz y parte aérea no existieron diferencias entre los tratamientos. De particular interés fueron las diferencias en el contenido de Ca en las plantas inoculadas y no inoculadas. Se encontraron 3.30, 2.64 y 2.37 veces más Ca en la parte aérea de plantas inoculadas con esporas de *Helvella lacunosa*, suelo nativo y esporas de *Hebeloma mesophaeum* en comparación con las plantas no inoculadas (Cuadro 3. 2). Sumando los valores de raíz y parte aérea, se registró un mayor contenido de N total en las plantas inoculadas, independientemente de la fuente de inóculo, en comparación con las plantas no inoculadas. Una tendencia contraria se observó para el K y Ca total en donde no existieron diferencias entre los tratamientos. Las plantas inoculadas con esporas de *Helvella lacunosa* tuvieron mayor contenido de P y Mg total que las plantas no inoculadas. Mientras que las plantas inoculadas con el suelo nativo presentaron mayor contenido de P total que aquellas no inoculadas (Cuadro 3.2).

**Cuadro 3.1.** Peso seco, altura y diámetro del tallo de plantas de *Pinus ayacahuite*, de dos años de edad, inoculadas o no, con 3 fuentes de inóculo.

Tratamiento ¶	Peso seco (mg)			Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)
	Parte aérea	Raíz	Total		
Plantas inoculadas con					
<i>Helvella lacunosa</i>	2360.0±292.0a	1536.7±118.5a	3896.7±227.6a	21.37 ±0.1a	3.62 ±0.1a
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	1692.6±90.3ab	1653.1±197.2a	3345.7±273.8a	18.70±0.4a	3.71± 0.2a
Suelo nativo	1472.6±42.7b	1185.8±105.0a	2658.4±101.1ab	21.47±0.1a	3.11 ±0.1a
Plantas no inoculadas	1058.7±39.5b	993.4±398.1a	2052.1±412.3b	15.62± 0.4b	3.79 ±0.2a

¶ Para detalles de las fuentes de inóculo ver sección de materiales y métodos. Los valores son promedios ± error estándar de la media. Para peso seco, para altura y diámetro del tallo (n=15). Valores con la misma letra dentro de la misma columna no son diferentes de acuerdo con Tukey (p<0.05).

**Cuadro 3. 2.** Contenido de N, P, K, Ca y Mg de la parte aérea, raíz y total de plantas de *Pinus ayacahuite* de dos años de edad, inoculadas o no, con 3 fuentes de inóculo.

Tratamiento ¶	N	P	K	Ca	Mg
	Mg por planta				
Parte aérea de					
plantas inoculadas con <i>Helvella lacunosa</i>	12.98±1.60a	0.70±0.087a	5.90±0.73a	10.85±1.34a	5.04±0.78a
Plantas inoculadas con <i>Hebeloma mesophaeum</i>	13.37±0.71a	0.67±0.03a	4.40±0.23a	7.78±0.41a	4.06±0.21a
Plantas inoculadas con suelo nativo	11.33±0.32a	0.88±0.25a	6.33±0.18a	8.67±2.73ba	3.23±0.09ba
Plantas no inoculadas	5.82±0.21b	0.42±0.01b	4.22±1.02a	3.28±0.12b	2.01±0.07b
Raíz de					
Plantas inoculadas con <i>Helvella lacunosa</i>	11.37±0.87a	0.92±0.07a	3.22±0.24a	11.21±0.86a	3.68±0.28a
Plantas inoculadas con <i>Hebeloma mesophaeum</i>	10.91±1.30a	0.82±0.98a	4.13±0.49a	11.57±1.38a	2.81±0.33a
Plantas inoculadas con suelo nativo	6.04±0.39a	0.94±0.08a	2.37±0.21a	11.02±0.97a	2.60±0.23a
Plantas no inoculadas	6.45±2.58a	0.49±0.19a	2.18±0.87a	9.14±3.66a	2.28±0.91a
Total de					
Plantas inoculadas con <i>Helvellalacunosa</i>	24.35±1.18a	1.62±0.06a	9.12±0.58a	22.07±0.97a	8.73±0.62a
Plantas inoculadas con <i>Hebeloma mesophaeum</i>	24.28±1.91a	1.50±0.12ab	8.53±0.69a	19.35±1.72a	6.87±0.52ba
Plantas inoculadas con suelo nativo	17.38± 0.22a	1.83±0.08a	8.70±0.23a	19.69±1.83a	5.84±0.22b
Plantas no inoculadas	12.28±2.66b	0.92±0.20b	6.40±1.27a	12.42±3.7a	4.29±0.94b

¶ Para detalles de las fuentes de inóculo ver sección de materiales y métodos. Los datos mostrados son promedios ± error estándar de la media (n = 3). Valores en la misma columna, para cada parte de la planta, con la misma letra no son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (p<0.05).



**Micronutrientes.** En el caso del contenido de Fe, se observó una tendencia similar a la registrada para el contenido de Ca. Existió mayor contenido de Fe en la parte aérea de las plantas inoculadas en comparación con las plantas no inoculadas, independientemente de la fuente de inóculo (Cuadro 3.3). Sin embargo, no existieron diferencias en el contenido de Fe en la raíz y de la planta completa entre plantas inoculadas y no inoculadas. Existió 3.79, 2.36 y 2.24 veces más Fe en la parte aérea de las plantas inoculadas con *Helvella lacunosa*, suelo nativo y *Hebeloma mesophaeum* que en las plantas no inoculadas (Cuadro 3. 3). En el caso del contenido de Mn, no existieron diferencias entre plantas inoculadas o no inoculadas independientemente de la fuente de inóculo (Cuadro 3. 3).

#### **3.4.3 Relación parte aérea:raíz**

Se observó una mayor relación parte aérea:raíz del peso seco en plantas inoculadas con *H. lacunosa* y con suelo nativo en comparación con aquellas no inoculadas o inoculadas con *H. mesophaeum* (Cuadro 3. 4). La mayor relación de peso seco de plantas inoculadas versus no inoculadas se observó en el caso de *H. lacunosa* (Cuadro 3. 4). En el caso de plantas inoculadas se observó mayor cantidad de N, Mg y Mn en la parte aérea que en la raíz, independientemente de la fuente de inóculo. Los mayores valores de la relación parte aérea:raíz entre plantas inoculadas y no inoculadas fueron registrados para Ca y Fe, independientemente de la fuente de inóculo empleada, (Cuadro 3.4). Esto fue particularmente evidente en la relación parte aérea:raíz entre plantas inoculadas con *H. lacunosa* y plantas no inoculadas en donde los valores fueron de 2.69 y 2.87 para Ca y Fe, respectivamente. También se observó un valor alto en el contenido de N de la relación parte aérea:raíz entre plantas inoculadas con suelo nativo y plantas no inoculadas, siendo

**Cuadro 3. 3.** Contenido de Fe y Mn de plantas de *Pinus ayacahuite*, de dos años de edad, inoculadas o no, con 3 fuentes de inóculo.

Tratamiento	Fe (µg)			Mn (µg)		
	Parte aérea	Raíz	Total de la planta	Parte aérea	Raíz	Total de la planta
Plantas inoculadas con						
<i>Helvellalacunosa</i>	1.86±0.23a	35.62±2.75a	37.48±2.60a	6.03±1.33a	2.25±0.17a	8.29±1.20a
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	1.11±0.05b	26.61±3.17a	27.73±3.22a	5.28±0.28b	1.86±0.22a	7.14±0.47a
Suelo nativo	1.16±0.03b	32.37±2.86a	33.53±2.85a	1.92±0.80b	0.90±0.08a	2.83±0.86b
Plantas no inoculadas	0.49±0.01c	27.27±10.93a	27.77±10.93a	5.24±0.19ab	1.33±0.53a	6.57±0.62ab

¶ Para detalles de las fuentes de inóculo ver sección de materiales y métodos. Los datos mostrados son promedios ± error estándar de la media (n = 3). Valores en la misma columna, para cada parte de la planta, con la misma letra no son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey (P ≤ 0.05)

Cuadro 3. 4. Relaciones parte aérea:raíz del peso seco y contenido nutrimental de plantas de *Pinus ayacahuite*, de dos años de edad, inoculadas o no, con 3 fuentes de inóculo.

Tratamientos	peso seco (g)	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn
		mg					μg	
Plantas inoculadas con <i>Hebeloma mesophaeum</i>	1.02	1.22	0.81	0.09	0.67	1.44	0.04	2.82
Plantas inoculadas con <i>Helvella lacunosa</i>	1.53	1.14	0.76	0.27	0.96	1.36	0.05	2.67
Plantas inoculadas con suelo nativo	1.24	1.87	0.93	2.67	0.78	1.24	0.03	2.11
Plantas no inoculadas	1.06	0.90	0.85	1.93	0.36	0.88	0.01	3.93
Plantas inoculadas con <i>Hebeloma mesophaeum</i> : plantas no- inoculadas	0.96	1.35	0.95	0.05	1.87	1.64	2.30	0.71
Plantas inoculadas con <i>Helvella lacunosa</i> : plantas no- inoculadas	1.44	1.26	0.88	0.14	2.69	1.55	2.87	0.67
Plantas inoculadas con suelo nativo: plantas no- inoculadas	1.16	2.07	1.09	1.37	2.19	1.41	1.92	0.53

el valor de dicha relación de 2.07.

#### **3.4.4 Producción de raíces cortas y colonización**

Se observó un mayor número de raíces cortas en las plantas inoculadas con *H. lacunosa* respecto a las no inoculadas (Fig. 3.2). El número total de raíces fue 3.65 veces mayor en plantas inoculadas con éste hongo ectomicorrízico, respecto a plantas no inoculadas. En contraste no existieron diferencias entre el número total de raíces cortas en plantas inoculadas con *H. mesophaeum* o suelo nativo y plantas no inoculadas. El porcentaje de raíces cortas muertas varió de 4.0, 16.1, 26.3 y 31.3% en plantas inoculadas con *H. lacunosa*, *H. mesophaeum*, suelo nativo y plantas no inoculadas, respectivamente. Las plantas inoculadas con *H. lacunosa* produjeron 2.2 y 3.5 veces más raíces micorrizadas que las plantas inoculadas con *H. mesophaeum* y suelo nativo (Fig. 3.2). La colonización micorrízica de plantas inoculadas con *H. lacunosa*, *H. mesophaeum* y suelo nativo fue de 58.7, 52.3 y 40.9 %, respectivamente, después de dos años de ser mantenidas en invernadero. En contraste, se observó un porcentaje muy bajo (4%) de colonización ectomicorrízica en plantas no inoculadas.

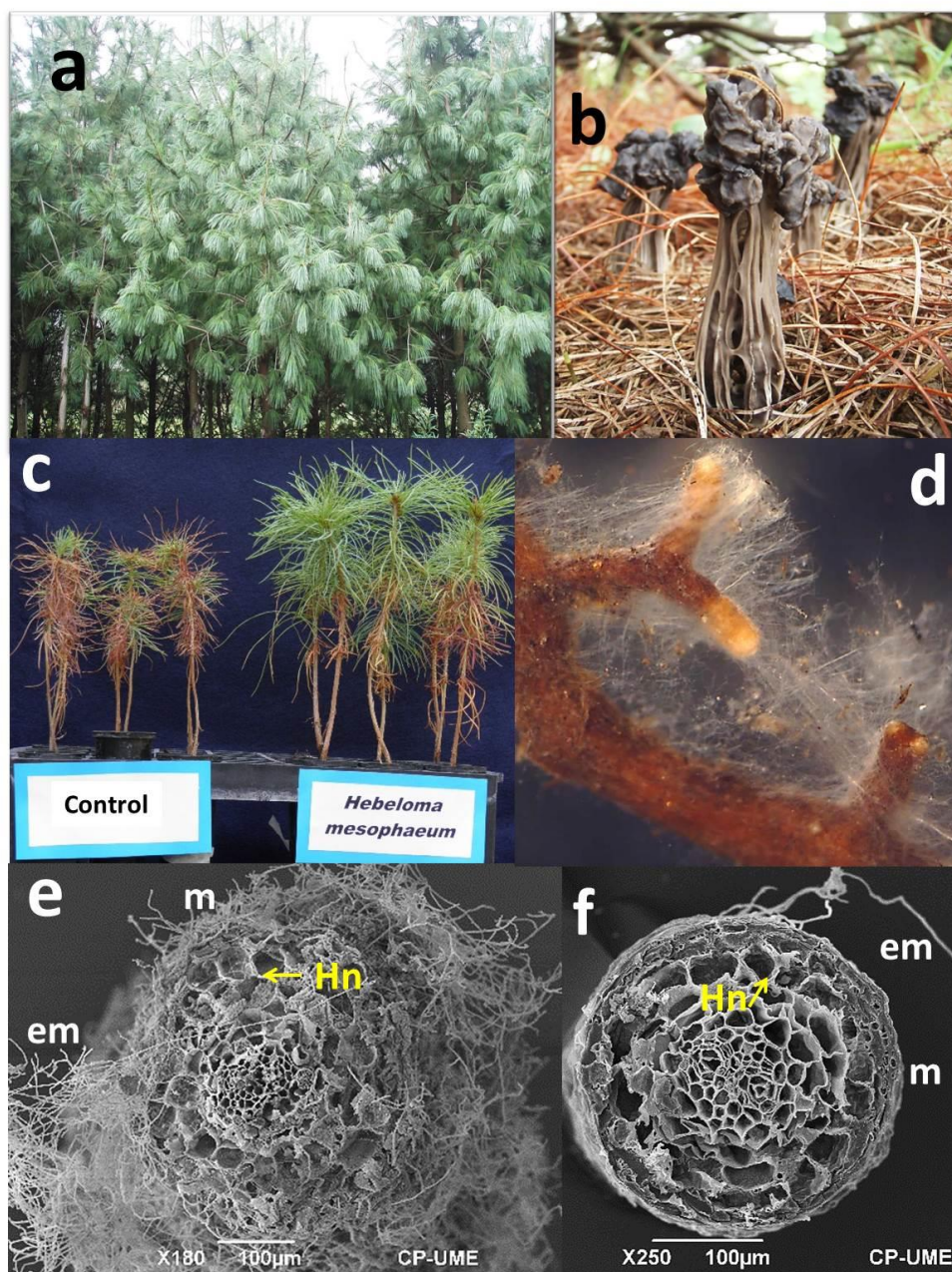
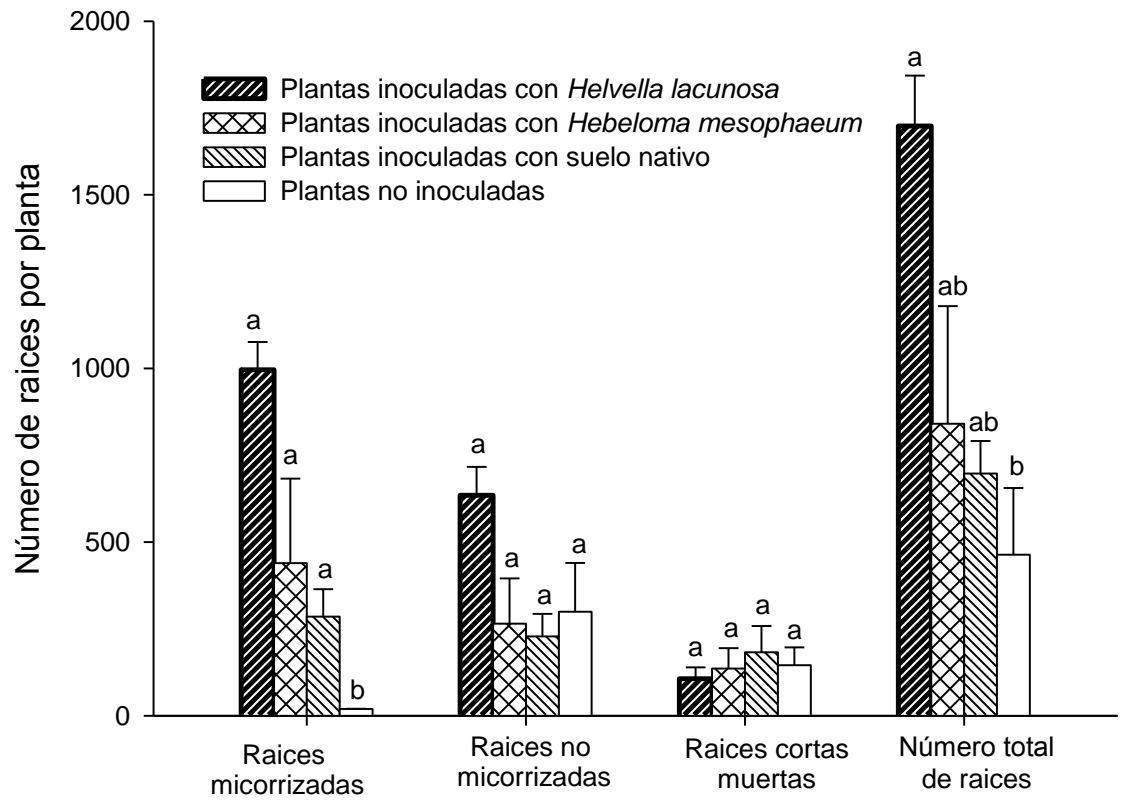


Figura 3.1. a) Rodal del pino de Navidad Mexicano *Pinus ayacahuite*, b) Esporomas de *Helvella lacunosa* creciendo en un rodal de *P. ayacahuite*, d) Efecto de la inoculación con esporas de *Hebeloma mesophaeum* en el crecimiento de *P. ayacahuite* después de dos años; plantas inoculadas (derecha), plantas no inoculadas (izquierda), d) Ectomicorriza de *Hebeloma mesophaeum* con *P. ayacahuite*, e) y f) Micrografías tomadas en microscopio de barrido de las ectomicorizas de *H. mesophaeum* y *H. lacunosa*, mostrando manto (m), red de Hartig (Hn) y micelio externo (em).



**Figura 3.2. Número de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas, muertas y total, en plantas de *P. ayacahuite* de dos años de edad, inoculadas y no inoculadas con 3 fuentes de inóculo. Los datos mostrados son promedios  $\pm$  error estándar de la media ( $n = 3$ ). Valores para cada tipo de raíces con la misma letra no son diferentes, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ )**

### 3.5 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se reporta un efecto benéfico, en términos de altura y peso seco total, de las plantas de *Pinus ayacahuite* como consecuencia de la inoculación con los hongos ectomicorrízicos *H. lacunosa* y *H. mesophaeum*. Tendencias similares se registraron en el contenido de N, P, Ca y Mg de la parte aérea y del contenido total de N, P, Mg y Mn, de plantas inoculadas con dichos hongos. Previamente, se ha documentado que la inoculación con hongos ectomicorrízicos origina efectos positivos en el crecimiento y contenido nutricional de sus plantas hospederas asociadas, tanto gimnospermas como angiospermas (Smith y Read 2008; Siddiqui y Pitchtel 2008). Recientemente, uno de los criterios de selección de hongos ectomicorrízicos para inocular plantas de interés forestal, ha sido su comestibilidad (Yun y Hall 2004; Zambonelli y Bonito 2012; Guerin-Laguette *et al.* 2014). Esto debido a que, adicional a los efectos benéficos que origina la inoculación con los hongos ectomicorrízicos comestibles, su comercio internacional ha sido estimado en billones de dólares anualmente (Hall *et al.* 2003). Así mismo, se ha demostrado que los hongos comestibles ectomicorrízicos constituyen un recurso forestal no maderable de enorme importancia social, ambiental y económica en la conservación de los ecosistemas forestales (Martínez-Peña *et al.* 2011). Sousa *et al.* (2012) inocularon plantas de *Pinus pinaster* con los hongos comestibles ectomicorrízicos *Suillus bovinus*, *Laccaria laccata* y *Lactarius deterrimus* y reportaron efectos benéficos en

términos de altura, biomasa total y mayor concentración de N en la parte aérea en plantas inoculadas, con respecto a las no inoculadas. Slama *et al.* (2012) inocularon plantas de *Helianthemum sesiliflorum*, un arbusto que crece en zonas desérticas africanas, con el hongo ectomicorrízico comestible *Terfezia boudieri* conocido como “la trufa del desierto”. Dichos autores encontraron que las plantas inoculadas presentaron mejor desarrollo en términos de altura, número de hojas y concentraciones de N, P y K en comparación con las plantas que no fueron inoculadas. Sanchez-Zabala *et al.* (2013) inocularon plantas de *Pinus pinaster* con los hongos ectomicorrízicos comestibles *Suillus luteus* y *Lactarius deliciosus*, reportando mayor altura y diámetro del tallo en las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas. Tres años después de ser transferidas de vivero al campo, estos autores observaron que las plantas inoculadas presentaron menores índices de mortalidad comparadas con las plantas no inoculadas. Adicionalmente, encontraron que los niveles de carbohidratos solubles y aminoácidos fueron mayores en la época de frío en las plantas inoculadas lo que contribuyó a superar los posibles daños causados por congelamiento de los tejidos vegetales. Por lo que, estos autores señalaron que un mayor contenido nutrimental presente en las plantas inoculadas, constituye una ventaja competitiva para superar el estrés al ser trasplantadas del vivero al campo, respecto a las plantas no inoculadas. El género *Helvella* incluye 52 especies a nivel mundial (Kirk *et al.* 2008), de las cuales 19 se han reportado en México (Landeros y Guzmán-Dávalos 2013). Dentro de estas especies se encuentra



*Helvella lacunosa*, la cual ha sido reportada en Europa, Norte América y Asia (Abbot y Currah 1997; Asef 2013; Nguyen *et al.* 2013). En México esta especie es altamente apreciada como comestible y abundantemente comercializada en el centro del país (Pérez-Moreno *et al.* 2008; 2010), en donde se asocia con *Pinus*, *Abies* y bosque mixto de *Quercus* (Medel *et al.* 2012; Landeros y Guzmán-Dávalos 2013). Zhang *et al.* (2010), aislaron una proteasa alcalina llamada “helvellisina” de los esporomas de *H. lacunosa*. Las proteasas alcalinas son enzimas ampliamente utilizadas comercialmente en las industrias de detergentes, cervecera, fotográfica, y de la piel, así como en la producción de proteínas, carne, y productos lácteos (Kalis 1988). Recientemente, Leal *et al.* (2013) reportaron una alta concentración de licopenos en éste hongo ectomicorrízico. Los licopenos son sustancias con propiedades antioxidantes, antiinflamatorios y quimioterapéuticos sobre las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y algunos tipos de cáncer, también han sido utilizados contra la infertilidad masculina (Cruz-Bojórquez *et al.* 2013; Takeshima *et al.* 2014; Durairajanayagam *et al.* 2014). A pesar de la importancia de *H. lacunosa*, hasta donde conocemos, sólo existe un trabajo en donde se haya evaluado el efecto de la inoculación de éste hongo en árboles. Martínez-Amores *et al.* (1991) observaron un incremento en el peso seco de la parte aérea en las plantas de *Pinus patula* 12 meses después de la inoculación. En el presente trabajo se utilizó el hongo comestible ectomicorrízico *H. lacunosa* (Fig. 3.1b) en la inoculación de plantas de *Pinus ayacahuite* con

resultados muy favorables en cuanto a mayor peso seco en la parte aérea y peso seco total, así como mayor contenido de P, Mg y Fe, mayor producción de raíces cortas con respecto a las plantas no inoculadas. El otro hongo evaluado en esta investigación y que también mostró efectos benéficos al ser inoculado en plantas de *Pinus ayacahuite* fue *Hebeloma mesophaeum* (Fig. 3.1c). Las especies del género *Hebeloma* forman asociaciones ectomicorrízicas tanto con angiospermas como gimnospermas en asociaciones tempranas, hábitats disturbados y bosques maduros (Nara *et al.* 2003a y b, Trowbridge y Jumpponen 2004; Trocha *et al.* 2007). Garibay *et al.* (2013) reportaron que las especies del género *Hebeloma* tienen una gran importancia ecológica en los ecosistemas de *Pinus moctezumae*, dado que dicho género fue el mejor representado en los bancos de esporas de las comunidades de hongos ectomicorrízicos existentes en la Faja Volcánica Transmexicana. Obase *et al.* (2007) reportaron a *H. mesophaeum* como uno de los hongos importantes para el establecimiento de *Pinus maximowiczii*, *Salix hultenii* var. *angustifolia* y *Salix sachalinensis* después de la devastación del área por una erupción volcánica en Japón. *H. mesophaeum* es una especie de hongo ectomicorrízico que presenta una amplia comercialización en los mercados del centro de México (Montoya *et al.* 2004; Pérez-Moreno *et al.* 2010). Trabajos previos han mostrado la eficacia de esta especie para incrementar el crecimiento vegetal y el contenido de nutrientes de *Pinus hartwegii* (Perea-Estrada *et al.* 2009), *P. greggii* (Méndez-Neri *et al.* 2011; Martínez-Reyes *et al.* 2012), *P.*

*patula* y *P. pseudostrobus* (Carrasco-Hernández *et al.* 2011). Sin embargo, previamente no se había registrado el efecto benéfico en términos de crecimiento y contenido nutrimental en *Pinus ayacahuite*. Esta es una especie forestal nativa de Mesoamérica (Musalem y Ramírez 2003) apreciada por su calidad de madera, para la producción de pulpa, papel, creación de artesanías y se utiliza en aserrío, Actualmente *Pinus ayacahuite* tiene un alto valor ecológico y económico en México en plantaciones comerciales de árboles de navidad y como una especie ornamental en jardines y parques urbanos (CONAFOR 2009; Torres 2004). No obstante, el conocimiento de los simbiontes ectomicorrízicos asociados con *P. ayacahuite* ha recibido muy escasa atención. A la fecha, sólo se había registrado la síntesis y descripción de la ectomicorriza formada entre dos cepas guatemaltecas de *Lactarius indigo* con *Pinus ayacahuite* (Flores *et al.* 2005). El presente trabajo hace una aportación adicional con el estudio de la colonización ectomicorrízica de *P. ayacahuite* por un Ascomicete, *Helvella lacunosa* (Fig. 3.1 f) y otro Basidiomicete, *Hebeloma mesophaeum* (Fig.3.1 c, d y e). Además, es necesario enfatizar que el contenido de Fe y Ca en la relación parte aérea: raíz fue de 1.87 a 2.87 veces mayor en plantas inoculadas respecto a las no inoculadas, dependiendo del tipo de inóculo utilizado. Este es un indicador de la alta eficacia de los inóculos ectomicorrízicos empleados (*Helvella lacunosa*, *Hebeloma mesophaeum* y suelo nativo), no solo para tomar los nutrimentos Fe y Ca del suelo, sino también para movilizarlos hacia la parte aérea de las plantas inoculadas. En el caso

específico del Fe la mayor eficacia de movilización se observó cuando se inoculó con *H. lacunosa* y *H. mesophaeum*, debido a que el contenido de Fe en relación parte aérea:raíz fue 2.82 y 2.30 veces mayor en plantas inoculadas comparando con las no inoculadas. El Fe es un micronutriente fundamental para procesos celulares básicos como: fotosíntesis, respiración y síntesis de ADN (Neilands 1995; Greenshields *et al.* 2007). A pesar de que este elemento es abundante en la corteza terrestre, su disponibilidad en ambientes aeróbicos frecuentemente presenta limitaciones dado que se encuentra en formas insolubles (Dancis *et al.* 1990; Haselwandter *et al.* 2011). Se ha demostrado que los hongos ectomicorrízicos son capaces de producir moléculas de bajo peso molecular ( $M_r < 1500$ ) con alta afinidad por el ion férrico, denominados sideroforos (Szaniszlo *et al.* 1981; Landerweert *et al.* 2001). El tipo de sideroforos producidos por los hongos ectomicorrízicos pertenecen al grupo de los hidroxamatos. Szaniszlo *et al.* (1981) demostraron que diversos hongos ectomicorrízicos incluidos en los géneros *Amanita*, *Boletus*, *Suillus*, *Pisolithus* y *Cenococcum* liberan “hydroxamate siderophores” bajo condiciones limitantes de Fe. Haselwandter y Winkelmann (2002) identificaron que el sideroforo producido por *Cenococcum geophilum* corresponde al grupo de las ferricrocinas. Este compuesto y ferrichromo, otro sideroforo, han sido detectados también en *Suillus variegatus* (Moberg *et al.* 2003). Así mismo, se han reportado otros grupos de sideroforos en especies de *Suillus*, tales como: *S. granulatus* el cual libera fusigeno, ferrichromo, coprogeno y

triacetilfusarinina C y *S. luteus* quien es productor de fusigeno, ferricrocina y coprogeno (Haselwandter *et al.* 2011). La mayoría de estos estudios han sido efectuados con cultivos puros de los hongos ectomicorrízicos “in vitro”, sin embargo, existen dos excepciones. Los trabajos de Rineau *et al.* (2008) y Van Hesse *et al.* (2006). Rineau y colaboradores, evaluaron la capacidad de las raíces ectomicorrizadas con *Xerocomus* sp. y *Lactarius suddulcis* recientemente colectados en ecosistemas maduros en Francia, para quelatar complejos de Fe y movilización de los iones de Fe libres. En condiciones más realistas que los de cultivo “in vitro”. Estos autores encontraron que las ectomicorrizas de *Xerocomus* fueron más eficientes para acceder a complejos y iones libres de Fe que las de *L. suddulcis*. En el caso de *Hebeloma* uno de los géneros estudiados en el presente trabajo se ha demostrado la producción de sideroforos por van Heeset *et al.* (2006). Estos autores demostraron que el micelio externo de *H. crustuliniforme* creciendo en asociación simbiótica con *Pinus sylvestris* es capaz de producir como parte de sus exudados, ferricrocina. Sí bien es cierto, que todos los organismos requieren Fe para una diversidad de procesos metabólicos, su exceso o abundante almacenamiento puede resultar tóxico. Por lo que se requiere de sistemas de adquisición y almacenaje regulados con mucha precisión (Neilands 1995). Se ha demostrado que la ferricrocina está involucrada en la distribución intra- y transcelular de Fe interviniendo entonces, en la regulación celular de dicho elemento (Wallner *et al.* 2009). En términos generales la movilización de Fe por parte de los

hongos ectomicorrízicos he recibido escasa atención en Gimnospermas. Hasta donde conocemos el presente trabajo es uno de los pocos que demuestra movilización de este micronutriente a gimnospermas inoculadas con hongos ectomicorrízicos.

### **3.6 CONCLUSIONES**

La inoculación con esporas de los hongos comestibles ectomicorrízicos *Helvella lacunosa* y *Hebeloma mesophaeum* originó mayor biomasa total en *Pinus ayacahuite*. Existió mayor contenido de N, P, Ca, Mg y Fe en la parte aérea de las plantas inoculadas en comparación con las plantas no inoculadas, independientemente de la fuente de inóculo empleada. En el caso de Fe y Ca, existió movilización de dichos nutrientes a la parte aérea como consecuencia de la inoculación ectomicorrízica con las tres fuentes de inóculo. La colonización ectomicorrízica varió de 41 a 59%, dependiendo del tipo de inóculo, demostrando la eficiencia de los métodos empleados. La producción total de raíces cortas de plantas de *Pinus ayacahuite* inoculadas con *Helvella lacunosa* fue 3.5 veces mayor que la de plantas no inoculadas. Hasta donde conocemos, en la presente contribución se reporta por primera vez el efecto benéfico, en términos de contenido nutrimental, como consecuencia de la inoculación ectomicorrízica en *Pinus ayacahuite*. Así mismo, el presente es uno de los pocos trabajos que reporta un incremento en el contenido de Fe en la parte aérea de gimnospermas como consecuencia de la inoculación ectomicorrízica.

Estos datos demuestran el potencial de utilización biotecnológica de los hongos ectomicorrízicos comestibles *Helvella lacunosa* y *Hebeloma mesophaeum* en la producción en vivero del árbol de Navidad mexicano: *Pinus ayacahuite*.

### 3.7 LITERATURA CITADA

Abbott SP, Currah RS (1997) The Helvellaceae: systematic revision and occurrence in northern and northwestern North America. *Mycotaxon* 62:1– 125

Allen SE, Grimshaw HM, Parkinson JA, Quarmby C (1997) *Chemical Analysis of ecological materials*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK

Asef MR (2013) The genus *Helvella* in Iran. *Mycologia Iranica* 1:9-13

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

Bremer JM (1975) Total Nitrogen. In: C. A. Black (Ed.). *Methods of soil analysis*. Part 2. *Agronomy* 9: 1149-1178. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin

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

CONAFOR, Comisión Nacional Forestal (2009) *Manual para la producción de árboles de Navidad*. México

CONAFOR, Comisión Nacional Forestal (2013) *Árboles de Navidad*. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, México

- Cruz-Bojórquez RM, González GJ y Sanchez CP (2013) Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutrición Hospitalaria* 28:6-15
- Dancis A, Klausner RD, Hinesbuch AG, Barriocanal JG (1990) Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 10:2294-2301
- Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C, Prashast P (2014) Lycopene and male infertility. *Asian J Androl* 16:420-425
- FAO (2013) Forestry Department, Infosylva Forestry News Clippings. 1, 24:1-17
- Flores R, Días G, Honrrubia M (2005) Mycorrhizal synthesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. with five Neotropical pine species. *Mycorrhiza* 15:563-570
- Garibay-Orijel R, Morales-Marañón E, Domínguez-Gutierrez M, Flores-García A (2013) Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus moctezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Trasmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 54:153-169
- Greenshields LD, Guosheng L, Feng J, Selvaraj G, Wei Y (2007) The siderophore biosynthetic gene SID1, but not the ferroxidase gene FET3, is required for full *Fusarium graminearum* virulence. *Mol Plant Pathol* 8:411-421
- Guerin-Laguette A, Butter RC, Willows A, Hesom-Williams N, Shouhong L, Wan Y (2014) *Lactarius deliciosus* and *Pinus radiata* in New Zealand: toward the development mushroom orchards. *Mycorrhiza* (in Press) DOI 10.1007/s00572-014-0570-y
- Hall RI, Stephenson LS, Buchanan KP, Yun W, Cole JLA (2003) Edible and Poisonous Mushrooms of the world. New Zealand Institute for Crop Food Research Limited, Christchurch, New Zealand
- Haselwandter K, Häninger G, Ganzera M (2011) Hydroxamate siderophores of the ectomycorrhizal fungi *Suillus granulatus* and *S. luteus*. *Biometals* 24:153-157
- Haselwandter K, Winkelmann G (2002) Ferricrocin: an ecto- mycorrhizal siderophore of *Cenococcum geophilum*. *Biometals* 15:73–77



- Kalitz HM (1988) Microbial proteases. *Adv. Biotechnol* 36:1-65
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Spatafora JA (2008) Dictionary of the fungi. 10th edition, CAB International, Wallingford, UK
- Landeros F, Guzmán-Dávalos L (2013) Revisión del género *Helvella* (Ascomycota:fungi) en México. *Revista Mexicana Biodiversidad* 4:1-20
- Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, Van Breemer N (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecology Evolution* 16: 248-253
- Leal AR, Barros L, Barreira CMJ, Sousa JM, Martins A, Santos-Buelga C, Ferreira CFRI (2013) Portuguese wild mushrooms at the "pharm-nutrition" interface; Nutritional characterization and antioxidant properties. *Food Research International* 50:1-9
- Martínez-Amores E, Valdes M, Quintos M (1991) Seedling growth and ectomycorrhizal colonization of *Pinus patula* and *P. radiata* inoculated with spores of *Helvella lacunosa*, *Russula brevipes* or *Lycoperdon perlatum*. *New Forest* 4:237-245
- Martínez-Peña F, Oria de Rueda AJ, Agreda T (2011) Manual para la gestión del recurso micológico forestal en Castilla y León. España
- Martínez-Reyes M, Pérez-Moreno J, Villareal-Ruiz L, Ferrera-Cerrato R, Xoconostle-Cázares B, Vargas-Hernández J, Honrubia-García M (2012) Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. Inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18: 183-192
- Medel R, Baeza Y, Mata G, Trejo D (2012) Ascomycetos ectomicorrízicos del Parque Nacional Cofre de Perote, Veracruz, México. *Revista Mexicana de Micología* 35:43-47
- Méndez-Neri M, Pérez-Moreno J, Quintero-Lizaola R, Hernández-Acosta E, Lara-Hernández A (2011). Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Lationamericana* 29:1-9
- Moberg M, Holmstro SJM, Lundstro US, Markides KE (2003) Novel approach to the determination of structurally similar hydroxamate siderophores by column-switching capillary liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr* 1020:91–97

- Moberg M, Holmström SJM, Lundström US, Markides KE (2003) Novel approach to the determination of structurally similar hydroxamatesiderophores by column-switching capillary liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatography* 1020:91–97
- Montoya A, Kong A, Estrada-Torres A, Cifuentes J, Caballero J (2004) Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Diversity*. 17:115-143
- Musalem MA, Ramírez LA (2003) Monografía de *Pinus ayacahuite*. INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Libro Técnico No. 6
- Nara K, Nakaya H, Hogetsu T (2003a) Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji. *New Phytol* 158:193–206
- Nara K, Nakaya H, Wu B, Zhou Z, Hogetu T (2003b) Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. *New Phytol* 159:743–756
- NCTA (2014) Christmas tree Statistics. National Christmas tree Association, USDA National Agricultural Statistics Science. Washington DC
- Neilands JB (1995) Siderophores. Structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal Biological Chemistry* 270:26723-26726
- Nguyen NH, Landeros F, Garibay-Orijel R, Hansen K, Vilinga CE (2013) *Helvella lacunosa* species complex in Western North America: cryptic species, misapplied names and parasites. *Mycologia* 105:1275-1286
- Obase K, Tamai T, Yajima T, Miyamoto T (2007) Mycorrhizal associations in woody plant species at the Mt. Usuvocano, Japan. *Mycorrhiza* 17:209-215
- Perea-Estrada VM, Pérez-moreno J, Villareal-Ruiz L, Trinidad-Santos A, De la I de Bauer Ma L, Cetina-Alcalá VM, Tijerina-Chávez L (2009) Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32:93-102
- Pérez-Moreno J, Lorenzana-Fernández A, Carrasco-Hernández V, Yescas-Pérez A (2010) Los hongos comestibles silvestres del

parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. 2<sup>da</sup> Ed Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACyT. Montecillo, Texcoco, estado de México

- Pérez-Moreno J, Lorenzana-Fernández A, Medel-Ortíz R, Ferrera-Cerrato R, Mata-Montes de Oca G (2014). Los hongos ectomicorrízicos de México: una perspectiva global. In: Álvarez J, Rodríguez-Guzmán MP, Alarcón A (eds.) Biodiversidad Microbiana de México. SUBNARGEM-CONABIO. México City (in press)
- Pérez-Moreno J, Martínez-Reyes M, Yescas-Pérez A, Delgado-Alvarado A, Xoconostle-Cázares B (2008) Wild mushroom markets in Central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany* 62:425-436
- Pérez-Moreno J, Read JD (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to the tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytol* 145:301-309
- Perry J (1991) *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland, Oregon
- Read JD, Pérez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - A journey towards relevant? *New Phytologist* 157:475-492
- Rineau F, Courty PT, Uroz S, Buée M, Garbaye J (2008) Simple microplate assay to measure iron mobilization and oxalate secretion by ectomycorrhizal tree roots. *Soil Biology Biochemistry* 40:2460-2463
- Sanchez-Zabala J, Majada J, Martín-Rodríguez N, Gonzalez-Murua C, Ortega U, Alonso-Graña M, Arana O, Duñabeitia KM (2013) Physiological aspects underlying the improved outplanting performance of *Pinus pinaster* Ait. seedlings associated with ectomycorrhizal inoculation. *Mycorrhiza* 8:627-640
- SAS. (2002) *Statistical Analysis system Institute. SAS User's guide. Version 9*. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA
- Siddiqui ZA, Pichtel J (2008) Mycorrhizae: an Overview. In Siddiqui ZA, Akhtar MS, Futai K (eds.) *Sustainable Agriculture and Forestry*
- Slama A, Gorai M, Fortas Z, Boudabous A, Neffati M (2012) Growth, root colonization and nutrient status of *Helianthemum sessiliflorum*

- Desf. Inoculated with a desert truffle *Terfezia boudieri* Chatin. Saudi Journal of Biological Sciences 19:25-29
- Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis. 3rd Ed Academic Press, London
- Sousa RN, Franco RA, Oliveira SD, Castro LMP (2012) Ectomycorrhizal fungus as an alternative to use of chemical fertilizers in nursery production of *Pinus pinaster*. J Environmental Management 95:5269-5274
- Szanişzlo PJ, Powell CP, Reid CPP, Cline GR (1981) Production of hydroxamate siderophore iron chelators by ectomycorrhizal fungi. Mycologia 73:1158-1174
- Takeşhima M, Ono M, Higuchi T, Chen C, Hara T, Nakanos S (2004) Anti-proliferative and apoptosis-inducing activity of lycopene against three subtypes of human breast cancer cell lines. Cancer Science 105:252-257
- Torres PJ (2004) Indicadores financieros en actividades forestales. In: Memoria de Resúmenes del V Congreso Nacional de Biotecnología Agropecuaria y Forestal. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, estado de México, México
- Trocha KL, Olesyn J, Turzanska E, Rudawska M, Reich BP (2007) Living on the edge: Ecology of an incipient *Betula*-fungal community growing on brick walls. Tree 21:239-247
- Trowbridge J, Jumpponen A (2004) Fungal colonization of shrub willow roots at the forefront of a receding glacier. Mycorrhiza 14:283–293
- USDA (2014) United States Department of Agriculture. 2014. Christmas Tree Production
- Valencia AS (2004) Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. Boletín de la Sociedad Botánica de México 75:33–53
- Van Hees WAP, Roslin A, Essén S, Godbold LD, Jones LD, Finlay DR (2006) Oxalate and ferricrocin exudation by the extrametrical mycelium of an ectomycorrhizal fungus in symbiosis with *Pinus sylvestris*. New Phytologist. 169:367-378
- Wallner A, Blatzer M, Schrettl M, Sarg B, Lindner H, Haas H (2009) Ferricrocin, a siderophore involved in intra- and transcellular iron distribution in *Aspergillus fumigatus*. Applied Environmental Microbiology 75:4194-4196

Whiriskey J, Carthy PM (2006) Christmas tree production. Teagasc fact sheets 30:1-2

Yun W, Hall RI (2004) Edible ectomycorrhizal mushrooms: Challenges and achievements. *Can J Bot* 82:1063-1073

Zambonelli A, Bonito MG (2012) Edible ectomycorrhizal mushrooms. *Soil Biology* 34, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

Zhang G, Wang H, Zhang X, Tzibun Ng (2010) Helvellisin, a novel alkaline protease from the wild ascomycete mushroom *Helvella lacunosa*. *J Bioscience Bioengineering* 109:20-24

## CAPITULO IV

### CRECIMIENTO, MOVILIZACIÓN NUTRIMENTAL Y COLONIZACIÓN DE *Pinus ayacahuite* DE DOS PROCEDENCIAS, CON PROPÁGULOS ECTOMICORRÍZICOS DE LA SIERRA NEVADA, MÉXICO

#### 4.1 RESUMEN

La simbiosis ectomicorrízica se establece entre más de 2000 especies de gimnospermas y angiospermas y alrededor de 20,000 especies de hongos, principalmente del grupo de los Basidiomycetes y Ascomycetes. Esta simbiosis resulta fundamental para la supervivencia de diferentes familias de árboles, incluyendo las Pináceas. En el caso específico del género *Pinus*, se ha demostrado que en condiciones naturales, en ausencia de la simbiosis ectomicorrízica las plantas no son capaces de sobrevivir. Diversos estudios han demostrado que los diferentes genotipos dentro de una especie vegetal presentan con frecuencia enormes variaciones fisiológicas entre las cuales se incluyen diferencias en tiempos de germinación, temperaturas mínimas para formar semillas viables, adaptación a diferentes fotoperiodos y producción de distintos exudados radicales. Sin embargo, la capacidad de diversos genotipos de árboles ectomicorrízicos de asociarse con diferentes micobiontes ha recibido escasa atención en términos generales. En el presente trabajo se evaluó el crecimiento, contenido de macro y micronutrientos y la micorrización de genotipos de dos procedencias distintas de *Pinus ayacahuite*, geográficamente distantes, una de la región de Toluca, estado de México y la otra de la región de Xalapa, Veracruz inoculados con la misma fuente de propágulos ectomicorrízicos consistente en suelo forestal procedente de una plantación de *P. ayacahuite* de la Sierra Nevada. Existió una capacidad

de respuesta diferencial, como consecuencia de la micorrización, en términos de crecimiento y de contenido nutrimental, en el material de las dos procedencias evaluadas. Este estudio constituye uno de los primeros desarrollados en México, que demuestra que la procedencia de las semillas, es un factor importante a tomar en consideración en programas de reforestación con plantas micorrizadas.

**Palabras clave:** Micorrización, ectomicorriza, Nitrógeno, Fósforo.

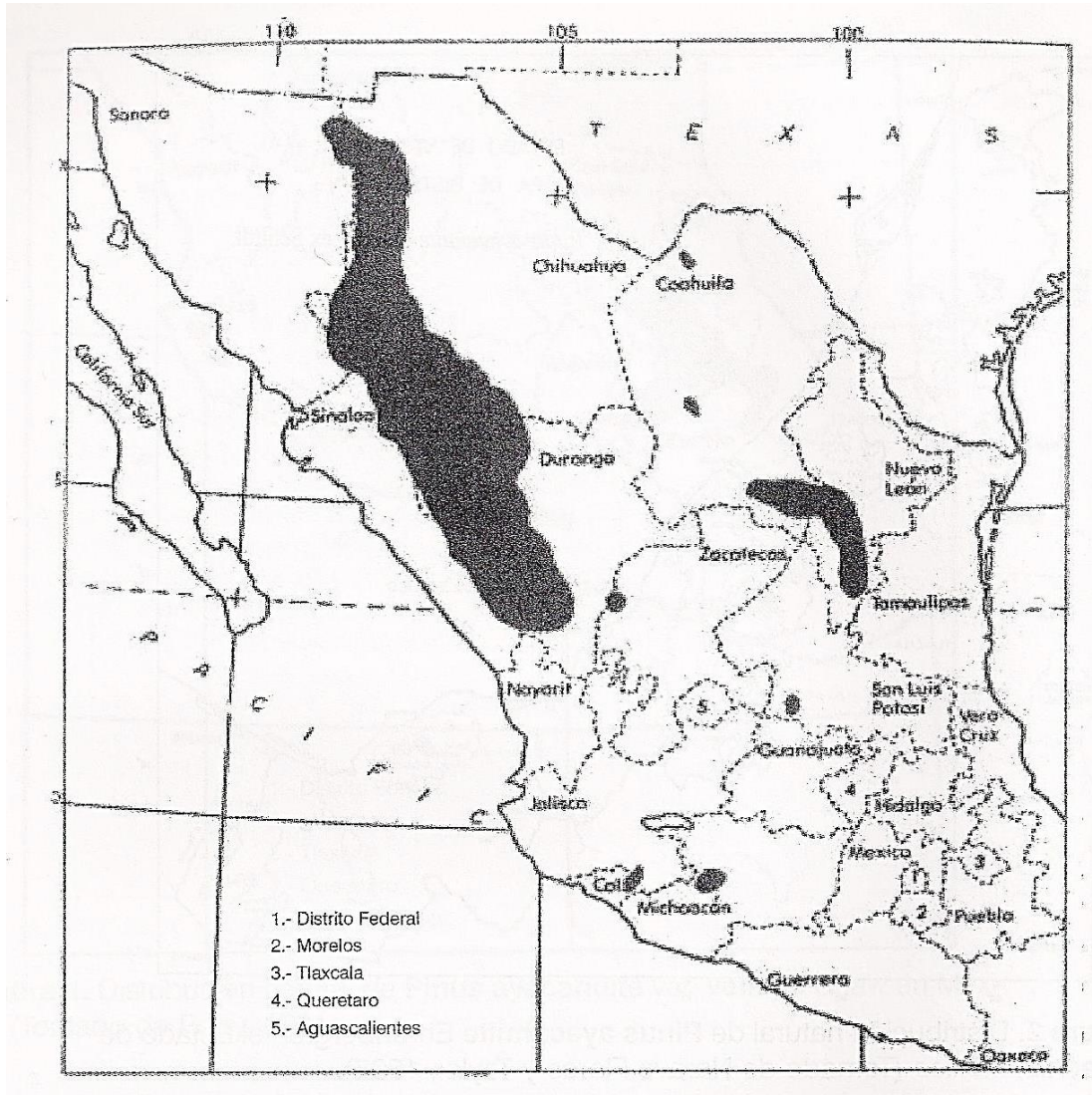
## 4.2 INTRODUCCIÓN

México constituye un importante reservorio de taxa del género *Pinus*. El país cuenta con alrededor de 47 especies de pinos, 3 subespecies y 22 variedades. Aproximadamente el 55% de los taxa se consideran endémicos y se ha calculado que el país cuenta con 42% de las especies existentes a nivel mundial (Sánchez-González 2008). La gran diversidad de pinos se encuentra distribuida principalmente en las serranías (Eguiluz 1982; Perry 1991). La topografía accidentada en tales sitios ha permitido condiciones específicas para el crecimiento y desarrollo de estas importantes especies forestales. Los bosques son desde una perspectiva económica muy importantes, tanto por los productos maderables como no maderables que ofrecen. Asimismo, son una fuente fundamental de servicios ambientales ya que captan y permiten la filtración de agua, contribuyen a la mitigación de los efectos del cambio climático, generan oxígeno, protegen la biodiversidad, impiden la erosión de los suelos, son un refugio de la fauna silvestre que se desarrolla en estos ambientes y además influyen en el clima a nivel regional, local y global (García y González 2003; Ramírez *et al.* 2005). Adicionalmente no se puede negar la belleza escénica que brindan al ser humano. Dentro de la diversidad de especies de pinos mexicanos se

encuentra *Pinus ayacahuite* Ehren. ex Schldtl. La palabra “ayacahuite” proviene del náhuatl y significa pino de niebla. Se considera una especie endémica de México y Centroamérica. Se localiza en el Centro y Sur de México en los estados de Colima, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, México, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala y Veracruz, extendiéndose hacia Guatemala, El Salvador y Honduras. En Chiapas es considerada en peligro de extinción debido a actividades antropogénicas (Musálem y Ramírez 2003). *P. ayacahuite* cuenta con dos variedades *P. ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw cuya distribución principal se localiza en el Norte de México (Figura 4.1) y la segunda variedad es *P. ayacahuite* var. *veitchii* Shaw la cual se encuentra en un rango altitudinal que va desde 2,000 a 3,700 msnm, 18°30' a 21°20' latitud norte 97°15' a 103°50' Longitud Oeste, localizándose principalmente en la parte central de México, en el Distrito Federal, Estado de México, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Michoacán, Guerrero, Tlaxcala y Jalisco (Figuras 4.2 y 4.3). Este tipo de pino además de tener enorme importancia ecológica, su madera tiene una gran demanda ya que puede ser utilizada para la elaboración de artesanías, muebles, lápices y también es utilizada en la construcción de puertas y ventanas (Donahue *et al.* 1991). Es común que esta variedad de pino se utiliza como planta ornamental en parques, jardines, campos deportivos, así como un importante elemento decorativo en las fiestas de Navidad. El Estado de México es la entidad federativa que ocupa el primer lugar a nivel nacional en la producción y venta de árboles de navidad (CONAFOR 2007). Las ectomicorrizas son parte primordial en la salud y desarrollo de los árboles forestales al beneficiarlos de diversas maneras: Uno de los aspectos más importantes es sin duda la absorción de nutrientes del suelo especialmente elementos de baja movilidad, como son P y micronutrientes (Smith y Read 2008) y también N (Chalot y Byan 1988). Así mismo se ha observado que el micelio fúngico puede ser una vía de traslocación de una cantidad significativa de carbono entre hospederos de una misma o entre diferentes especies (Simard *et al.*



1997). Otros tipos de beneficios proporcionados por los hongos ectomicorrízicos es mejorar la estructura del suelo y la protección contra patógenos (Borchers y Perry 1992; Perrin y Garbaye 1983). En general los hongos ectomicorrízicos juegan un papel importante al constituir una parte muy dinámica en las comunidades de los ecosistemas forestales (Chai *et al.* 2013). Por otro lado la procedencia de las comunidades forestales mexicanas suelen presentar diferencias anatómicas, morfológicas y fisiológicas dentro y entre sus poblaciones (Mendizábal 1999; Farfan *et al.* 2002; Reyes *et al.* 2005; Mápula *et al.* 2006; Agis *et al.* 2006). Sin embargo, hasta donde se conoce los estudios relacionados con la influencia de la procedencia de los árboles ectomicorrízicos en la colonización micorrízica ha recibido escasa atención. Es importante mencionar que los ensayos de procedencia permiten apoyar programas de conservación de recursos forestales a mediano y largo plazo, sirven también como base para iniciar programas de mejoramiento genético forestal y por consiguiente también contribuyen a la toma de decisiones en los programas de reforestación (Zobel y Talbert 1988; Farfan *et al.* 2002). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la colonización de los hongos ectomicorrízicos en plantas de *Pinus ayacahuite* de dos procedencias distintas: germoplasma proveniente de la región de Xalapa, Veracruz y germoplasma proveniente de la región de Toluca, en el estado de México, utilizando como fuente de inóculo de propágulos ectomicorrízicos, suelo forestal proveniente de la Sierra Nevada, México.



**Figura 4.1 Distribución natural en el norte de México de *Pinus ayacahuite* var. *brachyptera* Shaw., marcada con área de color negro principalmente en los estados de Chihuahua, Sinaloa, Durango, Nuevo León y Coahuila y en áreas restringidas en los estados de Sonora, Zacatecas, San Luis Potosí, Michoacán y Colima ( FUENTE: Perry 1991).**

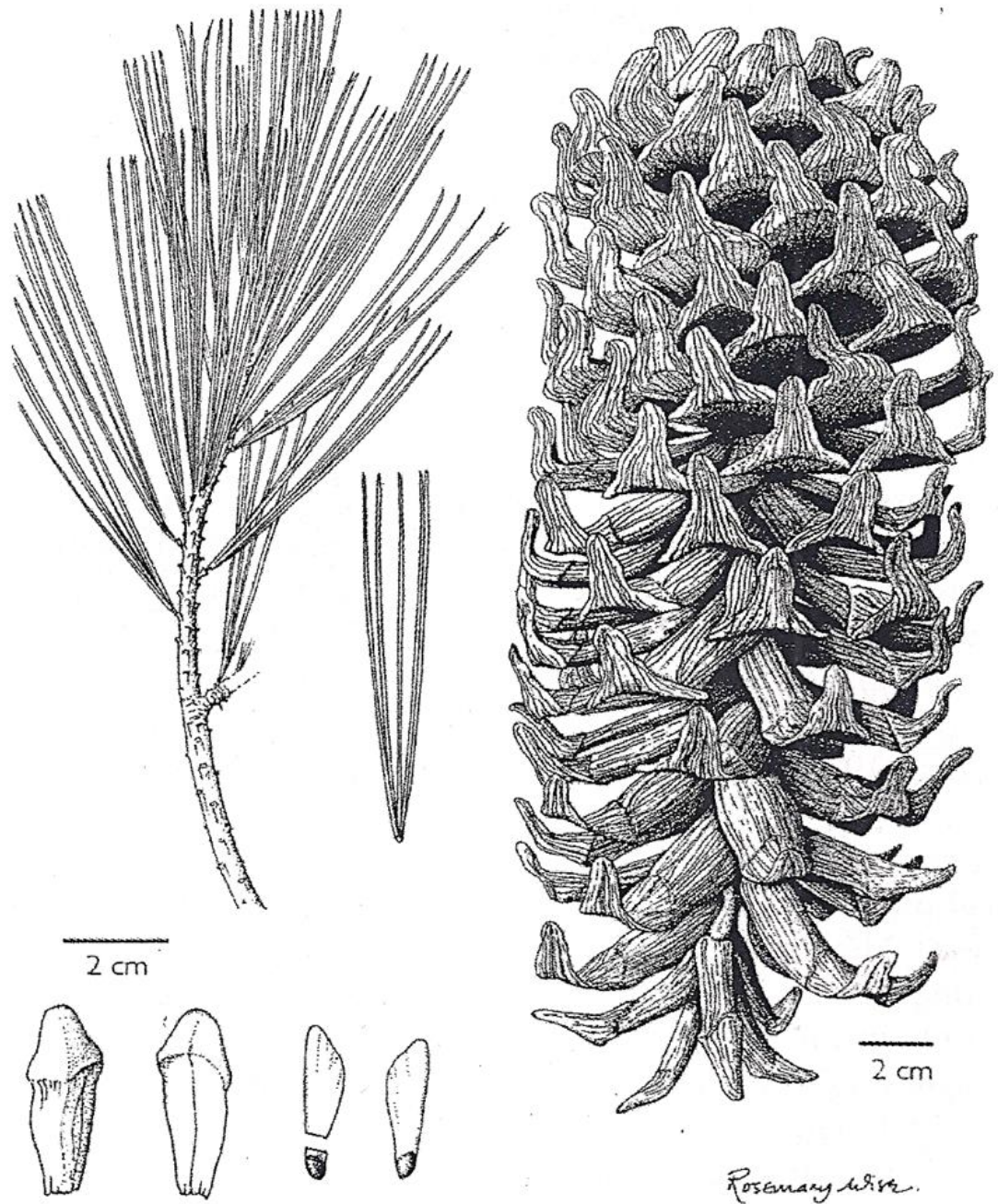


Figura 4.2 Esquemas diagnósticos de una rama, acículas, estróbilo y semillas de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw. (FUENTE: Musalén y Ramírez 2003).





**Figura 4.3 Distribución natural en el centro y occidente de México de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw. en los estados de México, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Michoacán, Guerrero, Tlaxcala, Jalisco (FUENTE: Perry 1991).**

## **4.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.3.1 Material vegetal y preparación de inóculo**

Las semillas de *Pinus ayacahuite* utilizadas en este bioensayo provenían de dos localidades: i) Semillas recolectadas en bosques naturales de la zona del Cofre de Perote, Veracruz, México; y ii) Semillas provenientes de Toluca, Estado de México. Las semillas, se colocaron en un recipiente con agua durante 24 horas, cambiando el agua cada 7 horas para permitir su oxigenación. Después, las semillas se esterilizaron superficialmente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 20 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril en condiciones asépticas. Posteriormente, las semillas fueron sembradas en charolas de crecimiento que contenían arena y piedra volcánica (tezontle) estéril. El material, utilizado como fuente de inóculo ectomicorrízico, fue suelo forestal proveniente de un rodal de *Pinus ayacahuite* localizado en la localidad de San Pablo Ixayoc, Municipio de Texcoco, en la Sierra Nevada, México. El suelo fue recolectado de los horizontes de fermentación (F) y orgánico (O), dado que se conoce que los propágulos ectomicorrízicos se distribuyen en dichas regiones (Pérez-Moreno y Read 2001a y 2001b). El suelo forestal se secó a temperatura ambiente, fue tamizado para la homogenización del tamaño de partículas y almacenado a 5 °C, hasta su utilización.

### **4.3.2 Montaje del experimento e inoculación**

Una vez germinadas las plántulas de *Pinus ayacahuite*, se trasplantaron a tubetes de plástico de 140 cm<sup>3</sup>. Estos contenían como sustrato, una mezcla de arena de río, corteza de pino molida y suelo forestal, en proporción 2:2:1. El sustrato fue previamente esterilizado con vapor de agua a 125 °C durante 3 horas, se dejó reposar durante dos

días y al cuarto día se esterilizó por segunda ocasión a la misma temperatura durante dos horas. Los tubetes fueron llenados por capas de material estéril (excepto el suelo forestal que se utilizó como inóculo): en la base se colocó una capa de tezontle, posteriormente una capa de sustrato, encima de la cual se colocó una capa del inóculo (suelo forestal), sobre la que se agregó nuevamente una capa de sustrato y finalmente una capa de tezontle; los volúmenes de éstos materiales fueron de aproximadamente 15, 40, 30, 40, y 15 cm<sup>3</sup>, respectivamente. Adicionalmente, se trasplantaron plantas a las cuales no se les adicionó ningún inóculo. Existieron entonces, en total 4 tratamientos: i) plantas inoculadas procedentes de Veracruz; ii) plantas no inoculadas de la misma procedencia; iii) plantas inoculadas procedentes de Toluca Estado de México; y iv) plantas no inoculadas procedentes de la zona anteriormente mencionada. Cada tratamiento tuvo 15 unidades experimentales, cada una consistente en una planta, por lo que se tuvieron en total 60 plantas que se establecieron en un diseño experimental completamente al azar. Con el fin de prevenir el “damping-off” en las plantas, en el riego se aplicó Captan, en una solución de 2.5g/L cada tercer día hasta la lignificación de los tallos. Posteriormente las plantas recibieron riego sin Captan cada tercer día durante los siguientes 720 días.

### 4.3.3 Variables evaluadas

El diámetro de la base del tallo y la altura fueron evaluados en todas las plantas, 720 días después de la siembra. En ese momento, se evaluó también, la colonización ectomicorrízica para lo cual se realizó un muestreo destructivo de 3 plantas seleccionadas aleatoriamente de cada tratamiento. Para ello, se separó la parte aérea de éstas plantas de sus respectivas raíces. Las raíces fueron divididas en tres segmentos correspondientes a la parte superior, media y baja del cepellón, cada una de ellas ocupando un volumen aproximado de 47 cm<sup>3</sup> de sustrato. Estas raíces se lavaron bajo el chorro de agua corriente, empleado tres tamices de 1.19, 0.180 y 0.050 mm de diámetro de abertura, para colectar el mayor número de raíces cortas. El conteo de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas y muertas se realizó con la ayuda de un microscopio estereoscópico Motic SMZ-143. El porcentaje de colonización se obtuvo calculando la proporción de raíces finas ectomicorrizadas en relación al número total de raíces finas de cada planta. Para comprobar la existencia de raíces ectomicorrizadas se efectuaron cortes transversales detectando la presencia de manto, red de Hartig y micelio externo. Se tomaron fotografías de éstas estructuras mediante un microscopio Olympus BX51. La evaluación del peso seco de la parte aérea y de la raíz fue efectuada de manera destructiva en todas las plantas. La parte aérea de la planta, así como el total de la raíz fueron deshidratadas a 70°C por 48 horas. Posteriormente, se realizó el análisis nutrimental de los macro y micronutrientes: N, P, K, Ca, Mg, Mn y Fe tanto de la parte

aérea como radical, en tres plantas de cada tratamiento seleccionadas aleatoriamente. El N se determinó por el método semimicro-Kjeldahl (Bremner 1975); el P total, según el método de Allen *et al.* (1997); el K, mediante extracción con acetato de amonio por fotometría de llama, y el Ca, Mg, Fe, y Mn mediante absorción en un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian, Spectra-AA220).

#### **4.3.4 Análisis estadístico**

Para las variables de crecimiento, peso seco de la parte aérea y raíz, así como para los contenidos nutrimentales se realizó un análisis de varianza y se hizo una comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el programa Statistical Analysis System (SAS 2002). Los datos de porcentaje de colonización ectomicorrízica fueron transformados a raíz cuadrada, para cumplir con los criterios de normalidad.

### **4.4 RESULTADOS**

#### **4.4.1 Crecimiento de las plantas**

Se observó mayor peso seco de la parte aérea y mayor peso seco total en las plantas inoculadas procedentes de Veracruz, en comparación con las plantas no inoculadas. Una tendencia contraria se observó el germoplasma procedente de Toluca, en donde no existieron diferencias entre plantas inoculadas o no inoculadas. En el peso seco de la raíz, independientemente de la procedencia, no existieron diferencias. Una tendencia similar se obtuvo con los parámetros de diámetro de tallo y



altura donde no existieron diferencias, sin importar la procedencia de las plantas (Cuadro 4.1).

#### **4.4.2 Contenido nutrimental**

**Macronutrientes:** En la parte aérea, del germoplasma proveniente de Veracruz, se observaron diferencias significativas en los contenidos de N, P, y K con respecto a las plantas que no fueron inoculadas. Mientras que en la parte aérea y en toda la planta (raíz más parte aérea), de los tratamientos inoculados, del germoplasma proveniente de Toluca sólo se presentaron diferencias en el contenido de P en comparación con las plantas no inoculadas (Cuadro 4.2). Una tendencia similar a la observada para la parte aérea se observó en el caso del contenido total de nutrimentos entre plantas inoculadas y no inoculadas. En este caso, solo se observaron diferencias para el contenido total de P en el caso de germoplasma de Toluca, situación que contrastó con la existente en el caso de germoplasma de Veracruz, en donde existieron diferencias para el contenido total de N, P y K, entre plantas inoculadas y no inoculadas (Cuadro 4.2). En cuanto a los contenidos de macronutrientes en la raíz de las plantas provenientes de Veracruz se observaron nuevamente mayores contenidos en los contenidos de P y K, en las plantas inoculadas respecto a las no inoculadas. En contraste en los contenidos de macronutrientes de la raíz de germoplasma de Toluca no existieron diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas.

**Cuadro 4.1.** Peso seco, altura y diámetro de tallo en plantas de *Pinus ayacahuite*; de dos procedencias, de dos años de edad, inoculadas o no con inóculo nativo de una plantación de la Sierra Nevada, México.

Procedencia/Tratamiento	Peso seco (mg)			Altura (cm)	Diámetro del tallo (cm)
	Parte aérea	raíz	Total		
Germoplasma de Veracruz					
Plantas inoculadas	959.2±149.6a	574.9±82.6a	1533.1±230.8a	16.9±1.15a	2.94±0.12a
Plantas no inoculadas	292.9±11.1b	260.7±104.3a	553.6±114.6b	14.8± 0.92a	2.61±0.15a
Germoplasma de Toluca					
Plantas inoculadas	1642.6±330.2a	1033.7±287.0a	2676.3±551.97a	17.6±1.084a	3.7±0.17a
Plantas no inoculadas	950.4±56.51a	1157.9±42.9a	2108.3±71.8a	15.8±0.84a	3.3±0.14a

Los valores son promedio ± error estándar de la media. n=15 para peso seco. Valores con la misma letra, dentro de cada germoplasma, son iguales según Tukey p=0.05.

**Cuadro 4.2.** Contenido de macronutrientes en el tejido de plantas de *Pinus ayacahuite*, de dos procedencias, el inoculo utilizado fue suelo de una plantación de la Sierra Nevada, México.

Procedencia/ Tratamiento	N	P	K	Ca	Mg
(mg por planta)					
Germoplasma de Veracruz					
Parte aérea					
Plantas inoculada	7.4±1.15a	1.05±0.16a	5.21±0.88a	3.45±0.53a	1.92±0.30a
Plantas no inoculadas	2.4±0.09b	0.29±0.001b	1.11±0.07b	1.99±0.73a	1.73±0.40a
Raíz					
Plantas inoculadas	4.9±0.71a	0.40±0.05a	1.38±0.19a	4.65±0.67a	1.15±0.16a
Plantas no inoculadas	3.0±1.21a	0.10±0.05b	1.04±0.41b	2.24±0.89a	0.80±0.32a
Total					
Plantas inoculadas	12.3±1.85a	1.4±0.22a	6.58±1.08a	8.10±1.20a	3.07±0.46a
Plantas no inoculadas	5.4±1.29b	0.12±0.05b	3.03±0.48b	4.2±1.18a	2.54±0.71a
Germoplasma de Toluca					
Parte aérea					
Plantas inoculadas	8.88±1.78a	1.31±0.26a	4.26±3.33a	3.81±2.61a	2.95±1.02a
Plantas no inoculadas	6.65±0.39a	0.47±0.02b	2.95±0.17a	5.03±0.30a	2.09±0.12a
Raíz					
Plantas inoculadas	8.06±2.23a	0.72±0.20a	1.96±0.54a	10.85±3.01a	2.17±1.44a
Plantas no inoculadas	9.50±0.35a	0.34±0.01a	1.85±0.06a	10.71±0.40a	2.12±0.11a
Total					
Plantas inoculadas	16.93±3.59a	2.03±0.41a	6.23±3.86a	14.04±3.74a	5.95±2.21a
Plantas no inoculadas	16.15±0.53a	0.82±0.03b	4.80±0.18a	15.80±0.70a	5.21±0.17a

Los valores son promedio ± error estándar de la media. n=3. Valores con la misma letra, para cada parte de la planta dentro de cada germoplasma vegetal, son iguales según Tukey p=0.05.

**Micronutrientes:** En el caso del contenido de Mn, no se observaron diferencias entre plantas inoculadas o no inoculadas en la parte aérea, raíz o total en el germoplasma de Toluca. Mientras que una tendencia contraria se observó en el germoplasma procedente de Veracruz. En este último caso existieron diferencias en el contenido de Mn en la parte aérea y en el contenido total entre plantas y no inoculadas (Cuadro 4.3). Un caso contrario, y único, se observó en el contenido de Fe, en donde no existieron diferencias en la parte aérea, raíz y total de entre plantas inoculadas y no inoculadas en el germoplasma de Veracruz. Mientras que se registraron diferencias en la raíz y contenido total de Fe entre plantas inoculadas y no inoculadas en el germoplasma de Toluca (Cuadro 4.3).

#### **4.4.3 Relación parte aérea:raíz**

La relación entre la parte aérea: raíz de plantas inoculadas y no inoculadas proporciona información relacionada con la movilización nutrimental. Valores superiores a uno indican movilización nutrimental, no solo a la parte radical sino a la parte aérea, mientras que valores inferiores o iguales a uno, indican que no existe movilización nutrimental a la parte aérea. Se observó una movilización nutrimental a la parte aérea en el caso de N, P y K como consecuencia de la inoculación con suelo forestal tanto en el caso del germoplasma de Veracruz, como de Toluca. Sin embargo, la movilización registrada fue mayor en el caso del germoplasma de Veracruz que en el caso de Toluca, para estos nutrimentos. El caso más dramático fue el observado para P. En este caso la relación de la parte aérea:raíz de plantas inoculadas: plantas no inoculadas fue 6.8 veces mayor (9.0475 versus 1.3273) en el germoplasma de Veracruz comparado con el germoplasma de Toluca.

En contraste para el caso de Ca no se registró una movilización a la parte aérea en ninguna de las dos procedencias (Cuadro 4.4). Respecto a la movilización de Mn, se registró una movilización a la parte aérea 1.6 veces mayor (2.0224 versus 1.2668) en el germoplasma de Veracruz respecto a la existente en caso del germoplasma de Toluca. El caso del Fe, fue otra vez la excepción dado que se registró una mayor movilización a la parte aérea de este micronutriente en el germoplasma de Toluca, comparado con la movilización registrada en el germoplasma de Veracruz (Cuadro 4.4).

**Cuadro 4.3.** Contenido de los micronutrientos Fe y Mn, y su relación parte aérea:raíz, en plantas de *Pinus ayacahuite*, de dos procedencias, de dos años de edad, inoculadas o no con inóculo nativo de una plantación de la Sierra Nevada.

Procedencia/Tratamiento	Fe ( $\mu\text{g}$ por planta)	Mn
Germoplasma de Veracruz		
Parte aérea		
Plantas Inoculadas	1.36 $\pm$ 0.21a	2.31 $\pm$ 0.36a
Plantas no inoculadas	1.52 $\pm$ 0.05a	0.50 $\pm$ 0.09b
Raíz		
Plantas inoculadas	29.87 $\pm$ 4.29a	0.64 $\pm$ 0.09a
Plantas no inoculadas	13.89 $\pm$ 5.56a	0.28 $\pm$ 0.11a
Total		
Plantas inoculadas	31.23 $\pm$ 4.50a	2.96 $\pm$ 0.45a
Plantas no inoculadas	15.42 $\pm$ 5.61a	0.78 $\pm$ 0.21b
Relación parte aérea:raíz		
Plantas inoculadas	0.0455	3.60
Plantas no inoculadas	0.0985	1.78
Relación parte aérea:raíz de plantas inoculadas vs no inoculadas	0.4619	2.0224
Germoplasma de Toluca		
Parte aérea		
Plantas inoculadas	1.54 $\pm$ 0.31a	3.61 $\pm$ 0.72a
Plantas no inoculadas	1.38 $\pm$ 0.80a	2.89 $\pm$ 0.83a
Raíz		
Plantas inoculadas	0.71 $\pm$ 0.19a	1.41 $\pm$ 0.39a
Plantas no inoculadas	4.20 $\pm$ 0.15b	1.43 $\pm$ 0.05a
Total		
Plantas inoculadas	2.26 $\pm$ 0.45a	5.03 $\pm$ 1.01a
Plantas no inoculadas	5.58 $\pm$ 0.17b	4.217 $\pm$ 0.88a
Relación parte aérea:raíz		
Plantas inoculadas	2.1690	2.5602
Plantas no inoculadas	0.3285	2.0209
Relación parte aérea:raíz de plantas inoculadas vs no inoculadas	6.6027	1.2668

Los valores son promedio  $\pm$  error estándar de la media. n=3, Valores con la misma letra, dentro de cada germoplasma, son iguales según Tukey p=0.05.

**Cuadro 4.4.** Relaciones parte aérea:raíz del peso seco y contenido de macronutrientes en arboles de *Pinus ayacahuite* de dos procedencias, de dos años de edad, inoculados o no con inóculo de una plantación de la Sierra Nevada, México.

Tratamiento	Peso seco	N	P	K	Ca	Mg
Germoplasma de Veracruz						
Plantas inoculadas	1.6712	1.4958	2.6265	3.7763	0.7427	1.6712
Plantas no inoculadas	1.1231	0.7842	0.2903	1.9092	0.8856	2.1428
Plantas inoculadas:no inoculadas	1.4906	1.9074	9.0475	1.9779	0.8386	0.7799
Germoplasma de Toluca						
Plantas inoculadas	1.5889	1.1000	1.8161	2.1712	0.2930	0.9862
Plantas no inoculadas	0.8208	0.7007	1.3682	1.5904	0.4677	0.6688
Plantas inoculadas:no inoculadas	1.9357	1.5698	1.3273	1.3651	0.6264	1.4745

#### **4.4.4 Producción de raíces cortas y colonización**

El porcentaje de micorrización varió de 47 a 71% en el caso del germoplasma de Veracruz, y de 28 a 48% en el caso del germoplasma de Toluca, dependiendo de la región del tubete. Los menores porcentajes siempre fueron registrados en la parte superior del cepellón. Para los dos germoplasmas evaluados se observó un porcentaje dramáticamente superior de raíces ectomicorrizadas vivas en las plantas inoculadas, respecto a las plantas no inoculadas (Cuadro 4.5), demostrando la eficiencia de los materiales de los horizontes de fermentación y orgánicos como fuentes de inóculo ectomicorrízico. La tendencia general fue de mayor porcentaje de raíces muertas en las plantas no inoculadas en el caso del germoplasma de Veracruz, independientemente de la parte del cepellón. Mientras tanto una tendencia contraria se registró en el caso del germoplasma de Toluca, particularmente en las partes superiores e inferiores del cepellón (Cuadro 4.6).

#### **4.5 DISCUSIÓN**

En términos generales, en el presente trabajo se observaron mayores diferencias en términos en crecimiento y contenido nutrimental, como consecuencia de la ectomicorrización en plantas procedentes de Veracruz en relación a las plantas procedentes de Toluca, al ser inoculadas con propágulos de hongos ectomicorrízicos contenidos en suelo forestal de la Sierra Nevada, México.



**Cuadro 4.5.** Porcentaje de raíces cortas vivas, micorrizadas y muertas en plantas de *P. ayacahuite* de dos años de edad con diferentes procedencias, como inoculo se utilizó suelo de una plantación de La Sierra Nevada, México como inóculo.

Tratamiento	Raíces micorrizadas	Raíces no micorrizadas	Raíces muertas
Germoplasma de Veracruz			
Parte superior del cepellón			
Plantas inoculadas	46.65±6.91a	36.58±2.63a	16.76±9.26ab
Plantas no inoculadas	0.62±0.34b	51.58±11.52a	47.78±11.42a
Parte media del cepellón			
Plantas inoculadas	67.04±15.59a	26.58±13.29a	6.37±3.12b
Plantas no inoculadas	0.33±0.33b	68.91±2.83a	30.75±3.09ab
Parte inferior del cepellón			
Plantas inoculadas	70.95±8.25a	15.34±2.59a	13.69±5.76ab
Plantas no inoculadas	0.38±0.10b	58.98±8.87a	40.62±8.93a
Germoplasma de Toluca			
Parte superior del cepellón			
Plantas inoculadas	27.89±14.06ab	20.54±8.86b	51.55±22.91a
Plantas no inoculadas	1.98±0.90c	60.32±11.30a	37.69±11.82a
Parte media del cepellón			
Plantas inoculadas	46.77±8.00a	29.41±8.23ab	23.81±6.09a
Plantas no inoculadas	5.63±1.19bc	74.86±9.49a	19.50±10.14a
Parte inferior del cepellón			
Plantas inoculadas	42.08±12.53a	17.08±5.37a	40.83±11.16a
Plantas no inoculadas	1.76±0.59c	63.15±4.64a	35.07±4.08a

Los valores son promedio ± error estandar. n=3 Valores con la misma letra, dentro de cada germoplasma, son iguales según Tukey p=0.05.

Existen varias posibles explicaciones, una de ellas pudiendo ser el tamaño de la semilla. Las semillas procedentes de Veracruz fueron alrededor de un tercio más pequeñas que las semillas procedentes de Toluca. Previamente, se ha demostrado que árboles con semillas pequeñas tales como *Betula pendula*, responden más eficientemente a la inoculación ectomicorrízica en términos de crecimiento y contenido nutrimental (Pérez-Moreno y Read 2001a y b). Esto resulta mucho más dramático en grupos de plantas de semillas todavía más pequeñas como las orquídeas, las cuales son totalmente dependientes de los hongos

micorrízicos para su germinación, dado que contienen cantidades muy pequeñas de nutrimentos para poder sobrevivir (Smith y Read 2008). En contraste se conoce que plantas con semilla de mayor tamaño tales como *Quercus* y *Fagus* son menos dependientes de la colonización temprana por parte de los hongos ectomicorrízicos, debido a la reserva nutrimental contenida en sus semillas de mayor tamaño (Smith y Read, 2008).

Es importante mencionar que un conjunto de diferencias morfológicas, ecológicas y fisiológicas han sido documentadas en diferentes genotipos vegetales dentro de la misma especie, dependiendo de las procedencias de las semillas. En general las coníferas suelen presentar variaciones en las características de sus conos y semillas aún dentro de una misma población (López y Donahue 1995). Agis *et al.* (2006) encontraron que la germinación y crecimiento de plántulas de *Pseudotsuga* estaban asociadas principalmente a factores geográfico-ambientales de los sitios de origen: latitud y precipitación anual. Resultados similares fueron reportados por Mápula *et al.* (2006) quienes señalaron que la producción de semillas, así como el porcentaje y velocidad de germinación de las mismas está relacionada con el ambiente en que se desarrollan los árboles, o bien se deben a un proceso de deriva genética, como resultado de la fragmentación y el consecuente aislamiento de las localidades en las poblaciones de *Pseudotsuga*. Por ejemplo en el norte de México los bosques de *Pseudotsuga* son de mayor tamaño y las semillas son más grandes y pesadas en comparación con los bosques localizados en el sur del país. Niembro (1985) realizó un estudio de la variación morfológica en las semillas de *Pinus ayacahuite* de tres procedencias de Veracruz, tomando en cuenta: largo, ancho y grueso de la semilla, así como el largo, ancho del ala y número de cotiledones, observando que existieron diferencias significativas en estas características morfológicas entre las procedencias. Otro estudio realizado por Huerta (2000) enfatizó las características cuantitativas de conos y semillas de *Pinus ayacahuite* en dos localidades de la Sierra Nevada de México mostrando una alta

correlación entre el tamaño del cono y el número de semillas por cono. Farfan *et al.* (2002) reportaron una variación significativa entre los árboles de *Pinus ayacahuite* en su crecimiento, altura y diámetro dependiendo de su procedencia. Estos autores encontraron que los árboles procedentes del Sur de México tuvieron mayor crecimiento que los árboles originarios de Centroamérica. Munive *et al.* (2008) realizaron un estudio para conocer la variación de conos y semillas de *Pinus ayacahuite* de dos procedencias en el estado de Tlaxcala. Estos autores reportaron diferencias en la longitud y diámetro de los conos, así como en el largo, ancho y peso de las semillas entre las dos procedencias. En general, entonces es posible señalar que existen diferencias morfológicas y fisiológicas en las especies de pinos dependiendo de su procedencia. Sin embargo, como estas diferencias influyen en las relaciones bióticas de árboles con distintas procedencias, no es totalmente conocido a la fecha.

En relación a las interacciones de microorganismos con árboles de diferentes procedencias, Nina *et al.* (2008) realizaron un ensayo de la resistencia de diversas procedencias de *Pinus sylvestris* en Siberia contra patógenos, indicando que la resistencia a los patógenos dependía tanto del régimen ecológico de la zona de cultivo como de las peculiaridades genéticas de los tipos de clima determinados por su lugar de origen. En el caso de las relaciones entre hongos ectomicorrízicos y procedencias vegetales han existido algunos estudios que señalan la influencia de los genotipos vegetales en el establecimiento de comunidades de dichos hongos. Otras posibles causas de las diferencias encontradas en la mayor biomasa vegetal aérea y total, y la mayor movilización de algunos nutrimentos (particularmente N y K) en el caso del germoplasma de *Pinus ayacahuite* procedente de Veracruz en relación al germoplasma procedente de Toluca, podría estar relacionado con la diferente compatibilidad entre simbiontes, fenómeno posiblemente vinculado con la producción diferencial de exudados radicales entre germoplasmas vegetales de diferentes procedencias. Sin embargo, es importante

mencionar que la respuesta diferencial a la inoculación ectomicorrízica encontrada en los dos diferentes germoplasmas en el presente trabajo dista mucho de ser totalmente comprendida en el presente estudio; y esta investigación más bien constituye un estudio seminal.

## **4.6 CONCLUSIONES**

Se observaron respuestas diferenciales, en términos de crecimiento y movilización nutrimental, en los dos germoplasmas evaluados de diferentes procedencias, inoculados con suelo forestal, como fuente de propágulos ectomicorrízicos, procedente de la misma área. Particularmente existieron diferencias en términos de la biomasa de la parte aérea y de la biomasa total entre las dos procedencias, existiendo una respuesta positiva en el caso de plantas inoculadas versus no inoculadas para el germoplasma de Veracruz pero no en el caso del germoplasma procedente de Toluca. Respecto a los nutrimentos se observaron diferencias similares a las del peso seco, principalmente en el contenido de N y de P. Entre las posibles explicaciones se encuentra un tamaño de semilla más pequeño, y entonces una mayor dependencia ectomicorrízica, en el caso del germoplasma procedente de Veracruz. Otras posibles causas pudiera ser una compatibilidad genética diferencial entre los micobiontes y fitobiontes evaluados, vinculado con una mayor eficiencia de translocación nutrimental. A pesar de no generar conclusiones definitivas, este estudio es seminal en México, en relación a la selección de las procedencias de árboles en la utilización de especies útiles para reforestación en el país.

## **4.7 LITERATURA CITADA**

- Allen SE, Grimshaw HM, Parkinson JA, Quarmbry C (1997) Chemical Analysis of ecological materials. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK
- Borchers JG, Perry DA (1992) The influence of soil texture and aggregation on carbon and nitrogen dynamics in southwest Oregon forests and clearcuts. *Canadian J Forest Research* 22:298– 305
- Bremer JM (1975) Total Nitrogen. In: Black CA Ed. Methods of soil analysis. Part 2, Agronomy 9:1149-1178, American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin
- Chai DD, Guo SJ, Sun XB, Qin TT (2013) The major factors affecting ectomycorrhizal fungi diversity in the forest ecosystem. *Advance Journal of Food Science and Technology* 5: 879-890
- Chalot M, Bran A (1998) Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *FEMS Microbiology Review* 22: 21–44
- Donahue JK, Dvorak WS, Gutiérrez EA (1991) The distribution, ecology, and gene conservation of *Pinus ayacahuite* and *P. chiapensis* in Mexico and Central America. CAMCORE Bulletin on Tropical Forestry No 8. Raleigh, N.C
- Farfán VEG, Jasso MJ, López UJ, Vargas HJ, Ramírez HC (2002) Parámetros genéticos y eficiencia de la selección temprana en *Pinus ayacahuite* Ehren. var. *ayacahuite*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25:239-246
- Huerta VJL (2000) Estudio de conos y semillas de *Pinus ayacahuite* var. *vetchii* Shaw en dos localidades de la Sierra Nevada de México. Tesis Profesional. División de Ciencias forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México
- Juárez-Agis A, López-Upton J, Vargas-Hernández J, Sáenz-Romero C (2006) Variación geográfica en la germinación y crecimiento inicial de plántulas de *Pseudotsuga menziesii* de México. *Agrociencia* 40: 783-792.
- López-Upton J, Donahue JK (1995) Seed production of *Pinus greggii* Engelm. in natural stands of Mexico. *Tree Planter's Notes* 46:1-10
- Mápula LM, López J, Vargas J, Hernández LA (2007) Reproductive indicators in natural populations of Douglas–fir in Mexico. *Biodiv. Conserv.* 16:727–742

- Mendizábal HL, Alba LJ, Rebolledo CL (1999) Prueba de procedencia/progenie de *Pinus oocarpa* Schiede en el municipio de Emiliano Zapata, Veracruz, México. *Foresta Veracruzana* 1:9-12.
- Munive ME, Vázquez CO, Zamora-Campos ME, Fernández PF, García GG (2008) Variación de conos y semillas de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw de dos procedencias del estado de Tlaxcala. *Foresta Veracruzana* 1:39-46
- Musálem MA, Ramírez LA (2003) Monografía de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Chapingo, estado de México
- Niembro RA (1985) Variación morfológica en semillas de *Pinus ayacahuite* Ehr., de tres procedencias en el estado de Veracruz. Boletín Técnico No. 24. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México
- Nina AK, Sergey RK (2008) Intraspecific response of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) to pathogens in a provenance trial in middle Siberia. *Eurasian Journal of Forest Research* 11:51-59
- Pérez-Moreno J, Read DJ (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to the tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytol* 145: 301-309.
- Perrin R, Garbaye P (1983) Influence of ectomycorrhizae on infectivity of *Pythium*-infected soils and substrates. *Plant Soil* 71:345–351.
- Perry. J. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland, Oregon
- Ramírez HC, Vargas HJ, López UJ (2005) Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. *Acta Botánica Mexicana* 72:1-16
- Reyes H, Vargas JJ, López UJ, Vaquera H (2005) Variación morfológica y anatómica en poblaciones mexicanas de *Pseudotsuga* (Pinaceae). *Acta Bot Mex* 70:47- 67
- Sánchez-González A (2008) Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera Bosques* 14:107-120
- SAS (2002) Statistical Analysis System Institute. SAS User's guide, Version 9. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA
- Simard.S W, Perry DA, Jones MD, Myrold DD, Durall DM, Molina R (1997) Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388:579–582

Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal Symbiosis. 3rd Ed. Academic Press,  
London

## CAPITULO V

### CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ANATÓMICA DE LAS ECTOMICORRIZAS DE *Pinus ayacahuite* CON *Hebeloma mesophaeum* s.l., *Thelephora* aff. *terrestris* Y *Cenococcum geophilum*.

#### 5.1 RESUMEN

*Pinus ayacahuite* es una especie nativa del sureste de México y de Centroamérica. Se distribuye naturalmente en altitudes de 2,000 a 3,500 msnm. La especie es altamente apreciada por su madera, el color de sus acículas y el olor de su resina. Es ampliamente utilizado como un árbol de ornato, en parques de áreas urbanas y es una de las especies de mayor importancia en México en la industria de la producción de árboles de Navidad, la cual es una actividad de creciente valor económico en el país por ser una labor altamente rentable que genera empleos, y está vinculada con la conservación de suelo y de biodiversidad en áreas degradadas. Además, esta especie tiene propiedades medicinales y veterinarias. Como todos los pinos, *P. ayacahuite* depende de la simbiosis ectomicorrízica para la translocación de agua y nutrimentos y su protección contra patógenos, en áreas naturales. Sin embargo, a pesar de ser importante tanto económica y ambientalmente, los estudios relacionados con los simbiontes ectomicorrízicos de *P. ayacahuite* en general son escasos. A la fecha, solamente se ha desarrollado síntesis de su ectomicorriza con el hongo comestible, de color azul, *Lactarius indigo* en germoplasmas de Guatemala. En el presente trabajo se describen tres ectomicorrizas que fueron sintetizadas después de dos años de inocular plantas de *P. ayacahuite* en invernadero. Los hongos involucrados en las ectomicorrizas que se describen morfológica y anatómicamente son: *Hebeloma mesophaeum* s.l., *Thelephora* aff. *Terrestris* y *Cenococcum geophilum*. Se



presenta información detallada de la morfología y anatomía de las ectomicorrizas sintetizadas, generada con microscopía estereoscópica, óptica de campo claro y electrónica de barrido. Adicionalmente se comparan las ectomicorrizas encontradas en el presente trabajo, con ectomicorrizas descritas para estos hongos con otros simbiontes, en otras partes del mundo. Hasta donde conocemos es la primera ocasión que se describen estas micorrizas asociadas con *P. ayacahuite*. Finalmente, se discute la importancia funcional y biotecnológica de estos hongos y su potencial en la producción de plantas de *P. ayacahuite* en México.

**Palabras clave:** morfoanatomía, esclerocios, hongos comestibles ectomicorrizicos.

## 5.2 INTRODUCCIÓN

Los hongos ectomicorrizicos son microorganismos rizosféricos simbióticos, que forman asociaciones mutualistas con angiospermas y gimnospermas de ecosistemas boreales, templados y algunos subtropicales y tropicales (Pérez-Moreno y Read, 2004); La simbiosis ectomicorrizica juega un papel de enorme importancia en la estructura y funcionamiento de estos ecosistemas, en procesos clave como el reciclaje nutrimental (Read y Pérez-Moreno, 2003), tanto de fuentes inorgánicas como orgánicas (Pérez-Moreno y Read, 2000; 2001a; 2001b). Adicionalmente, se ha demostrado que la ectomicorriza contribuye a incrementar la tolerancia a factores de estrés en sus plantas hospedantes tales como sequía (Wang *et al.* 2012; Bingham y Simard, 2012), presencia de metales pesados (Colpaert *et al.* 2000; Silva *et al.* 2013; Kumla *et al.* 2014; Machuca, 2014), temperaturas extremas (Marx *et al.* 1970a; Fujimura *et al.* 2012; Timling y Taylor 2012), salinidad (Wang *et al.* 2011) y presencia de microorganismos patógenos (Nagy y Fossdal 2013; Zhang *et al.* 2011; Tang *et al.* 2008). De hecho el mecanismo fundamental en el que

se basa el mutualismo de la ectomicorriza es el intercambio nutrimental; los hongos asociados recibiendo carbono de sus plantas hospederas y estas a su vez recibiendo nutrimentos, tales como N, P, K, Ca, Mg, Mn y Fe. Esta asociación se establece entre unas 20,000 especies de hongos ectomicorrizicos (ECM) y unas 8,000 especies de plantas (Rinaldi *et al.* 2008). México es un importante reservorio internacional de hongos y plantas ECM. En relación a los hongos ECM, el 39% de los géneros conocidos a nivel mundial han sido registrados en México (Pérez-Moreno *et al.* 2014), además de contar con 72 taxa de *Pinus* (Perry *et al.* 1998), de los cuales 55% son endémicos; esto significa que 42% de las especies del mundo se encuentran en nuestro país y al menos 20 taxa de los pinos mexicanos están en alguna categoría de riesgo (Sánchez-González, 2008).

*Pinus ayacahuite* var. *Veitchii* Shaw, se distribuye de manera natural en la parte central de México, en el Distrito Federal y los estados de México, Morelos, Hidalgo, Puebla, Tlaxcala, Jalisco, Veracruz, Michoacán y Guerrero. Su presencia en las cañadas de la alta montaña, lugares de suelo profundo y húmedo, lo convierte en un componente importante en la regulación del ciclo hidrológico, el control de la erosión del suelo, así como nicho de fauna y flora de las regiones donde crece. Además de proveer de alimento a la fauna a través de sus grandes piñones, su permanencia en los bordes de los bosques donde el embate de la deforestación está ocurriendo, tiene un gran valor ecológico cuando actúa como remanente en las áreas de cultivo (Musálem y Ramírez 2003; Munive *et al.* 2008). *P. ayacahuite* es usado por su madera de buena calidad en la elaboración de diversos productos, así como en la reforestación de zonas urbanas y suburbanas y en plantaciones como árboles de navidad por su rápido crecimiento, y su capacidad de retener sus acículas después de cortado para las festividades navideñas, por la forma simétrica mediante la poda, por su fuste fuerte y por su abundante y flexible follaje de agradable color verde (CONAFOR 2014; Musálem y Ramírez 2003).

Todas las especies del género *Pinus*, requieren de manera obligada de la existencia de la ectomicorriza para poder sobrevivir (Pérez-Moreno y Read 2004). Esto se debe a que el micelio externo de los hongos ectomicorrizicos juega un papel fundamental en la translocación nutrimental a las especies de este género, indispensable para su supervivencia (Read y Pérez-Moreno 2003). Sin embargo a pesar de su enorme importancia económica, social y ecológica, a la fecha no se han realizado estudios de los simbioses ectomicorrizicos de *P. ayacahuite*. Existe solo un trabajo donde Flores *et al.* (2005) realizó la síntesis de micorriza de *P. ayacahuite* var. *ayacahuite* Ehren con *Lactarius indigo*, en material genético procedente de Guatemala; sin embargo es necesario estudiar un mayor número de micobiontes asociados con *P. ayacahuite*, debido a que se ha reportado en estudios recientes que un árbol maduro puede asociarse hasta con 100 especies diferentes de hongos ectomicorrizicos (Bahram *et al.* 2011). En el presente trabajo se estudió por primera vez la asociación de *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quel., *Thelephora terrestris* Ehrh. Y *Cenococcum geophilum* Fr. con *P. ayacahuite* y se presenta un estudio morfoanatómico de las ectomicorrizas entre estos simbioses, el cual incluye una caracterización con microscopía electrónica de barrido.

## **5.3 MATERIALES y MÉTODOS**

### **5.3.1 Material vegetal e inóculo**

Las semillas de *P. ayacahuite* procedieron de un rodal de *P. ayacahuite*, de 20 años de edad, en la Sierra Nevada en la población de San Pablo Ixayoc, Municipio de Texcoco, estado de México. Estas fueron superficialmente esterilizadas antes de la siembra, empleando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%. Se utilizaron dos fuentes de inóculo ectomicorrizico: i) esporomas secos molidos de *H. mesophaeum* s.l. y ii) material de horizonte de fermentación y orgánico. Esto debido a que se conoce que de estos horizontes es donde existe la

mayoría de los propágulos ectomicorrizicos naturalmente. Los esporomas utilizados para el inóculo procedían de un rodal de *Pinus ayacahuite*, ubicado en la Sierra Nevada del estado de México. La preparación del inóculo esporal consistió en cortar los píleos de los estípites de *H. mesophaeum*, deshidratarlos a 35 °C y molerlos. Posteriormente los píleos molidos y el material del suelo forestal se tamizaron, por separado, empleando una malla de 1.19 mm de abertura (Duvesa, México, D.F.), para homogeneizar el tamaño de las partículas. Los inóculos así obtenidos se almacenaron a 5 °C hasta que fueron empleados.

### **5.3.2 Montaje del experimento y evaluación de variables**

El sustrato utilizado consistió en una mezcla de arena, corteza y suelo en una proporción 2:2:1, misma que fue esterilizada con vapor de agua a 1.3 kg/cm<sup>2</sup> y 125 °C durante 5 h. Posteriormente el sustrato se transfirió a tubetes de plástico negro de 140 mL. Una vez llenados los envases con el sustrato, se realizó una primera inoculación, constituida por 1 g de inóculo por planta, de los hongos *H. mesophaeum* y del suelo forestal, dependiendo del tratamiento. Para el caso del tratamiento donde se utilizaron esporas, este se inoculó con 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> esporas de *H. mesophaeum*, aplicándose a una profundidad de 3 cm de la parte superior del tubete y la semilla fue colocada a una profundidad de 1.0 cm. Tres meses después, se realizó una segunda inoculación. Las plantas permanecieron en el invernadero durante 104 semanas y después fueron cosechadas. Durante todo este tiempo se regaron cada tercer día con agua purificada.

### **5.3.3 Caracterización macro y micromorfológica de la ectomicorriza**

#### **5.3.3.1 Microscopiaestereoscópica y óptica de campo claro**

Para evaluar el porcentaje de micorrización se seleccionaron al azar 3 plantas inoculadas de cada tratamiento y 3 plantas sin inocular. Posteriormente se extrajeron de los tubetes los cepellones de dichas plantas y la parte radical se lavó bajo un chorro de agua con baja presión, empleando tres tamices de 1.19, 0.180 y 0.0850 mm de abertura (Duvesa y FIICSA, México, D.F.), que evitaron la pérdida de raíces cortas. Para evaluar las raíces micorrizadas o sin micorrizar, vivas y muertas se utilizó un microscopio estereoscópico (American Optical 570, California, USA). Se separaron todas las raíces cortas del cepellón y se efectuaron cortes para su análisis micromorfológico, para detectar las estructuras diagnósticas de la ectomicorriza: manto, red de Hartig y micelio externo (Agerer 1994) y se fotografiaron empleando un microscopio Olympus de campo claro Mod. BX51.

### **5.3.3.2 Microscopia electrónica de barrido**

Las raíces micorrizadas fueron evaluadas también con microscopía electrónica de barrido. Inicialmente las muestras se lavaron tres veces, durante cinco minutos cada vez, en una solución buffer con un pH de 7.1, posteriormente se introdujeron en una solución de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Solución A) y en  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Solución B), y después se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 80, 90 y 100%) durante 45 minutos por cada concentración, con tres cambios en el último lavado por 20 minutos. Adicionalmente en el lavado con etanol a 70% se les realizó a las muestras un microlavado en el ultrasonicliner (Doxpro) por 20 segundos, debido a que las muestras contenían aún residuos del sustrato. Una vez deshidratadas las muestras, se colocaron en un desecador a punto crítico (Tousimis, Sandri-795) durante una hora. Posteriormente se sombrearon con oro en un Ionizador (Jeol, Fine Coat Ion Sputter JFC-1100). Finalmente, cada una de las muestras se observaron en el microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscope Jeol

JSM-6360LV). Se efectuaron microfotografías de las estructuras características de las raíces micorrizadas, las cuales incluyeron manto, red de Hartig y micelio externo, y cuando fue el caso, estructuras adicionales tales como fíbulas, ornamentación de hifas o esclerocios.

## 5.4 DESCRIPCIÓN DE LAS ECTOMICORRIZAS

### 5.4.1 Descripción de la ectomicorriza de *Hebeloma aff. mesophaeum* con *P. ayacahuite*.

***Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél., *Mém. Soc. Émul. Montbéliard*, Sér. 2 5: 128 (1872)**

Sinónimos según *Index Fungorum* (2014):

*Agaricus fastibilis* var. *mesophaeus* Pers., *Mycol. eur.* (Erlanga) 3: 173 (1828).

*Agaricus mesophaeus* Fr., *Epicr. syst. mycol.* (Upsaliae): 179 (1838) [1836-1838].

*Agaricus mesophaeus* var. *holophaeus* Fr., *Hymenomyc. eur.* (Upsaliae): 240 (1874).

*Agaricus mesophaeus* var. *minor* Cooke, *Illustrations of British Fungi (Hymenomycetes)* (London) 3: pl. 453 (412) (1886).

*Agaricus strophosus* Fr., *Epicr. syst. mycol.* (Upsaliae): 161 (1838) [1836-1838].

*Hebeloma flammuloides* Romagn., *Sydowia* 36: 268 (1983).

*Hebeloma pyrophilum* var. *longiventriosopilis* (Quadr.) Quadr., *Mycol. helv.* 3(2): 200 (1989) [1988].

*Hebeloma strophosum* (Fr.) Sacc., *Syll. fung.* (Abellini) 5: 808 (1887).

*Hylophila mesophaea* (Pers.) Quél., (1886).

*Hylophila versipellis* var. *strophosa* (Fr.) Quél., (1886).

*Inocybe holophaea* (Fr.) P. Karst., *Bidr. Känn. Finl. Nat. Folk* 32: 470 (1879).

*Inocybe mesophaea* (Pers.) P. Karst., *Bidr. Känn. Finl. Nat. Folk* 32: 470 (1879). *Inocybe versipellis* var. *mesophaeus* (Pers.) S. Petersen, *Danske Agaricaceer* 2: 337 (1911).

Ectomicorrizas de hasta 10 mm de longitud y de 0.5 mm de diámetro, simples o dicotómicas, superficie lisa a algodonosa, de color blanquecino con tonos plateados en algunas zonas cuando jóvenes y con tonos café

claro cuando adultas. Ápices cilíndricos rectos o ligeramente curvos, de color blanco o café claro. Hifas emanantes abundantes rodeando el manto, de color blanquecino a crema, del tipo de exploración de corta distancia. Hifas emanantes de hasta 5 µm de diámetro, con abundantes fíbulas, en algunas ocasiones en cada simple septo. Las hifas frecuentemente se encontraron ramificadas y en algunas ocasiones presentaron ornamentación verrucosa. Arreglo del manto plectenquimatoso con hifas similares morfológicamente a las emanantes, irregularmente arregladas, sin un patrón discernible, con una característica red hifal sinenquiamatosa por debajo de la superficie del manto, con células irregulares de hasta 5 µm de diámetro por 25 µm de longitud, de paredes lisas, hialinas. Manto delgado de hasta 20 µm de diámetro, algodonoso laxo. Rizomorfos ausentes o escasamente diferenciados. Sin presencia de esclerocios (Figura 5.1).

Las características de las ectomicorrizas formadas entre *H. mesophaeum* y *P. ayacahuite* concuerdan con las descritas por Ingleby *et al.* (1990). Estos autores describieron que los caracteres diagnósticos de la micorriza de *H. mesophaeum* son el abundante micelio externo, la ornamentación verrucosa de las hifas y el arreglo de la superficie del manto. Adicionalmente, mencionaron que las ectomicorrizas de *Hebeloma* spp. son frecuentemente encontradas asociadas con una amplia diversidad de géneros de angiospermas y gimnospermas tales como *Betula*, *Picea* y *Pinus*, particularmente con árboles jóvenes, por lo que han sido considerados hongos de estadios primarios o especies pioneras. Erik *et al.* (2002) y Mleczko (2004) describieron que las ectomicorrizas de *H. mesophaeum* con *Picea glauca* y *Betula pendula*, respectivamente presentaron un manto de color amarillo café o amarillo. De manera similar Barroetaveña *et al.* (2012) describieron ectomicorrizas de un color ocre amarillento. Mientras tanto, Hryniewicz *et al.* (2012) ilustraron ectomicorrizas de *H. mesophaeum* con tonos blanquecinos a crema. Interesantemente, Hilszczanska *et al.* (1999) demostraron que el desarrollo



de ectomicorrizas de *H. mesophaeum* con *Pinus sylvestris* L., así como el micelio de este hongo, es estimulado por la exposición a luz láser de helio-neon (He-Ne) o Argón (Ar) ( $\lambda=632.8$  nm y 514 nm, respectivamente). Previamente en México, se ha demostrado que *H. mesophaeum* forma micorrizas con *Pinus montezumae* Lamb., *Pinus greggii* Engelm., *Pinus patula* Schiede ex Schltld. et Cham y *P. pseudostrobus* Lindl. (Garibay-Orijel *et al.* 2013; Martínez-Reyes *et al.* 2012; Carrasco-Hernández *et al.* 2011).

El género *Hebeloma* forma ectomicorrizas con gimnospermas y angiospermas de géneros arbóreos tales como *Betula* (Giltrap 1982), *Pinus* (Martínez-Reyes *et al.* 2012), *Picea* (Tibbett *et al.* 1998), *Populus* (Obase *et al.* 2009), *Quercus* (Sousa *et al.* 2014) y arbustos como *Cistus* (Comandini *et al.* 2006; Eberhardt *et al.* 2009) o *Dryas* (Debaud 1981; Harrington y Mitchell, 2002). *H. mesophaeum* es una especie que ha sido reportada de Europa (Boyle *et al.* 2006), Norte (Smith 1983) y Sudamérica (Barroetaveña *et al.* 2012), Asia (Obase *et al.* 2007; 2009; y África (Mo *et al.* 2009). Se ha estimado que el número de especies del género *Hebeloma* es de 250 a 600 especies (Cairney y Chambers 1999).

*H. mesophaeum* tiene un enorme potencial biotecnológico para inocular árboles de importancia forestal en invernadero debido a que posee un conjunto de características fisiológicas y ecológicas tales como: i) ser una especie pionera. Tradicionalmente, la especie ha sido considerada una especie típicamente asociada con estadios vegetacionales primarios (Obase *et al.* 2009). Por ejemplo, Visser (1995) encontró que *H. mesophaeum* se asocia con árboles de *Pinus banksiana* Lamb. de seis años de edad; ii) poseer la capacidad de formar abundantes bancos de esporas (Ishida *et al.* 2008; Garibay-Orijel *et al.* 2013); iii) ser encontrada con frecuencia en las raíces de árboles forestales en invernadero y en plantaciones y en invernadero (Barroetaveña *et al.* 2005; Rincón *et al.* 2007); iv) tener la capacidad de desarrollarse en sitios pobres

nutrimentalmente, tales como huecos entre las paredes (Trocha et al. 2007); v) en México, al ser una especie comestible, abundantemente comercializada en los mercados del centro del país es relativamente fácil el acceder a grandes cantidades por su importancia económica (Estrada-Martínez et al. 2009; Montoya et al. 2008; Pérez-Moreno et al. 2008; Pérez-Moreno et al. 2010). Al respecto es de interés señalar que en términos generales las especies del género *Hebeloma* son consideradas tóxicas a nivel mundial (Price 1927; Arora 1979; Valenzuela et al. 1996; Bonet et al. 2004). Sin embargo, en México existe un complejo de especies del género que son comestibles dentro de las que se incluye *H. mesophaeum* (Pérez-Moreno et al. 2010); y vi) tener la capacidad de originar colonizaciones extensas en diversas especies de importancia forestal, lo cual ha sido asociado con efectos benéficos en términos de crecimiento y contenido nutrimental, principalmente N, P, K, Ca y Mg (Martínez-Reyes et al. 2012; Carrasco-Hernández et al. 2011).

Adicionalmente, se ha demostrado que *H. mesophaeum* es una especie que incrementa la tolerancia a metales pesados a sus plantas hospederas. Krpata et al. (2008) detectaron que *H. mesophaeum* fue una de las especies que presentó mayor colonización en *Populus tremula* L. creciendo en sitios contaminados con metales pesados. De manera similar, Hryniewicz et al. (2008) reportaron la presencia de dicha especie fúngica en minas de plata en Freiberg, Alemania. Posteriormente, estos autores (Hryniewicz et al. 2012) encontraron que la co-inoculación de *H. mesophaeum* con *Bacillus cereus* resulta muy eficiente en la fitoextracción de Cd y Zn en sauces (*Salix viminalis* L.). Asimismo, Cheng y Li (2007) registraron el potencial de degradar petróleo por parte de *H. mesophaeum* en asociación con *Fraxinus sogdiana* Bunge.

*H. mesophaeum* establece una de las más fascinantes relaciones bióticas con otro género de Agaricales: *Squamanita*. Se ha comprobado, con técnicas de biología molecular, que los esporomas de *H. mesophaeum*

pueden ser parasitados por el *Squamanita*, género que ha sido recientemente registrado en México por Cortés-Pérez *et al.* (2014). Éste es un enigmático género de Agaricales, que comprende 15 especies a nivel mundial. Constituye el único género en el cual todas sus especies son parásitas a su vez de esporomas de otras especies de Agaricales (Readhead *et al.* 1994; Matheny y Griffith 2010; Henrici 2013). Los esporomas de las especies del género *Squamanita* surgen de bases engrosadas que han sido denominadas “cuerpos esclerociales” o “tubérculos protocárpicos”. *S. odorata* es un parásito de los esporomas de *H. mesophaeum* los cuales son transformados en agallas no identificables morfológicamente en su base, en Francia y Suiza (Mondiet *et al.* 2007).

---

**Figura 5.1 Vista general y detalles morfológicos y anatómicos de la ectomicorriza de *P. ayacahuite* con *Hebeloma mesophaeum* s.l. a) Vista general de una raíz ectomicorrizada en donde es posible apreciar las abundantes hifas emanantes de color blanquecino surgiendo del manto; es posible apreciar también el color blanquecino a café claro del ápice de la ectomicorriza; b) vista general de una raíz ectomicorrizada simple, con abundantes hifas emanantes a lo largo de toda la ectomicorriza y de su base; c) corte transversal de una raíz ectomicorrizada en donde es posible apreciar, las estructuras típicas de una ectomicorriza las cuales incluyen micelio externo, manto y red de Hartig; d) acercamiento a los espacios intersticiales de las células corticales, en donde se aprecia con claridad la red de Hartig, así como el manto; e) y f) Acercamiento a las fíbulas, estructuras características de Basidiomycetes, en este caso abundantes tanto en el manto como en el micelio externo. La imagen a) fue tomada usando microscopía estereoscópica y las imágenes b) a f), fueron tomadas con microscopía electrónica de barrido.**

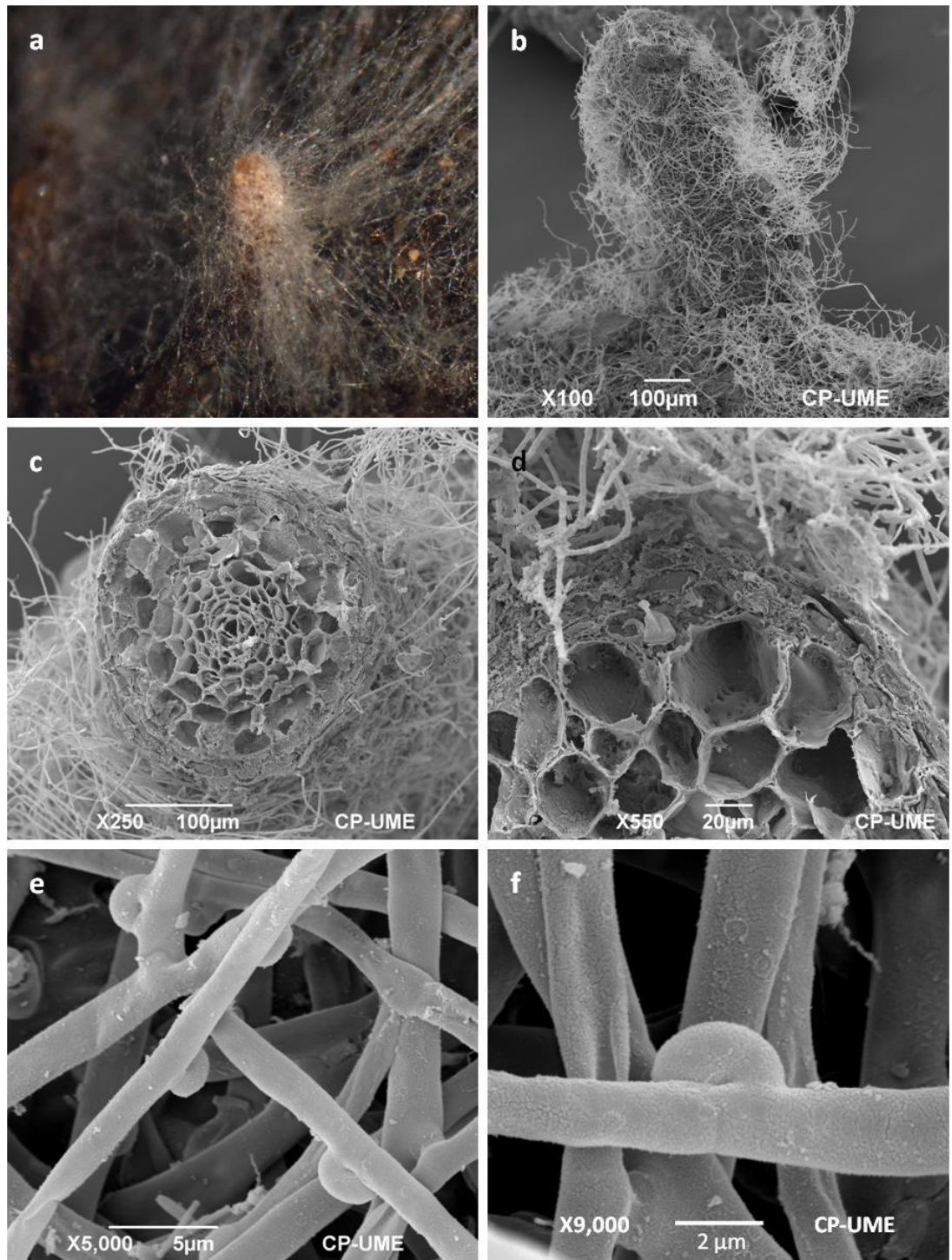


Figura 5.1 Ectomicorriza de *Hebeloma mesophaeum* s.l. con *P. ayacahuite*. Ver pie de figura en página anterior.

#### 5.4.2 Descripción de la ectomicorriza de *Thelephora* aff. *terrestris* con *P. ayacahuite*.

*Thelephora terrestris* Ehrh., *Pl. Crypt. Linn. Exsicc.*: no. 178 (1787).

Sinónimos según *Index Fungorum* (2014):

*Coniophora eradians* (Fr.) Fr., *Elench.fung.* (Greifswald) 1: 195 (1828).

*Hyphoderma terrestre* (Ehrh.) Wallr., *Fl. crypt. Germ. (Norimbergae)* 2: 579 (1833).

*Hypochnus eradians* (Fr.) Bres., *Annls mycol.* 1(2): 106 (1903).

*Phylacteria terrestris* (Ehrh.) Pat., *Essai Tax. Hyménomyc.* (Lons-le-Saunier): 119 (1900).

*Thelephora crustosa* Lloyd, *Mycol. Writ.* 7 (Letter 69): 1196 (1923).

*Thelephora eradians* Fr., *Elench. fung.* (Greifswald) 1: 195 (1828).

*Thelephora minor* Velen., *České Houby* 4-5: 770 (1922).

*Thelephora rhipidium* Velen., *České Houby* 4-5: 772 (1922).

*Thelephora terrestris* f. *resupinata* (Bourdot & Galzin) Donk, *Medded. Nedl. Mycol. Ver.* 22: 44 (1933).

*Thelephora terrestris* var. *infundibuliformis* (Bourdot & Galzin) Corner, *Beih. Nova Hedwigia* 27: 88 (1968).

*Thelephora terrestris* var. *tomentella* (Bourdot & Galzin) Corner, *Beih. Nova Hedwigia* 27: 88 (1968).

*Thelephora tristis* Sacc., *Fl. ital. crypt.*, Hymeniales (Genoa) 1: 1138 (1916)

Raíces ectomicorrizadas simples o dicotómicas, de hasta 1 cm de longitud; superficie brillante, inicialmente de color café claro y posteriormente de color café ocre, café naranja a café rojizo. Ápices no ramificados rectos a ligeramente curvos, de hasta 4 mm de longitud y 0.4 mm de diámetro. Superficie de los ápices ramificados lisos. Rizomorfos escasos, de hasta 200  $\mu\text{m}$  de grosor, blanquecinos a color café, lisos. Hifas emanantes escasas o inexistentes. Manto de hasta 70  $\mu\text{m}$  de diámetro, plectenquimatoso con hifas laxamente entretejidas, de 4 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, células irregulares, con pared engrosada de hasta 0.5  $\mu\text{m}$  de grosor, hialinas, con un característico retículo hifal debajo de la superficie del manto. Fíbulas presentes. Cistidios escasos. Rizomorfos ligeramente diferenciados. Red de Hartig conspicua, penetrando de 2 a 4 capas de células corticales (Fig. 5.2).

Las micorrizas descritas en el presente trabajo concuerdan con las descritas por Agerer y Weiss (1989). Estos autores consideraron que las características diagnósticas de la ectomicorrizas de *T. terrestris* incluyen el color blanquecino al inicio y de tonos cafés posteriormente, las red hifal debajo de la superficie del manto, las hifas con fíbulas, la presencia de cistidios de pared gruesa y de rizomorfos ligeramente diferenciados. De Román y de Miguel (2000) describieron las micorrizas de *T. terrestris* con *Quercus ilex* L. de color blanco amarillento a marrón anaranjado y Thomas y Jackson (1979) de color grisáceo, mientras que en el caso del presente trabajo las micorrizas siempre fueron de tonos más oscuros. Estos autores no encontraron cistidios, ni rizomorfos mientras que en *P. ayacahuite* se encontraron cistidios en algunas ocasiones así como rizomorfos en proceso de diferenciación. Por su parte Godbout y Fortin (1985) tampoco reportaron presencia de cistidios. Chu-Chou and Grace (1983) describieron detalladamente rizomorfos de hasta 108  $\mu\text{m}$  de diámetro.

*Thelephora terrestris* es el basidiomicete ECM más común en los viveros forestales del mundo (Marx y Bryan 1970), es un fuerte competidor

o puede prosperar en comunidades con escasos componentes ECM (Hilszczanska y Sierota 2006). *T. terrestris* es un simbiote que se asocia con diversas especies de angiospermas y gimnospermas y es un colonizador pionero en suelo fumigados o esterilizados en autoclave. Marx y Ross,(1970) reportaron que las basidiosporas de *T. terrestris* formaron ECM con *P. taeda*, dos y medio meses después de realizar la inoculación. Posteriormente estos autores confirmaron que dicha colonización estuvo originado por *T. terrestris* al realizar aislamientos de las ECM formadas los cuales fueron idénticos con el cultivo usado inicialmente. La supervivencia, crecimiento y nutrición de gimnospermas y angiospermas dependen con frecuencia, sobretodo en ecosistemas boreales y templados de la composición y actividad de los hongos ECM (Smith y Read 2008). En plantas de *P. sylvestris* y *Picea abies* llevadas a campo, Klavina *et al.* (2013) encontraron que *T. terrestris* predominó durante el primer año, para después ser reemplazada en su predominancia por *Wilcoxina rehmii* y *Amphinema byssoides*, en las siguiente tres estaciones de crecimiento que fueron muestreadas, lo que indica cierta adaptación de la comunidad de hongos ECM a las condiciones presentes en el sitio de estudio. Una de las razones que podría explicar este fenómeno es que *T. terrestris* se encuentra adaptada a los altos niveles de nutrientes y humedad presentes en invernadero, condiciones que en el campo disminuyen. Hilszczanska y Sierota (2006) reportaron una situación muy similar con *P. sylvestris* cuando se inoculó en invernadero con una cepa de *T. terrestres*. Después de 6 meses que las plantas fueron llevadas a campo, se evaluó la colonización de ECM y se encontraron dos cepas diferentes de *T. terrestris*, una correspondía a la cepa que se inoculó y la otra era una cepa nativa; los mismos resultados fueron encontrados en el segundo año del experimento en campo domino la cepa nativa, lo que confirmó que *T. terrestris* es un hongo importante en la comunidad de ECM del sitio.

En 1996 por primera vez se registró la simbiosis de las micorrizas de *T. terrestris* con *Eucalyptus globulus*, var. *Globulus* las cuales son similares



a las reportadas cuando se asocia con otras especies de árboles (Ingleby y Mason 1996). De manera similar a lo reportado por Klavina *et al.* (2013) y Hilszczanska y Sierota (2006), Lee (1996) reportó que diez años después de la inoculación y de 6 a 9 años después de que las plantas fueran llevadas a campo, se observó que la colonización por *P. tinctorius* y *T. terrestris* fue disminuyendo y fueron desplazados por los hongos ectomicorrizicos nativos del suelo, por lo que se sugiere que para seleccionar un hongo ectomicorrizico para ser utilizado como inoculante, este debe de ser competitivo tanto en invernadero como en campo (Lee 1992). Previamente este autor había encontrado que *T. terrestris* no estimuló el crecimiento de las plantas inoculadas con micelio en *Pinus densiflora*, *P. thunbergii*, *P. rigida* y *P. rigida x taeda* y *P. koraiensis* en invernadero en sustrato fumigado con bromuro de metilo, debido tal vez a los bajos porcentajes de infección de 40 al 60% comparadas con las de *Pisolithus tinctorius* de 80%; para *T. terrestris* no existieron diferencias significativas en la cantidad total de N y P con 4.67 y 0.52 mg por planta de la parte aérea, respectivamente comparadas con el control con 4.87 y 0.59 mg, respectivamente (Lee y Koo 1983). Marx *et al.* (1970) identificaron cinco grupos de hongos simbiotes aislados de ECM con *Pinus echinata* de 7 a 9 meses de edad, con 70 a 80% de colonización, creciendo en suelo altamente fumigado en invernadero dentro de los que se incluyó *T. terrestris*. El primer grupo simbiote, representado por siete aislamientos o cultivos fue morfológica y microscópicamente idéntico a *T. terrestris*. *T. terrestris* creció mejor en el medio MMN, de forma intermedia en medio Hagem e inconspicuamente en PDA. Marx y Bryan (1970), inocularon con micelio de *T. terrestris* y *P. tinctorius* plantas de 17 especies de *Pinus*, *Picea abies* y *Pseudotsuga menziesii*, las cuales formaron esporomas de *T. terrestris* y ECM de ambas especies de hongos. Así mismo se realizaron reaislamientos exitosos de las micorrizas de las diferentes especies de hospederos. Las características de las ECM de *T. terrestris* fueron macroscópica y microscópicamente diferentes de las de *P. tinctorius*, pero



las micorrizas formadas por los diferentes aislamientos de las ECM de *T. terrestris* fueron similares, independientemente del hospedero. En base a los resultados de este experimento en 1970 los autores sugirieron que el hongo simbionte determina el color y morfología de la ECM. Ivory (1983) inoculó plantas de *Pinus caribea* con cultivos miceliales de 8 hongos y cultivo de basidiosporas de 4 hongos. Cuatro meses después se observaron las ECM de las especies inoculadas. Los inoculantes miceliales con las especies de mayor éxito fueron *P. tinctorius*, *R. nigrescens*, *S. bovista*, *S. texense* y *T. terrestris*.

Se ha reportado que *T. terrestris* es capaz de colonizar plantas de *P. taeda* a temperaturas de hasta 29 °C. Marx *et al.* (1970) registraron que este hongo formó ECM en 45% de las raíces cortas a temperaturas de 14, 19 y 24°C, 30% a 29 °C y ninguna a 34 °C en plantas de *P. taeda* en cultivo puro. Con técnicas de biología celular en la ontogenia de la asociación ECM se ha demostrado la presencia de fibras con polisacáridos y glicoproteínas. *T. terrestris* es capaz de producir estos polisacáridos (Clarice *et al.* 2002), esto es importante debido a que la pared de la hifas de los hongos está compuesta en 75% por polisacáridos y algunos constituyen un manto extracelular en el micelio (Gutiérrez *et al.* 1996).

La aplicación de fungicidas y la fertilización, es una práctica muy común en los viveros forestales. Esta práctica se realiza durante los diferentes estadios del desarrollo de las plantas ya sea en forma individual o combinada y a diferentes tasas de aplicación; sin conocer con certidumbre su efecto en el desarrollo de la formación de ECM y por ende su efecto en la calidad de plantas forestales producidas. Nueve meses después de la producción de *P. radiata* a raíz desnuda, Smaill *et al.* (2013) registraron 5 taxa de hongos ECM, éstos fueron en orden decreciente de acuerdo a su abundancia *Rhizopogon rubescens*, *Wilcoxina mikolae*, *Hebeloma* sp., *Tuber* sp. y *T. terrestris*. La abundancia relativa de *R. rubescens* disminuyó cuando se aplicaron los tratamientos estándar, el cual consistió en la aplicación de 550 kg de fertilizante y 8000 ml de fungicida

por  $\text{ha}^{-1}$ , en cambio *Wilcoxina*, *Hebeloma* y *T. terrestris* aumentaron. Existió una correlación positiva entre *T. terrestris* y la concentración de Cu y Fe en la parte aérea y negativa para N.

En el caso específico de México se han mencionado algunas especies de *Thelephora*, que incluyen *T. terrestris* y *T. cervicornis*. Un registro muy interesante del género fue efectuado recientemente por Ramírez-López *et al.* (2013) en bosques tropicales en la estación biológica de Chamela en el estado de Jalisco. Los esporomas de la especie de *Thelephora* encontrados tienen forma clavarioide que puede convertirse en resupinado durante el desarrollo y el crecimiento si están en contacto con rocas, arena o plantas naturales, estableciendo en este último sólo una relación epífita y demostrando su enorme plasticidad fenotípica. Los basidiomas fueron encontrados en sitios de dosel cerrado, independientemente del nivel de perturbación del sitio, la abundancia relativa de los esporomas fue de 27.9% con respecto a otros hongos clavarioides de la estación de estudio. La forma de crecimiento fue solitario y algunas ocasiones gregario. La longitud de los esporomas fue de 8 a 145  $\mu\text{m}$ , de color marrón claro o rojizo a oscuro-violeta, marrón en la base y la parte intermedia, y los ápices de color gris o amarillo a blanco, reacciona con el hidróxido de potasio, sus esporas son ornamentadas. El himenio siempre fue liso. Por las diversas características encontradas y los análisis de biología molecular realizada, se adscribe a una nueva especie de *Thelephora* aún no descrita.

---

**Figura 5.2 Vista general y detalles morfológicos y anatómicos de la ectomicorriza de *P. ayacahuite* con *Telephora aff. terrestris*. a) Vista general de dos raíces ectomicorrizadas en donde es posible apreciar los tonos café oscuro de las ectomicorrizas ramificadas, con áreas plateado brillantes, escaso micelio externo y ápices redondeados de tonos más claros; b) vista general de una raíz ectomicorrizada ramificada, en donde se aprecian algunas hifas emanantes surgiendo a partir del manto; c) corte transversal de una raíz ectomicorrizada en donde es posible apreciar, las estructuras típicas de una ectomicorriza las cuales incluyen escaso micelio externo, grueso manto y red de Hartig; d) acercamiento a los espacios intersticiales de las células corticales, en donde se aprecia con claridad la red de Hartig, con su característica forma, así como el manto; e) Arreglo superficial de las hifas externas saliendo del manto, con algunas hifas y f) Acercamiento a una fíbulas, estructuras características de Basidiomycetes, y a la ornamentación de las hifas. La imagen a) fue tomada usando microscopía estereoscópica y las imágenes b) a f), fueron tomadas con microscopía electrónica de barrido.**

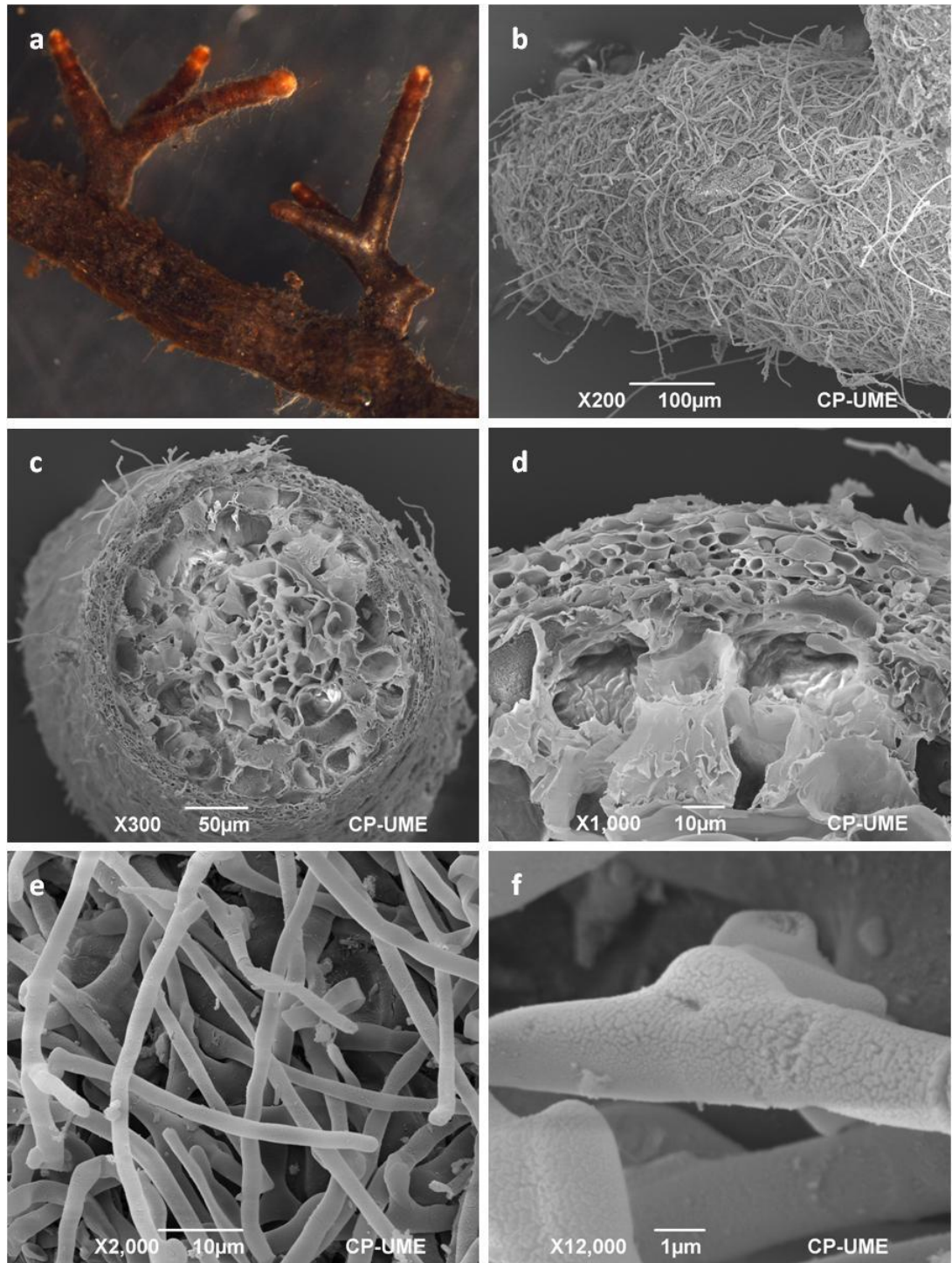


Figura 5.2 Ectomicorriza de *Telephora aff. terrestris* con *P. ayacahuite*. Ver pie de figura en página anterior.

#### 5.4.3 Descripción de la ectomicorriza de *Cenococcum geophilum* con *P. ayacahuite*.

*Cenococcum geophilum* Fr., *Syst. mycol.* (Lundae) **3**(1): 66 (1829).

Sinónimos según *Index Fungorum* (2014):

*Cenococcum geophilum* var. *byssisedum* Fr., *Syst. mycol.* (Lundae) **3** (1): 66 (1829).

*Cenococcum geophilum* var. *geophilum* Fr. *Syst. mycol.* (Lundae) **3** (1): 66 (1829).

*Cenococcum geophilum* var. *xylophilum* Fr. *Syst. mycol.* (Lundae) **3** (1): 66 (1829).

Ectomicorrizas negras en su totalidad, simples, de hasta 5 mm, o en algunas ocasiones con pequeños crecimientos sobre el eje principal, con un diámetro de hasta 0.5 mm, sin rizomorfos. Superficie fibrosa, brillante. Ápices simples rectos, de hasta 2 mm de longitud, con un diámetro de hasta 0.4 mm. Abundantes hifas emanantes de color café oscuro o negro, muy rectas, de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, con paredes engrosadas. Sin fíbulas. Cistidios no observados. Tipo de exploración hifal de distancia corta. Manto plectenquimatoso, con hifas dispuestas radialmente, pigmentadas de color café oscuro a negruzco, células de 8 a 20  $\mu\text{m}$ , con paredes engrosadas, lisas. Superficie del manto algodonosa. Manto de hasta 40  $\mu\text{m}$  de diámetro. Hartig net claramente colonizando una o dos capas de células corticales. Abundantes esclerocios negros, globosos, de 0.5 a 1.5 mm, con la superficie negra, con arreglo de células angulares pseudoparenquitoso, con abundantes células compactas (Fig 5.4 y Fig. 5.5).

El género *Cenococcum* Fr. y la especie *C. geophilum* fueron descritos por primera ocasión en la obra magna de Elias Fries *Sytema Mycologicum* en su volumen 3 en 1829 (Fries 1829) (Fig. 5.3).



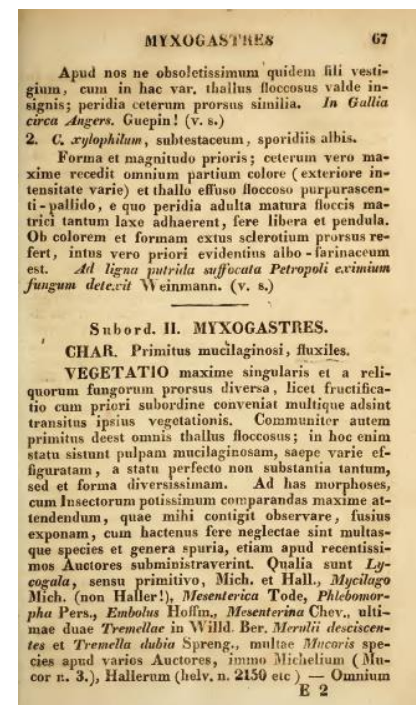
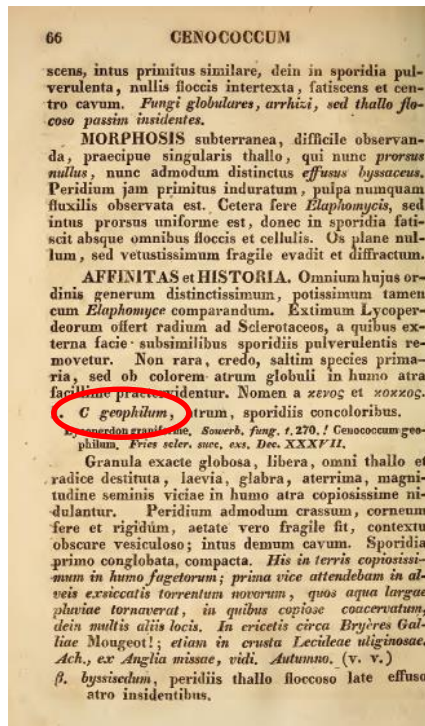
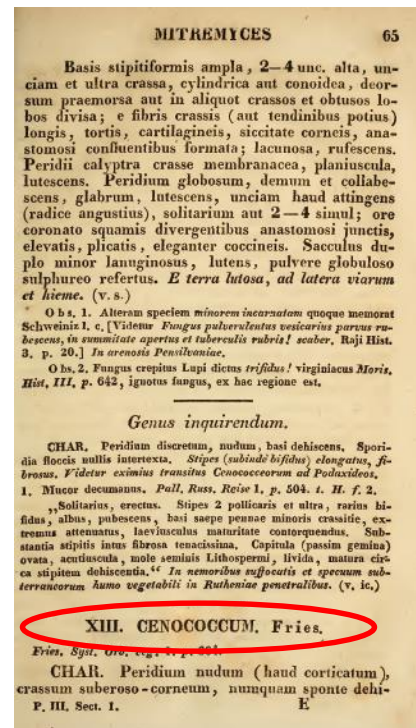
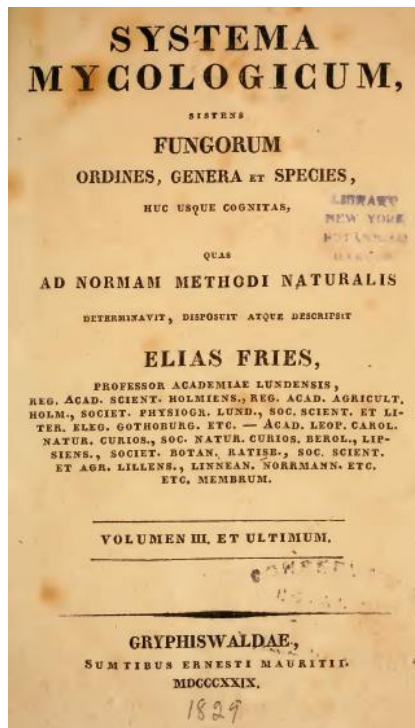


Figura 5.3. Portada de la obra *Systema Mycologicum* de Elias Fries publicada en 1829, en la cual se describe por primera vez el género *Cenococcum* en la páginas 65 y la especie *Cenococcum geophilum* en las páginas 66 y 67.

Las características encontradas en las ectomicorrizas establecidas entre *P. ayacahuite* y *C. geophilum* concuerda por la presentada por Agerer and Rambold (2014). Menge y Gran (1981) describieron ectomicorrizas y esclerocios formadas entre *C. geophilum* y *P. taeda* ligeramente más pequeñas que las descritas en el presente trabajo. Estos autores encontraron que sus ectomicorrizas poseían una longitud de hasta 3 mm, mientras que en las descritas en el presente trabajo éstas alcanzaron hasta 5 mm. Asimismo describieron esclerocios de 0.4 a 1.2 mm de diámetro, mientras que en el caso de los esclerocios encontrados asociados con *P. ayacahuite*, éstos alcanzaron diámetros de hasta 1.5 mm. Ingleby *et al.* (1990), mencionaron que las características diagnósticas de la ectomicorriza de *C. geophilum* son su color negro, sus características hifas emanantes del mismo color, y su manto compuesto por células de paredes engrosadas radialmente arregladas. Las ectomicorrizas encontradas en el presente trabajo en *P. ayacahuite* concuerdan, con la descripción efectuada por de Román y de Miguel (2000) quienes describieron ectomicorrizas de *C. geophilum* con *Q. ilex*, una de las especies de mayor importancia en la truficultura en España, dado que esta especie de encinos se micorriza con *Tuber melanosporum*. La principal diferencia entre las micorrizas descritas por estos últimos autores y las descritas en el presente trabajo es el color de las hifas emanantes, dado que éstos autores describieron que podían ser de color rojo oscuro y en las ectomicorrizas de *P. ayacahuite*, las ectomicorrizas con *C. geophilum* siempre fueron negruzcas o negras.

Las ECM de *C. geophilum* son de color negro, con hifas emanantes delgadas y fuertes, no se conocen sus estructuras de reproducción sexual por esporas, aunque produce hifas vegetativas y abundantes esclerocios. Paradójicamente siendo uno de los hongos ECM mas abundantes, también es uno de los mas pobremente caracterizados filogenética y biológicamente (Spatafora *et al.* 2012). El hongo produce ramificaciones simples o irregulares, con superficie fibrosa brillante, manto

plectenquimatoso con hifas dispuestas en forma radiada correspondiente al tipo G de Agerer (1988). Abundantes hifas de color oscuro a negro, muy rectas y con los tabiques muy marcados, sin fíbulas, sin rizomorfos, sin cistidios; con abundantes esclerocios negros, los cuales no se encuentran directamente unidos a la micorriza (de Román y de Miguel 2000).

*C. geophilum* es un hongo ectomicorrizico con una amplia distribución geográfica y ecológica con uno de los más grandes genomas de los Ascomicetes, con un tamaño estimado de 203 Mpb (Kipfer *et al.* 2010; Bourne *et al.* 2014). *C. geophilum* es un hongo generalista, con un amplio rango de hospederos, incluyendo angiospermas y gimnospermas (Spatafora *et al.* 2012), es con frecuencia una de las especies más dominantes en árboles adultos, dado que es un colonizador competitivo de nuevas raíces, más que otras especies ECM (Herzog *et al.* 2013). Es considerada una especie que beneficia a sus hospederos, especialmente en condiciones ambientales adversas como; i) estrés por la sequia (Cairney y Chambers 1999), la producción de melanina, una clase de polímeros negros complejos que se encuentran en las paredes celulares de hifas y esporas de los hongos, de alto peso molecular y resistente a la descomposición, puede ser una característica rasgo funcional clave de *C. geophilum* para la tolerancia al estrés por agua, reduciendo la porosidad de las paredes de la célula, y bajando entonces la tasa de pérdida de agua de la célula, al menos inicialmente, sobre la reducción del potencial osmótico del suelo o contenido de humedad (Fernandez *et al.* 2013b); ii) pH bajo (Pigott 1982); iii) pH alto (Lehto 1994) y iv) Temperatura ambiente alta. Al respecto se conoce que la temperatura promedio letal del micelio de la mayoría de los hongos en general es de 60 a 80 °C, mientras que la del hongo ECM es de 30 a 40 °C. Sin embargo el conocimiento es escaso para otras formas somáticas o reproductivas de los hongos ECM como por ejemplo los esporas y los esclerocios. Kipfer *et al.* (2010) encontró que *Rhizopogon roseolus* y *C. geophilum* fueron las especies más abundantes después de haber expuesto el suelo de donde procedían a temperaturas



de 60 a 70°C. Más recientemente, Herzog *et al.* (2013) observaron un aumento en el número de las raíces de encino micorrizadas (un tercio de las raíces cortas) con *C. geophilum*, cuando se aumentó la temperatura del aire. Estos aspectos son muy importantes debido a que con el cambio climático que se vive actualmente se prevén aumentos en las temperaturas y en los periodos de sequias en los ecosistemas naturales seguido por una fuerte precipitación (IPCC 2007).

En un estudio llevado a cabo en rizotrones con mantillo forestal se observó que las ECM formadas por *C. geophilum* persistieron de 4 a 10 veces más tiempo y exhibieron contrastantes patrones estacionales de vitalidad comparados con otros hongos ECM. Esto sugiere a la vez que el mantillo resultado de la muerte de *C. geophilum* es relativamente recalcitrante para descomponerse y poder desproporcionalmente influenciar el ciclo biogeoquímico forestal por retardar la tasa en la cual el carbono y los nutrientes son reciclados. La amplia persistencia de las ECM de *C. geophilum* aunada a su baja vitalidad durante la estación de crecimiento, sugieren que una proporción considerable de las ECM de *C. geophilum* en el suelo forestal están muertas y son resistentes a la descomposición. Esta forma recalcitrante puede ser el resultado de la alta deposición de melanina en las paredes celulares de este hongo. La permanencia de las ECM de *C. geophilum* en el ambiente puede significativamente retardar las tasas de los ciclos de C, N y fósforo, por sus ECM recalcitrantes, y por las grandes cantidades de micelio externo y las estructuras de resistencia (esclerocios) que este hongo produce naturalmente (Fernandez *et al.* 2013a).

---

**Figura 5.4 Vista general y detalles morfológicos y anatómicos de la ectomicorriza de *P. ayacahuite* con *Cenococcum geophilum*. a) Vista general de una raíz ectomicorrizada ramificada dicotómicamente en donde es posible apreciar las abundantes hifas emanantes de color negro surgiendo de la superficie de la ectomicorriza y de su base; b) vista general de una raíz ectomicorrizada ramificada, en donde se aprecian las hifas emanantes surgiendo a partir del manto; c) corte transversal de una raíz ectomicorrizada en donde es posible apreciar el manto y red de Hartig; d) acercamiento a los espacios intersticiales de las células corticales, en donde se aprecia la red de Hartig y un manto delgado; e) Acercamiento a las hifas externas saliendo del manto, con una clara ornamentación verrucosa y sin fíbulas; y f) Acercamiento a la clara ornamentación verrucosa de las hifas, donde puede apreciarse que las verrugas tienen un tamaño que va desde 0.3  $\mu\text{m}$  hasta 1  $\mu\text{m}$ . La imagen a) fue tomada usando microscopía estereoscópica y las imágenes b) a f), fueron tomadas con microscopía electrónica de barrido.**

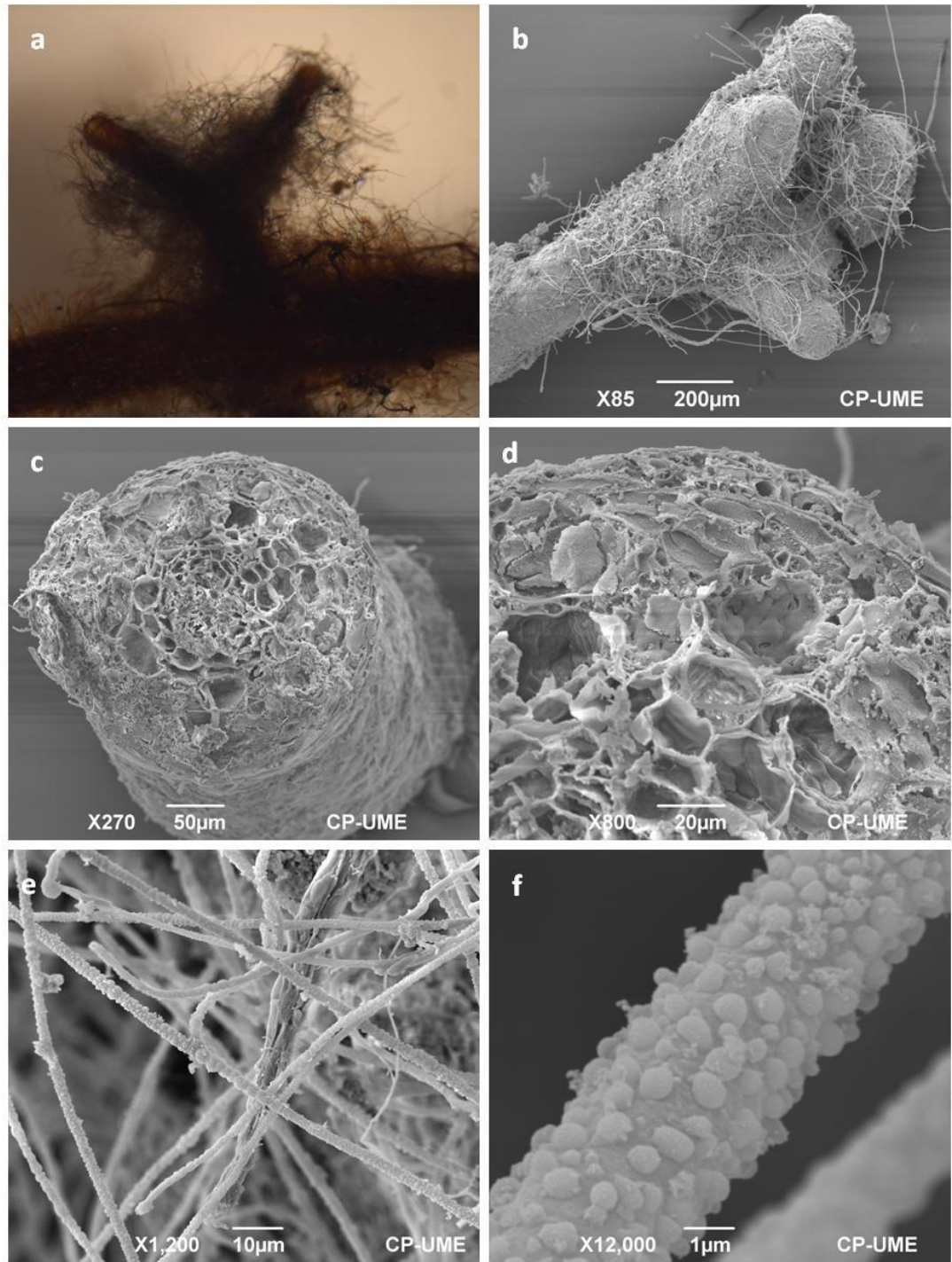


Figura 5.4 Ectomicorriza de *Cenococcum geophilum* con *P. ayacahuite*. Ver pie de figura en página anterior.

---

**Figura 5.5 Vista general y detalles morfológicos y anatómicos de la ectomicorriza de *P. ayacahuite* con *Cenococcum geophilum* y de esclerocios de dicho hongo. a) Vista general de una raíz ectomicorrizada simple ramificada dicotómicamente en donde es posible apreciar las abundantes hifas emanantes de color negro surgiendo de la superficie de la ectomicorriza (a la izquierda) y en la parte superior derecha de la imagen un esclerocio de color negro; b) vista general de un esclerocio negro con su morfología esférica característica, con abundantes hifas de color negro asociadas con él, y algunas partículas de suelo de color café claro; c) Vista general del esclerocio esférico, de superficie lisa con abundantes hifas asociadas con él; d) corte transversal del esclerocio en donde es posible apreciar un acercamiento a la corteza (parte superior de la imagen) y una médula (parte inferior de la imagen) con células de tamaños contrastantes; e) Acercamiento al área de contacto de la corteza y médula del esclerocio; y f) Acercamiento al contenido citoplásmico de las células de la médula del esclerocio y a sus paredes engrosadas las cuales van de 1  $\mu\text{m}$  hasta 2  $\mu\text{m}$ . Las imágenes a) y b) fueron tomada usando microscopía estereoscópica y las imágenes c) a f), fueron tomadas con microscopía electrónica de barrido.**

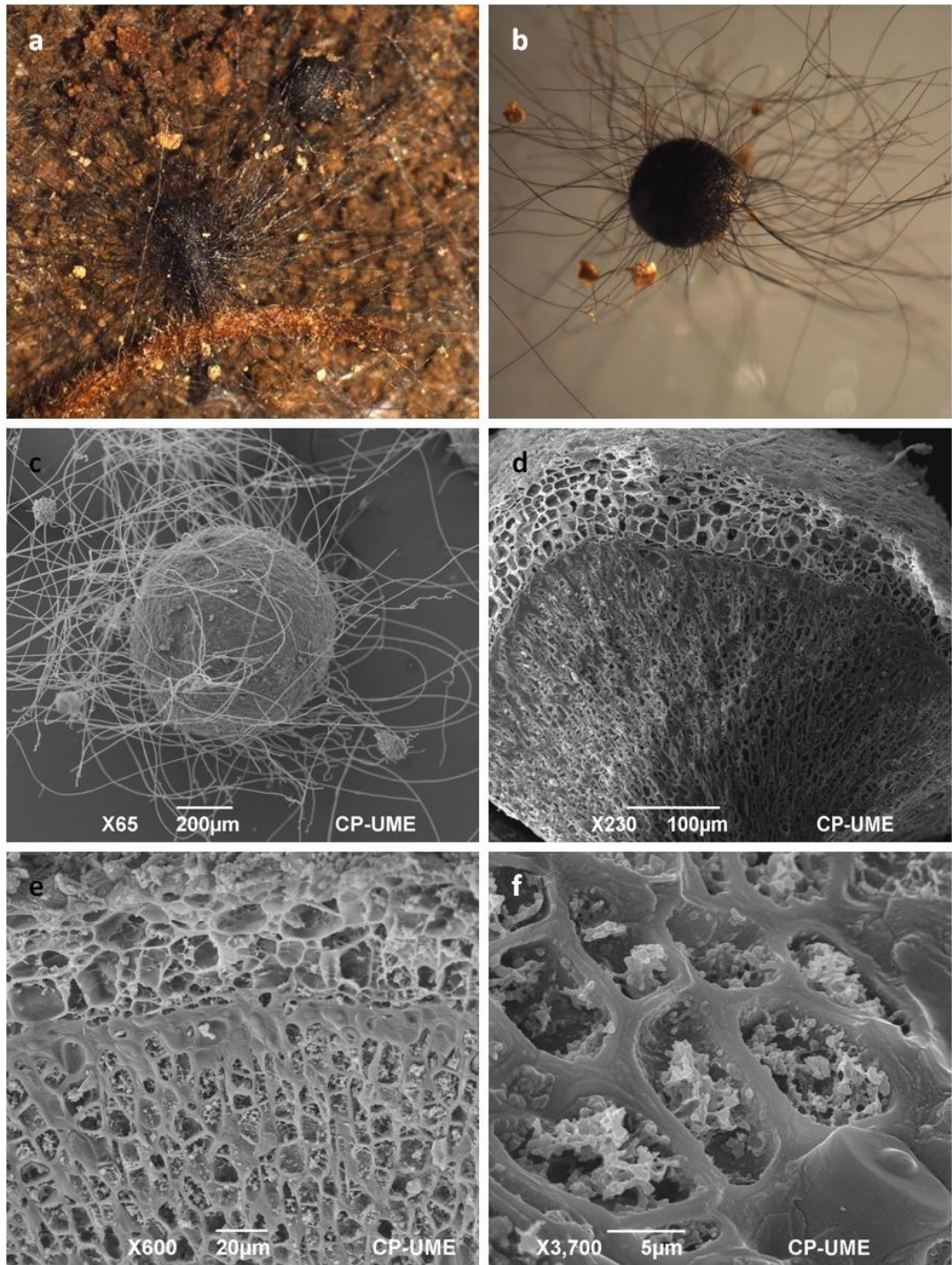


Figura 5.5 Esclerocios de *Cenococcum geophilum* con *P. ayacahuite*. Ver pie de figura en página anterior.



## 5.5 LITERATURA CITADA

- Agerer (1987-1993). Colour atlas of ectomycorrhizae. Einhorn-Verlang Eduard Dietenberger, Schwabisch Gmung, Alemania.
- Agerer R, Weiss M (1989) Studies on Ectomycorrhizae. XX. Mycorrhizae formed by *Thelephora terrestris* on Norway spruce. Mycologia 81: 444-453.
- Agerer, R. and G. Rambold. 2014. DEEMY - An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. München, Germany [<http://www.deemy.de/>] Consultado el 24 de Julio de 2014.
- Bahram M, Polme S, Koljalg U, Tedersoo L (2011) A single European aspen (*Populus tremula*) tree individual may potentially harbour dozens of *Cenococcum geophilum* ITS genotypes and hundreds of species of ectomycorrhizal fungi. FEMS Microbiol.Ecol. 75:313–320
- Barroetaveña C, Bassani V, Rajchenberg M (2012) Inoculación micorrícica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. Bosque 33:163-169.
- Bourne EC, Mina D, Goncalves SC, Loureiro J, Freitas E, Muller LAH (2014) Large and variable genome size unrelated to serpentine adaptation but supportive of cryptic sexuality in *Cenococcum geophilum*. Mycorrhiza 24:13-20
- Boyle H, Zimdars B, Renker C, Buscot F (2006) A molecular phylogeny of Hebeloma species from Europe. Mycological Research 110:369–380
- Carrasco-Hernández V, Pérez-Moreno J, Espinosa-Hernández V, Almaraz-Suárez JJ, Quintero-Lizaola R, Torres-Aquino M (2011) Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. Revista Chilena de Historia Natural 84: 83-96.
- Cheng GL, Li P (2007) Degradation effect of ectomycorrhizal fungi-inoculated *Fraxinus sogdiana* on petroleum hydrocarbon in soil. Chinese Journal of Ecology 26:389-392
- Clarice AO, Sasaki GL, Zancan GT, Iacomini M (2002) Studies on neutral exopolysaccharides produced by the ectomycorrhiza *Thelephora terrestris*. FEMS Microbiology Letters 216:145-149

- Comandini O, Contu M, Rinaldi AC. 2006. An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16: 381-395.
- CONAFOR. *Pinus ayacahuite*  
Ehren <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/953Pinus%20ayacahuite.pdf> Consultado el 17 de julio de 2014.
- Cortés-Pérez A, Gastón G, Ramírez-Guillén F (2014) *Squamanita umbonata* (fungi, agaricales, Tricholomataceae), primer registro en México. *Acta Botanica Mexicana* 108: 105-111.
- de Román M, de Miguel AM (2000) Identificación y descripción de las ectomicorrizas de *Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. en una zona quemada y una zona sin alterar del carrascal de Nazar (Navarra). *Publicaciones de Biología, Universidad de Navarra, Serie Botánica* 13:1-42
- Debaud JC, Pepin R, Bruchet G. 1981. Ultrastructure des ectomycorhizes synthétiques à *Hebeloma alpinum* et *Hebeloma marginatum* de *Dryas octopetala*. *Canadian Journal of Botany* 59: 2160-2166.
- Eberhardt U, Beker HJ, Vila J, Vesterholt, Llimona X, Gadjieva R (2009) *Hebeloma* species associated with *Cistus*. *Mycological Research* 113: 153–162
- Erik A. Lilleskov, Timothy J. Fahey, Thomas R. Horton and Gary M. Lovett. 2002. Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology* 83:104–115.
- Estrada-Martínez E, Guzmán G, Cibrián TD, Ortega PR (2009) Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos comestibles silvestres de mercados regionales y comunidades de la Sierra Nevada (México). *Interciencia* 34:25-33
- Fernandez CW, Koide RT (2013b) The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecology* 6:479-486
- Fernandez CW, McCormack ML, Hill JM, Pritchard SG, Koide RT (2013a) On the persistence of *Cenococcum geophilum* ectomycorrhizas and its implications for forest carbon and nutrient cycles. *Soil Biology Biochemistry* 65:141-143
- Flores R, Díaz G, Honrubia M (2005) Mycorrhizal synthesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. With five Neotropical pine species. *Mycorrhiza* 15:563-570

- Fries, E. 1829. *Systema Mycologicum*, sistens fungorum ordines, genera et species, huc usque cognitae, quas ad normam methodi naturalis determinavit, disposuit atque descripsit., Gryphiswaldiae, Vol. III. ex officina Berlingiana. Lundae. 202 p.
- Garibay-Orijel R, Morales-Marañón E, Domínguez-Gutiérrez, Flores-García A (2013) Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 153-169
- Giltrap J (1982) *Hebeloma* spp. as mycorrhizal associates of birch. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 79:157-160
- Gutiérrez A, Prieto A, Martínez AT (1996) Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. *Carbohydr. Res.* 281:143-145
- Harrington TJ, Mitchell DT. 2002. Characterization of *Dryas octopetala* ectomycorrhizas from limestone karst vegetation, western Ireland. *Canadian Journal of Botany* 80: 970-982.
- Henrici A. 2013. *Squamanita* of Britain and Europe. *Field Mycology* 14: 56-63.
- Herzog C, Peter M, Pritsch K, Günthardt-Goerg MS, Egli S (2013) Drought and air warming affects abundance and exoenzyme profiles of *Cenococcum geophilum* associated with *Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pubescens*. *Plant Biology* 15:230–237
- Hilszczanska D, Oszako T (1999) Influence of laser light on mycelial growth of *Hebeloma mesophaeum* and ectomycorrhizal development on Scots pine. *Mycorrhiza* 8:323-327
- Hilszczanska D, Sierota Z (2006) Persistence of ectomycorrhizas by *Thelephora terrestris* on outplanted Scots pine seedlings. *Acta Mycol.* 41:313-318
- Hryniewicz K, Dabrowska G, Baum Ch, Niedojadlo K, Leinweber P (2012) Interactive and Single Effects of Ectomycorrhiza Formation and *Bacillus cereus* on Metallothionein MT1 Expression and Phytoextraction of Cd and Zn by Willows Water Air Soil Pollut. 223:957–968



- Hryniewicz K, Haug I, Baum Ch (2008) Ectomycorrhizal community structure under willows at former ore mining sites. *European Journal Soil Biology* 44: 37–44
- Index Fungorum. 2014. Database coordinated and supported by The Royal Botanic Gardens Kew and the Institute of Microbiology of the Chinese Academy of Science, with the contributions of over 100 mycologist coordinated by Paul Kirk from CABI (Centre for Agricultural Bioscience International), Reino Unido. [<http://www.indexfungorum.org>] Consultado el 24 de julio de 2014.
- Ingleby K, Mason PA (1996) Ectomycorrhizas of *Thelephora terrestris* formed with *Eucalyptus globulus*. *Mycologia* 88:548-553
- Ingleby K, Mason PA, Last FT, Fleming LV. (1990) Identification of ectomycorrhizas. London, HMSO, 112pp. (ITE research publication, no.5).
- IPCC (2007) Climate change. The physical science basis, contribución of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change [Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (eds)] Cambridge University Press, Cambridge, UK, New York, USA
- Ivory MH (1983) Growth and survival of container-grown *Pinus caribaea* infected with various ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 71:339-344
- Kipfer T, Egli S, Ghazoul J, Moser B, Wohlgemuth T (2010) Susceptibility of ectomycorrhizal fungi to soil heating. *Fungal Biology* 114:467-472.
- Klavina D, Gaitnieks T, Menkis A (2013) Survival, growth and ectomycorrhizal community development of container and bare-root grown *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings outplanted on a forest clear-cut. *Baltic Forestry* 19:39-49
- Krpata D, Peintker U, Langer I, Fitz WJ, Schweiger P (2008). Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. *Mycological Research* 112:1069-1079.
- Lee KJ (1992) A ten-year result of artificial inoculation of pines with ectomycorrhizal fungi, *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris*. *Journal of Korean Forestry Society* 81:156-163

- Lee KJ y Koo CD (1983) Inoculation of pines in a nursery with *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris* in Korea. *Plant and Soil* 71:325-329
- Martínez-Reyes M, Pérez-Moreno J, Villarreal-Ruiz L, Ferrera-Cerrato R, Xoconostle-Cázares B, Vargas-Hernández J, Honrubia-García M (2012) Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. *Rev. Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18:183-192.
- Marx DH, Bryan WC (1970) Pure culture synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on different conifer hosts. *Can. J. Bot.* 48:639-643
- Marx DH, Ross EW (1970) Aseptic synthesis of ectomycorrhizae on *Pinus taeda* by basidiospores of *Thelephora terrestris*. *Can. J. Bot.* 48:197-198.
- Marx DH, Bryan WC, Davey ChB (1970a) Influence of temperature on aseptic synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on loblolly pine. *Forest Sci.* 16:424-431
- Marx DH, Bryan WC, Grand LF (1970b) Colonization, isolation, and cultural descriptions of *Thelephora terrestris* and other ectomycorrhizal fungi of shortleaf pine seedlings grow in fumigated soil. *Can. J. Bot.* 48:207-211
- Matheny PB Griffith GW (2010) Mycoparasitism between *Squamanita paradoxa* and *Cystoderma amianthinum* (Cystodermateae, Agaricales). *Mycoscience* 51:456–461
- Mleczko P (2004) Mycorrhizal and saprobic macrofungi of two Zinc wastes in Southern Poland. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 46: 25–38.
- Mo A, Basu SK, Gyar SD, Goyal A, Bhowmik PK, Datt BS (2009) Proximate composition and functional properties of mushroom flours from *Ganoderma spp.*, *Omphalotus olearius* (DC.) Sing. and *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. used in Nasarawa State, Nigeria. *Mal. J. Nutr.* 15: 233-241
- Mondiet N, Dubois MP, Selosse MA (2007) The enigmatic *Squamanita odorata* (Agaricales, Basidiomycota) is parasitic on *Hebeloma mesophaeum*. *Mycological Research* 111:599-602

- Munive ME, Vázquez CO, Zamora-Campos EM, Fernández PE, García GE (2008) Variación de conos y semillas de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw de dos procedencias del estado de Tlaxcala. *Foresta Veracruzana* 10:39-46
- Musálem MA, Ramírez AL (2003) Monografía de *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw. CONACYT- INIFAP. Libro Técnico No. 6, México, D.F.
- Obase K, Tamai Y, Yajima T, Miyamoto T (2007) Mycorrhizal associations in woody plant species at the Mt. Usu volcano, Japan. *Mycorrhiza* 17:209-215
- Obase K, Tamai Y, Yajima T, Miyamoto T (2009) Mycorrhizal synthesis of four ectomycorrhizal fungi in potted *Populus maximowiczii* seedlings. *Mycoscience* 50:143-145
- Pérez-Moreno J, Lorenzana Fernández A, Medel Ortiz R, Ferrera-Cerrato R, Mata G (2014). Los hongos ectomicorrízicos de México: una perspectiva global. In: Alvarez J, Rodríguez-Guzmán MP, Alarcón A (eds.) Biodiversidad Microbiana de México. Colegio de Postgraduados, Trillas, UNAM, México, D.F. (en prensa).
- Pérez-Moreno J, Read D J (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist* 145:301-309
- Pérez-Moreno J, Read DJ (2001a) Exploitation of pollen by mycorrhizal mycelial systems with special reference to nutrient recycling in boreal forests. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 268:1329–1335.
- Pérez-Moreno J, Read DJ (2001b) Nutrient transfer from soil nematodes to plants: a direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. *Plant Cell. Environ.* 24:1219–1226
- Pérez-Moreno J, Read DJ (2004) Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247
- Perry JPJr, Graham A, Richardson MD (1998) The history of pines in México and Central America. In: Richardson MD (ed) *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press. UK. pp:137-149
- Price HD. 1927. Mushroom poisoning due to *Hebeloma crustuliniforme* report of four cases. *Am. J. Dis. Child.* 34:441-442.

- Ramírez-López I, Villegas RM, Cano-Santana Z (2013) Phenotypic plasticity of the basidiomata of *Thelephora* sp. (Thelephoraceae) in tropical forest habitats. *Rev. Biol. Trop.* 61:343-350
- Read DJ, Pérez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytologist* 157:475-492
- Redhead SA, Ammirati JF, Walker GR, Norvell LL, Puccio MB. 1994. *Squamanita contortipes*, the rosetta stone of a mycoparasitic Agaric genus. *Canadian Journal of Botany* 72: 1812–1824.
- Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW (2008) Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33:1-45.
- Smaill SJ, Walbert K (2013) Fertilizer and fungicide use increases the abundance of less beneficial ectomycorrhizal species in a seedling nursery. *Applied Soil Ecology* 65:60-64.
- Smith AH, Evenson VS, Mitchel DH (1983) The veiled species of *Hebeloma* in the Western United States. University of Michigan Press.
- Smith SE, Read DJ (2008) Mycorrhizal symbiosis, 3rd edn. Academic, San Diego.
- Sousa NR, Franco AR, Oliveira RS, Castro PML (2014) Reclamation of an abandoned burned forest using ectomycorrhizal inoculated *Quercus rubra* *Forest Ecology Management* 320:50-55.
- Spatafora JW, Alisha OC, Douhan GW, Boehm EWA, Schoch CL (2012) Phylogenetic placement of the ectomycorrhizal genus *Cenococcum* in Gloniaceae (Dothideomycetes). *Mycologia* 104:758–765.
- Tibbett M, Sanders FE, Minto SJ, Dowell M, Cairney JWG (1998) Utilization of organic nitrogen by ectomycorrhizal fungi (*Hebeloma* spp.) of arctic and temperate origin. *Mycol. Res.* 102 :1525-1532
- Visser S (1995) Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol.* 129:389-401
- Wang JG, Zheng R, Bai SL, Liu S, Yan W (2012) Responses of ectomycorrhiza to drought stress: A review. *Chinese Journal of Ecology* 31: 1571-1576

## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo constituye uno de los pocos estudios relacionados con la diversidad de hongos ectomicorrízicos asociados con *Pinus ayacahuite* conocido a nivel internacional. Se encontró que esta especie forestal de enorme valor económico y cultural nativa de México, establece claras asociaciones ectomicorrízicas con *Hebeloma mesophaeum s.l.*, *Helvella lacunosa s.l.*, *Thelephora aff. terrestris* y *Cenococcum geophilum*, procedentes de la Sierra Nevada, México. Se describe la morfoanatomía de las ectomicorrizas formadas por estos hongos con las raíces de *P. ayacahuite* después de dos años. Los estudios incluyen una caracterización efectuada con microscopía electrónica. Adicionalmente, se demostró que particularmente la inoculación con *H. mesophaeum s.l.* y *H. lacunosa*, origina conspicuos incrementos en el crecimiento y movilización de macro y micronutrientes en comparación con plantas no inoculadas de *P. ayacahuite*, después de dos años en invernadero. El porcentaje de micorrización de las plantas inoculadas varió de 41 a 59%, dependiendo de la fuente de inóculo. Adicionalmente, existió una alta eficiencia en la translocación de Ca y Fe a la parte aérea de las plantas inoculadas independientemente de la fuente de inóculo. También se encontró que existe un efecto de la procedencia de los genotipos de *P. ayacahuite*, en el efecto benéfico de la micorrización originada por materiales de los horizontes de fermentación y orgánicos de la Sierra Nevada, como fuentes de propagulos ectomicorrízicos, en términos de crecimiento y contenido nutricional.

Los resultados de la presente investigación demuestran que existe un enorme potencial biotecnológico de la utilización tanto de especies

ectomicorrízicas individuales nativas, como del material de los horizontes de fermentación y orgánicos, como fuentes de propágulos ectomicorrízicos, en la producción de plantas de *P. ayacahuite* en vivero en México.