



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGIA

**TRANSFERENCIA NUTRIMENTAL Y
CRECIMIENTO DE PINOS NEOTROPICALES
CON HONGOS COMESTIBLES
ECTOMICORRÍZICOS EN DOS SUSTRATOS**

MA. CONCEPCIÓN RENTERÍA CHÁVEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO 2015

La presente tesis titulada: **Transferencia nutrimental y crecimiento de pinos neotropicales inoculados con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos**, realizada por la alumna **Ma. Concepción Rentería Chávez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESOR



DR. VÍCTOR MANUEL CETINA ALCALÁ

ASESOR



DRA. BEATRIZ XOCONOSTLE CÁZARES


ASESOR



DR. RONALD FERRERA CERRATO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril de 2015

Esta tesis de Maestría 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-Suárez quien se agradece su valioso apoyo.



*"Nadie camina en esta vida sin
haber pisado en falso, nadie
recoge rosa sin sentir sus espinas
y nadie alcanza el éxito sin la
ayuda de dios"*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo en el financiamiento de la maestría.

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

Al Colegio de Postgraduados, por la oportunidad de formarme en el amplio campo de la ciencia.

Doctor Jesús Pérez Moreno, el tiempo transcurre muy rápidamente, pero descubres que no solo hay conocimiento, sino también hay lazos de amistad y personas de gran calidad humana. Gracias por brindarme todos estos valiosos detalles que me llevaron a la culminación del presente trabajo. Porque si no fuera por su valioso tiempo que día tras día me dedicaba no hubiera podido llegar hasta aquí, por esas palabras de aliento las que siempre me decía, porque solo bastaba entrar a su oficina para salir con una actitud positiva, por estar ahí siempre cuando lo necesitaba, por sus palabras de aliento que me daba fortaleza y fuerzas para poder seguir en este proceso. De todo corazón mil gracias.

Doctor Manuel Cetina Alcalá, quien con sus valiosos conocimientos, enseñanzas y asesoría, los que han aportado grandes beneficios para la realización de este trabajo, además de su amistad que hacen de la vida un sabor especial y una experiencia enriquecedora en cada vivencia. Por ser ante todo un amigo antes que un Dr. mil gracias.

Doctora Beatriz Xocnostle Cazares, Gracias por confiar en mí sin conocerme, por su apoyo incondicional y por ser parte de esta gran experiencia de mi vida.

Doctor Ronald Ferrera- Cerrato, Gracias por haberme brindado Sus conocimientos y por permitirme ser parte del área de Microbiología. Por qué el trabajo en equipo es un esfuerzo grupal queda como resultado un desempeño que es superior a la suma de aportaciones individuales y eso lo aprendí aquí Gracias

Doctor Juan José Almaraz Suarez, por apoyarme siempre en mis salidas de campo, sin pedir nada cambio y por aclarar mis dudas, mis inquietudes por eso y por otras cosas más mil gracias.

Doctor Alejandro Alarcón, por brindarme su amistad en el transcurso de mi investigación.

Maestra María Encarnación, por su amistad brindada en estos últimos dos años,

Al personal del Laboratorio de Fijación, por apoyarme siempre con el material que necesitaba.

Al personal del vivero Forestal: Maximino Juárez Zarate, porque siempre cuando necesitaba de su ayuda ahí estaba para ayudarme.

Mis más sinceros agradecimientos a estas cinco personitas por todo el apoyo y esfuerzo que me brindaron día, tras día, aun teniendo la responsabilidad de secretaria, siempre me dedicaron tiempo y mucha paciencia, pues sin ustedes no sería posible este logro, por esto y otras cosas más, cada una de ustedes formaran siempre parte de mi vida. Monserrat, Laura Bolaños, Remedios Sánchez, Ma. Del Rosario Galicia y Jaqueline.

Amigos, Y no me puedo ir sin antes decirles, que sin ustedes a mi lado no lo hubiera logrado, tantas desveladas sirvieron de algo y aquí está el fruto. Les agradezco a todos con todo mi corazón el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables como también momentos tristes, pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Yazmin Pérez, Lucio, Azareel, Faustino, Brigsania, Dra: Magdalena, Violeta, Heidi Itzel y Deysi.

DEDICATORIA

A dios, Primero que nada quiero agradecerle, quien me ha dado la vida y todo lo que soy, al que supo guiarme por el buen camino, darme fuerza para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

Con todo mi cariño y amor para dos personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes "**MIS PADRES**", gracias por siempre corregir mis faltas y celebrar mis triunfos. A ustedes que con su amor y enseñanza han sembrado las virtudes que se necesitan para vivir con anhelo y felicidad.

Como las ramas de un árbol crecemos en diferentes direcciones pero nuestra raíz es una sola. Ustedes me han hecho reír y llorar, hemos compartidos momentos inolvidables y hemos peleado como perros y gatos, con ellas aprendí a mentir y a decir la verdad. Quiero agradecerles por estar siempre conmigo y creer en mí, por recibir su apoyo y sus consejos, en todo momento gracias por ser quienes son. **A mis Hermanas.**

A mi esposo Juan Alfonso Villegas Olivera, Por su apoyo constante y amor incondicional ha sido amigo y compañero inseparable, calma y consejo en todo momento. Por acompañarme en este proceso, porque siempre encontraba una sonrisa que calmaba mi cansancio, por tus brazos que me consolaban cuando sentía que todo iba mal, gracias a esto, hoy hemos alcanzado un triunfo más porque los dos somos uno y mis logros son tuyos. Te amo.

A mi abuelita, gracias por llevarme en tus oraciones porque estoy segura que siempre lo haces, gracias por estar a mi lado siempre que te he necesitado, por darme tus sabios consejos en el momento oportuno, gracias por ser la persona más bella con la que me he encontrado, ella que ha conocido la derrota, conocido el sufrimiento, conocido la lucha, conocido la pérdida, y ha encontrado la forma de salir de esas profundidades. Esa persona tiene una apreciación, una sensibilidad y una comprensión de la vida, que la llena de compasión y humildad, gracias por tanto amor.

Doctora cristina Arteaga, quiero agradecer sinceramente a esta persona, que es mi Madrina, amiga y compañera, ella que siempre estuvo apoyándome con sus valiosos consejos y al pendiente de mis enfermedades, mil gracias por estar siempre a mi lado cuando yo más la necesitaba. T.K.M.

**TRANSFERENCIA NUTRIMENTAL Y CRECIMIENTO DE PINOS
NEOTROPICALES CON HONGOS COMESTIBLES
ECTOMICORRÍZICOS EN DOS SUSTRATOS**

Ma. Concepción Rentería Chávez

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

La ectomicorriza es una simbiosis mutualista de enorme importancia en la producción de árboles de interés forestal. Uno de los criterios de selección de los hongos empleados de gran interés actualmente, es su comestibilidad, por la importancia económica, ecológica y cultural de los hongos comestibles ectomicorrízicos (HCE) como un producto forestal no maderable. Se evaluó el efecto de la inoculación con 3 HCE, ampliamente comercializados en México, en el crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii*, crecido en un sustrato experimental, y un sustrato comercial enriquecido con un fertilizante de liberación lenta. Dos años después de la siembra, se observaron conspicuas diferencias en altura, biomasa aérea y radical y contenido de macro y micronutrientes entre plantas inoculadas y no inoculadas, independientemente de la especie fúngica y del sustrato. A pesar de que plantas crecidas en sustrato comercial, tuvieron mayor crecimiento y contenido nutrimental, sus porcentajes de colonización fueron conspicuamente menores que plantas crecidas en sustrato experimental. Existieron evidentes diferencias en la transferencia nutrimental a la parte aérea de los pinos inoculados, entre las especies fúngicas. La transferencia de Ca por *Laccaria laccata*; de Na por *L. bicolor* y de Mn por *Hebeloma leucosarx* registradas en el sustrato experimental; constituyen uno de los pocos reportes conocidos de transferencia de dichos nutrientes en gimnospermas por HCE. Se demuestra que la selección de sustratos, constituye un factor clave en la producción de plantas ectomicorrizadas y que las 3 especies de HCE evaluados tienen un enorme potencial en la producción de *P. greggii*. Adicionalmente se efectuaron bioensayos iniciales con *Pinus patula* y *P. ayacahuite*.

Palabras clave: hongos comestibles ectomicorrízicos, biotecnología forestal, transferencia nutrimental, sodio, calcio, magnesio.

NUTRIENT TRANSFER AND GROWTH OF NEOTROPICAL PINES WITH EDIBLE ECTOMYCORRHIZAL MUSHROOMS IN TWO SUBSTRATES

Ma. Concepción Rentería Chávez

Colegio de Postgraduados, 2015

Abstract

The ectomycorrhiza is a mutualistic symbiosis of paramount importance in the production of trees with importance in forestry. Currently, one the selection criteria of ectomycorrhizal fungi of great importance is their edibility, due to the economic, ecologic and cultural relevance of the edible ectomycorrhizal mushrooms (EEM) as a non-timber forest product. The effect of the inoculation with 3 EEM, widely sold in Mexico, on the growth and nutrient contents of *Pinus greggii*, grown in an experimental substrate and a commercial substrate enriched with a slow-release fertilizer, was evaluated. Two years after sowing, conspicuous differences in terms of height, shoot and root biomass and macro and micronutrient contents between inoculated and non-inoculated plants, were recorded, independently of the fungal species and the substrate. Despite the fact that plants grown in commercial substrate had higher growth and nutrient contents, their ectomycorrhizal colonization percentages were conspicuously smaller than those of plants grown in experimental substrate. Evident differences in the nutrient transfer to the inoculated plant shoots among the evaluated fungal species were recorded. Ca mobilization by *Laccaria bicolor*, Na by *L. bicolor* and Mn by *Hebeloma leucosarx* recorded in the plants growing in experimental substrate, constitute one of the few known reports of transference of these nutrients in gymnosperms by EEM. It is demonstrated that the selection of substrates, constitutes an important factor in the production of ectomycorrhizal plants and that the 3 evaluated species of EEM have an enormous potential in the production of *P. greggii*. Additionally, some preliminary bioassays with *Pinus patula* and *Pinus ayacahuite* were carried out.

Keywords: edible ectomycorrhizal mushrooms, biotechnological forestry, nutrient transfer, sodium, calcium, magnesium.

CONTENIDO	
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
INDICE DE CUADROS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	vi
CAPÍTULO I	1
1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.2. LITERATURA CITADA	3
CAPITULO II	5
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	5
2.1 Objetivo General.....	5
2.1.1 Objetivos Específicos	5
2.2 Hipótesis particulares	6
CAPITULO III	7
REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
3.1. Descripción de la especie <i>Pinus greggii</i>	7
3.1.2 Distribución y ecología.....	7
3.1.3 Importancia	8
3.2. Descripción de la especie <i>Pinus patula</i>	9
3.2.1. Distribución y ecología.....	10
3.3. Descripción de la especie <i>Pinus ayacahuite</i>	11
3.3.1 Distribución y ecología.....	11
3.3.2 Importancia	11
3.4. Hongos ectomicorrízicos comestibles de México	12
3.5. Producción de inoculantes de hongos ectomicorrízicos.....	13
3.5.1 Tierra de monte o mantillo	15
3.5.2 Inoculo esporal	16
3.5.3. Inóculo miceliar (Micelio vegetativo)	16
3.6 Sustratos utilizado en hongos ectomicorrízicos	17
3.7. BIBLIOGRAFIA	18
CAPITULO IV	25

4.1. RESUMEN.....	25
4.1.1. Abstract	26
4.2. INTRODUCCIÓN	27
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.3.1. Material vegetal y fúngico.....	29
4.3.2. Preparación de inóculo e inoculación de plantas	29
4.3.3. Diseño experimental.....	30
4.3.4. Evaluación de variables.....	30
4.3.5. Análisis estadístico.....	31
4.4. RESULTADOS.....	31
4.4.1. Altura, diámetro del tallo y peso seco	31
4.4.2. Colonización micorrízica	32
4.4.3. Contenido nutrimental.....	32
4.4.4. Relaciones nutrimentales parte aérea: raíz	35
4.5. DISCUSIÓN	47
4.6. BIBLIOGRAFÍA	51
CAPITULO V	58
CONCLUSIONES GENERALES	58
ANEXO 1. Inoculación de <i>Pinus greggii</i> con <i>Laccaria proxima</i> y suelo agrícola con uso forestal previo utilizando un sustrato comercial.	59
ANEXO 2. Evaluación de <i>P. patula</i> y <i>P. ayacahuite</i> inoculados con suelo de plantaciones forestales de las mismas especies y suelo agrícola con uso forestal previo..	66

INDICE DE CUADROS

	Página
Tabla 1. Peso seco de parte aérea y parte radical de <i>Pinus greggii</i> , de 24 meses de edad inoculadas o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “comercial” y “sustrato experimental”. Ver composición de sustrato en materiales y métodos.	41
Tabla 2. Contenido de macronutrientes de plantas de <i>Pinus greggii</i> , de 36 meses de edad inoculadas o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “experimental” (ver composición de sustrato en materiales y métodos).	42
Tabla 3. Contenido de macronutrientes de plantas de <i>Pinus greggii</i> , de 24 meses de edad inoculados o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “comercial” (ver composición de sustrato en materiales y métodos).	43
Tabla 4. Contenido de micronutrientes de plantas de <i>Pinus greggii</i> , de 24 meses de edad inoculadas o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “experimental” (ver en composición de sustrato en materiales y métodos).	44
Tabla 5. Contenido de micronutrientes de plantas de <i>Pinus greggii</i> , de 24 meses de edad inoculados o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “comercial” (ver en composición de sustrato en materiales y métodos).	45
Tabla: 6. Relaciones parte aérea: raíz de macronutrientes y micronutrientes de <i>Pinus greggii</i> , de 24 meses de edad inoculados o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “experimental” y un sustrato “comercial” (ver en composición de sustrato en materiales y métodos).	46

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema diagnóstico de una rama y semillas de <i>Pinus greggii</i> .	9
Figura 2. Aspecto de un esporoma maduro de un hongo, de la forma más conocida, se muestra detalle del píleo (sombrero) y del sitio de corte del píe o estípite. El píleo se deshidrató y se molió para ser utilizados como fuente de inóculo de plantas en vivero.	36
Figura 2. Aspectos generales del bioensayo. a) Venta de hongos ectomicorrízicos comestibles <i>Laccaria</i> spp. y <i>Hebeloma leucosarx</i> en el mercado de Ozumba, México; b) Preparación de inóculo en un deshidratador; c) y d) Efecto de la inoculación ectomicorrízica con <i>H. leucosarx</i> (Hl), <i>L. bicolor</i> (Lb) y <i>L.laccata</i> (Ll) en comparación con plantas testigo (T) no inoculadas crecidas en (c) sustrato experimental y (d) sustrato comercial; e) y f) ectomicorriza de <i>L. bicolor</i> mostrando en (e) micromorfología de los morfotipos con textura gelatinosa y en (f) manto (m), red de Hartig (rH) y micelio externo (me); g) y h) ectomicorriza de <i>H. leucosarx</i> mostrando en (g) abundantes hifas emanantes (he) y en (h) micelio externo (me), manto (m) y red de Hartig (rH).	36
Figura 3. Porcentaje de colonización de plantas de <i>Pinus greggii</i> , inoculadas o no, con 3 hongos comestibles ectomicorrízicos, 12 y 24 meses después del trasplante a los contenedores de 5 kg. Hl= <i>Hebeloma leucosarx</i> ; Lb= <i>Laccaria bicolor</i> y Ll= <i>Laccaria laccata</i> . Barras con la misma letra para cada fecha en cada tratamiento, son iguales de acuerdo con Tukey ($P \leq 0.05$). Los valores son promedios \pm error estándar de la media (n=3).	38
Figura 4. Altura de plantas de <i>Pinus greggii</i> , inoculadas o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos, en dos tipos de sustratos 24 meses después de la siembra a los contenedores de 5kg. Plantas inoculadas con (a) <i>Hebeloma leucosarx</i> ; (b) <i>Laccaria bicolor</i> ; (c) <i>Laccaria laccata</i> y (d) Plantas sin inocular. Para la composición de los sustratos “comercial” y “colpos” ver la sección de materiales y métodos. Valores con la misma letra para cada fecha son iguales según la prueba de comparación de medias de Tukey ($p=0.05$). Los valores son promedios de \pm error estándar de la media (n=3).	39
Figura 5. Diámetro del tallo de plantas de <i>Pinus greggii</i> , inoculadas o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en dos tipos de sustratos 360 días después del trasplante a los contenedores	

de 5kg. Plantas inoculadas con (a) *Hebeloma leucosarx* (b) *Laccaria bicolor*; (c) *Laccaria laccata* y (d) Plantas sin inocular. Valores con la misma letra para cada fecha son iguales según la prueba de comparación de medias de Tukey ($p=0.05$). Los valores son promedios de \pm error estándar de la media ($n=3$) 40

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

El país cuenta con alrededor de 47 especies de pinos, 3 subespecies y 22 variedades, aproximadamente 55% de dichas taxa se consideran endémicos y se ha calculado que el país cuenta con 42% de las especies existentes a nivel mundial (Sánchez-González, 2008). *Pinus greggii* Engelm, es una especie endémica de México con gran importancia ecológica y económica. Este pino se distribuye en poblaciones aisladas a lo largo de la Sierra Madre Oriental, en zonas semiáridas y a veces semitropicales (Donahue y López-Upton, 1999). Por otro lado, a nivel regional, *P. greggii* es uno de los árboles de mayor valor económico para las poblaciones humanas que habitan en zonas aledañas. Se aprovecha para la obtención de madera para la industria del aserrío, y localmente en la obtención de postes para cerca y leña combustible. Además, *P. greggii* ha mostrado altas tasas de crecimiento en altura y diámetro en ensayos de plantaciones (López *et al.*, 1999; Salazar *et al.*, 1999; Azamar *et al.*, 2000). Otras de las especies de pino con gran importancia es *Pinus patula* Schl. *et Cham.*, la cual es una especie mexicana de rápido crecimiento que en las últimas décadas ha obtenido un importante reconocimiento, convirtiéndose en la especie de pino tropical mexicano más plantada en el mundo. Países como Swazilandia, Rodesia, Madagascar, Angola y Malawi tienen plantado *P. patula* en más de 60% de su superficie destinada a plantaciones forestales (Dvorak *et al.*, 2002). En México, se estima que de las 256 000 ha destinadas a plantaciones forestales comerciales, 15% corresponde a plantaciones de *Pinus patula*. Dentro de la diversidad 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 (Musalem y Ramírez, 2003). Todas estas especies arbóreas requieren de manera obligada de una asociación mutualista que se establece entre hongo y raíces de los árboles para poder sobrevivir, denominada ectomicorriza. Desde el punto de vista biológico se puede definir a las micorrizas como

asociaciones mutualistas entre ciertos hongos y las raíces de las plantas, en la que ambos miembros de la asociación se benefician y participan activamente en el transporte y absorción de nutrientes, influyendo tanto en la estructura como en la estabilidad de las comunidades vegetales (Bolan 1991; Maldonado y Ramirez 1997, Miyasaka y Habte, 2001). Los hongos ectomicorrízicos son conocidos para formar relaciones simbióticas con especies de pinos (Nieto y Carbone, 2009; Pera y Alvarez, 1995). Sin embargo, la asociación ectomicorrízica, al inicio del establecimiento de la simbiosis es altamente demandante de carbohidratos cuando se produce la colonización (Conjeaud *et al.*, 1996). Por otra parte, las prácticas de fertilización puede tener diferentes efectos en la colonización ectomicorrízica, los cuales en algunas ocasiones pueden ser negativos (Rincón *et al.*, 2007), y en otras ocasiones mejorar las asociaciones micorrízicas que originan beneficios para la planta, (Liu *et al.*, 2008). Por otro lado, en algunas ocasiones inhiben la colonización (Castellano y Molina, 1989; Vaario *et al.*, 2009). Otros estudios también han demostrado que la fertilización no afecta a la formación de ECM (Castellano y Molina, 1989; Conjeaud *et al.*, 1996; Rincón *et al.*, 2007). Los fertilizantes se utilizan a menudo en los viveros ya que mejoran la germinación y crecimiento de las raíces y el desarrollo (Rincón *et al.*, 2007; Walker, 2001). Por lo que resulta de interés estudiar como la fertilización química afecta la colonización ectomicorrízica. Este aspecto ha sido poco estudiado en hongos ectomicorrízicos mexicanos, tales como *Laccaria laccata*, *L. bicolor* y *Hebeloma leucosarx*. Por esta razón se planteó el presente estudio en donde se evaluó la influencia de la inoculación con estos 3 hongos en *Pinus greggii*, crecidos en dos sustratos, uno sin fertilización química y otro con adición de un fertilizante de liberación lenta durante 24 meses. Adicionalmente, existen pocos estudios de la influencia de la micorrización en la movilización de micronutrientes a la parte aérea y raíz de sus árboles hospderos asociados. Finalmente, se iniciaron estudios de micorrización con otros dos pinos mexicanos: *Pinus patula* y *P. ayacahuite* inoculados con suelos de plantaciones forestales o de suelos agrícolas previamente con uso forestal, procedentes de la Sierra Nevada.

1.2 LITERATURA CITADA

1. Azamar, O. M., J. López U., J. J. Vargas H., y A. Plancarte B. 2000. Evaluación de un ensayo de procedencias-progenies de *Pinus greggii* y su conversión a huerto semillero. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Reforestación. Programa Nacional de Reforestación-Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. p. 7.
2. Bolan, N. S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Journal Plant and Soil* 134: 189-207
3. Castellano, M. A., Molina, R. 1989. Mycorrhizae. In: Landis, T.D., Tinus, R.W., McDonald, S.E., Barnett, J.P. (Eds.), *The Biological Component: Nursery Pests and Mycorrhizae. The Container Tree Nursery Manual. Agric. Handbk. U.S.D.A. For. Serv., Washington D.C.* p. 101-167.
4. Conjeaud, C., Scheromm, P., Moussain, D. 1996. Effects of phosphorus and ectomycorrhiza on maritime pine seedlings (*Pinus pinaster*). *New Phytol.* p. 345-351.
5. Donahue, J., López-Upton, J. 1999. Geographic variation in leaf, cone and seed morphology of *Pinus greggii* Engelm. In native forest. *For. Ecol. Manag.* 82: 145- 157.
6. Dvorak, W, S, J, E. Kietzka, J. K. Donahue, G. R. Hodge y T. K. Stanger. 2000. *Pinus greggii*. In: *Conservation & Testing of Tropical & Subtropical Forest Tree Species by the CAMCORE Cooperative. Central America & Mexico Coniferous Resources Cooperative, North Carolina State University, Raleigh, NC.* pp. 52-73.
7. Dvorak, W. S. 2002. Central America and Mexico Coniferous Resources Cooperative (CAMCORE). Department of Forestry, North Carolina State University. In: *Vozzo, A, J. Tropical tree seed manual. Part II—Species Descriptions.* p. 615-617.
8. Liu, Q., Loganathan, P., Hedley, M. J., Grace, L. J. 2008. Effect of mycorrhizal inoculation on rhizosphere properties, phosphorus uptake and growth of pine seedlings treated with and without a phosphate rock fertilizer. *J. Plant Nutr.* 31, p. 137-156.
9. López, A., J., L., J. Vargas H., C. Ramírez H. y J. López, U. 1999. Variación intraespecífica en el patrón de crecimiento del brote terminal de *Pinus greggii* Engelm. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 5(2): 133-140.

10. Maldonado, J., M, Ramírez, G., A. 1997. Efecto de la inoculación con hongos micorrizogenos en almacigos de cafe (*Coffea arabiga*) variedad Colombia. Tesis Ingeniero Agronomo. Medellin, Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. p. 3-83.
11. Miyasaka, S., Habte., M.. 2001. Plant mechanisms and mycorrhizal symbiosis to increase phosphorus uptake efficiency. *Soil Science Plant Anal.* 32: 1101-1147.
12. Musálem, M., A., Ramírez, L., A. 2003. Monografía de *Pinus ayacahuite var. veitchii* Shaw. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, Agícolas y pecuarias, Chapingo Estado de México.
13. Nieto, M., P., Carbone, S., S. 2009. Characterization of juvenile maritime pine (*Pinus pinaster Ait.*) ectomycorrhizal fungal community using morphotyping, direct sequencing and fruitbodies sampling. *Mycorrhiza* 19, 91e98.
14. Pera, J., Álvarez, I., F. 1995. Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinaster*. *Mycorrhiza* 5, p. 193-200.
15. Rincón, A., Parladé, J., Pera, J. 2007. Influence of the fertilisation method in controlled ectomycorrhizal inoculation of two Mediterranean pines. *Ann. For. Sci.* 64, p. 577-583.
16. Salazar G., G., J., J., J. Vargas H., J. Jasso M., J. D. Molina G., C. Ramírez H. y J. López U. 1999. Variación en el patrón de crecimiento en altura de cuatro especies de *Pinus* en edades tempranas. *Madera y Bosques* 5(2): 19-34.
17. Sánchez–González, A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera Bosques.* 14:107-120
18. Vaario, L., Tervonen, A., Haukioja, K., Haukioja, M., Pennanen, T., Timonen, S. 2009. The effect of nursery substrate and fertilization on the growth and ectomycorrhizal status of containerized and outplanted seedlings of *Picea abies*. *Can. J. For. Res.* 39, p. 64-75.
19. Walker, R., F. 2001. Growth and nutritional responses of containerized sugar and Jeffrey pine seedlings to controlled release fertilization and induced mycorrhization. *For. Ecol. Manage.* 149, p. 163-179.

CAPITULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General

- Estudiar el efecto de la inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* en el crecimiento, contenido nutrimental y colonización de pinos Neotropicales con dos tipos de sustrato.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de inoculación de 3 especies de hongos ectomicorrízicos (*Hebeloma leucosarx*, *Laccaria laccata* y *Laccaria bicolor*) en el crecimiento de parte área y colonización en *Pinus greggii* crecidos en 2 tipos de sustratos.
- Evaluar el efecto de inoculación de 3 especies de hongos ectomicorrízicos (*Hebeloma leucosarx*, *Laccaria laccata* y *Laccaria bicolor*) en el contenido nutrimental de *Pinus greggii*, crecidos en 2 sustratos.
- Evaluar la colonización ectomicorrízica en plantas crecidas en un sustrato con adición de fertilizante químico en comparación con plantas crecidas en sustrato sin fertilización.

2.2 Hipótesis particulares

- La inoculación con los hongos ectomicorrízicos comestibles *Hebeloma leucosarx*, *Laccaria laccata* y *L.bicolor* origina un mayor de crecimiento de parte aérea y raíz de *Pinus greggi*, en comparación con plantas no inoculadas.
- La inoculación con los hongos ectomicorrízicos comestibles *Hebeloma leucosarx*, *Laccaria laccata* y *L.bicolor* origina un mayor de contenido de macro (N, P, K, Ca y Mg) y micronutrientes (Cu, Zn, Mn, Fe y Na).
- La colonización ectomicorrízica es mayor en plantas crecidas en sustrato sin adición de fertilizante químico, en comparación con plantas crecidas en sustrato sin fertilización química.

CAPITULO III

REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Descripción de *Pinus greggii*

Pinus greggii Engelm, es una especie endémica de México con gran importancia ecológica y económica. Este pino se distribuye en poblaciones aisladas a lo largo de la Sierra Madre Oriental, en zonas semiáridas y a veces semitropicales (Donahue y López-Upton, 1999). Es un árbol de 10 a 15 m de altura. En algunos lugares se le ha encontrado de 20 m con 40 cm de diámetro en el tronco y copa amplia e irregularmente redonda (Eguiluz, 1978). En áreas donde las condiciones ecológicas y ambientales favorecen a la especie alcanza una altura de hasta 25 m (Perry, 1991). Por otro lado, a nivel regional, *P. greggii* es uno de los árboles de mayor valor económico para las poblaciones humanas que habitan en zonas aledañas. Se aprovecha para la obtención de madera para la industria del aserrío, y localmente en la obtención de postes para cerca y leña combustible. Además, *P. greggii* ha mostrado altas tasas de crecimiento en altura y diámetro en ensayos de plantaciones (López *et al.*, 1999; Salazar *et al.*, 1999; Azamar *et al.*, 2000), así como un gran potencial para adaptarse a condiciones limitantes de humedad (Vargas and Muñoz, 1988, 1991; López and Muñoz, 1991). Estas características favorecen el uso de *P. greggii* en programas de reforestación para la recuperación de suelos degradados en diferentes partes de México y en programas de plantaciones comerciales en sitios marginales donde no se adaptan otras especies de *Pinus*. En México, es la cuarta especie de pino en términos de importancia en plantaciones del Programa Nacional de Reforestación (Dvorak and Donahue, 1993; Dvorak *et al.*, 1996).

3.1.2 Distribución y ecología

Se distribuye en la Sierra Madre Oriental en el Centro y Norte de México. En el Norte se encuentra en altitudes de 2,300 a 2,800 msnm (Dvorak *et al.*, 2000), mientras que en el centro del país se encuentran en altitudes que van de 1,200 a 2,800 (Hernández, 2003). Las coordenadas geográficas para el área de

distribución de las poblaciones del centro y norte del país se encuentran entre 20° 00' a 25° 40' de Latitud Norte y 97° 40' a 101° 20' de longitud Oeste (Eguiluz, 1978), y comprende los estados de, Coahuila, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, Puebla, San Luis Potosí y Veracruz. Se reportan dos variedades de *Pinus greggii*, la variedad *australis* que se encuentra en el Centro-Este de México, y la variedad *greggii* representa la población localizada en el Norte del país en los estado de Coahuila y Nuevo León (Dvorak, *et al.*, 2000; Martínez, 1948; Perry, 1991).

3.1.3 Importancia

Es una especie que ha logrado importancia a nivel nacional e internacional en países como Brasil, Chile, Colombia, México, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Zimbawe (Dvorak *et al.*, 2000). Actualmente se considera importante por su plasticidad genética para adaptarse en suelos pobres, erosionados, con poca profundidad y materia orgánica, por lo que se ha recomendado su uso en programas de protección, recuperación de cuencas hidrológicas y áreas degradadas, debido a que muestra adaptación al igual que rápido crecimiento en terrenos con tales condiciones. Ha demostrado tolerancia a sequía así como resistencia a ciertas plagas y enfermedades forestales; además tiene gran potencial para usarse en programas de mejoramiento genético dado, que presenta floración precoz, producción de abundante semilla a temprana edad y rápido crecimiento (INIFAP, 2003). Se le ha encontrado otros beneficios como producción de árboles de Navidad (Prieto and Merlín, 2000).

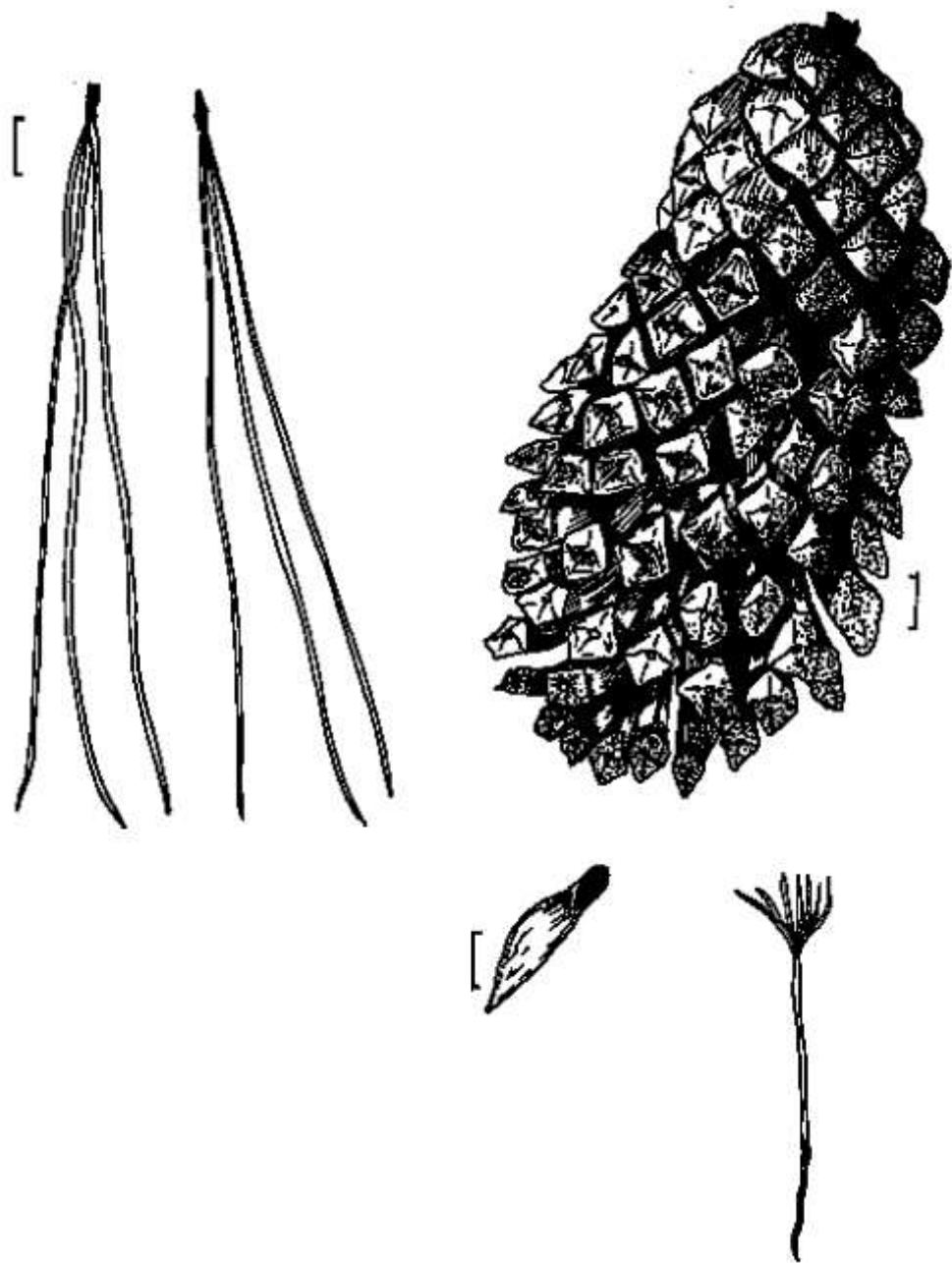


Figura 1. Esquema diagnóstico de una rama y semillas de *Pinus greggii* (Fuente: Dvorak, 2002).

3.2. Descripción de *Pinus patula*

Pinus patula Schl. et Cham. es una especie mexicana de rápido crecimiento que en las últimas décadas ha obtenido un importante reconocimiento, convirtiéndose en la especie de pino tropical mexicano más plantada en el

mundo. Países como Swazilandia, Rodesia, Madagascar, Angola y Malawi tienen plantado *P. pátula* en más del 60% de su superficie destinada a plantaciones forestales (Dvorak *et al.*, 2000). En México, se estima que de las 256 000 ha destinadas a plantaciones forestales comerciales, el 15% corresponde a plantaciones de *Pinus patula*.

3.2.1. Distribución y ecología

Pinus patula se distribuye principalmente sobre la Sierra Madre Oriental, ha sido reportada para los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Distrito Federal y Tlaxcala (Perry, 1991), crece mejor en lugares donde las lluvias son más frecuentes en verano, fenómeno que ocurre en su lugar de distribución natural. Sin embargo, y aun cuando exista el régimen de precipitación adecuado, no crece satisfactoriamente en lugares donde la sequía es muy severa. Al parecer el crecimiento de la especie se retarda cuando la temperatura es tan baja como -10° C, a esta temperatura la especie entra en latencia. Por debajo de los 30° de latitud, *Pinus patula* crece adecuadamente sin que las bajas temperaturas que se registran en algunos lugares sean un factor limitante. Los suelos favorables son los ácidos, húmedos y profundos (Perry, 1991).

3.2.2. Importancia económica

Pinus patula ha mostrado una gran capacidad de producción debido a que presenta un crecimiento muy rápido. Además tiene buena conformación, copas pequeñas, poda natural adecuada, fuste recto relativamente libre de nudos, y en general buena calidad de la madera por su bajo contenido de resinas y adecuadas características físicas y químicas, así como una elevada productividad bajo un manejo intensivo (Vela, 1980; Monroy, 1995). La especie produce celulosa y madera de cortas dimensiones en tiempos más breves que la mayoría de las especies forestales asociadas con ella. La madera es liviana, poco resinosa, adecuada para cajas de empaque, acabados de interiores, exteriores y bases de pisos, y con excelente calidad de pulpa para papel (Monroy, 1995).

3.3. Descripción de *Pinus ayacahuite*

En muchas regiones de México es la especie más popular como árbol de navidad. Es un árbol de 12 a 35 metros de altura y de 25 a 100 cm. de diámetro, de copa cónica y aguda, de ramas extendidas y verticiladas; corteza grisácea y lisa en los árboles jóvenes, áspera y de color moreno rojizo en los viejos (Perry, 1991). Sus hojas se presentan en grupos de cinco, de 8 a 15 cm de longitud, a veces hasta 17, pero más frecuentemente alrededor de 13, son delgadas, triangulares, extendidas, colocadas en la extremidad de las ramillas; de color verde, generalmente algo oscuro; las vainas son amarillentas, apergaminadas, escamosas y brillantes de 10 a 15 mm y pronto caediza; sus yemas son oblongas de color castaño rojizo de unos 15 mm de longitud; tiene conillos subterminales casi cilíndricos, con ápice redondeado, en pedúnculos de unos 15 a 20 mm y con escamas anchas; los conos son ligeros, subcilíndricos, gradualmente atenuados y un poco encorvados, de 20 a 30 cm de largo a veces algo más (Farjon y Styles, 1997).

3.3.1 Distribución y ecología

P. ayacahuite se distribuye desde el centro de México hasta el sur con la frontera de Guatemala, Honduras y El Salvador. En el territorio nacional se localiza en el eje Neovolcánico aunque no es muy abundante; se extiende desde el paralelo 18°20' al 21°00' de Latitud Norte y del meridiano 96°50' al 102°35' de Longitud Oeste. De la misma manera se encuentra en los estados de Guerrero, Hidalgo, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Veracruz y el Distrito Federal (Musálem y Ramírez, 2003). Eguiluz (1978) mencionó que el intervalo altitudinal de *P. ayacahuite* es de 2,000 a 3,700 msnm, pero con mayor frecuencia a los 2,900 msnm, por lo que la considera una especie de clima templado; prefiriendo suelos profundos, bien drenados y protegidos.

3.3.2 Importancia

Caracterizada por ser endémica de Mesoamérica, es altamente y 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, 2003).

3.4. Hongos ectomicorrízicos comestibles de México.

México posee una alta diversidad de especies fúngicas debido a que el país se ubica entre dos importantes regiones biogeográficas: el Neotrópico y Neártico. En el territorio mexicano existen bosques templados de gimnospermas y angiospermas, los cuales favorecen el desarrollo de alrededor de 200 000 especies de hongos (Guzmán, 2008a). Se ha estimado que en México existen más de 300 especies de hongos silvestres comestibles (Boa, 2004). Los hongos han sido utilizados como alimento y medicina tradicional desde épocas prehispánicas e incorporadas en la dieta de diversos grupos étnicos (Guzmán, 2008b). Los hongos comestibles poseen altos contenidos de proteínas, carbohidratos y vitaminas, y bajos en grasas (Colak *et al.*, 2009). Actualmente, el interés de los hongos comestibles ha crecido significativamente debido a que han demostrado propiedades nutrimentales y medicinales que han sido utilizadas en tratamientos terapéuticos (Barros *et al.*, 2008).

En México se conocen alrededor de 70 especies de hongos que han sido utilizadas en prácticas de medicina tradicional para el tratamiento de 40 tipos de problemas de salud humana (Guzmán, 2008a). Adicionalmente, los hongos comestibles silvestres son considerados un recurso forestal no maderable ya que contribuyen a la conservación de bosques, y forman parte de la estructura y funcionamiento de los mismos, estando entonces vinculados a la prestación de servicios forestales, tales como: recreación, captura de agua y carbono, conservación de la biodiversidad y ecoturismo (Pilz y Molina, 2002).

Diversos estudios se han realizado por ejemplo, en Oaxaca, con hongos comestibles silvestres estudiando la venta, consumo y conocimiento tradicional, sin embargo, pocos son los trabajos realizados sobre la importancia de los hongos comestibles silvestres en la medicina moderna y su potencial biotecnológico a través de la producción de bioinoculantes de árboles forestales. (Ruan-Soto *et al.*, 2004; Zamora-Martínez and Pascual-Pola, 2004; Garibay-Orijel *et al.*, 2006, 2009a).

Los hongos micorrízicos comestibles se hace más atractivos, dado la marcada disminución en las cosechas de algunos hongos micorrízico comestibles en los continentes de Europa y Asia, así como el creciente interés y preocupación por los suplementos dietéticos y alimentos funcionales (Karwa *et al.* 2011). Asimismo, las especies de árboles que han sido considerados como candidatos potenciales para la fitorremediación viven por naturaleza en simbiosis con hongos ectomicorrízicos, siendo el intercambio nutrimental el principal beneficio para ambos simbioses (Smith and Read 2008). Pérez-Moreno *et al.* (2010a) mencionaron que en países como México, este tipo de acercamiento se encuentra en desarrollo y posee un enorme potencial.

En general en México particularmente se le ha dado poca importancia a las características morfológicas y fisiológicas, óptimas que deberían tener las plantas antes de ser llevadas al sitio definitivo de plantación. Debido a lo anterior, la inoculación de hongos ectomicorrízicos en la producción de planta forestal en vivero es una práctica que poco se realiza.

3.5. Producción de inoculantes de hongos ectomicorrízicos

La dependencia de los árboles forestales con ectomicorrizas ha sido reconocida. El uso de hongos específicos para formar la simbiosis ectomicorrízica en las plántulas en el vivero mejora su desarrollo después del trasplante en campo, ya que aumentan la capacidad del hospedante para captar nutrientes N, P y agua (Prasad, 2010). Con el fin de desarrollar prácticas controladas de micorrización es necesario aislar y seleccionar hongos ectomicorrízicos que sean capaces de colonizar las especies de plantas destinadas y que son eficientes en la promoción de su crecimiento bajo las condiciones ambientales en el sitio de plantación. Para que una especie de hongo sea adecuado para la inoculación de las plántulas en vivero, estos deben ser capaces de crecer rápidamente en cultivo a gran escala y mantener altas tasas de infectividad durante su almacenamiento. Aunque han pasado varias décadas desde los primeros experimentos con micorrizas en campo, su uso no es común, debido a que faltan inoculantes ectomicorrízicos adecuados en el mercado (Rossi *et al.* 2007).

Existe una gran cantidad de información sobre técnicas para la producción de plántulas de árboles inoculados con hongos ECM competitivos y eficientes (Le Tacón *et al.* 1992), pero principalmente con especies que no son comestibles o poseen pobre interés culinario. Adicional a esto, es escasa la información que indica que la inoculación con hongos ECM puede ser eficiente al trasplantar en campo (Duñabeitia *et al.* 2004).

La selección de un portador apropiado es un paso importante en el desarrollo de un proceso para la producción de inoculante. El inóculo debe permanecer viable entre el momento de la siembra y el momento en que se forman raíces receptoras. El micelio naciente debe resistir condiciones adversas tales como la sequía, el antagonismo microbiano, o la predación de insectos y otros artrópodos (Rossi *et al.* 2007). Se han hecho estudios realizados para lograr una mayor calidad de inóculo y un proceso de producción mejorado, Krupa y Piotrowska (2003) utilizaron alginato inmovilizado de inóculo de hongos micorrízicos para introducir el hongo al suelo, se informó de que la concentración total de cada suelo contaminado inoculadas con hongos ECM fue menor que en el suelo no inoculado. Además, Kropáček *et al.* (1990) mencionan que utilizaron micelios de hongos ECM inmovilizados en gel de alginato en una mezcla con un silicato de portadora perlita, este inóculo se aplicó a la siembra en viveros forestales para obtener plantas resistentes a la forestación de zonas expuestas a estrés por el hombre. En ambas condiciones estériles y no estériles, el crecimiento de las siembras y el desarrollo de micorriza se incrementaron por la inoculación con una cepa *Laccaria proxima*. Esta formulación de ECM ofrece una gran flexibilidad, ya que permite la adición de aditivos químicos para mejorar la estabilidad de gel y conservar el inoculante (Mauperin *et al.* 1987).

La inoculación consiste en incorporar a un medio (sustrato de crecimiento) las esporas o micelio de un hongo simbiote (micorrízico), el principio general consiste en aportar el inóculo de un hongo micorrízico en las fases jóvenes de una planta. Se considera inoculante a todo producto biológico que facilita la introducción de microorganismos con diversas actividades fisiológicas para favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ferrera-Cerrato 2012). En

el cultivo de planta forestal, con sustratos artificiales o comerciales, la micorrización no ocurre, por lo que es necesario micorrizar artificialmente.

A lo largo de la historia, en la producción de planta de interés forestal en vivero, la micorrización con hongos ectomicorrízicos se ha realizado a través de tres tipos principales o básicos de inóculo: 1) tierra de monte, 2) esporas, 3) micelio de hongos ectomicorrízicos (cultivado en condiciones estériles en el laboratorio) (Pérez-Moreno and Read 2007).

La motorización con inóculo miceliar obtenido a partir de cultivos puros o inoculación vegetativa, es posiblemente el método más seguro, ya que carece de riesgos de introducción de otros organismos no deseables como patógenos y competidores. Es el más efectivo, alcanzando mayores porcentajes de formación de micorrizas en menor tiempo, sin embargo es el más costoso y de manipulación más sofisticada, ya que su implantación requiere de una adecuación tecnológica de las instalaciones (Honrubia *et al.* 1992, Estrada-Torres y Santiago-Martínez 2003). En México, los inoculantes vegetativos se han utilizado principalmente a nivel experimental. Actualmente, se venden en el país inóculos vegetativos comerciales producidos en el país o importado de los Estados Unidos. La producción de inoculantes de hongos ECM es un punto crítico que ha sido revisado actualmente y debido a que las técnicas de inoculación controlada tardan muchos años en ser perfeccionadas, son celosamente guardadas por las empresas que las han desarrollado (Rossi *et al.* 2007).

3.5.1 Tierra de monte o mantillo

Anteriormente, en el sistema tradicional de producción de planta forestal, en el cual se utilizaba tierra de monte como sustrato y bolsas de polietileno negro como envases, era común utilizar la capa superficial del suelo (materia orgánica que abarca los primeros 10 cm) (Pérez-Moreno, 2007). Esto consiste en incorporar de 2 a 3% de mantillo forestal por volumen de mezcla utilizado. Debido al deterioro ecológico asociado y a la adopción del sistema tecnificado, en el que se usan sustratos comerciales diferentes del suelo y envases rígidos, la incorporación de tierra de monte como sustrato de

crecimiento está en desuso. Ferrera-Cerrato (2012), mencionó que esta fuente de inoculo no se consideraba tan adecuada, ya que presenta varios inconvenientes: *i*) se requieren grandes cantidades de suelo forestal (se generan disturbios importantes al bosque), *ii*) heterogeneidad en la cantidad de inoculante (distribución irregular de los propágulos) y *iii*) el mantillo o suelo forestal, pese a sus buenos resultados, puede introducir organismos patógenos como los hongos causantes del mal de almacigo tales como el complejo denominado “damping-off” (Pérez-Moreno, 2007).

3.5.2 Inoculo esporal

Las esporas se encuentran en el himenio o parte fértil del píleo (sombrero) de los hongos. Generalmente, las esporas de hongos son pequeñas aproximadamente de 10 μ m de longitud (Cléménçon *et al* 2004); y normalmente se producen en grandes cantidades (por ejemplo, 1×10^8 a 1×10^9 esporas por esporoma. Algunos de los géneros de hongos ectomicorrízicos tales como *Pisolithus*, *Scleroderma* o *Rhizopogon*, fructifican en abundancia y producen gran cantidad de esporas. Pero la mayor desventaja de utilizarlos es que se trata de especies exóticas, en el caso de nuestro país (Pérez-Moreno, 2007). En México, apenas inician la utilización de esporas de hongos silvestre nativos de los géneros *Hebeloma*, *Russula*, *Suillus*, *Laccaria*, *Boletus* y *Amanita*; como estas especies producen esporas en menor cantidad, por su propia morfología, es necesario deshidratarlos y utilizar los píleos completos de los cuerpos fructíferos (Figura 2b) como inoculante, en dosis de un centímetro cúbico de inóculo por planta o mezclados con arena (1/100, peso/volumen) (Pérez-Moreno *et al.*, 2002.)

3.5.3. Inóculo miceliar (Micelio vegetativo)

La inoculación por este método consiste en producir el micelio en laboratorio y encapsularlo en alginato de calcio, para después adicionarlo en la mezcla de sustrato o aplicarlo mecánicamente directo en el envase. Esta técnica tiene la desventaja de que algunas especies de hongos son difíciles de reproducir de manera masiva; además, tiene alto costo, requiere de instalaciones sofisticadas, de equipo y personal especializado (Grove y Malajczuk, 1994).

3.6 Sustratos utilizado en hongos ectomicorrízicos

El termino sustrato se refiere a todo material sólido diferente del suelo que puede ser natural o sintético, mineral u orgánico y que colocado en contenedor, de forma pura o mezclado, permite el encaje de las plántulas a través de su sistema radicular (Pastor, 1999). En general, un sustrato adecuado sería aquel que garantice altos porcentajes en la producción de plantas, y a la vez presente menos pérdidas de estas por factores adversos durante el proceso germinativo (Aparicio *et al.*, 1999), y dado que el volumen de un contenedor es limitado, el sustrato y sus componentes deben poseer características físicas y químicas que combinadas con un programa integral de manejo, permitan un crecimiento óptimo (Cabrera, 1999). Actualmente se utilizan diferentes tipos de sustratos como turba orgánica (peatmoss), perlita, vermiculita, agrolita, corteza de pino, aserrín; así como mezcla de algunos de ellos. La selección de cualquiera de los tipos de sustratos dependerá de su disponibilidad, costo y posibilidad de manejo. Sin embargo, cuando las plántulas se producen en el sistema tradicional, los sustratos de crecimiento son diversos y entre ellos destacan la tierra de monte, el azolve de río, el mantillo de encino, la arena y la corteza composteada (Prieto *et al.*,1999). Salgado (2009) mencionó que el sistema productivo analizado incorpora fortuitamente inóculo micorrízico a la producción de plántulas, con la ayuda también de los diferentes tipos de sustratos que existen, los cuales fueron ya mencionados anteriormente, se ha trabajado con arena volcánica y se pudo observar la colonización rápidamente demostrando que las plantas en este caso fueron de *Pinus ponderosa* pueden establecerse y crecer satisfactoriamente. También las coníferas, y en particular el género *Pinus*, necesitan establecer asociaciones simbióticas con hongos ectomicorrízicos para proveerse de nutrientes esenciales, principalmente nitrógeno, fosforo y agua (Meyer 1973, Read *et al.* 1992, Smith y Read 2008). Numerosos estudios han demostrado la superioridad de las plantas micorrizadas frente a las no micorrizadas en términos de establecimiento y supervivencia en campo, generando mejores respuestas a los crecimientos en las forestaciones (Gagnon *et al.* 1988 y referencias allí incluidas, Stenstrom *et al.* 1990, 1997, Krasowski *et al.* 1999, Jumpponen 2001, Van Tichelen *et al.*

2001, Dunabeitia *et al.* 2004, Ortega *et al.* 2004). Sin embargo, existe el manejo de la micorrización bajo sistemas en viveros que reciben fertilización lo cual requiere un estudio detallado para cada caso, dado que existen reportes contradictorios sobre el efecto inhibitorio de la fertilización sobre la micorrización, dependiendo de las especies arbóreas y fúngicas involucradas (Menkis *et al.* 2005).

La utilización de hongos micorrízicos en la etapa de viveros es una técnica que se utiliza con el propósito de obtener una mejor plántulas con alta capacidad productiva; y por buena calidad, el crecimiento de la raíz y su capacidad para formar estructuras simbióticas con hongos es de gran importancia para el desarrollo de las plantas, ya que este factor es el responsable de satisfacer las demandas de agua y nutrientes a la parte aérea (Marshall y Waring, 1985). Existen posiciones diferenciales entre distintos autores respecto al efecto de la fertilización sobre la micorrización de plántulas en viveros. Algunos han reportado que altos niveles de fertilizantes inhiben la micorrización que, en caso de existir, resulta muy pobre (Gagnon *et al.* 1987, 1988, Hunt 1988, Reitveld *et al.* 1989, Chakravarty y Chatarpaul 1990, Le Tacon *et al.* 1997, Smith y Read 1997). Otros, en cambio, han reportado que la formación de micorrizas sería independiente de la fertilización, pues no encontraron diferencias entre tratamientos con distintas dosis de fertilizantes (Molina y Chamard 1983, Danielson *et al.* 1984, Khasa *et al.* 2001). Trappe (1977), por su parte, reconoció que cada hongo ectomicorrízico reacciona de manera diferente frente a la fertilización, aumentando la micorrización en algunos casos o disminuyéndola drásticamente en otros.

3.7. BIBLIOGRAFIA

1. Aparicio R., A., H. Cruz J. y J. Alba L. 1999. Efecto de seis sustratos sobre la germinación de *pinus patula* Sch. et Cham., *Pinus montezumae* Lam. y *Pinus pseudostrobus* Lindl. En condiciones de vivero. Forestal veracruzana 1(2)1-36.
2. Azamar, O, M., López U. J., Vargas H. J. J., y Plancarte B. A. 2000. Evaluación de un ensayo de procedencias-progenies de *Pinus greggii* y su conversión a huerto semillero. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Reforestación. Programa Nacional de Reforestación-Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. P.7.

3. Barros, L. Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., and Ferreira, I. C. F. R. 2008. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. 46:2742-2747.
4. Boa, E. 2004. Los hongos silvestres comestibles. Perspectiva global de su uso e importancia para la población, No. 17. FAO, Roma. 161 p.
5. Cabrera R., I. 1999. Propiedades, uso y manejo de sustratos de cultivo para la producción de plantas en maceta. Chapingo Serie Horticultura 5(1):5-11.
6. Colak, A. Faiz, Ö. and Sesli, E. 2009. Nutritional composition of some wild edible mushrooms. Turk. J. Biochem. 34:25-31.
7. Danielson RM. 1984. Ectomycorrhizal associations in Jack pine stand in Northeastern Alberta. Can J Bot 62: 932-939.
8. Donahue, J., López-Upton, J. 1999. Geographic variation in leaf, cone and seed morphology of *Pinus greggii* Engelm. In native forest. For. Ecol. Manag. 82: 145- 157.
9. Duñabeitia M, Rodríguez N, Salcedo I, Sarrionandia E ,2004. Field mycorrhization and its influence on the establishment and development of the seedlings in a broadleaf plantation in the Basque Country. For Ecol Manage 195:129–139.
10. Dvorak, W. S. y J. K. Donahue.1993. Reseña de investigaciones de la cooperativa CAMCORE. 1980-1992. Central America & México Coniferous Resources Cooperative. Raleigh, NC. 94 pp.
11. Dvorak, W. S., J. E. Kietzka y J. K. Donahue.1996. Three-year survival and growth of provenances of *Pinus greggii* in the tropics. For. Ecol. Manag. 83: 123-131.
12. Dvorak, W. S., Kietzka J. E., Donahue, J. K., Hodge G. R., Stanger T. K. 2000. *Pinus greggii*. In: Conservation & Testing of Tropical & Subtropical Forest Tree Species by the CAMCORE Cooperative. Central America & México Coniferous Resources Cooperative, North Carolina State University, Raleigh, NC. p. 52-73.
13. Dvorak, W, S. 2002. Central America and México Coniferous Resources Cooperative (CAMCORE). Department of Forestry, North Carolina State University. En: Vozzo, A, J. Tropical tree seed manual. Part II—Species Descriptions. pp. 615-617.

14. Eguiluz, P., T. 1978. Ensayo de integración de los conocimientos sobre el género *Pinus* en México. Tesis profesional, UACH. Chapingo, México. 446 p.
15. Estrada-Torres A, Santiago-Martínez M, G ,2003. Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Fundación Produce Tlaxcala, México, 76 p.
16. Farjon, A., T., Styles. 1997. *Pinus (Pinaceae)*. Flora Neotropica Monograph 75. The New York Botanical Garden. USA. pp 25-27.
17. Ferrera-Cerrato, R. 2012. Manual Micorrizas. Manual Micorrizas. In http://es.scribd.com/sonia_barr%C3%B3n_4/d/61858236-Manual-Micorrizas-Propagulo (16 de enero de 2012).
18. Gagnon J, CG Langlois, JA Fortin. 1988. Growth and ectomycorrhiza formation of containerized black spruce seedlings as affected by nitrogen fertilization, inoculum type, and symbiont. *Can. J. For. Res.* 18: 922-929.
19. Garibay-Orijel, R. Cifuentes, J., Estrada-Torres, A., and Caballero, J. 2006. People using macro-fungal diversity in Oaxaca, México. *Fungal Diversity* 21:41-67.
20. Garibay-Orijel, R. Córdova, J., Cifuentes, Valenzuela, R., Estrada-Torres, A. and Kong, A. 2009a. Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for indigenous community forests. *258:122-131*.
21. Guzmán, G. 2008a. Hallucinogenic mushrooms in México: an overview. *Econ. Bot.* 62:404-412.
22. Guzman, G. 2008b. Inventorying the fungi of México. *Biodivers Conserv* 7:369–384.
23. Hernández, M, J. 2003. Zonas semilleros de *Pinus greggii* Engelm. en el estado de Hidalgo. Tesis profesional, UACH. Texcoco, Estado de México. 89 p.
24. Honrubia, M.; Torres, P.; Díaz, G. y Cano, A. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA. 47 p.
25. INIFAP, 2003. Monografía de *Pinus greggii* Engelm. Campo experimental del Valle de México. Chapingo, México. Edición Jiménez Editores. 341 p.

26. Karwa A, Vamma A y Rai M. 2011. Edible Ectomycorrhizal Fungi: Cultivation, Conservation and Challenges. *Soil Biology* 25:429-453.
27. Kropáček, K., Cudlin, P., and Mejstřík, V, 1990. The use of granulated ectomycorrhizal inoculum for reforestation of deteriorated regions. *Agr. Ecosyst. Environ.* 28: 263–269.
28. Krupa, P., Piotrowska-Seget, Z., 2003. Positive aspects of interaction between plants and mycorrhizal fungi originating from soils polluted with cadmium. *Pol. j. environ. stud.* 12: 723–726.
29. Le Tacon F, Alvarez IF, Bouchard D, Henrion B, Jackson RM, Luff S, Parlade JI, Pera J, Sternström E, Villeneuve N, Walker C ,1992. Variations in field responses of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. In: Read DJ, Lewis DH, Lewis AH, Alexander IJ (eds) *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB International, Wallingford, pp 119–134.
30. López, U., J. y A., Muñoz O. 1991. Selección familiar por tolerancia a sequía en *Pinus greggii* Engelm. I. Evaluación en plántula. *Agrociencia, Serie Fitociencia* 2(2): 111-123.
31. López, A., J., Vargas L., J., Ramírez, H., C., López, H., J., U. 1999. Variación intraespecífica en el patrón de crecimiento del brote terminal de *Pinus greggii* Engelm. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 5(2): 133-140.
32. Martínez, M. 1948. Los Pinos mexicanos. Segunda Edición. Ediciones Botas. México. p.431
33. Marshall, J. and R. Waring. 1985. Predicting fine root production and turnover by monitoring root starch and soil temperature. *Can. J. For. Res.* 15:791-800.
34. Mauperin, C.H., Mortier, F., Garbaye, J., Le Tacon, F. and Carr, G. 1987. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. *Can. J. Bot.* 65: 2329–2336.
35. Meyer FH. 1973. Distribution of ectomycorrhiza in native and man-made forest. In Marks GC, TT Kozlowsky eds. *Ectomycorrhizae, their ecology and physiology*. New York, USA. Academic Press. p. 87-105.
36. Menkis A, R Vasiliaskas, AFS Taylor, J Stenlid, R Finlay. 2005. Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza* 16: 33-41.

37. Monroy, R.C. 1995. *Pinus patula* Schl. et Cham. en México. INIFAP, Campo Experimental Ixtacuaco, Tlapacoyan, Veracruz, México. 145 p.
38. Musalen, M.A. y Ramírez, L.A. 2003. Monografía de *Pinus ayacahuite*. INIFAP, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Libro Técnico No 6., México, D.F.
39. Ortega U, M Dunabeitia, S Menéndez, C Gonzalez-Murua, J Majada. 2004. Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on growth and water relations of *Pinus radiata* in different water regimes. *Tree Physiol.* 24: 65-73.
40. Pastor S., J. N 1999. Utilización de sustratos en viveros. *Terra* 17(3):231-235.
41. Perry, J., r., J., P. 1991. The pines of México and Central America. Timber Press, Inc. Portland, Oregon, EUA. 563 p.
42. Pérez-Moreno J, Read D.J. 2001a Exploitation of pollen by mycorrhizal mycelial systems with special reference to nutrient recycling in boreal forests. *Proceedings of the Royal Society of London.* 268:1329-1335.
43. Pérez-Moreno, J., J. Alvarado-López y R. Ferrera-Cerrato (Eds.). 2002. Producción y control de calidad de inoculantes agrícolas y forestales. Colegio de Postgraduados y Comité Mexicano de Inoculantes Agrícolas y Forestales. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 107 pp.
44. Pérez-Moreno J. and Read D. J. 2007. Ecología fisiológica y simbiosis ectomicorrízica. In: Ferrera- Cerrato, R. y A. Alarcón. (eds). *Microbiología agrícola*, Editorial Trillas, México, pp.134-168.
45. Prasad, k. 2010. Ectomycorrhizal symbiosis: Possibilities and prospects. In: Mahendre Rai (ed.) *Progress in Mycology*. University of Debrecen, India.
46. Prieto R. J. A., G. Vera C. y E. Merlín B. 1999. Factores que influyen en la calidad de brizales criterios para su evaluación en vivero. Folleto Técnico No. 12 INIFAP.
47. Prieto, R., J. A. y E. Merlín, B. 2000. Producción de árboles de Navidad en regiones semiáridas del Norte de México. *Boletín Técnico INIFAP.* 1 (1):3-26.
48. Pliz D., Molina D. 2002. Commercial harvest of edible mushrooms from the forest of the Pacific Northwest Unites States: issues,

- management and monitoring for sustainability. *Forest Ecology and Management*.155: 3-6.
49. Read, D., J. 1992. The mycorrhizal mycelium. In: Allen, M.F. (Ed.), *Mycorrhizal functioning*. Chapman & Hall, New York, pp. 102-133.
50. Rossi M, J, Furigo A, Oliveira V.L, 2007. Inoculant production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. *Food Technol Biotechnol* 45:277–286.
51. Ruán-Soto, F. R. Garibay-Orijel y J. Cifuentes. 2004. Conocimiento micológico tradicional en la planicie costera del Golfo de México. *Revista Mexicana de Micología*.
52. Salazar, G., G., Vargas, J., J., J., Jasso, H., J., M., Molina, J., D., Ramírez, G., C., López U H., J.1999. Variación en el patrón de crecimiento en altura de cuatro especies de *Pinus* en edades tempranas. *Madera y Bosques* 5(2): 19-34.
53. Salgado S, ME. Rejchenber, M, Barroetaveña C. 2009. Evaluación del estado micorrízico de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego de la micorrización. *Bosque* 30 (3):127-134.
54. Smith, S. E. and D. J. Read. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press. London, UK.
55. Smith SE, Read D.J, 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3a Ed. Academic Press.
56. Stenstrom E, M Ek, T Unestam. 1990. Variation in field response of *Pinus sylvestris* to nursery inoculation with four different ectomycorrhizal fungi. *Can. J. For. Res.* 20: 1796-1803.
57. Stenstrom E, E Damm, T Unestam. 1997. Le role des mycorhizes dans la protection des arbres forestiers contre les agents pathogenes du sol. *Rev. For. Fr.* 49: 121-128.
58. Van Tichelen KK, JV Colpaert, J Vangronsveld. 2001. Ectomycorrhizal protection of *Pinus sylvestris* against copper toxicity. *New Phytol.* 150: 203-213.
59. Vargas H., J., J., y A. Muñoz O. 1988. Resistencia a sequía: II. Crecimiento y supervivencia en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. *Agrociencia* 72: 197-208.
60. Vargas H., J., J. y A. Muñoz O. 1991. Potencial hídrico, transpiración y resistencia estomatal en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. *Agrociencia, Serie Recursos Naturales Renovables* 1(3): 25-38.

61. Vela G., L. 1980. Contribución a la ecología de *Pinus patula* Schl. et Cham. Publicación especial No. 19, INIF, México. 109 p.
62. Zamora-Martínez, M. C. and Nieto de Pascual-Pola, C. 2004. Studies of *Tricholoma magnivelare* in México. *Micol. Apl. Int.* 6:13-23.

CAPITULO IV

Transferencia nutrimental y crecimiento de un pino Neotropical inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos

4.1. RESUMEN

La ectomicorriza es una simbiosis mutualista de enorme importancia en la producción de árboles de interés forestal. Uno de los criterios de selección de hongos ectomicorrízicos de gran interés actualmente, es su comestibilidad, por la importancia económica, ecológica y cultural de los hongos comestibles ectomicorrízicos (HCE) como un producto forestal no maderable. Se evaluó el efecto de la inoculación con 3 HCE, ampliamente comercializados en México, en el crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii*, crecido en un sustrato experimental, y un sustrato comercial enriquecido con un fertilizante de liberación lenta. Dos años después de la siembra, se observaron conspicuas diferencias en altura, biomasa aérea y radical y contenido de macro y micronutrientes entre plantas inoculadas y no inoculadas, independientemente de la especie fúngica y del sustrato. A pesar de que plantas crecidas en sustrato comercial, tuvieron mayor crecimiento y contenido nutrimental, sus porcentajes de colonización fueron conspicuamente menores que plantas crecidas en sustrato experimental. Existieron evidentes diferencias en la transferencia nutrimental a la parte aérea de los pinos inoculados, entre las especies fúngicas. La transferencia de Ca por *Laccaria laccata*; de Na por *L. bicolor* y de Mn por *Hebeloma leucosarx* registradas en el sustrato experimental; constituyen uno de los pocos reportes conocidos de transferencia de dichos nutrientes en gimnospermas por HCE. Se demuestra que la selección de sustratos, constituye un factor clave en la producción de plantas ectomicorrizadas y que las 3 especies de HCE evaluados tienen un enorme potencial en la producción de *P. greggii*.

Palabras clave: hongos comestibles ectomicorrízicos, biotecnología forestal, transferencia nutrimental, sodio, calcio, magnesio.

4.1.1. Abstract

The ectomycorrhiza is a mutualistic symbiosis of paramount importance in the production of trees with importance in forestry. Currently, one the selection criteria of ectomycorrhizal fungi of great importance is their edibility, due to the economic, ecologic and cultural relevance of the edible ectomycorrhizal mushrooms (EEM) as a non-timber forest product. The effect of the inoculation with 3 EEM, widely sold in Mexico, on the growth and nutrient contents of *Pinus greggii*, grown in an experimental substrate and a commercial substrate enriched with a slow-release fertilizer, was evaluated. Two years after sowing, conspicuous differences in terms of height, shoot and root biomass and macro and micronutrient contents between inoculated and non-inoculated plants, were recorded, independently of the fungal species and the substrate. Despite the fact that plants grown in commercial substrate had higher growth and nutrient contents, their ectomycorrhizal colonization percentages were conspicuously smaller than those of plants grown in experimental substrate. Evident differences in the nutrient transfer to the inoculated plant shoots among the evaluated fungal species were recorded. Ca mobilization by *Laccaria bicolor*, Na by *L. bicolor* and Mn by *Hebeloma leucosarx* recorded in the plants growing in experimental substrate, constitute one of the few known reports of transference of these nutrients in gymnosperms by EEM. It is demonstrated that the selection of substrates, constitutes an important factor in the production of ectomycorrhizal plants and that the 3 evaluated species of EEM have an enormous potential in the production of *P. greggii*.

Keywords: edible ectomycorrhizal mushrooms, biotechnological forestry, nutrient transfer, sodium, calcium, magnesium.

4.2. INTRODUCCIÓN

La ectomicorriza es una simbiosis mutualista que se establece entre las raíces de gimnospermas y angiospermas y alrededor de 20,000 especies de hongos, principalmente Basidiomycetes y Ascomycetes (Rinaldi *et al.* 2008). Los hongos ectomicorrízicos están involucrados en la movilización nutrimental, tanto mineral como orgánica, del suelo a los árboles hospederos asociados, así como en su protección contra patógenos e incremento a tolerancia a factores de estrés como sequía, presencia de metales pesados, salinidad y alta temperatura (Read and Pérez-Moreno, 2003; Smith and Read, 2008). Por estas razones, la bioinoculación con hongos ectomicorrízicos en la producción de árboles ha cobrado un gran interés en países con tradición forestal, dado que se ha demostrado que plantas ectomicorrizadas tienen con frecuencia mayor crecimiento, contenido nutrimental y mayor posibilidad de supervivencia al ser transplantadas de vivero a campo (Becquer *et al.*, 2014; Sánchez-Zabala *et al.* 2013; García y Zimmerman, 2014; Sousa *et al.*, 2011; 2012;). La selección de las combinaciones óptimas de micobiontes y fitobiontes es un factor clave en la inoculación exitosa de árboles de importancia forestal, dado que frecuentemente existen hongos que originan mayores beneficios en relación a otros, en cada árbol hospedero (Castrillon *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2012; Chávez *et al.*, 2009). Adicionalmente, uno de los criterios de selección, que ha cobrado gran interés a últimas fechas, es la comestibilidad de los micobiontes involucrados. Esto debido a que los hongos comestibles silvestres constituyen un producto forestal no maderable de enorme importancia económica, ecológica y cultural en diversas partes del mundo (Zambonelli y Bonito, 2012; Fernandez *et al.*, 2012; Pérez-Moreno y Martínez-Reyes, 2014; Pereira *et al.* 2010).

La micorrización de plantas requiere modificaciones de los métodos convencionales de producción de árboles de importancia forestal. Esto debido a que diversos factores como la composición de los sustratos, la fertilización química y la esterilización, son factores clave que afectan diferencialmente la colonización ectomicorrízica (Walker y Jones, 2013; Teste *et al.*, 2012;

Guerin-Laguette *et al.*, 2003). Previamente, han existido diversos estudios que han demostrado que la composición de sustratos y la fertilización química afectan, positiva o negativamente, de manera diferencial la micorrización y el crecimiento de árboles inoculados con hongos ectomicorrízicos (Jones *et al.*, 2012; Salomon *et al.*, 2009). Sin embargo, existe escasa información de cómo el contenido nutrimental y la movilización, principalmente de micronutrientes, resulta afectada en plantas hospederas micorrizadas artificialmente por la composición de los sustratos y la fertilización química. Adicionalmente, la mayor parte de la información generada en relación de la influencia de composición de sustratos, en el crecimiento de hospederos asociados y ectomicorrización, se ha centrado en árboles de distribución boreal y templada, y en contraste las especies de importancia subtropical y tropical han sido escasamente estudiadas.

En el presente trabajo, se estudió *Pinus greggii*, un pino Neotropical nativo de Mesoamérica, de gran importancia económica y ecológica a nivel internacional dado que: i) su madera se utiliza ampliamente en la industria de aserrío; y ii) por su rápido crecimiento, es ampliamente utilizada en plantaciones comerciales, y reforestaciones para la recuperación de suelos degradados (Villegas-Jiménez *et al.*, 2013; Gómez-Romero *et al.*, 2012; Dvorak, 2002). Por estas características, se han establecido exitosamente plantaciones de esta especie tropical y subtropical en Brasil, Sudáfrica, Italia, India y Nepal (Kanzler *et al.* 2012; van Wyk, G. 2002; Dvorak *et al.* 1996). En contraste, en términos generales, la diversidad y funcionalidad de las ectomicorrizas de dicha especie arbórea han sido escasamente estudiadas. En el presente trabajo se evaluó el efecto en el crecimiento, contenido de macronutrientes (N, P, K, Ca y Mg) y micronutrientes (Na, Fe, Cu, Mn y Zn); y micorrización, como consecuencia de la inoculación con 3 hongos comestibles ectomicorrízicos, ampliamente consumidos y de gran importancia económica, social y cultural en el centro de México: *Laccaria laccata*, *Laccaria bicolor* y *Hebeloma leucosarx*. Se compararon plantas crecidas, inoculadas con cualquiera de las 3 especies fúngicas, en un sustrato comercial enriquecido con un fertilizante de liberación lenta y en un sustrato experimental.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Material vegetal y fúngico

Los esporomas de *Laccaria bicolor*, *L. laccata* y *H. leucosarx* utilizados para producir el inóculo ectomicorrízico utilizado en los bioensayos en invernadero, fueron adquiridos en el mercado de Ozumba, estado de México (Fig.1a). Dichos esporomas fueron recolectados en los bosques de pinos aledaños a la comunidad del mismo nombre, ubicado en el centro del país. Las semillas de *P. greggii* utilizadas procedieron de bosques naturales de Xochicoatlán, Hidalgo. Los géneros de hongos comestibles ectomicorrízicos utilizados, *Hebeloma* y *Laccaria*, tienen una distribución cosmopolita y una gran diversidad de especies. Mueller (1985) reconoció 75 especies a nivel mundial para el género *Laccaria* y, en el caso de *Hebeloma* se ha estimado que existen de 250 a 600 especies (Cairney and Chambers, 1999). Las especies *L. bicolor*, *L. laccata* y *H. leucosarx*, se seleccionaron debido a su enorme importancia social, económica y cultural en el centro de México (Pérez-Moreno, 2010; Carrasco-Hernández *et al.*, 2010. Adicionalmente, estas son especies pioneras que se asocian con estadios tempranos de sus hospederos y están adaptadas a condiciones de baja fertilidad (Obase *et al.*, 2007; Trocha *et al.*, 2007).

4.3.2. Preparación de inóculo e inoculación de plantas

El inóculo se obtuvo a partir de esporomas frescos, de los cuales se cortaron los píleos de sus estípites y se deshidrataron a 35 °C en un secador de frutas JERSA (Fig.1b). Los píleos deshidratados de cada especie fúngica, se molieron y, el inóculo final así obtenido se almacenó en viales con capacidad de 1.5 mL a 5 °C hasta su utilización. Las semillas se esterilizaron con H₂O₂ a 30% durante 20 minutos y se enjuagaron por tres ocasiones con agua destilada estéril. Se utilizaron tubetes de plástico negro de 130 cm³, los cuales fueron lavados y desinfectados con alcohol a 70%. Se agregó sustrato a 90% del volumen del tubete, y se aplicó posteriormente inóculo fresco de esporomas a

los 4 meses de haber sembrado las semillas. En estas condiciones, se produjeron plantas micorizadas de *P. greggii* con dichos hongos, en los contenedores de 130 cm³, las cuales fueron mantenidas en invernadero durante 12 meses. Se seleccionaron árboles de *P. greggii* de 12 meses de edad con un porcentaje de micorrización de 90% o superior, para ser trasplantados a recipientes de 5 kg de volumen. Paralelamente, se produjeron plantas no micorizadas, en las mismas condiciones. En este estadio se utilizaron en los recipientes de 5kg, 2 tipos de sustrato: i) una mezcla de arena, corteza de pino y suelo forestal en una proporción 2:2:1, denominado de aquí en adelante “sustrato experimental”; ii); una mezcla de 60% de peatmoos, 20% de vermiculita, 15% de agrolita, 5% de corteza y un fertilizante de liberación lenta llamado “Osmocote®” en una proporción de 2 g L⁻¹ con una composición N-P-K de 15-9-12 g L⁻¹, denominado de aquí en adelante “sustrato comercial”. Ambos sustratos se esterilizaron en autoclave a 1.3Kg cm³ a 125°C, durante 5h, previo al montaje del experimento. Los árboles inoculados, y no inoculados, de *P. greggii*, permanecieron 12 meses más, en las macetas de 5Kg de volumen y fueron regados cada tercer día con agua destilada estéril.

4.3.3. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar. Las plantas de *P. greggii* fueron inoculadas con 3 especies de hongos: i) *L.laccata*, ii) *L.bicolor*, iii) *H. leucosarx*, y iv) plantas testigos sin inocular. Estos tratamientos se hicieron crecer en el sustrato experimental o en el sustrato comercial, en las macetas de 5Kg, obteniendo 8 tratamientos con 7 réplicas y un total de 56 unidades experimentales.

4.3.4. Evaluación de variables

Todos los pinos fueron cosechados 24 meses después de la siembra. Para ello se extrajeron las plantas de las macetas y se cortó la parte aérea de la parte radical (cepellón). Posteriormente, la mezcla de raíces y suelo contenida en los cepellones se lavó con agua corriente y se utilizó un tamiz malla 16 (Grupo FIICSA) de 1.18mm de abertura, con la finalidad de recuperar la mayor cantidad posible de raíces. Enseguida, se evaluó la totalidad de raíces cortas

vivas micorrizadas, vivas no micorrizadas y muertas para estimar el porcentaje de colonización ectomicorrízica. Tanto la parte aérea como la radical, fueron deshidratadas a 80°C para evaluar su peso seco. Adicionalmente, se realizó un análisis de macronutrientes de (N, P, K, Mg y Ca) y micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Na y Cu). El N se determinó por digestión húmeda (Bremner, 1965); 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 y Mg, mediante determinación colorimétrica en un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian SpectrAA 220). Los micronutrientes Fe, Mn, Zn, Na y Cu fueron evaluados por absorción atómica, previa digestión con una mezcla HNO₃ y HClO₄ en proporción 2:1.

4.3.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para el diseño completamente al azar. Cuando existieron diferencias entre tratamientos para las variables evaluadas, se efectuaron pruebas de comparación de medias de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (SAS Institute, 2002). El número de repeticiones que se consideraron para el análisis estadístico fue de 4 para evaluar la altura y diámetro del tallo, y 3 para evaluar el porcentaje de colonización ectomicorrízica.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Altura, diámetro del tallo y peso seco

Independientemente de la especie de hongo inoculada, existió una mayor altura en las plantas crecidas en el sustrato comercial en relación a aquellas crecidas en el sustrato experimental. Sin embargo, fue hasta los 24 meses que existieron diferencias en la altura de las plantas de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) entre los 2 tipos de sustratos para todos los tratamientos inoculados. Una tendencia similar se observó en las plantas no inoculadas. Adicionalmente, existió siempre mayor altura en las plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas, independientemente del hongo empleado.

De manera similar, independientemente de la especie de hongo inoculado existió un mayor diámetro de tallo en las plantas crecidas en el sustrato comercial en relación a aquellas crecidas en el sustrato experimental. Sin embargo, y al igual que en el caso de la altura fue hasta los 24 meses que existieron diferencias (Tukey $P \leq 0.05$), tanto en plantas inoculadas (Tabla 1) como en las no inoculadas (Tabla 1d). Adicionalmente, existió siempre mayor diámetro en las plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas, independientemente del hongo empleado. En términos generales, siempre existió un mayor diámetro del tallo en plantas que fueron inoculadas en comparación con las no inoculadas.

Igualmente, existió una mayor producción de biomasa aérea en plantas crecidas en el sustrato comercial en comparación con aquellas crecidas en sustrato experimental, tanto en plantas inoculadas como no inoculadas. Estas diferencias fueron particularmente evidentes en plantas inoculadas con *H. leucosarx* y con *L. laccata*, tanto para la biomasa de parte aérea como de biomasa total. Sin embargo, dichas diferencias fueron menos evidentes en el caso de la biomasa radical, particularmente para plantas crecidas en el sustrato experimental. En plantas crecidas tanto en el sustrato comercial como en el sustrato experimental existió siempre un mayor crecimiento en plantas inoculadas en comparación con aquellas no inoculadas (Tabla 1 y Figs. 1c y d).

4.4.2. Colonización micorrízica

En términos generales, existió una mayor colonización ectomicorrízica en plantas inoculadas en comparación con plantas no inoculadas. Esto fue particularmente evidente 24 meses después del trasplante (Fig.2). Contrariamente a lo encontrado en la altura, el diámetro del tallo y el peso seco, existió una mayor colonización en las plantas crecidas en el sustrato experimental comparadas con aquellas crecidas en el sustrato comercial. Sin embargo, a los 24 meses después del trasplante existió una mayor colonización en las plantas inoculadas con las 3 especies fúngicas evaluadas en comparación con las plantas sin inocular. Un contraste se registró en el caso de plantas crecidas en el sustrato comercial, en donde de los 3 hongos evaluados, solo *Laccaria bicolor* presentó mayor (Tukey $P \leq 0.05$) colonización

en comparación con *L. laccata* y *H. leucosarx* (Fig.2). Al final del experimento, la colonización micorrízica fue superior en las plantas inoculadas con hongos ectomicorrízicos comestibles comparados con plantas no inoculadas, independientemente del sustrato utilizado. Los porcentajes de colonización ectomicorrízica alcanzaron hasta 30% (Fig.2).

4.4.3. Contenido nutricional

Macronutrientes. En términos generales se observó un mayor contenido de macronutrientes tanto en la parte aérea como en la raíz en las plantas inoculadas, respecto a las no inoculadas a los 24 meses de edad. Esta tendencia fue independiente, de la especie de hongo inoculado y del sustrato empleado (Tablas 2 y 3). El contenido de macro y micronutrientes fue generalmente mayor cuando las plantas fueron crecidas en el sustrato comercial en comparación con plantas crecidas en el sustrato experimental (Tablas 2 y 3).

En el caso de las plantas crecidas en el sustrato experimental se observaron diferentes tendencias en el contenido de macronutrientes dependiendo de: i) las especies de hongos ectomicorrízicos inoculados; ii) la parte evaluada de la planta; y iii) del macronutriente evaluado. En el caso de la parte aérea, el contenido de todos los macronutrientes fue mayor para las plantas inoculadas con *H. leucosarx*, en comparación con las plantas inoculadas con alguno de los otros 2 hongos, excepto para el K. Contrariamente, en el caso del contenido de macronutrientes de la raíz, no se observó diferencia en ningún nutriente en plantas inoculadas, excepto en el caso del K, en donde existió un mayor contenido en plantas inoculadas con *H. leucosarx* en comparación con plantas inoculadas con *L. bicolor* y *L. laccata*. Finalmente, en el caso de los macronutrientes totales, se observaron diferencias en el contenido de Mg en plantas inoculadas con *H. leucosarx* en comparación con plantas inoculadas con cualquiera de los otros 2 hongos (Tabla 2). No existieron diferencias en el contenido total de N, K y Ca entre plantas inoculadas con cualquiera de los 3 hongos, crecidas en sustrato experimental. En el caso del contenido de macronutrientes de las plantas crecidas en el sustrato comercial se observó una tendencia distinta a la observada en el

sustrato experimental. El contenido de macronutrientes en la parte aérea en este caso, fue mayor en plantas inoculadas con *L. laccata* en comparación con las plantas inoculadas con alguno de los otros 2 hongos, excepto para Mg. El mayor contenido de macronutrientes en la raíz de plantas crecidas en el sustrato comercial se registró en aquellas inoculadas con *H. leucosarx*, excepto para P en donde las plantas inoculadas con *L. laccata* presentaron el mayor contenido de dicho nutriente. En el caso de nutrientes totales no se observaron diferencias entre plantas inoculadas con cualquiera de los hongos en su contenido de N; sin embargo, las plantas inoculadas con *L. laccata* presentaron los mayores contenidos de P y K en comparación con plantas inoculadas con los otros 2 hongos, y plantas inoculadas con *H. leucosarx* presentaron mayor contenido de Mg que plantas inoculadas con *L. bicolor* o *L. laccata* (Tabla 2).

Micronutrientes. En el caso de la parte aérea de plantas crecidas en el sustrato experimental, el contenido de Fe y Zn fue mayor cuando fueron inoculadas con *Hebeloma leucosarx*, en comparación con las plantas inoculadas con alguno de los otros 2 hongos, o en plantas no inoculadas. Mientras tanto, el mayor contenido de Cu y Zn de la raíz se registró en plantas inoculadas con *H. leucosarx*. Finalmente, se observó una mayor cantidad total de Zn en plantas inoculadas con *H. leucosarx* comparadas con plantas inoculadas con *L. bicolor* o *L. laccata*; y un mayor contenido de Mn en plantas inoculadas con *L. bicolor* en comparación con plantas inoculadas con cualquiera de los otros 2 hongos y con plantas no inoculadas.

En el caso de las plantas crecidas en el sustrato comercial, se observó una tendencia similar a la observada en el sustrato experimental. El contenido de Fe y Mn en la parte aérea fue mayor en plantas inoculadas con *L. laccata* en comparación con plantas inoculadas con cualquiera de los otros 2 hongos. El mayor contenido de Na y Fe se observó en plantas inoculadas con *L. bicolor* y la mayor cantidad de Cu se registró en plantas inoculadas con *H. leucosarx* en comparación con plantas inoculadas con cualquiera de los otros 2 hongos o con el testigo sin inocular. Asimismo, se observó mayor contenido total de Na en plantas inoculadas con *L. bicolor* en comparación con plantas inoculadas con los otros 2 hongos.

4.4.4. Relaciones nutrimentales parte aérea: raíz

El cálculo de las relaciones del contenido nutrimental entre la parte aérea y la raíz de plantas inoculadas *versus* dicha relación nutrimental en plantas no inoculadas, nos permite conocer la eficiencia de translocación nutrimental mediante los hongos ectomicorrízicos, no solo a la raíz de las plantas, sino a su parte aérea. Según estas relaciones, en el caso de translocación de macronutrientes en plantas crecidas en el sustrato experimental las proporciones fueron conspicuamente mayores que las observadas en plantas crecidas en sustrato comercial (Tabla 4). Adicionalmente, existieron claras diferencias en la transferencia nutrimental a la parte aérea de los pinos inoculados, entre las especies fúngicas evaluadas. Las mayores translocaciones de macronutrientes a la parte aérea se observaron en plantas inoculadas con *H. leucosarx*, las cuales translocaron principalmente N, K y Mg, cuando las plantas fueron crecidas en sustrato experimental. Mientras tanto, *L. laccata* translocó principalmente Ca, en dicho sustrato. Una tendencia similar se observó en el caso de algunos micronutrientes como Na con *L. bicolor* y de Mn con *H. leucosarx* en el sustrato experimental (Tabla 4).

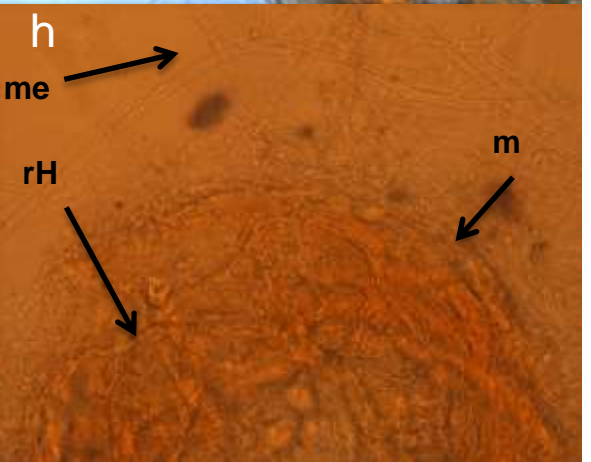
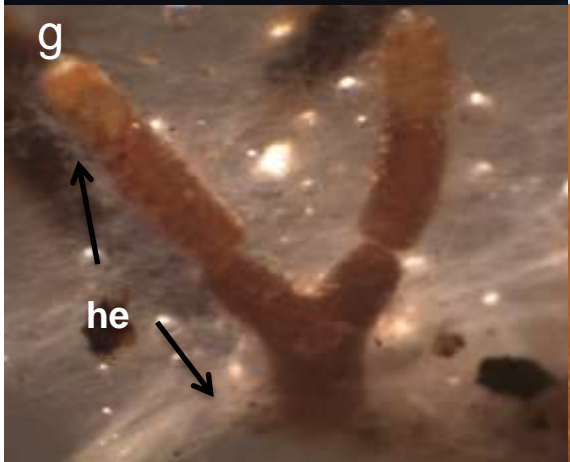
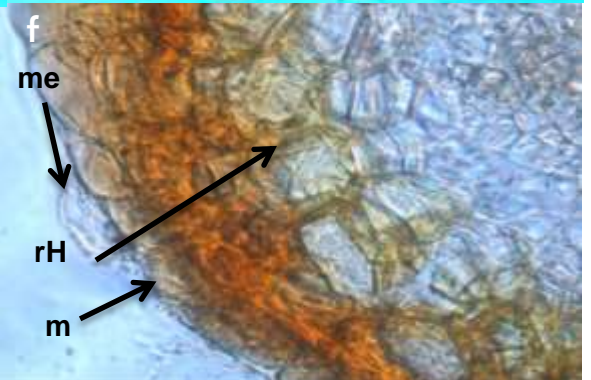
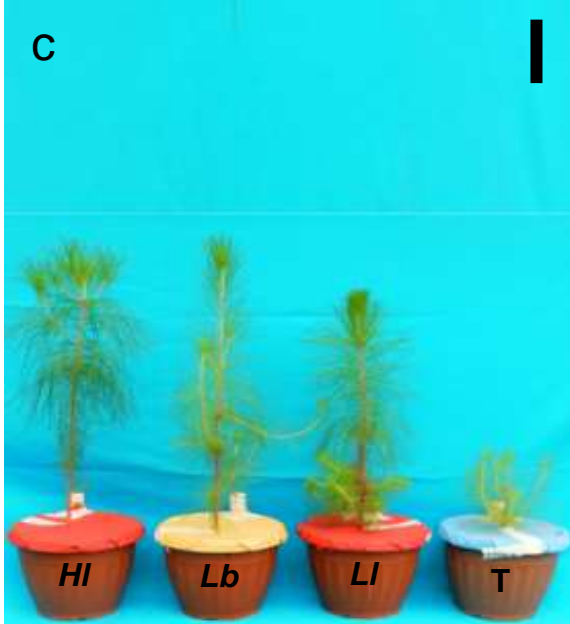


Figura 2. Aspectos generales del bioensayo. a) Venta de hongos ectomicorrízicos comestibles *Laccaria* spp. y *Hebeloma leucosarx* en el mercado de Ozumba, México; b) Preparación de inóculo en un deshidratador; c) y d) Efecto de la inoculación ectomicorrízica con *H. leucosarx* (Hl), *L. bicolor* (Lb) y *L.laccata* (Ll) en comparación con plantas testigo(T) no inoculadas crecidas en (c) sustrato experimental y (d) sustrato comercial; e) y f)ectomicorriza de *L. bicolor* mostrando en (e) micromorfología de los morfotipos con textura gelatinosa y en (f) manto (m), red de Hartig (rH) y micelio externo(me); g) y h)ectomicorriza de *H. leucosarx* mostrando en (g)abundantes hifas emanantes(he) y en (h)en micelio externo(me), manto(m) y red de Hartig (rH).

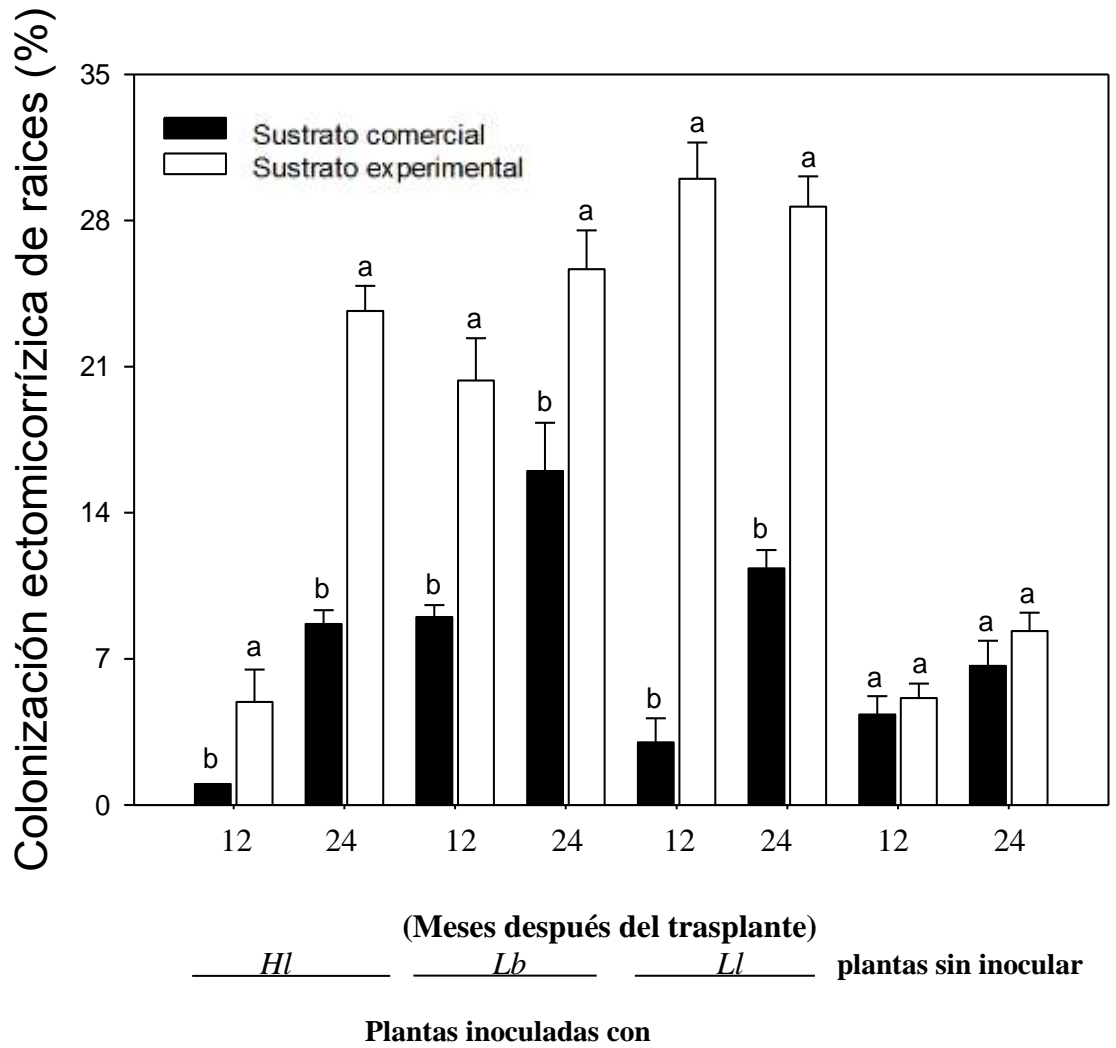


Figura 3. Porcentaje de colonización de plantas de *Pinus greggii*, inoculadas o no, con 3 hongos comestibles ectomicorrízicos, 12 y 24 meses después del trasplante a los contenedores de 5 kg. *Hl*=*Hebeloma leucosarx*; *Lb*=*Laccaria bicolor* y *Ll*=*Laccaria laccata*. Barras con la misma letra para cada fecha en cada tratamiento, son iguales de acuerdo con Tukey ($P \leq 0.05$). Los valores son promedios \pm error estándar de la media ($n=3$).

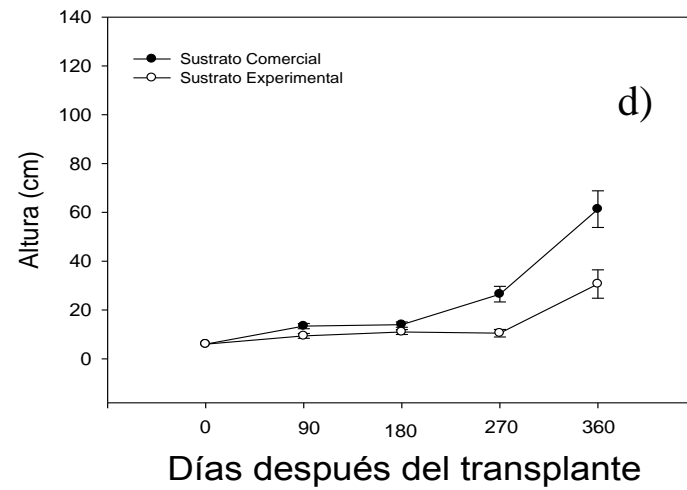
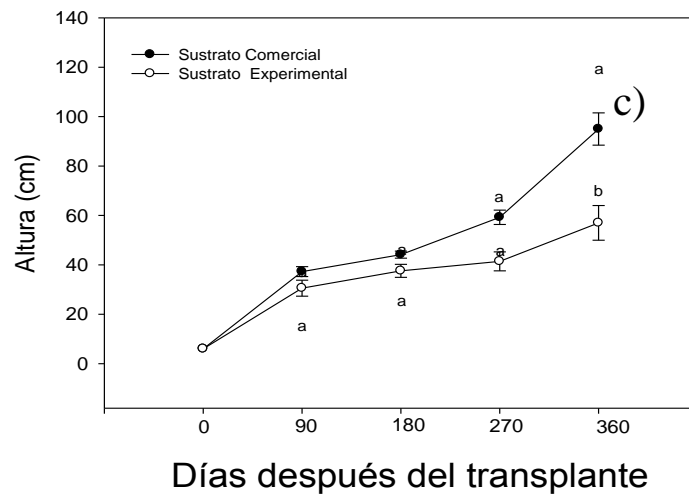
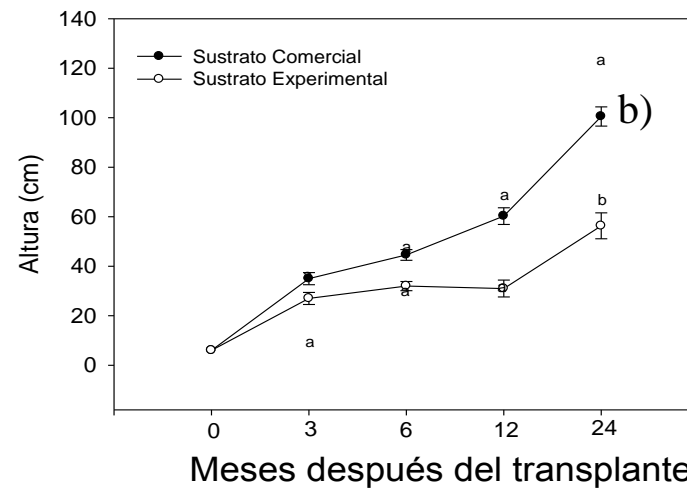
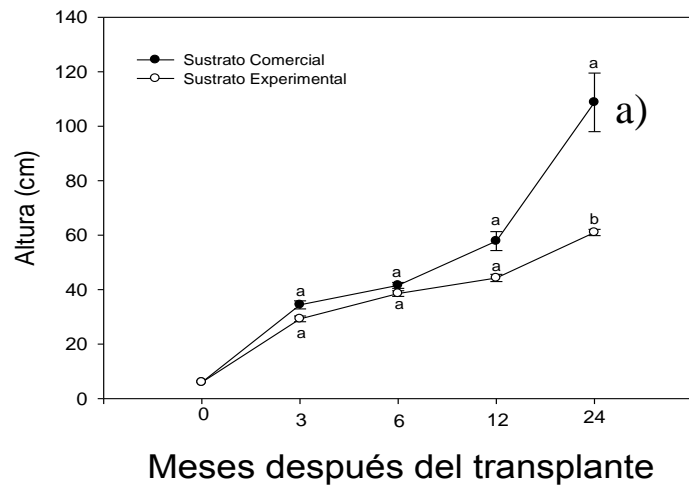


Figura 4. Altura de plantas de *Pinus greggii*, inoculadas o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos, en dos tipos de sustratos 24 meses después de la siembra a los contenedores de 5kg. Plantas inoculadas con (a) *Hebeloma leucosarx*; (b) *Laccaria bicolor*; (c) *Laccaria laccata* y (d) Plantas sin inocular. Para la composición de los sustratos “comercial” y “colpos” ver la sección de materiales y métodos. Valores con la misma letra para cada fecha son iguales según la prueba de comparación de medias de Tukey ($p=0.05$). Los valores son promedios de \pm error estándar de la media ($n=3$).

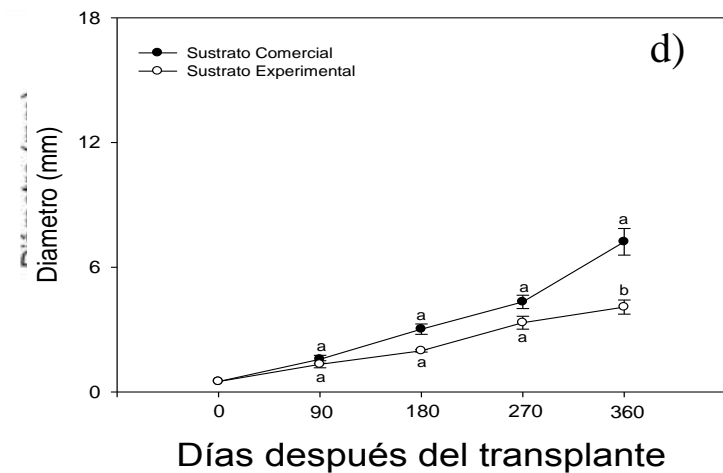
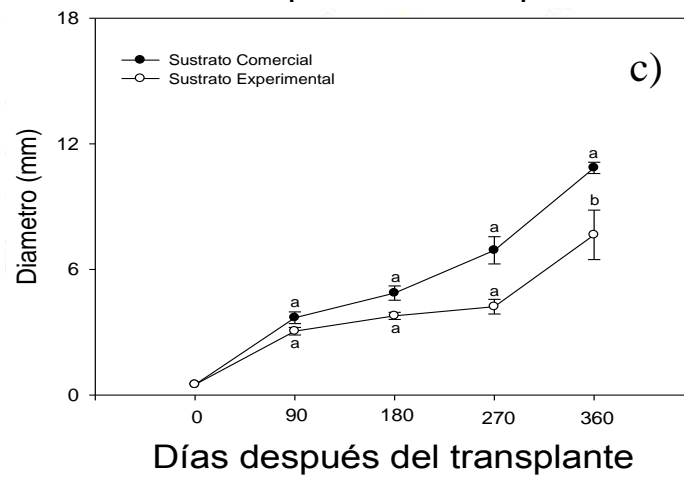
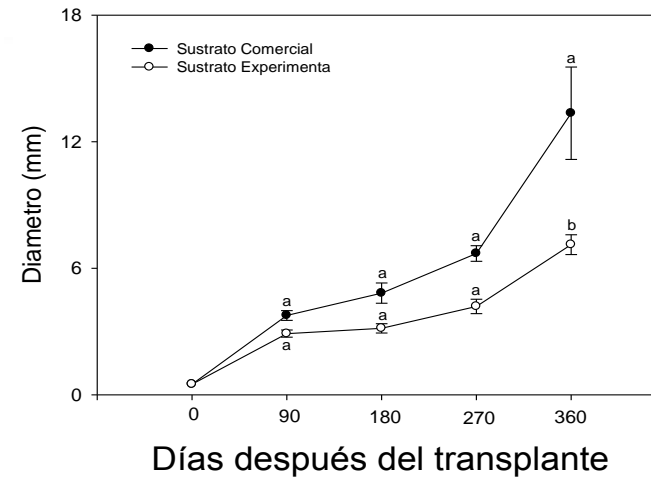
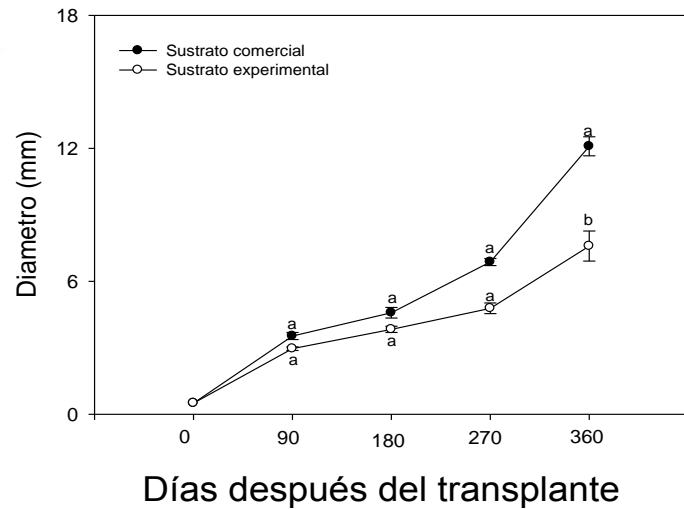


Figura 5. Diámetro del tallo de plantas de *Pinus greggii*, inoculadas o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en dos tipos de sustratos 24 meses después de la siembra a los contenedores de 5kg. Plantas inoculadas con (a) *Hebeloma leucosarx* (b) *Laccaria bicolor*; (c) *Laccaria laccata* y (d) Plantas sin inocular. Valores con la misma letra para cada fecha son iguales según la prueba de comparación de medias de Tukey ($p=0.05$). Los valores son promedios de \pm error estándar de la media ($n=3$).

Tabla 1. Peso seco de parte aérea y parte radical de *Pinus greggii*, de 24 meses de edad inoculadas o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “comercial” y “sustrato experimental”. Ver composición de sustrato en materiales y métodos.

Tratamiento	Sustrato “comercial”			Sustrato “experimental”		
	Parte aérea	Raíz	Total (g)	Parte aérea	Raíz	Total
Plantas inoculadas						
<i>Hebeloma leucosarx</i>	42.55 ± 4.02 a	20.27±1.06a	62.88± 4.73a	7.08 ± 0.28 a	4.8 ± 0.46a	11.88± 0.29a
<i>Laccaria bicolor</i>	41.39± 1.26 b	14.93±0.23b	56.320± 1.49b	6.95 ± 0.28 a	3.733± 0.26a	10.693 ± 0.16a
<i>Laccaria laccata</i>	42.59 ± 2.64 a	11.733±2.13b	54.37 ± 3.09b	6.74 ± 0.85 a	4.8± 0.46a	11.54± 1.27a
Plantas sin inocular	3.55 ± 0.70 c	3.2 ± 3.14c	6.75± 3.8c	2.13 ± 0.26 b	2.13 ± 0.27b	4.26 ± 0.52b

Los datos mostrados son promedios ± error estándar de la media n=3, valores con la misma letra en la misma columna son iguales de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey (p= 0.05).

Tabla 2. Contenido de macronutrientes de plantas de *Pinus greggii*, de 24 meses de edad inoculadas o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “experimental” (ver composición de sustrato en materiales y métodos).

Tratamientos	N	P	K	Ca	Mg
	(mg por planta)				
Parte aérea					
Pi¶ con <i>Hebeloma leucosarx</i>	75.79±3.09 a	7.79±0.31 a	55.95±2.28 a	37.54±1.53 a	34.00±1.38 a
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	49.76±2.01 b	8.35±0.33 a	48.72±1.96 a	29.23±1.18 ab	16.70±0.67 b
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	64.43±8.18 ab	4.72±0.59 b	42.05±5.39 a	25.63±3.25 b	14.84±1.88 b
Psi§	1.52±0.10 c	0.20±0.01 c	1.66±0.11 b	0.69±0.04 c	0.30±0.02 c
Raíz					
Pi¶ con <i>Hebeloma leucosarx</i>	22.08±2.19 a	3.36±0.32 a	11.52±1.10 b	18.72±1.80 a	15.84±1.52 a
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	29.49±2.10 a	3.36±0.24 a	19.41±1.38 a	16.42±1.17 a	15.30±1.09 a
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	28.32±2.27 a	3.36±0.32 a	18.24±1.75 a	18.72±1.80 a	18.24±1.76 a
Psi§	13.55±1.69 b	1.06±0.13 b	12.16±1.52 b	6.61±0.83 b	0.66±0.81 b
Total					
Pi¶ con <i>Hebeloma leucosarx</i>	97.89±1.92 a	11.15±0.20 a	67.47±1.57 a	56.26±1.11 a	49.84±0.95 a
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	79.25±1.24 a	11.71±0.19 a	68.13±1.15 a	45.95±0.70 a	32.01±0.66 b
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	92.75±10.62 a	8.08±0.89 b	60.74±6.96 a	44.35±4.89 a	33.08±3.51 b
Psi§	15.07±1.74 b	1.25±0.14 c	25.98±1.57 b	7.3±0.85 b	0.96±0.09 c

¶Pi = Plantas inoculadas; §Psi = Plantas sin inocular. Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=3. Valores con la misma letra en la misma columna, para cada parte vegetal, son iguales de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey (p=0.05).

Tabla 3. Contenido de macronutrientes de plantas de *Pinus greggii*, de 24 meses de edad inoculados o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “comercial” (ver composición de sustrato en materiales y métodos).

Tratamientos	N	P	K	Ca	Mg
	(mg por planta)				
Parte aérea					
Pi¶ con <i>Hebeloma leucosarx</i>	65.58±114.97ab	43.06±7.51b	218.92±38.21b	136.38±23.80ab	89.72±15.66a
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	46.39±22.36b	36.96±0.26b	242.94±11.62b	89.78±4.29b	55.45±2.65a
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	785.90±48.83a	68.15±4.23a	455.78±28.31a	161.86±10.05a	89.45±5.55a
Psi§	52.08±11.58c	5.57±1.22c	26.10±5.72c	9.68±2.14c	6.16±1.35 b
Raíz					
Pi¶ con <i>Hebeloma leucosarx</i>	293.86±15.46a	20.26±1.06b	62.82±3.30a	143.89±7.57a	204.69±10.77a
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	174.72±12.48b	16.42±0.00b	41.81±2.98b	97.06±6.93b	150.82±10.77b
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	137.28±24.96b	93.88±17.06a	28.16±5.12c	88±16b	92.69±16.85c
Psi§	38.04±0.00c	5.44±0.00b	11.2±0.00d	15.36±0.00c	28.8±0.00d
Total					
Pi¶ con <i>Hebeloma leucosarx</i>	359.44±129.26a	63.32±8.50b	281.74±41.26b	280.27±30.88a	294.41±25.88a
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	221.11±10.04a	53.38±0.26c	284.75±8.66b	186.84±2.69b	206.27±8.13b
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	923.18±72.78a	162.03±21.09a	483.94±33.17a	249.86±25.68ab	182.13±22.15b
Psi§	91.2±11.58b	11.01±1.22c	37.3±5.72c	25.04±2.1c	34.96±1.35c

¶Pi = Plantas inoculadas; §Psi = Plantas sin inocular. Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=3. Valores con la misma letra en la misma columna, para cada parte vegetal, son iguales de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey (p=0.05).

Tabla 4. Contenido de micronutrientos de plantas de *Pinus greggii*, de 24 meses de edad inoculadas o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “experimental” (ver en composición de sustrato en materiales y métodos).

Tratamientos	Na	Fe	Cu	Zn	Mn
	(µg por planta)				
Parte aérea					
Pi¶ con <i>Hebeloma leucosarx</i>	2.01±0.08a	1055.41±43.13a	14.16±0.57a	1870±76.42a	5100.00±208.44a
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	0.41±0.016a	692.52±27.97b	6.96±0.28b	288.84±11.66b	3908.04±157.85ab
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	2.32±0.29a	576.84±73.24b	16.86±2.14a	209.16±26.55bc	3440.08±436.90b
Psi§	0.05±0.03c	17.25±1.15c	0.09±0.06c	8.04±0.56c	33.45±2.23c
Raíz					
Pi¶ <i>Hebeloma leucosarx</i>	0.96±0.09a	18712.08±1800.64a	140.4±1.38c	1471.02±141.56a	1392.00±133.94b
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	1.21±0.08a	14897.86±1064.13ab	44.08±3.2a	190.04±13.6b	5249.06±374.93a
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	0.40±0.39a	12336.00±1187.03b	28.08±2.77b	156.00±15.01b	1116.00±107.38bc
Psi§	0.67±0.08a	3749.33±468.66c	6.04±0.26d	89.06±11.2b	233.06±29.2c
Total					
Pi¶ con <i>Hebeloma leucosarx</i>	2.97±0.05a	19768.21±1766.85a	28.56±0.99b	3341.02±94.00a	6492.00±131.91b
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	1.62±0.07b	15590.38±1041.37ab	51.76±2.97a	479.24±7.83b	9157.01±262.01a
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	2.73±0.35a	12912.84±1251.00b	45.66±4.74a	365.14±40.26b	4556.08±532.61c
Psi§	0.67±0.08c	3766.25±469.24c	7.03±0.30c	98.00±11.49c	266.51±30.37d

¶Pi = Plantas inoculadas; §Psi = Plantas sin inocular. Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=3. Valores con la misma letra en la misma columna, para cada parte vegetal, son iguales de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey (p=0.05).

Tabla 5. Contenido de micronutrientes de plantas de *Pinus greggii*, de 24 meses de edad inoculados o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “comercial” (ver en composición de sustrato en materiales y métodos).

Tratamientos	Na	Fe	Cu	Zn	Mn
	(µg por planta)				
Parte aérea					
Pi¶ con <i>Hebeloma leucosarx</i>	1.25±0.21b	1920.11±335.20b	143.56±25.06a	1686.83±294.48ab	8344.42±1456.73b
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	4.35±0.20a	1175.09±56.23b	66.01±3.15b	1082.67±51.81b	4898.43±234.40b
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	1.49±0.09b	40019.56±2486.59a	191.68±11.91a	1916.85±119.10a	12885.49±800.63a
Psi§	0.11±0.02c	280.13±61.48b	3.153±0.69c	136.4±29.93c	912.26±200.22c
Raíz					
Pi¶ con <i>Hebeloma leucosarx</i>	2.02±0.10b	39763.02±20292.08b	618.13±32.53a	1317.33±69.33a	1742.93±91.73a
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	2.53±0.18a	54499.02±3892.08a	433.06±30.93b	978.13±69.86a	1351.46±96.53a
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	0.70±0.12c	20146.13±3.66c	410.66±74.66b	198.76±191.02b	932.08±169.09b
Psi§	0.88±7.85c	14808.00±0.00d	84.08±0.00c	291.02±0.00b	307.02±0.00c
Total					
Pi¶ con <i>Hebeloma leucosarx</i>	3.28±0.31b	41683.31±2403.18b	761.69±56.37a	3004.16±358.98a	10087.35±1541.07ab
Pi¶ con <i>Laccaria bicolor</i>	6.89±0.03a	55674.29±3836.88ab	499.08±27.79b	2060.80±19.13b	6249.09±138.78b
Pi¶ con <i>Laccaria laccata</i>	2.19±0.21c	60165.70±6059.29a	602.35±85.95ab	2115.61±126.39ab	13818.29±961.73a
Psi§	0.99±0.02d	15088.13±61.48c	87.95±0.69c	427.06±29.93c	1219.46±200.22c

¶Pi = Plantas inoculadas; §Psi = Plantas sin inocular. Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=3. Valores con la misma letra en la misma columna, para cada parte vegetal, son iguales de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey (p=0.05).

Tabla: 6. Relaciones parte aérea: raíz de macronutrientes y micronutrientes de *Pinus greggii*, de 24 meses de edad inoculados o no, con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, crecidos en sustrato “experimental” y un sustrato “comercial” (ver en composición de sustrato en materiales y métodos).

Tratamientos	N	P	k	Ca	Mg	Na	Fe	Cu	Zn	Mn
Plantas crecidas en sustrato "experimental"										
¶Pi con <i>H. leucosarx</i>	3.43	2.31	4.85	2.00	2.14	2.09	0.05	0.1	1.27	3.66
¶Pi con <i>L. laccata</i>	1.68	2.48	2.53	2.51	1.09	0.33	0.04	0.15	1.51	0.74
¶Pi con <i>L. bicolor</i>	2.27	1.4	2.30	1.36	0.81	5.08	0.04	0.60	1.34	3.08
Psi	0.11	0.18	0.13	0.1	0.45	0.07	0.004	1.49	0.09	0.14
¶Pi con <i>H. leucosarx</i> : Psi	31.18	12.83	37.31	20	4.74	29.86	12.5	0.07	14.11	26.14
¶Pi con <i>L. laccata</i> : Psi	0.74	13.78	19.46	25.1	2.42	4.71	10	0.1	16.78	5.29
¶Pi con <i>L. bicolor</i> : Psi	20.64	7.78	17.69	13.60	1.80	82.86	10	0.40	14.89	22.00
Plantas crecidas en sustrato "comercial"										
¶Pi con <i>H. leucosarx</i>	0.22	2.12	3.48	0.94	0.43	0.61	0.04	0.23	12.28	4.74
¶Pi con <i>L. laccata</i>	0.24	2.25	5.81	0.92	0.36	1.71	0.02	0.15	1.1	3.62
¶Pi con <i>L. bicolor</i>	5.72	0.72	16.18	1.83	0.96	2.12	1.98	0.46	9.64	13.82
Psi	1.36	1.02	2.33	0.63	0.21	0.12	0.01	0.03	0.46	2.97
¶Pi con <i>H. leucosarx</i> : Psi	0.16	2.08	1.49	1.49	2.05	5.08	4	7.67	26.70	1.60
¶Pi con <i>L. laccata</i> : Psi	0.18	2.21	2.49	1.49	1.71	14.25	2	5	2.39	1.22
¶Pi con <i>L. bicolor</i> : Psi	4.21	0.71	6.94	2.90	4.47	17.67	198	15.33	20.96	4.65

¶Pi = Plantas inoculadas; §Psi = Plantas sin inocular. Los valores son promedios \pm error estándar de la media, n=3. Valores con la misma letra en la misma columna, para cada parte vegetal, son iguales de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey ($p=0.05$).

4.5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se registró un efecto benéfico en el crecimiento y contenido nutrimental de la especie Neotropical *Pinus greggii* inoculado con cualquiera de las 2 especies de *Laccaria*: *L. laccata* y *L. bicolor*, y de la especie de *Hebeloma*: *H. leucosarx*. Estos resultados muestran el gran potencial que podrían tener cualquiera de las 3 especies evaluadas en la producción de plantas micorrizadas de dicha especie de pino. De particular interés resulta el hecho de que estas especies de hongos tienen gran importancia social, cultural y económica en el Centro de México, en donde son comercializadas y altamente apreciadas como alimento, constituyendo un recurso forestal no maderable de enorme interés en el país (Carrasco-Hernández *et al.*, 2015). El efecto benéfico en términos de crecimiento y contenido nutrimental como consecuencia de especies de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* en otras gimnospermas, principalmente de distribución boreal y templada, ha sido documentado previamente. Por ejemplo, se han registrado efectos benéficos como consecuencia de la inoculación con: i) *Laccaria laccata* con *Pinus pinaster* (Pera y Parladé, 2005); ii) *Laccaria bicolor* con *Pseudotsuga menziesii* (Parladé y Álvarez, 1993; Parladé *et al.*, 1997; Parladé *et al.*, 1999), *Pinus pinea* (Parladé *et al.*, 1997; Rincón *et al.*, 2001), *Pinus pinaster* (Perrin *et al.*, 1994; Parladé *et al.*, 1997; Parladé *et al.*, 1999), y *Pinus sylvestris* (Christophe *et al.*, 2010); y iii) *Hebeloma mesophaeum*, *Laccaria bicolor* y *L. laccata* con *P. pseudostrobus* (Carrasco-Hernández *et al.*, 2011). La importancia de la inoculación ectomicorrízica como un factor en la producción de plantas de interés forestal, para el incremento del contenido de macro y micronutrientes ha sido ampliamente documentada (Castrillon *et al.*, 2015). Incrementos notables en el contenido de macronutrientes como consecuencia de la inoculación ectomicorrízica ha sido documentada previamente por ejemplo de N, P, K (Becquer *et al.*, 2014; Garcia y Zimmermann, 2014; Walker *et al.*, 2004; Ahangar *et al.*, 2012; Diaz *et al.*, 2010), Ca (Parladé *et al.*, 2005) y Mg (Calvaruso *et al.*, 2010). En el caso de micronutrientes, los estudios han sido más escasos, sin embargo se ha documentado por ejemplo, la transferencia de Fe (Rineau *et al.*, 2008) y Zn (Bricking y Heyser, 1994) como consecuencia de la inoculación

ectomicorrízica. Interesantemente, en el presente trabajo se registró la transferencia de Ca, Na y Mn en plantas de *P. greggii* inoculadas por *Laccaria laccata*, *L. bicolor* y *Hebeloma leucosarx*, respectivamente. Hasta donde conocemos, estas observaciones constituyen uno de los pocos registros conocidos a nivel internacional relacionados con la movilización de dichos nutrimentos originados por la inoculación de hongos comestibles ectomicorrízicos en gimnospermas.

En nuestro caso, después de 24 meses, las colonizaciones ectomicorrízicas registradas fueron relativamente modestas. En plantas crecidas en el sustrato comercial, al cual se adicionó el fertilizante químico de liberación lenta Osmocote[®], las colonizaciones fueron de hasta 15%. En contraste, se observaron mayores colonizaciones, de hasta 30%, en plantas inoculadas crecidas en el sustrato experimental. Previamente, se han registrado colonizaciones equivalentes a las registradas en el presente trabajo, con la inoculación de diversas especies de hongos ectomicorrízicos. Por ejemplo: i) Trocha *et al.* (2007) registraron una colonización de 18% a 22% en raíces de *Betula pendula* con *H. mesophaeum*; ii) Rincón *et al.* (2005) registraron 34% de micorrización por *Laccaria laccata* en *Pinus pinea*; iii) Jonsson *et al.* (2001) reportaron colonizaciones de 0 a 2.8% en *Pinus sylvestris* inoculado con *Cenococcum geophilum*; y iv) Barroetaveña *et al.* (2012) reportaron colonizaciones de 11.4, 34.9 y 38.4% al inocular *P. ponderosa* con *H. mesophaeum*, *Rhizopogon roseolus* y *Suillus luteus*, respectivamente. Otros autores han registrado colonizaciones superiores, a las observadas en el presente trabajo. Por ejemplo: i) Jonsson *et al.* (2001) registraron colonizaciones de 55 a 78%, y de 95 a 99% en *Pinus sylvestris* inoculados con *Hebeloma crustuliniforme* y *Laccaria bicolor*, respectivamente; ii) Rincón *et al.*⁴⁹ reportaron una colonización de 81.3% en *Pinus pinea* inoculado con *Rhizopogon roseolus*; iii) Parladé *et al.*⁵² observaron colonizaciones de 50 a 80%, 84% y 90% por *Tuber maculatum*, *Scleroderma citrinum* y *Rhizopogon roseolus* en *Pinus pinaster*; y iv) Duñabeitia *et al.* (2004) registraron colonizaciones de 50 a 80% por *Rhizopogon roseolus* en *Pinus radiata*.

Se ha demostrado que la composición del sustrato influye en la colonización micorrízica. Por ejemplo Rincón *et al.* (2005) encontraron que los porcentajes

de colonización de diversos hongos ectomicorrízicos observados en plantas de *Pinus pinea* crecidas en turba y corteza fueron significativamente menores en comparación con los observados en plantas crecidas en turba y vermiculita. Estos autores reportaron reducciones dramáticas en la micorrización de pinos micorrizados con *Melanogaster ambiguus*, *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma verrucosum*, de 30.9, 58.0 y 65.7, respectivamente a 0% en todos los casos, como consecuencia del tipo de sustrato. Uno de las más interesantes observaciones del presente trabajo, fue que a pesar de que las plantas crecidas en el sustrato con fertilizante de liberación lenta, presentaron en general mayor biomasa aérea y radical, así como mayor contenido de macro y micronutrientes, en comparación con las plantas crecidas en sustrato experimental, su colonización ectomicorrízica fue conspicuamente menor. Al igual que en nuestro caso, Molina y Trappe. (1984) registraron que la adición del fertilizante de liberación lenta Osmocote®, originó reducciones en la colonización ectomicorrízica de *Pseudotsuga menziesii* inoculadas con esporas de *Rhizopogon vinicolor* y *R. colossus*. Reducciones moderadas de colonización por *Pisolithus tinctorius*, de 100 a 81% fueron registradas también en *Populus tremuloides* con la aplicación de Osmocote®, en relación a plantas no fertilizadas (Mahony, 2005). Se ha registrado que la fertilización química es un factor que, en términos generales, reduce la colonización de diversos hongos ectomicorrízicos (Valenzuela *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010; Vaario *et al.*, 2009; Ruehle, 1980). Sin embargo, Mason *et al.* (2000) reportaron que la reducción de la colonización ectomicorrízica de *Hydnangeum carneum* y *Laccaria fraterna* en *Eucalyptus globulus*, depende principalmente de las dosis de fertilización fosfatada, más que de la fertilización nitrogenada. Estos autores encontraron que altas dosis de fertilización de P, originaron decrementos en la colonización ectomicorrízica, independientemente de la fertilización nitrogenada, demostrando la importancia de la interacción entre nutrientes minerales disponibles en la solución del suelo. Mientras tanto, Rincón *et al.* (2007) encontraron que la fuente de fertilización, incluyendo fertilizantes de liberación lenta o solubles, fue un factor que afectó diferencialmente la colonización ectomicorrízica de *Pisolithus tinctorius* y *Melanogaster ambiguus* en *Pinus pinea*, una especie de pino mediterráneo. Sin embargo, existen

también estudios que han registrado que la fertilización es un factor que no modifica los porcentajes de colonización ectomicorrízica, por ejemplo de *Rhizopogon roseolus* en *Pinus ponderosa* (Martínez *et al.*, 2007) y de *Hebeloma longicaudum*, *L. bicolor*, *Paxillus involutus*, and *P. tinctorius* en diferentes especies de *Pinus*, *Picea* y *Larix* (Khasa *et al.*, 2001). Esto podría demostrar que otro factor implicado en la influencia de la fertilización en la colonización ectomicorrízica podría ser la combinación de micobiontes y fitobiontes, dado que es poco probable que todas las combinaciones ectomicorrízicas presenten las mismas respuestas a la fertilización química. En resumen, se ha demostrado previamente que la influencia de la fertilización en la colonización ectomicorrízica puede estar influenciada por diversos factores dentro de los que se incluyen: i) las diferentes combinaciones de micobiontes-fitobiontes; ii) la interacción entre nutrimentos, por ejemplo relaciones N-P; y iii) las fuentes de fertilización, ya sea fertilizantes de liberación lenta o soluble. Se ha demostrado que la frecuencia incrementada de fertilización puede modificar la estructura de comunidades ectomicorrízicas presentes, dado que por ejemplo existen especies nitrofilicas que ya sea toleran altas tasas de fertilización; o bien resultan beneficiadas con dicha práctica, por ejemplo *Thelephora terrestris*, *Hebeloma* spp., y *Cenococcum geophilum* (Trocha *et al.*, 2006; Fransson *et al.*, 2000); mientras tanto otras especies como *Piloderma* spp. Pueden resultar no afectadas sustancialmente; y otras más, ser sensibles y reducir su abundancia relativa a dicha fertilización como *Suillus* spp. y *Cortinarius* spp (Jones *et al.*, 2012). En el presente trabajo, independientemente de las especies de hongos ectomicorrízicos evaluados se observó una conspicua reducción en la colonización para las 3 especies fúngicas en la presencia del fertilizante de liberación lenta Osmocote®. La implicación obvia de este hecho, es que si las plantas crecidas en sustrato comercial con el fertilizante químico Osmocote®, son trasplantadas a áreas deforestadas que carezcan de presencia de propágulos ectomicorrízicos, a pesar de su mayor biomasa, sus posibilidades de supervivencia serían más reducidas, en comparación con las plantas con menor biomasa, crecidas en ausencia de Osmocote®, las cuales por sus mayores porcentajes de colonización tendrían mayores posibilidades de supervivencia al ser trasplantadas a condiciones de campo. Esto debido a que se ha demostrado

previamente, que la colonización ectomicorrízica es un factor crucial en la supervivencia de pinos al ser llevados de vivero a campo (Sánchez-Zabala *et al.*, 2013).

4.6. Bibliografía

1. Ahangar MA, Dar HG, Bhat ZA. Growth response and nutrient uptake of blue pine (*Pinus wallichiana*) seedlings inoculated with rhizosphere microorganisms under temperate nursery conditions. *Ann. For. Res.* 2012;55:217-227.
2. Allen SE, Grimshaw HM, Parkinson JA, Quarmby C. Chemical analysis of ecological materials. Oxford, UK Blackwell. Scientific Publications. 1997.
3. Barroetaveña C, Bassani NV, Rajchenberg M. inoculación micorrizica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimientos de las plántulas en vivero. *Bosque.* 2012;33:163-169.
4. Becquer A, Trap J, Irshad U, Ali MA, Plassard C. From soil to plant, the journey of P through trophic relationships and ectomycorrhizal association. *Frontiers in Plant Science.* 2014;5:548.
5. Bremner JM. Total nitrogen. In: black, edit. *Methods of soil analysis.* Madison, Wisconsin. American Society of Agronomy, 1965. p. 1149-1178.
6. Bricking H, Heyser W. The effect of ectomycorrhizal fungi on Zn uptake and distribution in seedlings of *Pinus sylvestris L.* *Plant Soil.* 1994;167:203-212.
7. Cairney JWG, Chambers SM. *Ectomycorrhizae fungi: key genera in profile.* Berlin, Germany. Springer. 1999.
8. Calvaruso C, Marie-pierre T, Uroz S, Leclere E, Kies A, Frey-Klett P. *Laccaria bicolor* S238N improves Scots pine mineral nutrition by increasing root nutrient uptake from soil minerals but does not increase mineral weathering. *Plant Soil.* 2010;328:145-154.
9. Carrasco-Hernández V, Pérez-Moreno J, Espinosa-Hernández V, Almaraz-Suárez JJ, Quintero-Lizaola R, Torres-Aquino M. Contenido

- de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. Rev. Chil. Hist. Nat. 2011;84:83-96.
10. Carrasco-Hernández V, Pérez-Moreno J, Quintero-Lizaola R, Espinosa-Solares T, Lorenzana-Fernández A, Espinosa HV. Edible species of the fungal genus *Hebeloma* and two Neotropical pines. Pak. J. Bot. 2015;47:319-32
 11. Castrillon M, Leon JD, Carvajal D, Osorio NW. Effectiveness of single and combined ectomycorrhizal inocula on three species of *Pinus* at nursery. Communications in soil science and plant analysis. 2015. p.169-179.
 12. Chávez MD, Pereira CG, Machuca H. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. Bosque. 2009;30:4-9.
 13. Christophe C, Turpault M, Uroz S, Leclerc E, Kies A, Frey-Klett P. *Laccaria bicolor* S238N improves Scots pine mineral nutrition by increasing root nutrient uptake from soil minerals but does not increase mineral weathering. Plant Soil. 2010;328:145–154.
 14. Diaz G, Carrillo C, Honrubia M. Mycorrhization, growth and nutrition of *Pinus halepensis* seedlings fertilized with different doses and sources of nitrogen. For. Sci. 2010; 67:10.1051.
 15. Duñabeitia MK, Hormilla S, Garcia-Plazaola J, Txarterina K, Arteche U, Becerril JM. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. Mycorrhiza. 2004;14:11-18.
 16. Dvorak WS, Kietzka JE, Donahue JK. Three-year survival and growth of provenances of *Pinus greggii* in the tropics and subtropics. For. Ecol. Manag. 1996;83:123-131.
 17. Fernández VM, Barroetaveña C, Bassani V, Ríos F. Rentabilidad del aprovechamiento del hongo comestible *Suillus luteus* para productores forestales y para familias rurales de la zona cordillerana de la provincia del Chubut, Argentina. Bosque. 2012;33:43-52.
 18. Fransson PMA, Taylor AFS, Finlay RD. effects of continuous optimal fertilization on belowground ectomycorrhizal community structure in a Norway spruce forest. Tree Physiology. 2000;20:599-606.

19. Garcia K, Zimmermann DS. The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:337.
20. Gómez-Romero M, Soto-Correa JC, Blanco-García JA, Sáenz-Romero C, Villegas J, Lindig-Cisneros R. Estudio de especies de pino para restauración de sitios degradados. *Agrociencia*. 2012;46:795-807.
21. Guerin-Laguette A, Conventi S, Plassard RC, Mousain D. The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of an rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza*. 2003;13:17–25.
22. Hodge GR, Dvorak WS. Growth potential and genetic parameters of four Mesoamerican pines planted in the Southern Hemisphere. *Southern Forests*. 2012;74:27–49.
23. Jonsson LM, Nilsson DA, Zachrisson O. Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos*. 2001;93:353-364.
24. Jones DM, Phillips AL, Treu R, Ward V, Berch MS. Functional responses of ectomycorrhizal fungal communities to long-term fertilization of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud. var. *latifolia* Engelm.) stands in central British Columbia. *Applied Soil Ecology*. 2012;60:29-40.
25. Kanzler A, Payn K, Nel A. Performance of two *Pinus patula* hybrids in southern Africa. *Southern Forests*. 2012;74:19-25.
26. Khasa PD, Sigler L, Chakravarty P, Dancik BP, Erickson L, Curdy MD. Effect of fertilization on growth and ectomycorrhizal development of container-grown and bare-root nursery conifer seedlings. *New Forests*. 2001; 22:179-197.
27. Mahony CP. Effects of native ectomycorrhizal fungi on aspen seedlings in greenhouse studies. Master Thesis, 2005. Montana State University. Bozeman, MO, USA.
28. Martínez DB, Barroetaveña C, Rajchenberg M. Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque*. 2007;28:226-233.

29. Mason PA, Ibrahim K, Ingleby K, Munro RC, Wilson J. Mycorrhizal development and growth of inoculated *Eucalyptus globulus*(Labill.) seedlings in wet and dry conditions in the glasshouse. For. Ecol. Manag. 2000; 128:269
- Molina R, Trappe J. Mycorrhiza Management in Bareroot Nurseries. In: Duryea ML, Landis TD (Eds.) Forest Nursery Manual: Production of Bareroot Seedlings. 1984.
30. Mueller GM. Numerical taxonomic analyses on *Laccaria* (Agaricales). Mycologia. 1985; 77:121-129.
31. Obase K, Tamai Y, Yajima T, Miyamoto T. Mycorrhizal associations in woody plant species at the Mt. Usu volcano, Japan. Mycorrhiza. 2007; 17:209-215.
32. Oliveira RS, Franco RA, Vosátka M, Castro LMP. Management of nursery practices for efficient ectomycorrhizal fungi application in the production of *Quercus ilex*. Symbiosis. 2010; 52:125–131.
33. Oliveira RS, Franco AR, Castro PML. Combined use of *Pinus pinaster* plus and inoculation with selected ectomycorrhizal fungi as an ecotechnology to improve plant performance. Ecol. Eng. 2012; 43:95-103.
34. Parladé J, Álvarez IF. Inoculation of aseptically grown Douglasfir with pairs of ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza. 1993; 3:93-96.
35. Parladé J, Pera J, Alvarez IF. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza. 1996; 6:237–245.
36. Parladé J, Pera J, Álvarez IF. The mycorrhization controlée du Douglas dans le nord de 'Espagne: Premieres résultats en plantation. Revue Forestière Française. 1997; 49:163-173.
37. Parladé J, Álvarez IF, Pera J. Coinoculation of containerized Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings with the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* and *Rhizopogon* spp. Mycorrhiza. 1999; 8:189-195.
38. Pera J, Parladé J. Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España. Investigación Agraria: Sist. Rec. For. 2005; 14:419-433.

39. Perrin R, Pera J, Parladé J. Réceptivité des sols forestiers à l'association ectomycorrhizienne. *Acta Botánica Gallica*. 1994; 141:541-545.
40. Pereira G, Chávez D, Machuca A, Martínez SL., Honrubia M. Trufas. Alternativa de Cultivo para Agroforestadores de la Provincia del Bío Bío. Universidad de Concepción, Chile. 2010. p. 46.
41. Pérez-Moreno, J., A. Lorenzana-Fernández, V. Carrasco-Hernández, Yescas-Pérez A. Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. Colegio Postgraduados, SEMARNAT, CONACYT. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 2010. p.167.
42. Pérez-Moreno J, Martínez-Reyes M. Edible Ectomycorrhizal Mushrooms: Biofactories for Sustainable Development. En: Guevara-Gonzales R, Torres-Pacheco I, Editors. *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*. Springer International Publishing. 2014. p. 151-233.
43. Read DJ, Pérez-Moreno J. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems a journey towards relevance?. *New Phytologist*. 2003; 157:475–492.
44. Rincón A, Álvarez IF, Pera J. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 2001; 11:265-271.
45. Rincón A, Parladé J, Pera J. Effects of ectomycorrhizal inoculation and the type of substrate on mycorrhization, growth and nutrition of containerised *Pinus pinea* L. seedlings produced in a commercial nursery. *Ann. For. Sci*. 2005; 62:1–6.
46. Rincon A, Parlade J, Pera J. Influence of the fertilisation method in controlled ectomycorrhizal inoculation of two Mediterranean pines. *Ann. Sci*. 2007; 64:577–583.
47. Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity*. 2008; 33:1-45.

48. Rineau F, Pierre-Emmanuel C, Uroz S, Buée M, Garbaye J. Simple microplate assays to measure iron mobilization and oxalate secretion by ectomycorrhizal tree roots. *Soil Biology*. 2008; 40:2460–2463.
49. Ruehle LJ. Ectomycorrhizal colonization of container-grown northern red oak as affected by fertility. USDA.1980.
50. SAS. Statistical Analysis System Institute. SAS User’s guide. Version 9. Cary, NC, USA: SAS Institute. 2002.
51. Salomón SM, Rajchenberg M, Barroetaveña C. Evaluación del estado micorrízicos de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego, sin manejo de la micorrización. *Bosque*. 2009; 30:127-134.
52. Sánchez-Zabala J, Majada J, Martín-Rodríguez N, Gonzales-Muria C, Ortega U, Alonso- Graña M, Arana O, Duñabeitia KM. Physiological aspects underlying the improved outplanting performance of *Pinus pinaster* Ait. seedlings associated with ectomycorrhizal inoculation. *Mycorrhiza*. 2013; 8:627-640.
53. Sanchez-Zabala J, Majada J, Martín-Rodrigues N, Gonzalez-Murua C, Ortega U, Graña MA, Arana O, Duñabeitia KM. Physiological aspects underlying the improved outplanting performance of *Pinus pinaster* Ait. seedlings associated with ectomycorrhizal inoculation. *Mycorrhiza*. 2013. p.627-540.
54. Sousa RN, Franco RA, Oliveira SR, Castro MLP. Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. Elsevier. 2012; 95:269-274.
55. Sun Y, Gu JC, Zhuang HF, Wang ZQ. Effects of ectomycorrhizal colonization and nitrogen fertilization on morphology of root tips in a *Larix gmelinii* plantation in northeastern China. *Ecol. Res*. 2010; 25:295–302.
56. Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal symbiosis. Third edition. Academic Press, New York, USA. 2008.
57. Teste PF, Lieffers JV, Strelkov ES. Ectomycorrhizal community responses to intensive forest management: thinning alters impacts of fertilization. *Plant Soil*. 2012; 360:333-347.

58. Trocha KL, Rudawska M, Leski T, Dabert M. genetic diversity of naturally established ectomycorrhizal fungi on Norway spruce seedlings under nursery conditions. *Microb. Ecol.* 2006; 52:418-425.
59. Trocha LK, Oleksyn J, Turzanska E, Rudawska M, Reich PB. Living on the edge: ecology of an incipient *Betula*-fungal community growing on brick walls. 2007; 21:239–247.
60. Vaario LM, Tervonen A, Haukioja K, Haukioja M, Pennanen T, Timonen S. The effect of nursery substrate and fertilization on the growth and ectomycorrhizal status of containerized and outplanted seedlings of *Picea abies*. *Can. J. For. Res.* 2009; 39:64-75.
61. Valenzuela FE, Barría AD, Martínez AO, Godoy BR, Oyarzún BC. Influencia de la fertilización nitrogenada sobre la abundancia y diversidad de basidiocarpos Agaricales *s.l.* en un bosque templado de *Nothofagus obliqua*. *Bosque.* 2013; 34:63-70.
62. Villegas-Jiménez D, Rodríguez-Ortiz G, Velasco-Velasco V, Ruiz-Luna J, Carrillo-Rodríguez J, Ramírez-Sánchez S. Partición de biomasa aérea en procedencias de *pinus greggii* plantadas en el sur de México. *Rev. Fitotec. Mex.* 2013; 36:421 – 427.
63. Walker RF, McLaughlin SB, West DC. Establishment of Sweet Birch on Surface Mine Spoil as Influenced by Mycorrhizal Inoculation and Fertility. *Restoration Ecology.* 2004; 12:8-9.
64. Walker JKM, Jones MD. Little evidence for niche partitioning among ectomycorrhizal fungi on spruce seedlings planted in decayed wood versus mineral soil microsites. *Oecologia.* 2013; 173:1499-1511.
65. Wyk G van. *Pinus greggii*. In: *Pines of Silvicultural Importance.* Forestry Compendium Global Module, CAB International. 2002. p. 144-145.
66. Zambonelli A, Bonito GM. Gives a modern approach to biology, cultivation and ecology of fungi. Springer. 2012. p. 401.

CAPITULO V

CONCLUSIONES GENERALES

Las plantas del árbol Neotropical *P. greggii* inoculadas con *L. laccata*, *L. bicolor* y *H. leucosarx* presentaron mayor altura, diámetro del tallo, biomasa aérea y radical en comparación con plantas no inoculadas, independientemente del sustrato de crecimiento. Una tendencia similar se observó en el contenido de macronutrientes, principalmente N, K y Ca; y de micronutrientes, principalmente Na, Zn y Mn. A pesar de que las plantas crecidas en el sustrato comercial presentaron mayor biomasa aérea y radical, así como mayor contenido nutricional, tuvieron una colonización ectomicorrízica conspicuamente menor. Asimismo, plantas crecidas en el sustrato experimental presentaron una mayor transferencia nutricional a la parte aérea, principalmente de N, P, Ca, K, Na y Mg, en comparación con las plantas crecidas en el sustrato comercial. Estos datos demuestran que la selección de sustrato, es un factor clave en la producción de plantas ectomicorrizadas y en la eficiencia de transferencia nutricional vía los hongos ectomicorrízicos. Existieron claras diferencias en la transferencia nutricional a la parte aérea de los pinos inoculados, entre las especies fúngicas evaluadas. De particular interés, resultó la transferencia de Ca, Na y Mn en plantas inoculadas por *Laccaria laccata*, *L. bicolor* y *Hebeloma leucosarx*, respectivamente, siendo el presente uno de los pocos trabajos a nivel internacional que reportan la transferencia de dichos nutrientes en gimnospermas, vía hongos ectomicorrízicos. La información obtenida, demuestra asimismo que las 3 especies de hongos comestibles ectomicorrízicos evaluados, los cuales son ampliamente comercializadas en el centro de México, constituyen una importante fuente potencial de inóculo ectomicorrízico para la producción de plantas de *Pinus greggii*, el cual es un pino nativo de Mesoamérica con gran potencial en el establecimiento de plantaciones y reforestaciones en áreas tropicales y subtropicales.

ANEXO 1

Inoculación de *Pinus greggii* con *Laccaria proxima* y suelo agrícola con uso forestal previo, utilizando un sustrato comercial

En México existe una seria preocupación por la reducción de masas boscosas tanto de zonas templadas como tropicales, afectadas ambas por la deforestación. Se ha estimado una disminución de 192,500 ha de bosques en áreas templadas y de 477,330 ha de bosques tropicales por año, respectivamente (Ricón *et al* 1999). Frente a este escenario, es importante la utilización biotecnológica de los hongos ectomicorrízicos, dado que la simbiosis ectomicorrízica tiene un papel estructural y funcional de gran relevancia en los ecosistemas forestales (Smith y Read, 1997). Dicha simbiosis mutualista se establece entre las raíces de las plantas gimnospermas y angiospermas y una amplia gama de basidiomicetes y ascomicetes en más de 20,000 especies de hongos especializados del suelo (Taylor y Alexander, 2005). Existen, algunas experiencias de los efectos favorables de la micorrización en *Pinus greggii*, la cual es una especie de gran importancia en programas de reforestación para la recuperación de suelos degradados en diferentes partes de México y en programas de plantaciones comerciales en sitios marginales donde no se adaptan otras especies de *Pinus*. En México, es la cuarta especie de pino en términos de importancia en plantaciones del Programa Nacional de Reforestación. (López et al., 1999; Salazar et al., 1999; Azamar *et al.*, 2000), y presenta asimismo un gran potencial para adaptarse a condiciones limitantes de humedad (Vargas y Muñoz, 1988, 1991; López y Muñoz, 1991). En el presente bioensayo se pretendió conocer si existen propágulos viables, utilizando como inóculo suelo forestal de un área cultivada agrícola durante 90 años y que anteriormente era bosque, y compararla con plantas inoculadas con *Laccaria proxima*. Se aplicaron 3 tratamientos los cuales se muestran en el Cuadro A1. El hongo ectomicorrízico utilizado fue colectado en el mercado de Ozumba, *Laccaria proxima*, una especie ectomicorrízica comestible de gran importancia en México (Pérez- Moreno *et al.*, 2010).

Objetivo general. Evaluar el crecimiento y mortalidad en Plantas de *Pinus greggii* crecidas en un sustrato comercial, inoculadas con un hongo ectomicorrízico, *Laccaria próxima* y utilizando una fuente de inóculo, nombrado suelo agrícola, lo anteriormente era una aérea cultivada, se pretende saber si existen propágulos ectomicorrízicos viables.

Montaje y descripción del experimento. El inóculo de *Laccaria proxima*, procedía del mercado de Ozumba, en el estado de México. Se compraron 50 kg de hongos comestibles del género *Laccaria*, los esporomas fueron seleccionados de acuerdo sus características macro y microscópicas siguiendo a Largent (1973), Largent *et al.*, (1977) y Muller (1992). Para la obtención de inóculo, se cortaron los estípites de los esporomas de la especie de *Laccaria proxima*, los píleos fueron secados en un deshidratador marca JERSA, el cual contaba con 20 charolas. La deshidratación fue efectuada a una temperatura de 35 °C, y posteriormente fueron molidos en un Picador Molinex (utilizado para moler los hongos secos). Cuando se utilizó como fuente de inóculo suelo de plantación, éste procedía del Monte Tláloc, Texcoco estado de México y se extrajo de un área que anteriormente tuvo uso forestal y actualmente es utilizada para siembras de cultivos como, maíz, arroz y cebada. Se utilizaron tubetes de plásticos negros de 140 mL, los cuales fueron lavados y desinfectados con alcohol, se agregó una capa muy fina de tezontle en la superficie del tubete, después fue rellenado todo el tubete con el sustrato que se utilizó, denominado sustrato comercial. Las semillas de *Pinus greggii* se remojaron en agua durante 24 h, posteriormente se desinfectaron con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a 30%, manteniendo las semillas en agitación durante 20 minutos y finalmente se enjuagaron con agua destilada. Fueron colocadas 3 semillas por tubete a una profundidad de 1 cm, finalmente se cubrieron con una capa superficial del sustrato mencionado anteriormente.

Cuadro A1-1. Tratamientos establecidos en el bioensayo con *Pinus greggii*, crecidos en sustrato comercial, descrito en el capítulo IV.

Número de tratamiento	Inóculo	Sustrato	Réplicas
1	Testigo	Comercial	100
2	<i>L. proxima</i>	Comercial	100
3	Suelo agrícola	Comercial	100

La siembra del experimento se llevó acabo el 12 de enero del 2014. El sustrato comercial fue preparado a partir de una mezcla de peat moss, 60% (31 litros), vermiculita, 20% (10 litros), agrolita 15% (7.7 litros) y corteza 5% (2.60 litros); adicionalmente se adicionaron 51 g del fertilizante de liberación lenta Osmocote®, con un contenido de 15:9:12 mg por litro de N-P-K. Una proporción reducida de dicho fertilizante es de 1g de Osmocote® por litro de sustrato. El inóculo ectomicorrízico utilizado fue 1g de inóculo por planta, conteniendo de 10^6 a 10^7 esporas. En el caso de plantas inoculadas con suelo agrícola, se emplearon 10g de inóculo por planta antes de la siembra de semillas. Se efectuaron riegos cada tercer día con agua destilada y Captan en una proporción de 2 g por litro de agua.

Dispositivos experimentales. Los dispositivos consistieron en charolas de 37 cm² utilizadas para colocar tubetes de 130 mL los cuales se les acondicionaron solo 25 tubetes, posteriormente en la parte inferior se colocó en la parte un recipiente colector de agua con cierta inclinación, y se cocoló una manguera que permitió el flujo del agua de riego hacia un recipiente de almacenamiento de mayor capacidad. En la parte superior de las charolas se colocó una estructura cubica con soportes de madera de 40 cm de altura, los cuales fueron sujetos en cada esquina del cuadrado y se colocaron plásticos en cada lado. El objetivo de estos

dispositivos fue evitar la dispersión de esporas entre tratamientos. En total se utilizaron 12 dispositivos experimentales, cuatro para los testigos, cuatro para las plantas inoculadas con *L. proxima* y los otros cuatro para plantas inoculadas con suelo agrícola con uso forestal previo.

Resultados preliminares. Este estudio no fue concluido, sin embargo en el caso de la altura 340 días después de la siembra, se observó que el mejor inóculo fue el suelo agrícola, siendo seguido de *Laccaria proxima* y finalmente de las plantas no inoculadas (Figs. A1-1 y A1-2). En contraste, 340 días después de la siembra no se observaron diferencias entre tratamientos para la variable diámetro del tallo (Figura A1-1). De manera similar que para el diámetro del tallo no se observaron diferencias relevantes en la variable supervivencia. Estas observaciones iniciales solo podrían ser explicadas al efectuar evaluaciones en un periodo mayor de tiempo, evaluando otras variables tales como porcentajes de colonización o contenidos de macro y micronutrientes a futuro.

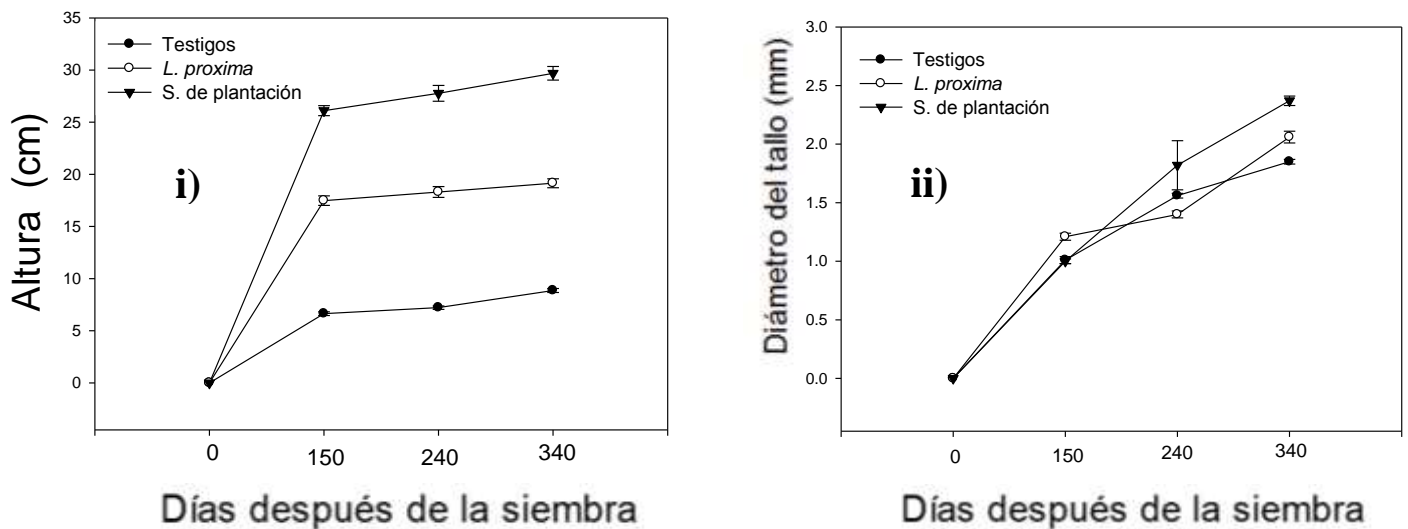


Figura A1-1. Altura (i) y diámetro del tallo (b) de plantas de *Pinus greggii*, inoculadas o no, con el hongo comestible ectomicorrízico *Laccaria próxima* o con suelo agrícola, con uso forestal previo, crecidos en un sustrato 12 meses después de la siembra. S. de plantación = suelo agrícola con uso forestal previo.

Cuadro A1-2. Supervivencia de *Pinus greggii* inoculadas o no, con *Laccaria proxima* o con suelo agrícola con uso forestal previo, 7 meses después de la siembra.

Tratamiento	Especie de <i>Pinus</i>	Total	Supervivencia %	Mortalidad %
<i>Laccaria proxima</i>	<i>P. greggii</i>	100	90%	10%
Suelo agrícola	<i>P. greggii</i>	100	93%	7%
Testigo	<i>P. greggii</i>	100	89%	11%

LITERATURA CITADA

- Azamar O., M., J. López U., J.J. Vargas H., y A. Plancarte B. 2000. Evaluación de un ensayo de procedencias-progenies de *Pinus greggii* y su conversión a huerto semillero. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Reforestación. Programa Nacional de Reforestación- Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 7 p.
- López, A., J.L., J.J. Vargas H.C., Ramírez H. y J. López U. 1999. Variación intraespecífica en el patrón de crecimiento del brote terminal de *Pinus greggii* Englem. Revista Chapingo, serie Ciencias forestales y del Ambiente 5: 133-140.
- Pérez- Moreno, J., A. Lorenza, V. Carrasco y A. Yescas. 2010. Los hongos comestibles silvestres del parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. Colegio de Postgraduados, CONACyT, SEMARNAT. 167 p.
- Rincón, E., Huerta, E. y Alvarez, M., 1999. Respuesta de plantas al cambio climático: un enfoque ecofisiológico. Ciencia 5:5-15.
- Salazar G., G.J., J. J. Vargas H., J. Jasson M., J.D. Molina G., C. Ramírez H. y J. López U. 1999. Variación en el patrón de crecimiento en altura de cuatro especies de *Pinus* en edades tempranas. Madera y Bosques 5: 19-34.
- Smith, S. E. Read, D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Second edition. Academic Press, London. 605 p.
- Taylor, A.F.S. and Alexander, I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real word. Mycologist 19:12-112.
- Vargas H., J.J Y A. Muños O. 1988. Resistencia en sequia: II Crecimiento y supervivencia en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. Agrociencia 72:197-208.
- Vargas H., J.J y A. Muñoz O. 1991. Potencial hídrico, transpiración y resistencia estomatal en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. Agrociencia, Serie Recursos Naturales Renpables 1: 25-38.

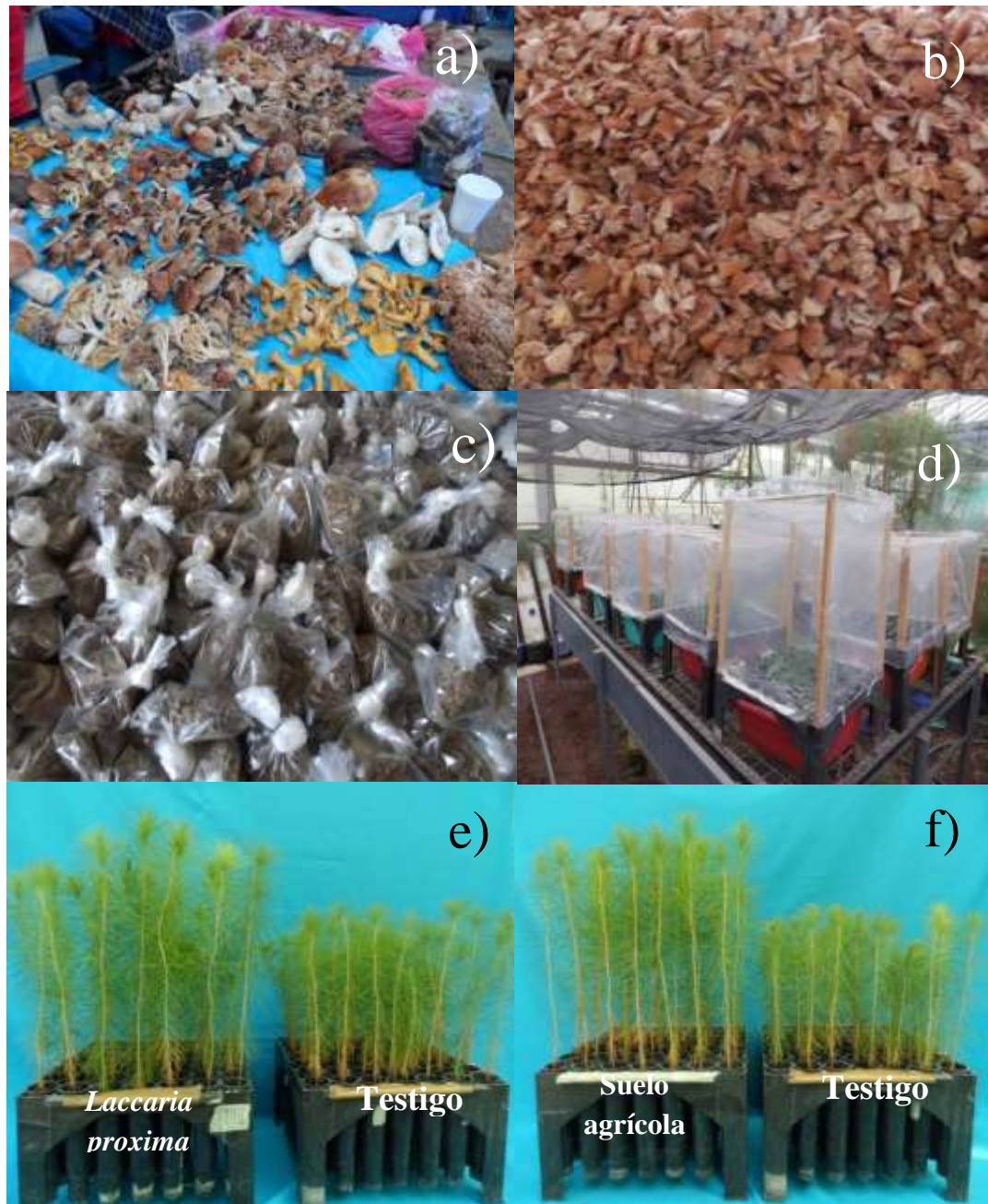


Figura A1-2. a) Aspectos generales del bioensayo y venta de hongos ectomicorrízicos comestibles *Laccaria* spp. en el mercado de Ozumba, estado de México; b) Preparación de inóculo de *Laccaria* spp. en un deshidratador de frutas; (c) Preparación de inóculo de suelo agrícola con la cantidad de 10 gramos; (d) Dispositivos experimentales; (e) Comparación de plantas inoculadas con *L. proxima* y plantas sin inocular; (f) Comparación de plantas inoculadas de suelo agrícola y plantas sin inocular; (f).

LITERATURA CITADA

- Azamar O., M., J. López U., J.J. Vargas H., y A. Plancarte B. 2000. Evaluación de un ensayo de procedencias-progenies de *Pinus greggii* y su conversión a huerto semillero. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Reforestación. Programa Nacional de Reforestación- Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 7 p..
- López, A., J.L., J.J Vargas H.C., Ramírez H. y J. López U. 1999. Variación intraespecífica en el patrón de crecimiento del brote terminal de *Pinus greggii* Englem. Revista Chapingo, serie Ciencias forestales y del Ambiente 5: 133-140.
- Pérez- Moreno, J., A. Lorenza, V. Carrasco y A. Yescas. 2010. Los hongos comestibles silvestres del parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. Colegio de Postgraduados, CONACyT, SEMARNAT. 167 p.
- Rincón, E., Huerta, E. y Alvarez , M, 1999. Respuesta de plantas al cambio climático: un enfoque ecofisiológico. Ciencia 5:5-15.
- Salazar G., G.J.,J. J. Vargas H.,J. Jasson M., J.D. Molina G., C. Ramírez H. y J. López U. 1999. Variación en el patrón de crecimiento en altura de cuatro especies de *Pinus* en edades tempranas. Madera y Bosques 5: 19-34.
- Smith, S. E. Read, D.J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Second edition. Academic Press, London. 605 p.
- Taylor, A.F.S. and Alexander, I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real word. Mycologist 19:12-112.
- Vargas H., J.J Y A. Muñoz O. 1988. Resistencia en sequia: II Crecimiento y supervivencia en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. Agrociencia 72:197-208.
- Vargas H., J.J y A. Muñoz O. 1991. Potencial hídrico, transpiración y resistenciaestomatal en plántulas de cuatro especies de *Pinus*. Agrociencia, Serie Recursos Naturales Renpvables1: 25-38.

ANEXO 2

Evaluación de *P. patula* y *P. ayacahuite* inoculados con suelo de plantaciones forestales de las mismas especies y suelo agrícola de con uso forestal previo.

Pinus ayacahuite var. *veitchii* constituye una de las 50 especies nativas de México (Eguiluz, 1982), se caracteriza por formar poblaciones aisladas de tamaño variado sin llegar a formar masas de gran magnitud, lo cual lo limita al no poder considerarlo como una fuente de abastecimiento de madera en forma natural y constante a la industria. Sin embargo, es una especie muy apreciada por sus características maderables, útiles en la construcción, aserrío triplay, pulpa para papel, postes, elaboración de muebles y artesanías, además es recomendada como árbol de navidad en plantaciones comerciales y también como planta ornamental en parques, jardines y campos deportivos debido a su gran porte, apariencia de sus fascículos azul verdosos y por sus grandes conos colgantes (Eguiluz, 1978). *Pinus patula* Schl. es una especie mexicana de rápido crecimiento, con plantaciones en África, Asia y Sudamérica (Wormald, 1975). En México se estima que de las 256000 ha destinadas a plantaciones forestales comerciales, 15% corresponde a plantaciones de *Pinus patula*. Sin embargo, no existen suficientes estudios que demuestren con precisión las especies de hongos ectomicorrízicos nativos de México con potencial biotecnológico en la producción de plantas de dicha especie.

Objetivo general. Evaluar si el suelo nativo, utilizado como fuente de inóculo ectomicorrízico, procedente de una plantación de la misma especie de pino, origina mayor crecimiento en comparación con un suelo procedente de una plantación de otra especie de pino.

Montaje y descripción del experimento. La metodología empleada fue la misma que la descrita para el bioensayo descrito en el Anexo 1, excepto que en este caso se evaluaron 2 especies de pinos (*P. patula* y *P. ayacahuite*) y se utilizaron como

fuentes de inóculo ectomicorrízico, ya sea suelo procedente de una plantación de *Pinus patula* o suelo de una plantación de *P. ayacahuite*. El montaje del experimento, fue efectuado en dispositivos experimentales iguales a los descritos en el Anexo 1.

Resultados preliminares. En el caso de *P. patula* se observó una mayor supervivencia cuando se utilizó como fuente de inóculo suelo procedente de una plantación de *P. patula*, en comparación con plantas inoculadas con suelo de una plantación de *P. ayacahuite*, suelo agrícola con uso forestal previo o plantas sin inocular. Existiendo una supervivencia 24% mayor en el caso de plantas inoculadas con suelo de plantación de *P. patula* comparadas con plantas no inoculadas (Cuadro A21). Una tendencia distinta fue observada en el caso de plantas de *P. ayacahuite*, en donde no existieron diferencias significativas entre tratamientos en el caso de los tratamientos (Cuadro A22). Estos datos iniciales solo podrían ser explicados formalmente, al evaluar variables adicionales incluyendo los contenidos nutrimentales y, principalmente la colonización ectomicorríza en un estudio posterior.

Cuadro A2-1. Mortalidad de plantas de *Pinus patula* de 12 meses de edad, inoculados o no con 2 inóculos ectomicorrízicos, crecidos en sustrato comercial.

Tratamiento	Especie	Repeticiones	Supervivencia %	Mortalidad %
Suelo agrícola	<i>Pinus patula</i>	25	60%	40%
Suelo de plantación de <i>Pinus ayacahuite</i>	<i>Pinus patula</i>	25	56%	44%
Suelo de plantación de <i>Pinus patula</i>	<i>Pinus patula</i>	25	76%	24%
Testigos	<i>Pinus patula</i>	25	52%	48%

Cuadro A2-2. Mortalidad de *Pinus ayacahuite* de 12 meses de edad inoculados o no con dos tipos de inóculos, crecidos en sustrato comercial.

Tratamiento	Especie	Total	Supervivencia %	Mortalidad %
Suelo agrícola	<i>Pinus ayacahuite</i>	25	36%	64%
Suelo de <i>Pinus ayacahuite</i>	<i>Pinus ayacahuite</i>	25	32%	68%
Suelo de <i>Pinus patula</i>	<i>Pinus ayacahuite</i>	25	44%	56%
Testigos	<i>Pinus ayacahuite</i>	25	48%	52%

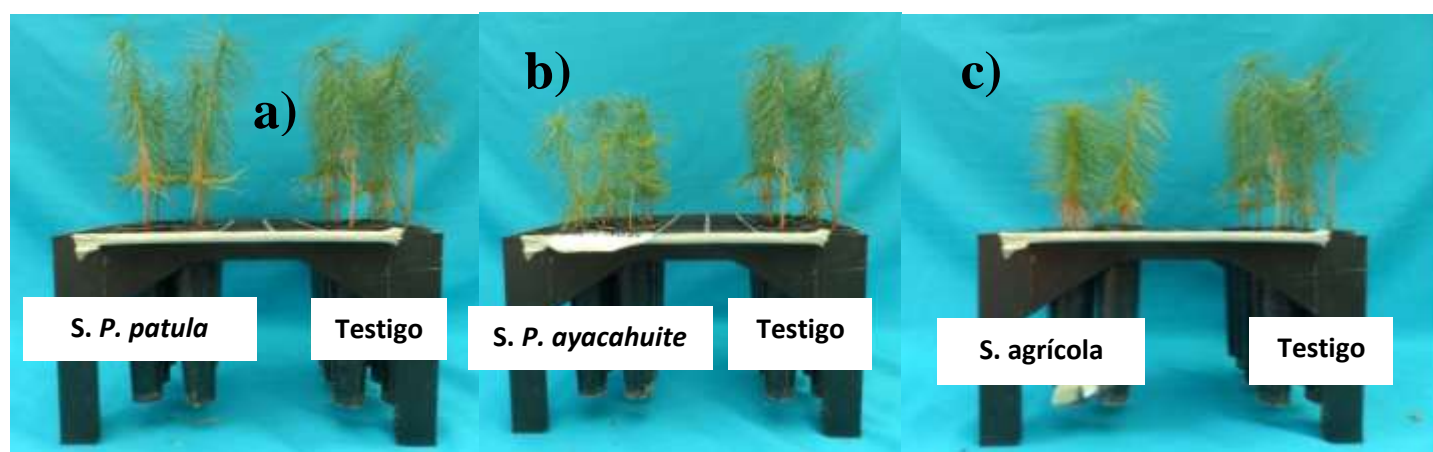


Figura A2-1. Diferencias en crecimiento de *P. ayacahuite* entre plantas sin inoculadas con suelo de una plantación de *P. patula* (a), suelo de una plantación de *P. ayacahuite* (b), suelo agrícola (c), en comparación con plantas sin inocular.

LITERATURA CITADA

- Eguiluz, Piedra, T. 1982. Clima y distribución del género *Pinus* en México. Ciencia Forestal No. 38. INIF-México.
- Eguiluz, Piedra, T. 1978. Ensayo de integración del conocimiento del género *Pinus* en México. Tesis de Licenciatura. Departamento de Bosques. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 306 p.
- WORMALD, T. J. 1975. *Pinus patula*. Tropical Forestry Papers No. 7. Comm. For. Inst., Oxford, England. 234 p.