



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN EDAFOLOGIA**

**Micorrización, crecimiento y contenido nutrimental de  
*Pinus greggii* y *P. montezumae* inoculados con tres hongos  
comestibles**

**MAGDALENA MARTINEZ REYES**

**T E S I S**

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

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MEXICO, DICIEMBRE 2010**

El presente proyecto de investigación titulado: “**Micorrización, crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* y *P. montezumae* inoculados con tres hongos comestibles**”, realizado por la alumna: **Magdalena Martínez Reyes** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**EDAFOLOGIA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERO**



---

**DR. JESUS PÉREZ MORENO**

**ASESOR**



---

**DR. LUIS VILLARREAL RUIZ**

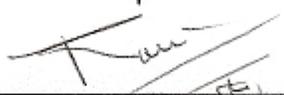
**ASESOR**



---

**DR. MARIO HONRUBIA GARCÍA**

**ASESOR**



---

**DR. RONALD FERRERA CERRATO**

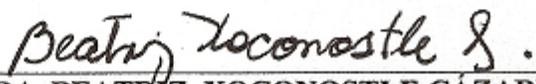
**ASESOR**



---

**DR. J. JESÚS VARGAS HERNÁNDEZ**

**ASESOR**



---

**DRA. BEATRIZ XOCONOSTLE CÁZARES**

**Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2010.**

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento del CONACyT por la beca brindada y el apoyo del proyecto FOMIX-VERACRUZ No. 108654 por el financiamiento otorgado.



Primordios de esporomas del hongo comestible ectomicorrízico *L. laccata* s.l. asociados con *P. montezumae*

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

Al Dr. Jesús Pérez Moreno, por su valiosa amistad y por ser el maestro con una extraordinaria capacidad y habilidad de enseñar y compartir sus conocimientos tanto científicos, como de la vida y hacer que sus discípulos se apasionen por los hongos comestibles ectomicorrízicos.

Al Dr. Luis Villareal Ruiz, por la asesoría, sugerencias y facilidades otorgadas para el feliz término de este proyecto.

Al Dr. Mario Honrubia García, por las facilidades y apoyo en la conclusión de esta meta.

Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, por su valioso asesoramiento y ayuda en el préstamo de equipo y material del Laboratorio de Fijación de Nitrógeno.

Al Dr. J. Jesús Vargas Hernández por sus valiosas y acertadas recomendaciones a lo largo de la realización de esta investigación.

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cazares, por su amistad, asesoramiento e incondicional apoyo moral y económico en la fase de Biología molecular.

Al Dr. Alejandro Alarcón y Dr. Juan Almaraz por compartir siempre su amistad y sus valiosos conocimientos.

Al Dr. Javier López Upton, por la siempre disposición en la asesoría y préstamo de material sobre todo en la fase de vivero.

Al Dr. Héctor de los Santos Posadas, por su valiosa ayuda para el análisis de datos.

Al Dr. Víctor Manuel Cetina Alcalá, por su amistad e incondicional ayuda en la presentación de esta tesis.

Al personal del Laboratorio de Fijación de Nitrógeno: Edmundo Martínez Galán, Manuel Solano Díaz, Lorenzo Viana Monsalvo y Fernando López Santillán por su ayuda y asesoramiento constante.

Al personal del vivero Forestal: Maximino Juárez Zarate, José Luis Gutiérrez Hernández, Asunción Hernández Nequiz y Lauro Guadalupe Franco Mejía, por su ayuda y los gratos momentos compartidos.

A la M. C. María E. Lara, M. C. Gabriela Sánchez Viveros, M. C. Alicia Franco, M. C. Violeta Carrasco, M. C. Armando Lorenzana y Biol. Cristina Heredia, por su amistad y toda la ayuda prestada en la fase de Laboratorio, en la toma de datos y fotomicrografías de este proyecto.

A la QBP Lidia Gómez Silva, de CINVESTAV del IPN, por la realización de los PCR y el apoyo técnico brindado.

A las secretarias: Ma. del Rosario Galicia López, Claudia Viridiana Soto Tagle y Laura Guadalupe Bolaños Alvarez por su disposición y apoyo logístico durante mi estancia en el Colegio.

## *Dedicatoria*

A DIOS: por permitirme conocer y estar en este maravilloso mundo.

A mis padres: Miguel Martínez Velásquez y Rebeca Reyes García

A mis hermanos: Mario Antonio, Catalina, Herminia, Miguel Ángel, Maricela y Leandro Alberto.

A mis cuñadas: Adela Camacho y Mirella Cerón.

A mis cuñados: Isidro Garay, Cecilio Martínez y Domingo Rosano.

A mis sobrinos: Alin Soledad, Edwin Antonio, Brenda Gissel, Víctor Antonio, Diana Judith, Juan Carlos, Oscar Javier, Danae Mercedes, Miguel Emiliano, Ignacio Aldair y T. Miguel.

Porque siempre me han acompañado y ayudado en todos los proyectos y trabajos de mi vida, por cuidar a mis hijos, por el apoyo incondicional que me han brindado y por la gran familia que somos. *¡LOS AMO MUCHO!*

A mis hijos: Brian Ricardo e Iván Vladimir, por el amor que nos une y porque siempre sean tan alegres, y unidos como los grandes hermanos que son.

A Aurelio Hernández López, con mucho cariño por los años que compartimos esta meta y por el gran apoyo económico. Gracias por todo.

A mis amigas de siempre: Chelito Zarate, Bety Hernández, Mary Rodríguez, Lili Muñoz, Naty Abúndez, Susanita Hernández, Betsy Ramírez, Felicitas Pacheco, Angélica Yescas, Viky Avilés y Elia Cruz. Gracias por los momentos que hemos compartido.

A mis amigos de siempre: Jorge Barajas, Cesar Gamboa, Leonardo García, Adalberto Vargas, Víctor Perea, Jorge Hernández, Armando Lorenzana y Cruz Frutero.

A mis amigas y amigos del Laboratorio de microbiología: Cristina Arteaga, Esmeralda Cruz, Claudia de la Rosa, Claudia Ordoñez, Rosalba Argumedo, Alejandra Hernández, Yessica González, Elvia Pérez, Vivian Quiroz, Azucena Ibarra, Isela Torres, Rosalba García, Blanca Ortega, Yadira Cornejo, Virginia Martínez, Mario Jiménez y Alfonso Quiroz.

# **Micorrización, crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* y *P. montezumae* inoculados con tres hongos comestibles**

**Magdalena Martínez Reyes, Dra.**

**Colegio de Postgraduados, 2010**

## **RESUMEN**

Los hongos ectomicorrízicos promueven el crecimiento, la transferencia nutrimental y la supervivencia en campo de diversas especies vegetales de importancia forestal. Uno de los criterios de selección de los hongos ectomicorrízicos, actualmente utilizado es su comestibilidad. En el presente trabajo se estudió el efecto de la inoculación con esporomas deshidratados molidos, solos o combinados, de *Laccaria laccata* s.l., *Hebeloma mesophaeum* s.l. y *Boletus edulis* s.l., en *Pinus greggii* Engelm. y *P. montezumae* Lamb., coníferas ampliamente usadas para reforestación en México. Se evaluó el efecto de estos tres hongos en el peso seco de la parte aérea, raíz, altura, diámetro del tallo y contenido nutrimental (N, P, K, Ca y Mg) de las dos especies de pino. El peso seco de la parte aérea, la raíz, así como la altura y el diámetro del tallo fueron mayores en las plantas inoculadas, con respecto a las plantas no inoculadas. Cuando *L. laccata* y *H. mesophaeum* se inocularon solas, se registraron altos porcentajes de micorrización, mayores a 80%, en ambas especies de pino; y cuando se inocularon en forma simultánea los porcentajes variaron dependiendo de la especie de pino involucrada. El contenido de todos los nutrimentos evaluados fue mayor en las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas independientemente de la especie de hongo involucrada. La inoculación con *H. mesophaeum* originó una alta eficiencia en la translocación de P y Mg a la parte aérea de los pinos. Además, se registró la formación de esporomas maduros de *L. laccata* y de *H. mesophaeum*, 284 y 392 días después de la inoculación, respectivamente, y se describió su ontogenia. La inoculación con *H. mesophaeum* y *L. laccata* tiene gran potencial de uso en la producción de plantas de *P. greggii* y *P. montezumae* en invernadero.

**Palabras clave:** *Laccaria laccata*, *Hebeloma mesophaeum*, *Boletus edulis*, especies pioneras, hongos comestibles silvestres.

**Mycorrhization, growth and nutrient content of *Pinus greggii* and *P. montezumae* inoculated with three edible mushrooms**

**Magdalena Martínez Reyes, Dra.**

**Colegio de Postgraduados, 2010**

**Abstract**

Ectomycorrhizal fungi promote the growth and nutrient transfer, and enhance the field survival of some tree species of high economic value. One of the criteria for selection of ectomycorrhizal fungi, currently used is their edibility. In this work we studied the effect of the inoculation with dehydrated ground sporomes, alone or combined, of *Laccaria laccata* s.l., *Hebeloma mesophaeum* s.l. and *Boletus edulis* s.l. on *Pinus greggii* Engelm. and *P. montezumae* Lamb., conifers widely used for reforestation in Mexico. The effect of these fungi on the dry weight of shoot, root, height, stem diameter and nutrient contents (N, P, K, Ca and Mg) of the two pine species was evaluated. Dry weight of shoot and root, and stem height and diameter, were higher in inoculated plants compared to those non-inoculated. When *L. laccata* and *H. mesophaeum* were inoculated alone, there were high percentages of mycorrhization, greater than 80%, for both pine species, and when the fungi were inoculated simultaneously the percentages varied depending on the pine species involved. Content of all evaluated nutrients was higher in inoculated seedlings compared to that in non-inoculated, independently of the fungal species involved. Inoculation with *H. mesophaeum* caused a high efficiency of P and Mg translocation to the pine shoots. In addition, the development of mature sporomes of *L. laccata* and *H. mesophaeum* was recorded 284 and 392 days after inoculation, respectively, and their ontogeny was described. Inoculation with *H. mesophaeum* and *L. laccata* has a great potential use in the production of plants of *P. greggii* and *P. montezumae* under greenhouse conditions.

**Key words:** *Laccaria laccata*, *Hebeloma mesophaeum*, *Boletus edulis*, pioneer species, edible wild mushrooms.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	vi
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	viii
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	x
<b>CAPITULO I</b>	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.2 LITERATURA CITADA	7
<b>CAPITULO II</b>	11
2.1. OBJETIVO GENERAL	11
2.2. OBJETIVOS PARTICULARES	11
<b>CAPITULO III.</b> Formación de esporomas de <i>Laccaria laccata s.l.</i> y <i>Hebeloma mesophaeum s. l.</i> en asociación ectomicorrízica con <i>Pinus greggii</i> Engelm y <i>P. montezumae</i> Lamb. en invernadero	12
3.1. RESUMEN	12
3.2. INTRODUCCIÓN	14
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.3.1. Material biológico y condiciones de crecimiento	15
3.3.2. Preparación de inoculantes	16
3.3.3. Inoculación de plantas	16
3.3.4. Diseño experimental y análisis estadístico	17
3.3.5. Evaluación de formación de esporomas y toma de fotomicrografías	17
	iii

3.3.6. Amplificación de secuencias internas transcritas de rRNA (ITS)	18
3.3.7. Amplificación del rRNA ITS por PCR	18
3.3.8. Secuenciación de ADN	18
3.3.9. Análisis de secuencia	19
3.4. RESULTADOS	19
3.4.1. Frecuencia de formación de esporomas	19
3.4.2. Colonización de hongos ectomicorrízicos	22
3.4.3. Desarrollo ontogénico de los esporomas	23
3.4.4. Identificación de especies fúngicas de inóculo y esporomas	29
3.5. DISCUSION	31
3.6. CONCLUSIONES	37
3.7. LITERATURA CITADA	38
<b>CAPÍTULO IV. Crecimiento y contenido nutrimental de <i>Pinus greggii</i> Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico <i>Hebeloma mesophaeum s. l.</i></b>	46
4.1. RESUMEN	46
4.2. INTRODUCCIÓN	47
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	48
4.3.1. Material vegetal e inóculo	48
4.3.2. Montaje del experimento y evaluación de variables	48
4.3.3. Caracterización macro y micromorfológica de la ectomicorriza	49
4.3.4. Análisis nutrimental de las plantas	49
4.3.5. Análisis estadístico	50
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50

4.4.1. Crecimiento vegetal	50
4.4.2. Colonización micorrízica	50
4.4.3. Contenido nutrimental	52
4.5. CONCLUSIONES	55
4.6. LITERATURA CITADA	57
<b>CAPITULO V. Colonización y transferencia de nutrimentos en <i>Pinus greggii</i> Engelm y <i>P. montezumae</i> Lamb. inoculados con tres hongos comestibles ectomicorrízicos solos o combinados en invernadero</b>	61
5.1. RESUMEN	61
5.2. INTRODUCCIÓN	62
5.3. MATERIALES Y MÉTODOS	63
5.3.1. Material biológico y condiciones de crecimiento	63
5.3.2. Preparación de inoculantes	64
5.3.3. Inoculación de plantas	65
5.3.4. Diseño experimental, variables y análisis estadístico	65
5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
5.4.1. Crecimiento vegetal	66
5.4.2. Colonización micorrízica	68
5.4.3. Contenido nutrimental	72
5.5. CONCLUSIONES	77
5.6. LITERATURA CITADA	78
<b>CAPITULO VI. CONCLUSIONES GENERALES</b>	81

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 3.1</b> Frecuencia de formación de esporomas maduros (¶) de <i>Laccaria laccata</i> y <i>Hebeloma mesophaeum</i> en <i>Pinus greggii</i> y <i>P. montezumae</i> , de 284 a 421 días después de la inoculación.	21
<b>Cuadro 3.2.</b> Comparación de etapas del desarrollo ontogénico de los hongos ectomicorrízicos <i>Laccaria laccata</i> y <i>Hebeloma mesophaeum</i> con <i>Agaricus bisporus</i> ampliamente estudiado.	26
<b>Cuadro 4.1.</b> Peso seco, altura y diámetro del tallo en plantas de <i>Pinus greggii</i> inoculadas o no con <i>Hebeloma mesophaeum</i> 421 días después de la inoculación.	51
<b>Cuadro 4.2.</b> Porcentaje de raíces cortas micorrizadas y no micorrizadas, vivas y muertas en plantas de <i>Pinus greggii</i> inoculadas o no con <i>Hebeloma mesophaeum</i> en 3 áreas del cepellón 421 días después de la inoculación.	52
<b>Cuadro 4.3.</b> Contenido nutrimental en plantas de <i>Pinus greggii</i> inoculadas o no con <i>Hebeloma mesophaeum</i> 421 días después de la inoculación.	53
<b>Cuadro 5.1.</b> Peso seco de la parte aérea, raíz, total, altura y diámetro del tallo en plantas de <i>Pinus greggii</i> y <i>P. montezumae</i> , inoculadas o no con tres especies de hongos comestibles ectomicorrízicos solos o combinados, 421 días después de la inoculación.	68
<b>Cuadro 5.2.</b> Porcentaje de raíces cortas micorrizadas y no micorrizadas, vivas y muertas, 421 días después de la inoculación en <i>Pinus greggii</i> con tres especies de hongos comestibles ECM solos o combinados.	70

<b>Cuadro 5.3.</b> Porcentaje de raíces cortas micorrizadas y no micorrizadas, vivas y muertas, 421 días después de la inoculación en <i>Pinus montezumae</i> con tres especies de hongos comestibles ECM solos o combinados.	71
<b>Cuadro 5.4.</b> Porcentaje de colonización micorrízica total y por especie fúngica, según características morfoanatómicas en los tratamientos en los que se inoculó simultáneamente más de una especie fúngica en <i>Pinus greggii</i> y <i>P. montezumae</i> , 421 días después de la inoculación.	73
<b>Cuadro 5.5.</b> Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en plantas de <i>Pinus greggii</i> y <i>P. montezumae</i> , inoculadas o no con hongos comestibles ectomicorrízicos (ECM) solos o combinados, 421 días después de la inoculación.	74
<b>Cuadro 5.6.</b> Contenido de calcio y magnesio en plantas <i>Pinus greggii</i> y <i>P. montezumae</i> , inoculadas o no con hongos comestibles ectomicorrízicos (ECM) solos o combinados, 421 días después de la inoculación.	75
<b>Cuadro 5.7.</b> Relación parte aérea:raíz en plantas de <i>Pinus greggii</i> y <i>P. montezumae</i> , inoculadas o no con hongos comestibles ectomicorrízicos (ECM) solos o combinados, 421 días después de la inoculación.	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 3.1.</b> Frecuencia acumulada de formación de esporomas de <i>Laccaria laccata</i> en asociación ectomicorrízica con <i>Pinus greggii</i> (a) y <i>P. montezumae</i> (b) de 284 a 421 días después de la inoculación, en invernadero.	22
<b>Figura 3.2.</b> <i>Laccaria laccata</i> <b>a</b> Agregado micelial. <b>b</b> Primordio pequeño. <b>c</b> Primordio grande. <b>d</b> Esporoma en etapa 3. <b>e</b> Esporoma inmaduro. <b>f</b> Esporoma joven. <b>g</b> Esporoma maduro y esporada (recuadro). <b>h</b> Esporoma senescente. <b>i</b> Ectomicorrizas. <b>j</b> Nuevas esporas.	27
<b>Figura 3.3.</b> <i>Hebeloma mesophaeum</i> . <b>a</b> Agregado micelial. <b>b</b> Primordio pequeño <b>c</b> Esporoma en etapa 2, diferenciándose píleo (P) de estípite (E). <b>d</b> Esporoma inmaduro <b>e</b> Esporoma joven <b>f</b> Esporoma con estípite elongado y un primordio (Pr) al lado. <b>g</b> Láminas. <b>h</b> Ectomicorrizas con hifas emanantes.	28
<b>Figura 3.4.</b> Árbol de distancia calculado usando el método UPMGA para secuencias de <i>Laccaria</i> . Las distancias se calcularon con 1000 réplicas. El clado superior muestra al inóculo con 100% de homología con dos esporomas obtenidos posterior a la inoculación. El clado inferior agrupa tres accesiones de <i>L. laccata</i> con ocho esporomas obtenidos.	30

- Figura 3.5.** Árbol de distancia calculado usando el método UPMGA para *Hebeloma*. El clado inferior agrupa al inóculo con 100% de homología con siete esporomas obtenidos posterior a la inoculación. En este clado está *H. mesophaeum* AB211272. Siete ITS de *Hebeloma* reportados se agrupan en cuatro clados distintos. 31
- Figura 4.1.** *Hebeloma mesophaeum* (Hm) y *Pinus greggii* (Pg). **a** Venta del hongo comestible Hm en el mercado de Ozumba, México. **b** Efecto de la inoculación de Hm en el crecimiento de Pg, plantas inoculadas (izquierda) o no (derecha). **c, d** Plantas micorrizadas mostrando el abundante micelio externo de Hm. **e, f** Morfología de la raíz ectomicorrizada de Pg con Hm. **g** Esporoma maduro de Hm asociado con las raíces de Pg. 56
- Figura 5.1.** Número de raíces cortas totales de *Pinus greggii* y *Pinus montezumae*, 421 días después de la inoculación con 3 especies de hongos comestibles ectomicorrízicos de los géneros *Laccaria*, *Hebeloma* y *Boletus* solos o combinados. 67

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Página</b>
<b>Anexo 1.</b> Homología de ITS de inóculos y esporomas obtenidos posterior a la inoculación. Se utilizó el método de alineamiento múltiple con penalización para deleciones. Se incluyeron secuencias identificadas en especies de <i>Laccaria laccata</i> disponibles en la base de datos.	83
<b>Anexo 2.</b> Homología de ITS de inóculos y esporomas obtenidos posterior a la inoculación. Se utilizó el método de alineamiento múltiple con penalización para deleciones. Se incluyeron secuencias identificadas en especies de <i>Hebeloma mesophaeum</i> disponibles en la base de datos.	84

# CAPITULO I

## 1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Con el inicio de la posible producción de trufas en Prusia, se desarrolló la teoría revolucionaria de la nutrición de árboles vía simbiosis entre un hongo y la raíz del árbol, como un solo órgano, denominado “micorriza” que significa literalmente “hongo-raíz”, vocablo asignado por el fisiólogo vegetal Albert Bernhard Frank en 1885 (Trappe, 2005). Desde entonces, ha sido el término aplicado en varias formas y amplias connotaciones (Peyronel *et al.*, 1969; Trappe, 2005). Actualmente el vocablo micorriza es utilizado para describir diversos tipos de simbiosis que se establecen entre las raíces de las plantas y ciertos grupos de hongos. Se estima que alrededor de 6000 especies de hongos establecen simbiosis con el 95% de las plantas vasculares (Smith y Read, 1997). La micorriza es una asociación bipartita en la que los simbiositos, planta y hongo, habitan el mismo ambiente, el suelo. La formación exitosa de dicha simbiosis depende no sólo de que ambos organismos estén presentes, sino también de que existan las condiciones micro y macro-ambientales adecuadas, que incluyen factores físicos, químicos y biológicos, como temperatura, pH y cantidad y tipo de propágulos micorrízicos (Francis y Read, 1994). El establecimiento de la asociación micorrízica provoca cambios estructurales evidentes en los participantes (hongo y planta), tal como el desarrollo de la interfase, sitio donde se lleva a cabo el intercambio de nutrimentos en ambas direcciones (Peterson y Bonfante, 1994), así como la formación de las estructuras fúngicas que caracterizan a cada tipo, como pueden ser: red de Hartig, manto, micelio externo, vesículas, enrrollamientos hifales y arbusculos. Considerando estas estructuras y de acuerdo con el grado de penetración del hongo en la raíz del hospedero, Smith y Read (1997; 2008) dividieron a las micorrizas en siete grandes grupos: micorrizas

arbusculares, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, micorrizas ericoides, arbutoides, monotropoides y orquidioides.

La ectomicorriza (ECM), término propuesto por Peyronel *et al.* (1969), es uno de los más importantes tipos de asociaciones micorrízicas, desde el punto de vista ecológico y biogeográfico (Pérez-Moreno y Read, 2004). La ECM es la simbiosis que se establece entre hongos y las raíces de las plantas, en donde el hongo crece y forma un manto en la superficie de la raíz y penetra el córtex intercelularmente para producir una red conocida como “red de Hartig” (Wilcox, 1984). A los hongos involucrados se les conoce como micobiontes y a las plantas se les denomina fitobiontes (Pérez-Moreno, 1995). Las estructuras típicas de la simbiosis ECM son: *i*) manto, *ii*) red de Hartig y *iii*) micelio externo.

Se ha demostrado que a través de la simbiosis ectomicorrízica existe un intercambio nutrimental fundamental para el funcionamiento de los ecosistemas forestales. Los hongos asociados reciben carbono de sus hospederos y las plantas reciben nutrientes, principalmente N y P tanto inorgánico como orgánico (Smith y Read, 2008). Se ha demostrado que, además de la movilización de nutrientes desde sustratos orgánicos naturales por los sistemas micorrízicos, una proporción significativa de éstos es transferida a las plantas asociadas. Frecuentemente, grandes proporciones de los nutrientes (principalmente N y P) contenidos en las plantas se derivaron originalmente de los sustratos orgánicos naturales (Pérez-Moreno y Read, 2000; 2001; 2004). La habilidad saprofítica por sí misma, es capaz de movilizar ciertas cantidades de nutrientes de sustratos orgánicos naturales, en ausencia de hongos micorrízicos. Sin embargo, este mecanismo, como ha sido demostrado (Pérez-Moreno y Read, 2001), es relativamente ineficiente en términos de la

transferencia de nutrientes a las plantas, en parte porque los microorganismos saprofitos transfieren nutrientes en el suelo en todas direcciones desde una fuente localizada, más que exclusivamente hacia las raíces de las plantas. En contraste, el micelio de los hongos micorrízicos efectúa la translocación de nutrientes directamente a las raíces micorrízicas, conectadas a través de la extensa red micelial sostenida por el carbono proporcionado por las plantas (Pérez-Moreno y Read, 2004).

Tradicionalmente, estos hongos (saprofitos y micorrízicos) han sido registrados como dos grupos funcionales distintos en los ecosistemas. Los hongos saprofitos obtienen carbono y nutrientes de la degradación de los componentes orgánicos y los hongos micorrízicos facilitan la captación de nutrientes por sus plantas hospederas autotróficas en compensación al carbono fijado como fotosintatos. Sin embargo, en las últimas dos décadas la diferencia entre estos dos grupos ha estado menos definida. Como se ha mencionado, existe ahora una evidencia considerable de que algunos hongos micorrízicos tienen potencial para asimilar N y P contenido en las moléculas orgánicas de plantas, microorganismos y detritus animal. Esto puede ocurrir directamente vía producción de enzimas catabólicas extracelulares o indirectamente vía interacción competitiva con hongos saprofitos (Taylor *et al.*, 2003).

El sistema de hifas y micelio de los hongos ectomicorrízicos puede producir estructuras que utilizan para su reproducción y por lo general las forman en cierta época del año, cuando las condiciones ambientales son favorables. La mayoría de estas estructuras reproductivas se pueden observar a simple vista al realizar un recorrido por bosques de las regiones montañosas, en la época de lluvia. Algunos hongos producen estructuras reproductivas por debajo del suelo y no son fáciles de observar. A este crecimiento subterráneo se le denomina hipogeo y cuando está sobre el suelo, epigeo (Kong, 2003). La mayoría de los

hongos ECM pertenecen a la clase de los Basidiomycetes y algunos a los Ascomycetes. Los Basidiomycetes se distinguen de la otra clase de hongos que forman ectomicorrizas debido a que sus esporas se producen externamente en células llamadas basidios. Los miembros de la clase Ascomycetes forman sus esporas en el interior de células en forma cilíndrica o de saco llamadas ascas (Kong, 2003). Adicionalmente, las micorrizas y en particular las ectomicorrizas, son de considerable interés dado que algunos de los Basidiomycetes y Ascomycetes que las forman producen hongos comestibles (Hall *et al.*, 2003).

Los hongos ectomicorrízicos pueden mejorar las condiciones nutricionales asociados con sus plantas hospederas que crecen en ambientes pobres, especialmente en ecosistemas deficientes de nitrógeno y fósforo. Esta propiedad ha sido utilizada en reforestación para promover el crecimiento de las plantas en campo. Dichas plantas han sido inoculadas con hongos ectomicorrízicos apropiados. La prioridad de la supervivencia en campo es la formación de ectomicorrizas, la cual puede ser evaluada en las plantas inoculadas (Tateishi *et al.*, 2003). El uso de esporas a partir de especies fúngicas involucradas en la simbiosis ectomicorrízica, tiene un enorme potencial biotecnológico en la producción de inoculantes forestales debido a su bajo costo y relativa facilidad de manejo (Martínez *et al.*, 2002). Actualmente, la producción de inoculantes basados en hongos ectomicorrízicos ha cobrado una enorme importancia en los países con tradición forestal. La aplicación exitosa de esta biotecnología, se ha basado en conocimientos taxonómicos, ecológicos y fisiológicos de dichos hongos, desarrollados principalmente durante las últimas cinco décadas. La práctica en los viveros tradicionales de utilizar la tierra del monte para rellenar los envases donde producían la planta suponía una micorrización natural de la misma. Sin embargo, este sistema tiene una serie de inconvenientes como son: no ejercer ningún control sobre el crecimiento del hongo, no conocer las condiciones de siembra y plantación y no controlar

la posibilidad de introducción de elementos patógenos. Por ello, actualmente, con el uso de sistemas de cultivo en envase utilizando sustratos estériles, se hace necesaria una micorrización controlada de las plantas, donde se asegure la consecución de sistemas rizosféricos más potentes, lo que se traduce en una mayor calidad de planta. En el caso de realizar una micorrización, es necesario determinar la especie fúngica, dado que cada especie o cepa tiene limitaciones ecológicas en las que el comportamiento es el más efectivo, en términos de crecimiento de su hospedante. Para inducir la micorrización en especies de importancia forestal, se han utilizado principalmente tres fuentes de inóculo: tierra de monte, esporas de hongos ectomicorrizicos y micelio (Pérez-Moreno, 2002).

Las plantas infectadas con la inoculación de esporas, cultivos o raíces ECM han llevado a la formación de esporomas de hongos comestibles ECM en el campo, incluyendo *Lactarius deliciosus*, *Rhizopogon rubescens*, *Suillus granulatus* y varias especies de *Tuber*. Danell y Camacho (1997) también produjeron *Cantharellus cibarius* en contenedores en invernadero. Pero fuera de estos éxitos, poco menos de una docena de muchos cientos de hongos comestibles ECM han sido cultivados con un cierto grado de éxito, y estos incluyen a especies comerciales importantes tales como: *Boletus edulis*, *Tricholoma matsutake* y *Tuber magnatum*. Consecuentemente, abastecer la variedad de hongos comestibles ECM comercialmente importantes aún está restringido a que estos se puedan cosechar de forma silvestre durante la temporada de lluvias (Hall *et al.*, 1998a; 1998b, Wang y Hall, 2004). De acuerdo con Chang y Buswell (1997), los hongos poseen de 19 a 35% de proteína, aminoácidos esenciales, poca grasa, vitaminas, minerales y de un 4 a 20% de fibra; y un contenido de carbohidratos entre 51 y 88 %. Asimismo, dichos hongos constituyen un recurso forestal no maderable, de enorme importancia para la conservación forestal, ya que son una fuente alimenticia o una alternativa de ingreso económico para las comunidades

locales (Montoya, 2003). Más de 100 especies de hongos comestibles ECM en México, son comercializadas en mercados locales y algunas de ellas tienen valor en mercados internacionales (Villareal y Pérez-Moreno, 1989). A la fecha, el comercio mundial de algunos hongos comestibles ECM está valuado anualmente en billones de dólares (Wang y Hall, 2004). Se ha estimado que en algunas localidades, la venta de hongos comestibles ECM extraídos de los bosques puede llegar a superar el valor económico de la madera (Salerni y Perini, 2004; Díaz *et al.*, 2003).

**Planteamiento del Problema:** En muchos casos la inoculación de árboles con especies de hongos ECM reduce considerablemente su tiempo de estancia en vivero e incrementa de manera significativa su supervivencia y desarrollo en condiciones de campo. Adicionalmente, uno de los criterios de selección de especies de hongos ECM utilizado actualmente a nivel internacional es su uso como alimento. Desafortunadamente, el desarrollo biotecnológico de producción de inoculantes de hongos silvestres ECM en general, y de especies comestibles ECM en particular, ha recibido escasa atención en nuestro país. Por lo que el presente trabajo de investigación tiene como finalidad contribuir a la generación de información relacionada con la inoculación, sola o combinada, de tres hongos silvestres comestibles ECM en dos especies de pinos nativos de México usados en reforestación.

## 1.2. LITERATURA CITADA

- Chang S.T., Buswell J. A. (1997). Mushroom nutraceuticals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 12: 473-476.
- Danell E., Camacho F. J. (1997). Successful cultivation of the golden chanterelle. *Nature* 385; 303 p.
- Díaz B. L., Álvarez N. A., Oria de Rueda A.S. (2003). Integración de la producción fúngica en la gestión forestal. Aplicación al monte "Urcido" (Zamora). *Invest. Agrar. Sist. Recur. For.* 12: 5-19.
- Francis R., Read D. J. (1994). The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. *In: Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry.* Robson, A. D., L. K. Abbott, N. Malajczuk (eds.). Kluwer Academic Publishers pp: 11-25.
- Hall I. R., Wang Y, Amicucci A. (2003). Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology* 21: 433-438.
- Hall I. R., Lyon A. J. E., Wang Y, Sinclair L. (1998a). Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 2. *Boletus edulis*. *Economic Botany* 52: 44-56.
- Hall I. R., Zambonelli A., Primavera F. (1998b). Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 3. *Tuber magnatum*, Tuberales. *Economic Botany* 52: 192-200.
- Kong L. A. (2003). Clasificación de los hongos ectomicorrizógenos. *In: Avances en el Estudio de la Ectomicorriza en el Estado de Tlaxcala, México.* Estrada-Torres A, Santiago-Martínez MG. (eds.). Universidad Autónoma de Tlaxcala. CONACYT. Fundación Produce Tlaxcala. A. C. México. pp:11-25.

- Martínez R. M., Pérez-Moreno J., Aldrete A., Cetina A.V. M. (2002). Potencial biotecnológico de especies mexicanas de hongos ectomicorrízicos comestibles para inoculantes forestales a base de esporas. *In: Producción y Control de Calidad de Inoculantes Agrícolas y Forestales*. Pérez-Moreno J, Alvarado LJ, Ferrera CR. (eds.). Colegio de Postgraduados, INIFAP y Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. México. pp:103-104.
- Montoya E. A. (2003). Conocimiento tradicional de los hongos ectomicorrizógenos en Tlaxcala. *In: Avances en el Estudio de la Ectomicorriza en el Estado de Tlaxcala, México*. Estrada-Torres A, Santiago-Martínez MG (eds.). Universidad Autónoma de Tlaxcala. CONACYT. Fundación Produce Tlaxcala. A. C. México. pp:35-41.
- Pérez-Moreno J. (1995). La simbiosis ectomicorrízica y su importancia ecológica. *In: Ferrera-Cerrato R, Pérez-Moreno J. eds. Agromicrobiología un Elemento Útil en la Agricultura Sustentable*. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. México, 200-225.
- Pérez-Moreno J., Read D. J. (2000). Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist* 145: 301-309.
- Pérez-Moreno J., Read D. J. (2001). Nutrient transfer from soil nematodes to plants: a direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. *Plant Cell Environment* 24: 1219-1226.
- Pérez-Moreno J., Read D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247.
- Pérez-Moreno J. (2002). Aspectos fisiológicos y ecológicos de la simbiosis ectomicorrízica y fuentes utilizadas en la producción de inoculantes forestales. *In: Producción y*

- Control de Calidad de Inoculantes Agrícolas y Forestales. Pérez-Moreno J, Alvarado L, Ferrera CR (eds.). Colegio de Postgraduados; INIFAP y Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. México. pp:55-66
- Peterson R. L., Bonfante P. (1994). Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. In: Robson AD, Abbott LK, Malajczuk N. eds. Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry. Kluwer Academic Publishers, 79-88.
- Peyronel B. Fassi B, Fontana A, Trappe J. M. (1969). Terminology of mycorrhizae. *Mycologia* 31: 410-411.
- Salerni E, Perini C. (2004). Experimental study for increasing productivity of *Boletus edulis* s.l. in Italy. *Forest Ecology and Management* 201: 161-170.
- Smith S. E., Read D. J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd. Edition. Academic Press, London. U. K.
- Smith S. E, Read D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd. Edition. Academic Press, London. U. K.
- Tateishi T., Yokohama K., Cono N., Okabe H., Maremoto T. (2003). Estimation of mycorrhizal colonization of the roots of oak seedlings inoculated with an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystea*. *Soil Science Plant Nutritión* 49: 641-645.
- Taylor A. F. S., Fransson P. M., Högborg P., Högborg M. N., Plamboeck A. H. (2003). Species level patterns in <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N abundance of ectomycorrhizal and saprotrophic fungal sporocarps. *New Phytologist* 159: 757-774.
- Trappe J. M. (2005). A. B. Frank and mycorrhizae: the challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza* 15: 277-281.

- Villarreal L., Pérez-Moreno J. (1989). Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micología Neotropical Aplicada* 2: 77-114.
- Wang Y., Hall I. R. (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany* 82: 1063-1073.
- Wilcox H. E. (1984). Morphology and development of ecto- and ectendomycorrhizae. In: Schenk NC. ed. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society, Saint Paul, Minnesota, USA, 103-114.

## CAPITULO II

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

2.1.1. Evaluar el efecto de la inoculación sola o combinada con tres hongos ectomicorrízicos comestibles (*Laccaria laccata s. l.*, *Hebeloma mesophaeum s.l.* y *Boletus edulis s. l.*) en el crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm y *P. montezumae* Lamb, con potencial de uso para reforestación en México, así como en la formación de esporomas.

### 2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

2.2.1. Evaluar la frecuencia de producción de esporomas de *Laccaria laccata* y *H. mesophaeum* en asociación ectomicorrízica con *Pinus greggii* Engelm y *P. montezumae* Lamb en invernadero, cuantificar la colonización ectomicorrízica asociada y describir la ontogenia de la formación de esporomas en dichos hongos.

2.2.2. Evaluar el efecto de la inoculación de *H. mesophaeum* en el crecimiento y contenido nutrimental (N, P, K, Ca y Mg) de *Pinus greggii* en invernadero.

2.2.3. Evaluar en invernadero el efecto simple o combinado de la inoculación de *Laccaria laccata s.l.*, *Hebeloma mesophaeum s.l.* y *Boletus edulis s. l.*, en el crecimiento y contenido nutrimental (N, P, K, Ca y Mg) de *Pinus greggii* y *P. montezumae*.

## CAPITULO III

### **Formación de esporomas de *Laccaria laccata* s.l. y *Hebeloma mesophaeum* s. l. en asociación ectomicorrízica con *Pinus greggii* Engelm y *P. montezumae* Lamb. en invernadero**

#### **3.1. RESUMEN**

En la inoculación de hongos ectomicorrízicos comestibles en plantas forestales se ha utilizado generalmente micelio, mientras que la eficiencia del uso de esporas o esporomas deshidratados como fuente de inóculo ha sido escasamente estudiada. En el presente estudio se inocularon plantas de *Pinus greggii* Engelm y *P. montezumae* Lamb. con esporomas deshidratados molidos, solos o combinados, de *Laccaria laccata* s.l. y *Hebeloma mesophaeum* s.l. Después de 284 y 392 días, a partir de la inoculación, se registró la primera aparición de esporomas de las especies inoculadas, respectivamente. Hasta los 421 días después de la inoculación, se formó un total de 66 esporomas maduros de *L. laccata* y 2 de *H. mesophaeum*. La mayoría (74%) de los esporomas de *L. laccata* se registraron asociados con *P. montezumae* y solo 26% con *P. greggii*. Las dos especies de pino presentaron altos porcentajes de colonización ectomicorrízica (que variaron de 80% a 84%), cuando se inocularon las especies de hongos de manera individual. Adicionalmente se describe la ontogenia de la formación de esporomas en las dos especies de hongos. Se observaron diferencias en el desarrollo de *L. laccata* y *H. mesophaeum* principalmente en el inicio de la formación de los píleos. En el caso de *L. laccata* se caracterizaron ocho estadios ontogénicos y se registró la formación de esporomas maduros y obtención de esporadas. En registros previos se ha documentado la aparición de esporomas de *Laccaria* o

*Hebeloma* a los 45 a 180 días después de la inoculación, utilizando como fuente de inóculo micelio, en la presencia de un hospedero, mientras que en el presente trabajo utilizando esporomas deshidratados se registraron los primeros esporomas más de nueve meses después de la inoculación. El presente estudio sugiere que en condiciones ambientales equivalentes el hospedero tiene una influencia en la formación de esporomas ectomicorrízicos.

**Palabras clave:** Pinaceae, hongos comestibles silvestres, inóculo esporal, producción de esporomas, colonizadores tempranos.

### 3.2. INTRODUCCIÓN

*Laccaria laccata* s.l. (Scop.) Cooke y *Hebeloma mesophaeum* s.l. (Pers.) Quél. son especies fúngicas que forman asociaciones ectomicorrízicas con numerosas especies de Gimnospermas y Angiospermas en varias familias de importancia económica forestal (Kropp y Mueller 1999; Marmeisse *et al.* 1999). Estas especies son consideradas colonizadores tempranos (Nara 2006; Obase *et al.* 2007; Ishida *et al.* 2008), en condiciones de escasa fertilidad (Cripps 2001; Trocha *et al.* 2007) y han sido registradas en invernadero asociadas con plantas en estadios jóvenes (Molina y Chamard 1983; Barroetaveña *et al.* 2005), lo cual las hace especies recomendables para la inoculación en viveros.

En términos generales la investigación del uso de esporomas deshidratados como fuente de inóculo esporal, a diferencia del uso del micelio (Debaud y Gay 1987; Massicotte *et al.* 2005; Yamada *et al.* 2007), ha sido escasamente estudiada a nivel internacional en hongos comestibles ectomicorrízicos. *L. laccata* y *H. mesophaeum* tienen una gran relevancia cultural como hongos comestibles y son objeto de comercialización en diversos mercados mexicanos (Pérez-Moreno *et al.* 2008; Estrada-Martínez *et al.* 2009). Debido a su gran abundancia en mercados, amplio periodo de formación de esporomas y bajo costo, los esporomas de ambas especies fúngicas tienen un gran potencial para ser utilizados directamente como fuentes de inóculo ectomicorrízico en viveros con baja tecnología en países como México. Adicionalmente, *i*) la influencia de los hospederos en la formación de esporomas ectomicorrízicos, en condiciones ambientales equivalentes; *ii*) la asociación entre formación de esporomas y colonización ectomicorrízica de dichos hongos; y *iii*) la descripción de la ontogenia de la mayoría de los hongos comestibles ectomicorrízicos; han

recibido, en términos generales, escasa atención. Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar la frecuencia de producción de esporomas de *L. laccata* y *H. mesophaeum* en asociación ectomicorrízica con *Pinus greggii* Engelm y *P. montezumae* Lamb en invernadero, cuantificar la colonización ectomicorrízica asociada y describir la ontogenia de la formación de esporomas en dichos hongos. La hipótesis planteada fue que existe una preferencia de formación de esporomas de hongos ectomicorrízicos con las plantas hospederas asociadas.

### **3.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.3.1. Material biológico y condiciones de crecimiento**

*P. greggii* y *P. montezumae* son especies nativas de México de gran importancia forestal. Las semillas utilizadas de dichas especies procedían de bosques naturales de Xochicoatlán, Hidalgo y Cofre de Perote, Veracruz. Las semillas se remojaron en agua corriente durante 24 horas, después se esterilizaron con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%, durante 20 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril bajo condiciones asépticas. Posteriormente se colocaron tres semillas de cada especie de pino en envases de plástico negro de 140 cm<sup>3</sup>, a los cuales se les agregó 150 g de sustrato compuesto de una mezcla de arena de río, corteza de pino molida compostada, y suelo forestal, en proporción 2:2:1. El sustrato se esterilizó con vapor a una presión de 1.3 kg/cm<sup>2</sup> y una temperatura de 125 °C durante 3 horas, se dejó reposar durante dos días y al cuarto día se volvió a esterilizar por 2 horas. Con la finalidad de prevenir “damping-off”, se aplicó el fungicida Captan, en una solución de 2.5 g/L cada tercer día durante dos semanas, después de la germinación y antes de la siembra. Posteriormente las

plantas fueron regadas con agua purificada por medio de filtro tamiz, carbón activado, suavización, micropulición, osmosis inversa, luz ultravioleta y ozono, durante el tiempo que duró el experimento en el invernadero.

### **3.3.2. Preparación de inoculantes**

Para la preparación de inoculantes se utilizaron hongos que procedían de la región de Ozumba, del estado de México y puestos en venta en el mercado “Ozumba”. Para la obtención de inóculos, se cortaron los estípites de los esporomas de *L. laccata* y *H. mesophaeum*; los píleos fueron secados en un deshidratador con 20 charolas internas de 56 X 56 cm (Maquinaria Jersa, Cuautitlán Izcalli, estado de México, México) a 36 °C, durante 48 h. Posterior a su secado, los píleos fúngicos se molieron con un molino eléctrico (Osterizer clásica, modelo 465-42, Sunbeam, México) y se pasaron a través de un tamiz malla 16, (Duvesa División mallas y tamices, México) de 1.19 mm (para homogeneizar el tamaño de las partículas), se depositaron en bolsas de plástico y se almacenaron a 5 °C hasta su utilización, con el fin de mantener su viabilidad. Para cada uno de los inoculantes se determinó la concentración de esporas con un hematocitómetro.

### **3.3.3. Inoculación de plantas**

Una vez llenados los envases con el sustrato, se realizó una primera inoculación, constituida por 1 g de inóculo por planta, de los hongos *H. mesophaeum* y *L. laccata*, dependiendo del tratamiento. El inóculo ectomicorrízico fue colocado en una cavidad que se hizo en la superficie del sustrato contenido en el recipiente. Con la finalidad de incrementar la probabilidad de colonización de las plantas, 90 días después de la siembra, se realizó una segunda inoculación consistente también en 1 g de inóculo. Cada planta fue

inoculada con al menos  $10^7$  a  $10^8$  esporas, cuando así correspondió a los tratamientos. Para reducir las probabilidades de contaminación se colocó tezontle estéril en la superficie de los envases. El experimento fue mantenido en invernadero durante 421 días.

#### **3.3.4. Diseño experimental y análisis estadístico**

El diseño experimental fue en bloques al azar. Se tuvieron 4 tratamientos para cada especie de pino: 1. *Laccaria laccata* (Ll), 2. *Hebeloma mesophaeum* (Hm), 3. *Laccaria laccata* + *Hebeloma mesophaeum* (Ll +Hm), y 4. Testigo sin inocular (T). En total el experimento consistió de 240 plantas para cada especie de pino, lo cual originó 480 plantas en total.

#### **3.3.5. Evaluación de formación de esporomas y toma de fotomicrografías**

Una vez que se registraron los primeros esporomas, se efectuaron, al menos cada tercer día, evaluaciones periódicas durante 137 días registrando la formación de nuevos esporomas o primordios. Se describieron las características morfológicas de los esporomas y de las raíces micorrizadas; En el caso de los primordios y los esporomas maduros, se realizó un análisis destructivo de éstos, separando el píleo del estípite en una muestra de por lo menos tres primordios o esporomas para cada estadio y se pesaron por separado para obtener la relación píleo:estípite. Se tomaron fotografías de esporomas maduros en invernadero con una cámara digital Full HD 1080 (SONY Corporation, Japón). Las fotografías de los primordios de los esporomas se tomaron con un estereoscopio Olympus SZ61, modelo SZ2-LGB. En esporomas maduros se colocó un portaobjetos debajo de los mismos para recolectar las esporas y registrar el color de las esporadas. Las fotografías de las esporas se tomaron con un microscopio Olympus BX51 modelo U-LH100H.

### **3.3.6. Amplificación de secuencias internas transcritas de rRNA (ITS)**

*Purificación de ADN fúngico.* 100 mg de esporomas frescos se liofilizaron para su posterior uso en la extracción y purificación de ADN total usando el kit DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Santa Clarita, CA). El ADN se separó en un gel de agarosa para verificar su integridad, mientras que su concentración y pureza fue calculada usando el valor de absorbancia 260/280 nm utilizando el espectrofotómetro Nanodrop.

### **3.3.7. Amplificación del rRNA ITS por PCR**

La region intergénica de los rRNA fue amplificada utilizando los iniciadores ITS4 e ITS5 en una reacción de 50 ul utilizando la enzima termoestable Takara ADN polymerase (Takara, Biosciences), de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Se obtuvo una sola banda de aproximadamente 800 pb, que se purificó y ligó al vector de clonación pDrive (Qiagen) a 16°C por 12 horas. Posteriormente, la ligación se utilizó para transformar genéticamente a células competentes *Escherichia coli* TOP 10 F' (Invitrogen, Carlsbad, CA). Por cada banda obtenida por PCR, se seleccionaron cinco colonias independientes para ser analizadas posteriormente. El ADN plasmídico se purificó usando el kit de "Miniprep plasmid DNA kit" (Qiagen), y fue digerido con la enzima EcoRI para verificar la presencia de insertos. Dos plásmidos de cada ensayo fueron empleados en la secuenciación de ADN.

### **3.3.8. Secuenciación de ADN**

Se utilizó el método de Sanger empleando el analizador ABI PRISM 6000g (Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA). La secuenciación de ambas cadenas complementarias se realizó en Cinvestav, Irapuato. La secuencia del vector fue eliminado de la secuencia obtenida para

posteriormente ser comparado con las bases de datos existentes en el Genbank, utilizando el algoritmo BLASTX. Las secuencias de rRNA ITS se registraron en el Genbank con los números 1401761, 1401766, 1403645, 1403666, 1403667, 1403641, 1403664, 1401770, 1403644 y 1403668 para *L. laccata* y 1414399,1414402, 1414404, 1414405, 1414407, 1414409, 1414411, 1414413 para *H. mesophaeum*.

**3.3.9. Análisis de secuencia.** El ITS ADN se comparó con secuencias de referencia en el Genbank utilizando alineamiento múltiple con penalización para intervalos (CLC Main Workbench 5.1 software). Con este alineamiento, se calculó un árbol filogenético utilizando el algoritmo UPGMA, con 1000 réplicas.

## **3.4. RESULTADOS**

### **3.4.1. Frecuencia de formación de esporomas**

Durante el transcurso del experimento se registró la formación de 66 esporomas maduros (con láminas completamente expuestas) de *L. laccata*. La gran mayoría de ellos (83.3%) se formaron en el tratamiento donde se inoculó exclusivamente con *L. laccata*, y un porcentaje más bajo (15.1%) se registró cuando se inoculó *L. laccata* y *H. mesophaeum* simultáneamente (Cuadro 3.1). La mayor cantidad de esporomas (49) se registraron asociados con *P. montezumae* en comparación con *P. greggii* (17); la formación de los mismos se registró desde los 284 hasta los 421 días (Figura 3.1). Los primeros esporomas de *L. laccata*, 284 días después de la inoculación, se observaron asociados con *P. montezumae* inoculado con este hongo. Veinte días después de la aparición del primer esporoma ya se tenían registrados siete esporomas en éste mismo tratamiento y uno en el tratamiento de *P. greggii* inoculado con *L. laccata*.

La mayoría de los contenedores solo presentaron un esporoma, sin embargo existieron cuatro contenedores en donde se registraron dos o tres esporomas de *L. laccata* por contenedor. Asimismo también se registró un caso donde se formaron dos esporomas en un contenedor y 56 días después en ese mismo contenedor se volvió a formar otro esporoma de *L. laccata*. Es interesante señalar que en un contenedor con *P. montezumae* inoculado con *L. laccata* se observaron simultáneamente 7 y en otro hasta 30 primordios de *L. laccata*. En el caso de *P. greggii* inoculado con *L. laccata* se observaron 9 primordios en un solo contenedor. Sin embargo, todos estos primordios abortaron y ninguno formó esporomas maduros. La mayoría de los esporomas de *L. laccata* se formaron en la parte superior de los contenedores, alrededor de 1.5 cm de la planta y solo ocasionalmente se observó formación de esporomas a distancias inferiores a 1 cm de ella. Hacia el final del experimento, 392 días después de la inoculación se observó un esporoma de *L. laccata* en *P. greggii* inoculado exclusivamente con *H. mesophaeum*, resultado de la contaminación de este tratamiento probablemente por la larga duración del experimento en invernadero, de 421 días.

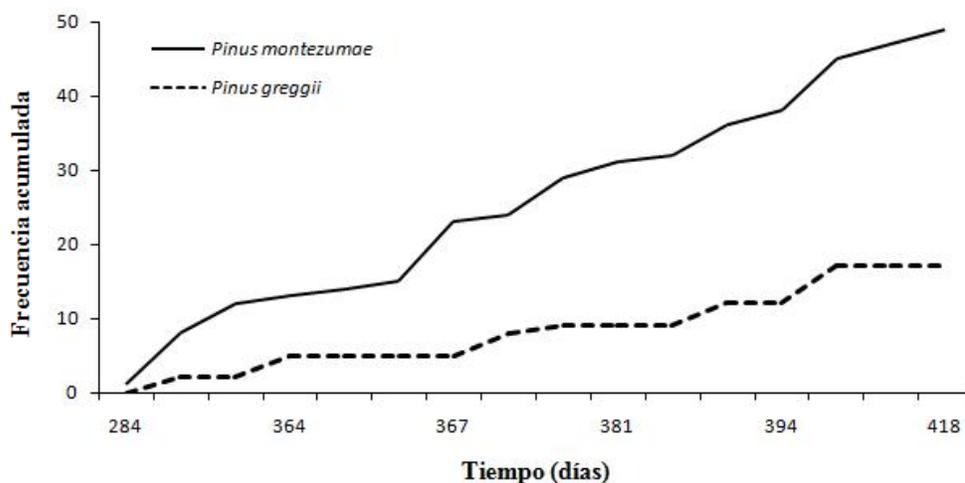
En contraste con la formación de esporomas de *L. laccata*, solo se registraron 2 esporomas de *H. mesophaeum*, ambos se observaron asociados con *P. greggii* (Cuadro 3.1) a diferencia de lo registrado para *L. laccata*, donde la mayoría se asocio con *P. montezumae*. La formación de estos esporomas ocurrió de manera tardía, iniciándose a los 392 días después de la inoculación. En el caso de los esporomas de *H. mesophaeum*, solo dos primordios se desarrollaron completamente de los 392 a los 412 días después de la inoculación; un tercer primordio abortó y no creció más de 3 mm. Estos esporomas jóvenes poseían el estípote elongado, píleo convexo y exposición de láminas (Fig. 3.3f). Después de

421 días de evaluación del experimento, una parte de las plantas se mantuvieron en el invernadero por más tiempo. Después de 24 meses de la inoculación se formaron otros siete primordios de *H. mesophaeum*, dos de estos poseían el estípite engrosado, bien definido y el píleo con velo (Fig. 3.3d), otros dos desarrollaron a esporomas inmaduros donde mostraron el píleo con velo roto y exposición de láminas (Fig. 3.3g). De los otros tres primordios, dos de ellos alcanzaron un diámetro mayor de 3 mm denominado primordio grande (Fig. 3.3c), y uno con el estípite engrosado y píleo con velo. Todos los primordios de *H. mesophaeum* se desarrollaron en la base del cepellón, cerca de los orificios de drenaje del contenedor observándose que los esporomas son geotropicamente positivos, debido a que se observaron estípites rectos en todos los casos.

**Cuadro 3.1** Frecuencia de formación de esporomas maduros (¶) de *Laccaria laccata* y *Hebeloma mesophaeum* en *Pinus greggii* y *P. montezumae*, de 284 a 421 días después de la inoculación.

Tratamiento	Especie de pino							
	<i>Pinus greggii</i>				<i>Pinus montezumae</i>			
	Número de esporomas		% colonización		Número de esporomas		% colonización	
Ll	Hm	Ll	Hm	Ll	Hm	Ll	Hm	
T	0	0	0.0	0.0	0	0	0.0	0.0
Ll	15	0	83.0	0.0	40	0	84.9	0.0
Hm	1	2	0.0	79.5	0	0	0.0	82.2
Ll+Hm	1	0	63.5	26.1	9	0	19.9	38.2
Total de esporomas	17	2			49	0		

¶: Se consideró un esporoma maduro aquel con láminas completamente expuestas; T=Plantas sin inocular, Ll=Plantas inoculadas con *Laccaria laccata*, Hm=Plantas inoculadas con *Hebeloma mesophaeum*, Ll+Hm = Plantas inoculadas simultáneamente con *Hebeloma mesophaeum* y *Laccaria laccata*. n= 60 plantas por tratamiento, total 240 plantas por especie de *Pinus*.



**Figura 3.1.** Frecuencia acumulada de formación de esporomas de *Laccaria laccata* en asociación ectomicorrízica con *Pinus greggii* (a) y *P. montezumae* (b) de 284 a 421 días después de la inoculación, en invernadero.

### 3.4.2. Colonización de hongos ectomicorrízicos

En términos generales las dos especies de pino presentaron altos porcentajes de micorrización con las dos especies de hongos inoculadas. Cuando existió inoculación exclusivamente con una especie de hongo, existieron plantas individuales que presentaron incluso más de 90% de colonización y en promedio porcentajes superiores a 75% de colonización total (Cuadro 3.1). En cuanto a la coinoculación o inoculación combinada de *L. laccata* y *H. mesophaeum*, no se encontró una relación de porcentaje de micorrización con respecto a la formación de esporoma. Adicionalmente se observó que la colonización de *L. laccata* (19.9%) en *P. montezumae* fue menor con respecto a *H. mesophaeum* (38.2%). Todas las plantas que componían el experimento presentaron, dependiendo del tratamiento, abundancia de micelio externo característico de *Laccaria* o *Hebeloma*. El micelio externo estuvo constituido por hifas de apariencia gelatinosa de color crema a café

amarillento en el caso de *L. laccata* y de textura algodonosa laxa y color blanquecino para el caso de *H. mesophaeum* (Figs. 3.2i y 3.3h).

Las ectomicorrizas de *L. laccata* fueron de color café-naranja pálido con las puntas hialinas, hinchadas y lisas cuando jóvenes y de color crema a color café claro cuando maduras. La morfología externa de las ectomicorrizas de *L. laccata* con ambas especies de pinos fueron simples y bifurcadas, de 2 a 3 mm de longitud y 0.5 mm de diámetro (Fig. 3.2i). Se apreciaron hifas de apariencia gelatinosa, blanquecina, y a veces de color café claro y amarillento.

*H. mesophaeum* también formó micorrizas con ambas especies de pino. El porcentaje de colonización al inocular exclusivamente dicha especie fue de alrededor de 80% en ambas especies de pinos, mientras que se registraron porcentajes menores cuando se efectuó la inoculación simultánea de dicha especie de hongo con *L. laccata* (Cuadro 3.1). Las ramificaciones de las micorrizas de *H. mesophaeum* fueron frecuentemente dicotómicas, y a veces simples, de 2 a 3 mm de longitud y 0.5 mm de diámetro, con hifas emanantes abundantes de color blanco (Fig. 3.3h).

### **3.4.3. Desarrollo ontogénico de los esporomas**

*Laccaria laccata*. Doscientos ochenta y cuatro días después de la inoculación, se observaron en la superficie de los contenedores agregados miceliales de color blanco (Fig. 3.2a), no mayores a un mm de diámetro, para ambas especies de pinos. Después de esta fase inicial se registró la formación de primordios pequeños, lacrimoides o piriformes, de color blanco o blanquecino (Fig. 3.2b), los cuales posteriormente comenzaron a engrosarse

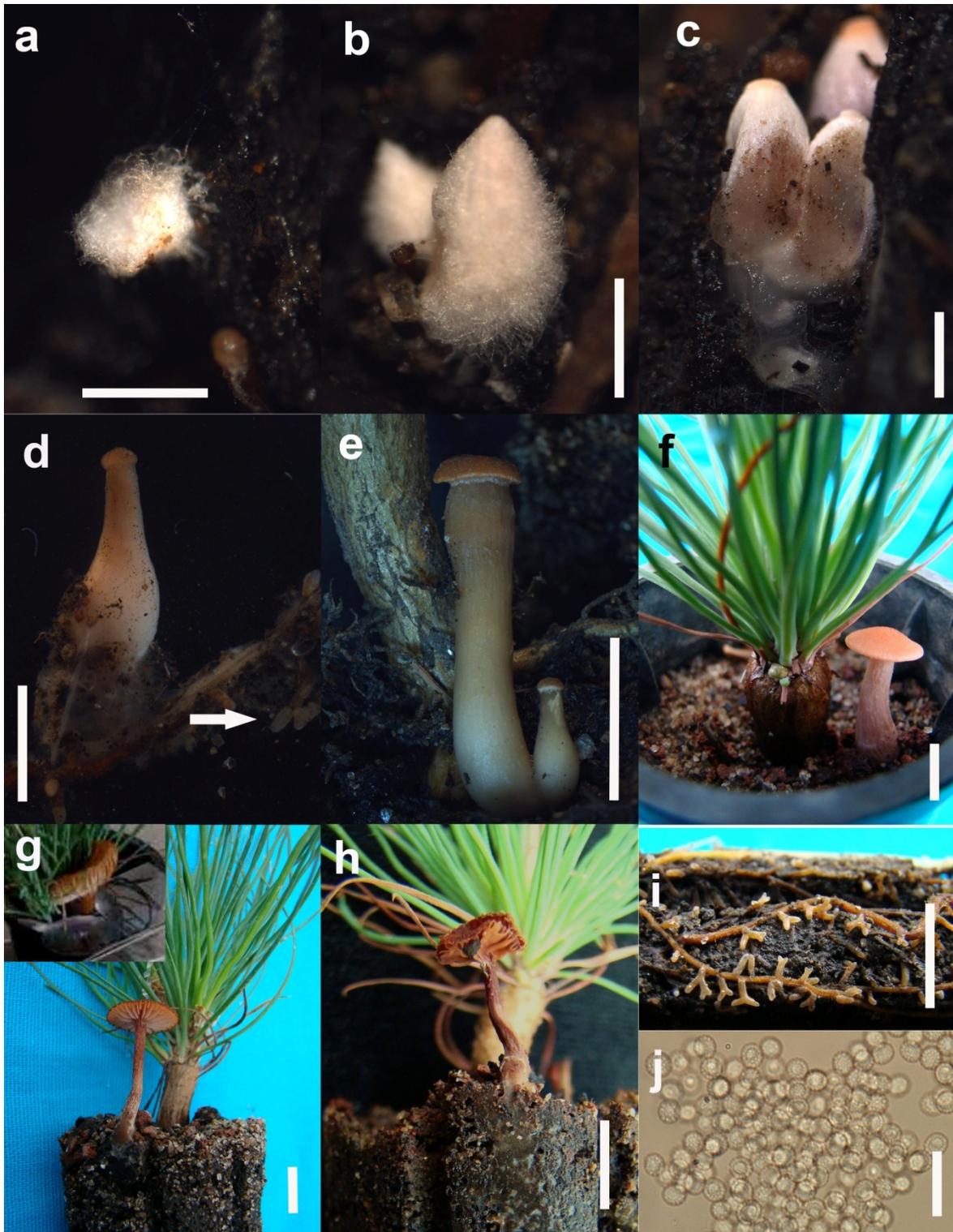
y elongarse. La formación del píleo se observó entre 5 y 7 días después del inicio de los agregados miceliales. El píleo inicialmente se observó como una pequeña protuberancia de color naranja marrón a café anaranjado, en el ápice superior del primordio, en esta etapa el píleo representaba el 0.8% del peso total del primordio. Posteriormente, el píleo se extendió (himenóforo joven) y fue posible apreciar láminas apretadas rosáceas bajo el margen del píleo, el cual representaba el 23.5% del peso total del himenóforo joven. El píleo se fue expandiendo simétricamente y el estípite continuó elongándose y engrosándose hasta formar esporomas maduros, con láminas expuestas; en esta etapa el píleo representó el 57.3% del peso total del esporoma. Durante este proceso existieron modificaciones en la forma del píleo, inicialmente semicilíndrico, después convexo y finalmente plano. El himenóforo maduro estaba compuesto de láminas paralelas, con lamélulas. Los esporomas maduros poseían un píleo de 8 a 15 mm en diámetro, presentaron un color naranja marrón cuando fresco y de color café oscuro cuando seco, con margen no estriado, contexto delgado, de color crema a rosáceo; láminas de color marrón claro, estípite de hasta 27 mm de largo y 5 mm de diámetro; un pedicelo fistuloso, finamente estriado, concolor con el píleo, con micelio basal blanco o translúcido. Las esporas fueron hialinas, globosas a subglobosas de 7.7-12.4 X 6.0-11.4  $\mu\text{m}$ , incluyendo la ornamentación, finamente equinulada. Esporada de color blanca. Al final, se observó una deshidratación de todo el esporoma lo cual generó su senescencia, sin putrefacción. El tiempo total transcurrido desde el inicio de los agregados miceliales hasta la senescencia de los esporomas fue de 30 a 35 días.

*Hebeloma mesophaeum*. Trescientos noventa y dos días después de la inoculación, se observaron agregados miceliares de color blanco, no mayores a un mm de diámetro (Fig. 3.3a), en la base del cepellón, con *P. greggii*. Después de esta fase inicial, se registró la formación de primordios pequeños, de color blanco a blanquecino, los cuales comenzaron a ensancharse en su base y el píleo inició su formación (Fig. 3.3b). El píleo inicialmente estaba constituido por una estructura subglobosa de menor diámetro que la base y posteriormente de diámetro equivalente. Al inicio se observó la presencia de láminas apretadas (himenóforo joven), de color crema y posteriormente estas fueron de color café claro. La presencia de las láminas fue más evidente cuando se inició la ruptura del velo. El píleo se fue expandiendo simétricamente hasta la completa ruptura del velo. La forma del píleo varió de subglobosa a hemisférica y posteriormente convexa. Ningún espécimen llegó a ser plano por lo que se consideró que no se alcanzaron a formar esporomas totalmente maduros. Los esporomas, aún, cuando no alcanzaron la completa madurez, formaron esporas. Estos esporomas poseían un píleo convexo de 6 a 8 mm de diámetro, de color café amarillento, superficie viscosa, margen con los restos del velo, contexto carnoso, grueso, de color blanco, láminas onduladas de color café marrón, Basidiosporas de 6.6- 10.4 X 4.5- 6.5  $\mu\text{m}$ , ovaladas a elípticas, de color ocre en Melzer y sin Melzer transparentes, con estípites fibriloso de hasta 1 cm de largo y un diámetro basal de 8 mm, lleno, cilíndrico o subclavado, finamente estriado, de color crema ocre, con pequeñas escamas junto al píleo.. La trama de las láminas careció de tonos rojizos en reactivo de Melzer. Existen similitudes morfológicas entre el desarrollo ontogénico de *L. laccata* y *H. mesophaeum* en asociación ectomicorrízica con *P. montezumae* y *P. greggii* y el hongo saprobio *Agaricus bisporus*, el cual ha sido universalmente caracterizado (Cuadro 3.2).

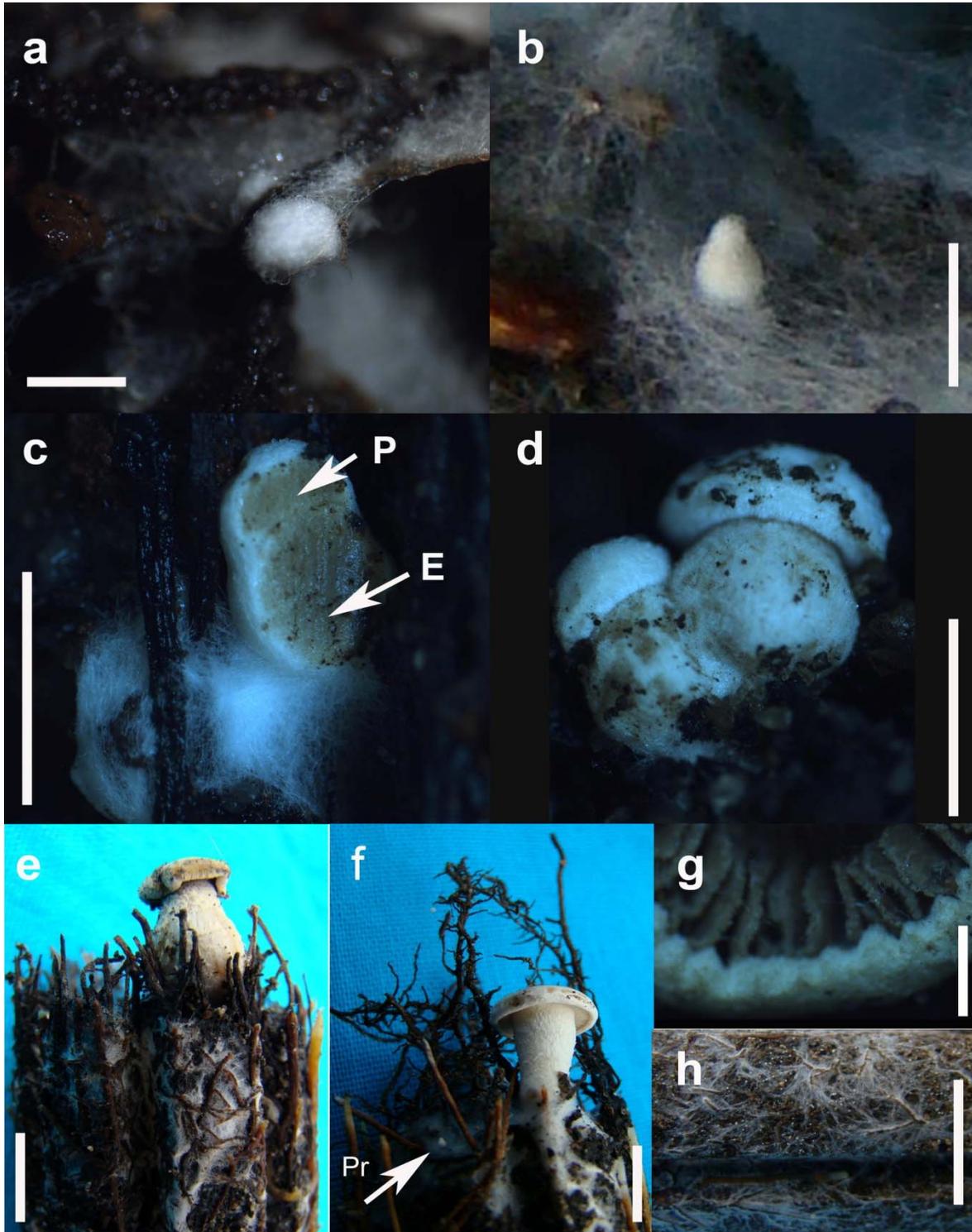
**Cuadro 3.2.** Comparación de etapas del desarrollo ontogénico de los hongos ectomicorrízicos *Laccaria laccata* y *Hebeloma mesophaeum* con *Agaricus bisporus* ampliamente estudiado.

Etapa de desarrollo	Especie de hongo comestible		
	<i>Agaricus bisporus</i> ¶	<i>Laccaria laccata</i> §	<i>Hebeloma mesophaeum</i>
0		Agregado micelial (< 1 mm de diámetro) (Fig. 1.2a).	Agregado micelial (< 1 mm de diámetro) (Fig. 1.3a).
1	Primordio vivo 1-3 mm en diámetro (Primordio pequeño).	Primordio pequeño, de 2 mm longitud, con la base del estípite ancha y píleo indiferenciado (Fig. 1.2b).	Primordio pequeño de 3 mm, con la base del estípite ancha y el píleo aun sin diferenciarse (Fig. 1.3b).
2	Primordio vivo >3 mm en diámetro (Primordio grande).	Primordio grande, de 5 mm de longitud, de color ligeramente rosado, con inicios de formación del píleo (Fig. 1.2c).	Primordio grande y con el píleo globoso, con estípite y píleo diferenciándose (Fig. 1.3c).
3	Estípite bien definido y píleo con velo.	Esporoma color marrón claro, elongación del estípite con la base ancha y píleo formado (Fig. 1.2d).	Estípite engrosado y píleo con velo bien diferenciado (Fig. 1.3d).
4	Píleo con inicios de velo roto y algunas láminas expuestas.	Esporoma inmaduro, con estípite elongado y píleo hemisférico, con láminas semiexpuestas (Fig. 1.2e).	Esporoma inmaduro, con el píleo con inicios de velo roto y algunas láminas expuestas (Fig. 1.3e).
5	Píleo con velo roto y láminas semiexpuestas.	Esporoma joven, con ensanchamiento del píleo hemisférico, con láminas expuestas y estípite carnoso semi fibrinoso (Fig. 1.2f).	Esporoma joven, con píleo hemisférico y láminas expuestas (Fig. 1.3f).
6	Píleo convexo y láminas expuestas.	Esporoma maduro, píleo aplanado con láminas y lamélulas e inicio de esporulación (Fig. 1.2g).	Esporoma con estípite elongado, píleo convexo y láminas expuestas (Fig. 1.3g).
7	Píleo plano y láminas completamente expuestas.	Senescencia (Fig. 1.2h).	

¶: Según Hammond y Nichols (1976); §: las etapas corresponden a las mostradas en la Figura 1.2.



**Figura 3.2.** *Laccaria laccata* **a** Agregado micelial. **b** Primordio pequeño. **c** Primordio grande. **d** Esporoma en etapa 3. **e** Esporoma inmaduro. **f** Esporoma joven. **g** Esporoma maduro y esporada (recuadro). **h** Esporoma senescente. **i** Ectomicorrizas. **j** Nuevas esporas. Barras a y b: 1mm, c y d: 3 mm, f-i: 1 cm. j: 30  $\mu$ m.

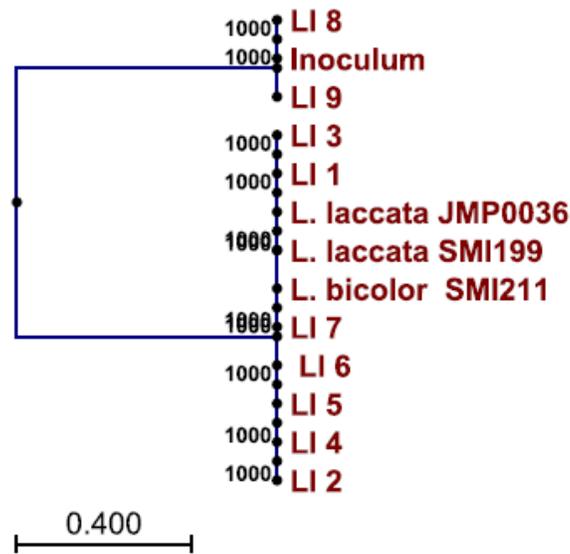


**Figura 3.3.** *Hebeloma mesophaeum*. **a** Agregado micelial. **b** Primordio pequeño **c** Esporoma en etapa 2, diferenciándose píleo (P) de estípite (E). **d** Esporoma inmaduro **e** Esporoma joven **f** Esporoma con estípite elongado y un primordio (Pr) al lado. **g** Láminas. **h** Ectomicorrizas con hifas emanantes. Barras a y g:1 mm; b, c y d:0.5 cm; e, f y h:1 cm.

#### **3.4.4. Identificación de especies fúngicas de inóculo y esporomas**

La identificación de los hongos presentes en el inóculo y de los esporomas obtenidos después de la síntesis se realizó a través del análisis de sus secuencias espaciadoras en rRNA. Las secuencias de ADN cuando se utilizó *Laccaria laccata* como inóculo, se compararon a través de un alineamiento múltiple como se muestra en el Anexo 1. La secuencia obtenida a partir del inóculo de *Laccaria* mostró 98% de homología con la cepa de referencia *L. laccata* voucher SMI199 and *L. laccata* voucher JMP0036. Por otro lado, los esporomas identificados y micelio obtenido de raíces micorrizadas mostraron 100% de homología con la secuencia obtenida del inóculo, sugiriendo fuertemente que los esporomas se formaron a partir de las esporas presentes en el inóculo. Un segundo grupo de ITS fueron identificados como homólogos a *L. laccata* voucher; esta evidencia experimental sugiere la presencia de una mezcla de esporas de *Laccaria* en el inóculo inicial o una colonización secundaria con esporas presentes en el ambiente.

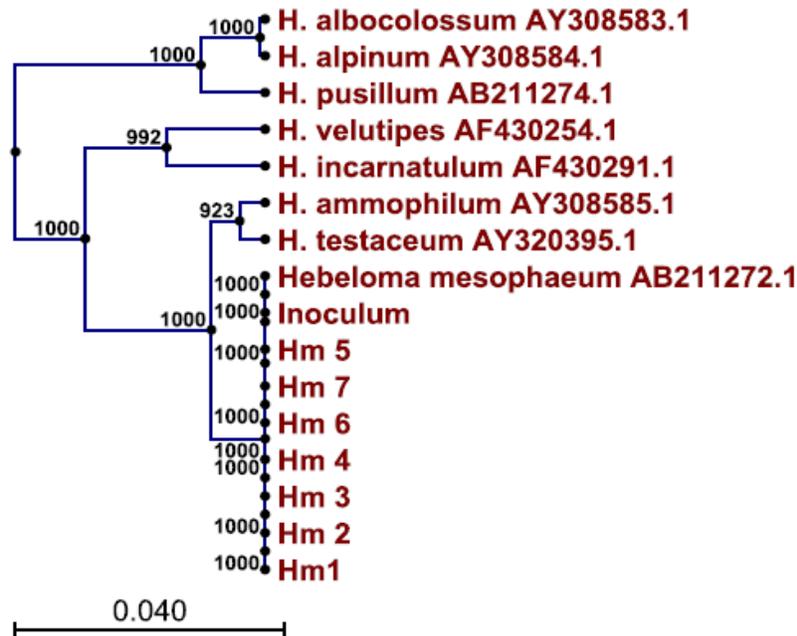
La comparación de ADN fue posteriormente utilizada para calcular un árbol de distancia como se describió en materiales y métodos. El árbol calculado con 1000 repeticiones mostró dos clados (Figura 3.4). En éste, se muestra la elevada homología de los esporomas obtenidos con los inóculos empleados. Un segundo clado muestra la similitud de secuencias con ITS de *Laccaria laccata* también reportados en la base de datos.



**Figura 3.4.** Árbol de distancia calculado usando el método UPMGA para secuencias de *Laccaria*. Las distancias se calcularon con 1000 réplicas. El clado superior muestra al inóculo con 100% de homología con dos esporomas obtenidos posterior a la inoculación. El clado inferior agrupa tres accesiones de *L. laccata* con ocho esporomas obtenidos.

Se empleó el mismo enfoque experimental para comparar las secuencias de *Hebeloma* presente en los hongos utilizados como inóculo con las secuencias obtenidas de micelio y esporomas obtenidos posteriores a la inoculación. En el Anexo 2 se observa la comparación de siete secuencias de esporomas e inóculo con las reportadas en la base de datos del género *Hebeloma*. El ITS del inóculo mostró 100% de homología con *Hebeloma mesophaeum* AB211272, mientras que siete secuencias procedentes de esporomas mostraron 100% de homología con el inóculo y la secuencia de referencia del Genbank. Con esta comparación, se calculó un árbol de distancia con 1000 repeticiones (Figura 3.5). Como consecuencia de la homología calculada, se resolvió un clado que agrupa al ITS del

inóculo y los siete esporomas con la secuencia *H. mesophaeum* AB211272. Este hecho sugiere fuertemente que los esporomas se generaron a partir de las esporas presentes en el inóculo. Cuatro clados adicionales pueden distinguirse agrupando siete secuencias ITS ya descritas para miembros del género *Hebeloma*.



**Figura 3.5.** Árbol de distancia calculado usando el método UPMGA para *Hebeloma*. El clado inferior agrupa al inóculo con 100% de homología con siete esporomas obtenidos posterior a la inoculación. En este clado está *H. mesophaeum* AB211272. Siete ITS de *Hebeloma* reportados se agrupan en cuatro clados distintos.

### 3.5. DISCUSION

En el caso de los hongos ectomicorrízicos comestibles se ha utilizado usualmente micelio como inoculante de plántulas (Yamada *et al.* 2001a; 2001b; 2007; Ruiz-Díez *et al.* 2006). En contraste, el uso de esporas y/o esporomas deshidratados, principalmente de Agaricales y Boletales comestibles ectomicorrízicos, ha recibido menor atención, a pesar de que se ha

demostrado que las esporas tienen funciones críticas en el desarrollo de las poblaciones y comunidades de los hongos ectomicorrízicos (Ishida *et al.*, 2008). Las esporas de algunos hongos ectomicorrízicos no comestibles, principalmente Gasteromycetes dentro de los géneros *Pisolithus*, *Scleroderma* (Martin *et al.* 2003; Turjaman *et al.* 2005; García-Rodríguez *et al.* 2006) y *Rhizopogon* (Castellano *et al.* 1985; Bruns *et al.* 2009) han sido usados exitosamente como fuentes de inóculo ectomicorrízico en plantas de los géneros *Eucalyptus*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Quercus*, *Shorea*, etc.

En nuestro caso se observó una clara preferencia en la formación de esporomas de *L. laccata* con *P. montezumae*, en comparación con *P. greggii*, bajo las mismas condiciones ambientales. Así mismo, al parecer no existe una relación entre el porcentaje de micorrización y la formación de esporomas; ya que cuando se inoculó *L. laccata* en forma individual, con porcentajes de colonización mayores a 80% se formaron esporomas de este hongo con ambas especies de pino, en inoculación combinada con *H. mesophaeum* también se observó esta relación, sin embargo con un mínimo de colonización de *L. laccata* (19%) formo 9 esporomas de *L. laccata*. Estos resultados sugieren que se requieren altos porcentajes de colonización ectomicorrízica para la producción de esporomas (Ohta 1998; Guerin-Laguette *et al.* 2000), aun y cuando esos porcentajes no sean únicamente del esporoma formado. Previamente, Godbout y Fortin (1990) señalaron como una observación que *L. bicolor* formó más esporomas con *P. strobus* que con *P. taeda* y *Picea glauca*; además se ha mencionado también que no solo influye la especie de hospedero sino incluso el clon vegetal (Last *et al.* 1984; Baum *et al.* 2009). *P. montezumae* es una especie que existe en el área de influencia del mercado de Ozumba, lo cual no ocurre para *P. greggii*, el cual está ausente en esta área. Otra explicación podría ser que *P. greggii* requiere de una

mayor cantidad de fotoasimilados para la formación de esporomas (Godbout y Fortin 1990; Ohta y Fujiwara 2003; Massicotte *et al.* 2005).

El período de formación de esporomas de *H. mesophaeum* a los 13 meses después de la inoculación es comparable con el periodo de formación de esporomas de *Cantharellus cibarius* y *Lactarius deliciosus* en presencia de *Pinus sylvestris* (Danell y Camacho 1997; Guerin-Laguette *et al.* 2000). Este periodo se puede prolongar hasta varios meses, como fue el caso de tres especies del género *Tricholoma* con *Pinus thunbergii* ectomicorrizadas *in vitro* con micelio de *Tricholoma portentosum*, *T. saponaceum* y *T. terreum* que formaron esporomas maduros en promedio 25 meses después de iniciado el estudio (Yamada *et al.* 2007). Utilizando micelio de diferentes especies de hongos ectomicorrízicos, Yamada *et al.* (2001a) observaron en *Pinus densiflora*, después de 5 meses, esporomas maduros de *Rhizopogon rubescens*, *Tricholoma portentosum*, *T. saponaceum* y *Lactarius akahatsu*. El tiempo para la obtención de esporomas de *Hebeloma* y *Laccaria* en presencia de un hospedero utilizando micelio proveniente de cultivo puro, es mucho menor que el observado en el presente estudio, y puede variar desde mes y medio, como es el caso de *H. cylindrosporum* con *Pinus pinaster* (Debaud y Gay 1987), hasta dos y seis meses, como en *H. sarcophyllum* con *Pinus virginiana* y *L. laccata* con *P. densiflora* (Ohga y Iida 2001) y *L. bicolor* con *Pinus strobus* (Godbout y Fortin 1990), respectivamente.

Se ha reportado la formación de esporomas de hongos comestibles considerados ectomicorrízicos en ausencia de hospederos; lo cual ha puesto de manifiesto que pueden existir especies ectomicorrízicas facultativas. Dentro de estas especies se han incluido *Hebeloma radicosum* (Ohta 1998), *Boletus reticulatus* (Yamanaka *et al.* 2000), *Boletus* sp. (Ohta y Fujiwara 2003), *Tylopilus castaneiceps* (Kikuchi *et al.* 2009), *Boletus edulis* (Díaz

*et al.* 2009) y *Phlebopus portentosus* (Sanmee *et al.* 2010). En el caso de los hongos comestibles saprobios, los tiempos de formación de esporomas suelen ser más cortos, por ejemplo *Agaricus bisporus* y *Flammulina velutipes* con un promedio de 21 días (Noble *et al.* 2003; Sakamoto 2010), o de hasta 10 días para *Pleurotus pulmonaris* (Sánchez *et al.* 2006).

Un primordio de *Agaricus bisporus* lo definió Wood (1976) como una estructura mayor a 1 mm de diámetro compuesta por una densa malla de hifas con una superficie lisa, visiblemente distinta de cordones o nudos de hifas, en el caso de los primordios de *L. laccata* y *H. mesophaeum*, desde etapas muy tempranas, la superficie de los agregados miceliales y de los primordios no fue lisa, sino más bien algodonosa de color blanco en ambas especies (Figs. 3.2a y 3.3a). En términos generales, la morfología de los esporomas maduros formados en invernadero fue similar a la encontrada en los esporomas silvestres con los cuales se inoculó, para ambas especies de hongos. La principal diferencia entre los esporomas maduros formados en invernadero y los silvestres utilizados como fuente de inóculo fue el tamaño, dado que éstos últimos fueron mayores. Los esporomas usados como inóculo tenían píleos de hasta 5 y 6 cm de diámetro en *L. laccata* y *H. mesophaeum*, respectivamente. Una situación similar, respecto al tamaño se registró para el largo y diámetro de los estípites, los cuales fueron de hasta 7.5 x 0.5 y 8 x 1.3 cm, para dichas especies respectivamente. Sin embargo, en términos generales los esporomas maduros registrados en invernadero presentaron el resto de las características correspondientes a *L. laccata* y *H. mesophaeum* según Mueller (1997) y Arora (1979). Tal y como lo describió Smith *et al.* (1983), las esporas de *H. mesophaeum* fueron amarillentas en Melzer.

Debaud y Gay (1987) también observaron que los esporomas de *H. cylindrosporum* asociados con *P. pinaster* fueron de menor tamaño que los encontrados en condiciones naturales. Una razón que podría explicar el menor tamaño de los esporomas en los contenedores podría ser un abastecimiento reducido de nutrimentos y de agua, tal y como lo señalaron Godbout y Fortin (1990) y Kikuchi *et al.* (2009). Se ha registrado previamente que los factores que influyen en la formación de esporomas de hongos ectomicorrízicos comestibles asociados con sus hospederos vegetales son principalmente la temperatura, el régimen de fertilización (Debaud y Gay 1987; Godbout y Fortin 1990), la humedad relativa (Yamada *et al.* 2007) así como la aportación de carbohidratos o incluso los impulsos eléctricos (Ohga y Iida 2001).

Los primordios de *H. mesophaeum* que se obtuvieron en este experimento se desarrollaron también en la base del cepellón, cerca de los orificios de drenaje del contenedor, como sucedió con *C. cibarius* inoculado en *P. sylvestris* (Danell y Camacho 1997), y con algunos primordios de *L. bicolor* (Godbout y Fortin 1990), donde los esporomas no presentaron gravitropismo, pues sus estípites permanecieron rectos en todos los casos; caso contrario al hongo comestible más popular del mundo *Pleurotus ostreatus* (Miyazaki *et al.* 2010).

*L. laccata* y *H. mesophaeum* son especies de hongos que se venden y consumen tradicionalmente en diversas regiones de México (Montoya *et al.* 2003; Pérez-Moreno *et al.* 2008; Estrada-Martínez *et al.* 2009). A pesar de que en términos generales las especies de *Hebeloma* son consideradas tóxicas a nivel internacional (Arora 1979; Valenzuela *et al.* 1996; Bonet *et al.* 2004), en México se ha podido constatar que por lo menos las especies de *H. alpinum*, *H. leucosarx* y *H. mesophaeum* son comestibles. Las especies estudiadas tienen un gran potencial para su uso en invernadero, dado que poseen características tales

como: *i*) ser especies pioneras (Obase *et al.* 2009); *ii*) desarrollarse en sitios con bajas cantidades de nutrientes (Trocha *et al.* 2007); *iii*) ser especies registradas abundantemente en plantaciones (Barroetaveña *et al.* 2005) y en invernadero (Barroetaveña *et al.* 2005; Rincon *et al.* 2007); *iv*) tener capacidad de formar banco de abundantes esporas (Ishida *et al.* 2008); y *v*) en México, al ser comestibles, es relativamente fácil el acceder a grandes cantidades por su amplia y comercialización en el área de estudio (Pérez-Moreno *et al.*, 2008) y en otras áreas del centro de México (Montoya *et al.* 2008). Los esporomas deshidratados y molidos de *L. laccata* y *H. mesophaeum* demostraron su eficacia capacidad de micorrizar plantas en estadios juveniles de *P. greggii* y *P. montezumae* en invernadero a una tasa de  $10^6$  a  $10^7$ , además de que formaron esporomas de ambas especies de hongos, 248 días de la inoculación. Los esporomas fueron capaces de formar esporas y completar su ciclo de vida en las condiciones experimentales estudiadas. El uso de inoculo a base de esporomas deshidratados y molidos presentan la ventaja de ser una técnica simple y económica, en relación al inoculo con micelio vegetativo. Además existe una gran diversidad genética potencial debido a la alta concentración de esporas con cantidad variable que va de  $10^6$  a  $10^7$ , que podría representar una ventaja para las plantas por la diversidad de funciones benéficas para los hospederos que se ha demostrado en otros estudios, dentro de los cuales se incluye: *i*) importancia en translocación nutrimental (Pérez-Moreno y Read 2000, 2001a, b; Finlay 2004; Zadworny *et al.* 2008), *ii*) potencial para el control de patógenos (Branzanti *et al.* 1999; Martín-Pinto *et al.* 2006; Machón *et al.* 2009), *iii*) resistencia a hospederos en condiciones adversas como presencia de metales pesados (Krpata *et al.* 2008) o sequía (Lehto *et al.* 2008). A pesar de que los resultados del presente trabajo son indicadores del potencial de uso de las especies fúngicas estudiadas son necesarias más investigaciones relacionadas con otras especies de pinos, dado que en el

país se conocen 72 taxa de *Pinus* y 150 especies de *Quercus* (Rzedowski 1978; Valencia 2004), aunado a las más de 100 especies de hongos silvestres comestibles que establecen relaciones simbióticas ectomicorrízicas (Villarreal y Pérez-Moreno 1989).

### **3.6. CONCLUSIONES**

Los resultados de este estudio sugieren que bajo las mismas condiciones ambientales la planta hospedera puede ejercer una influencia en la formación de esporomas. Se observó una mayor frecuencia (2.9 veces mayor) de formación de esporomas de *L. laccata* en *P. montezumae* que en *P. greggii*. En el caso de *H. mesophaeum* solo se registraron dos esporomas asociados con *P. greggii*. Cuando se inoculó exclusivamente con una sola especie de hongo se registraron altos porcentajes de colonización, superiores a 75%, asociados con la formación de esporomas de *Laccaria* y de *Hebeloma*. La aparición de los primeros esporomas ocurrió a los 284 y 392 días después de la inoculación para *Laccaria* y *Hebeloma*, respectivamente, mucho después de lo que se ha reportado en estudios que utilizan micelio como fuente de inóculo. Existieron similitudes morfológicas entre el desarrollo ontogénico de estos hongos en asociación ectomicorrízica con pinos y el hongo saprobio *Agaricus bisporus* universalmente caracterizado.

### 3.7. LITERATURA CITADA

- Arora D. (1979). *Mushrooms demystified a comprehensive guide to the fleshy fungi of the Central California Coast*. Ten speed press, Berkeley, California, United States of America.
- Barroetaveña C., Cázares E., Rajchenberg M. (2005). Mycorrhizal fungi in *Pinus ponderosa* introduced in Central Patagonia (Argentina). *Nova Hedwigia* 80:453-464.
- Baum Ch., Toljander Y.K., Eckhardt K., Weih M. (2009). The significance of host-fungus combinations in ectomycorrhizal symbioses for the chemical quality of willow foliage. *Plant Soil*. 323:213-224.
- Bonet J.A., Fischer C.R., Colinas C. (2004). The relationship between forest age and aspect on the production of sporocarps of ectomycorrhizal fungi in *Pinus sylvestris* forests of the central Pyrenees. *Forest Ecology and Management*. 203:157-175.
- Branzanti B.M., Rocca E., Pisi A. (1999). Effect of ectomycorrhizal fungi on chestnut ink disease. *Mycorrhiza* 9:103–109.
- Bruns T.D., Peay K.G., Boynton P.J., Grubisha L.C., Hynson N.A., Nguyen N.H., Rosenstock N.P. (2009). Inoculum potential of *Rhizopogon* spores increases with time over the first 4 yr of a 99-yr spore burial experiment. *New Phytologist* 181: 463-470.
- Castellano M.A., Trappe J.M., Molina R. (1985). Inoculation of container-grown Douglas-fir seedlings with basidiospores of *Rhizopogon vinicolor* and *R. colossus*: effects of fertility and spore application rate. *Can. J. For. Res.* 15:10-13.
- Cripps C.L. (2001). Mycorrhizal fungi of aspen forests: natural occurrence and potential applications. In: Shepperd W.D., Binkley D., Bartos D.L., Stohlgren T.J., Eskew

- L.G., Eds, Sustaining aspen in western landscapes: Symposium proceedings. RMRS-P-18. Rocky Mountain Research Station Publications. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station. U.S.A. pp. 285-298.
- Danell E., Camacho F.J. (1997). Successful cultivation of the golden chanterelle. *Nature* 385:303.
- Debaud J.C, Gay G. (1987). In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytologist*. 105:429-436.
- Díaz G., Flores R., Honrubia M. (2009). Descripción de cultivos miceliares de Boletales neotropicales y europeos (*Boletus* grupo *edulis*, *Boletellus* y *Suillus*) formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro. *Rev. Mexicana de Micología* 30:1-7.
- Estrada-Martínez E., Gastón G., Cibrián-Tovar D., Ortega-Paczka R. (2009). Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos comestibles silvestres de mercados regionales y comunidades de la Sierra Nevada (México). *Interciencia* 34:25-33.
- Finlay R.D. (2004). Mycorrhizal fungi and their multifunctional roles. *Mycologist* 18:91-96.
- García-Rodríguez J.L., Pérez-Moreno J., Aldrete A., Cetina-Alcalá V.M., Vaquera-Huerta H. (2006). Characterization of the wild ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch in culture and in symbiosis with eucalypt and pine. *Agrociencia* 40:665-676.
- Godbout C., Fortin J.A. (1990). Cultural control of basidiome formation in *Laccaria bicolor* with container-grow White pine seedlings. *Mycol Res*. 94:1051-1058.
- Guerin-Laguette A., Plassard C., Mousain D. (2000). Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and

- unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Can. J. Microbiol.* 46:790-799.
- Hammond J.B.W., Nichols R. (1976). Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing.: Changes in soluble carbohydrates during growth of mycelium and sporophore. *Journal of General Microbiology* 93:309-320.
- Index Fungorum (consultado el 21 de julio de 2010)
- <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>
- Ishida T.A., Nara K., Tanaka M., Kinoshita A., Hogetsu T. (2008). Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist* 180:491-500.
- Kikuchi K., Matsushita N., Suzuki K. (2009). Fruit body formation of *Tylophila castaneiceps* in pure culture. *Mycoscience* 50:313-316.
- Kropp B. R., Mueller G.M. (1999). *Laccaria*. In: Cairney J.W.G., Chambers S.M., Eds, *Ectomycorrhizal Fungi Key genera in Profile*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 65-88.
- Krpata D., Peintker U., Langer I., Fitz W.J., Schweiger P. (2008). Ectomycorrhizal communities associated with *Populus tremula* growing on a heavy metal contaminated site. *Mycological Research* 112:1069-1079.
- Last F.T., Mason P.A., Pelham J., Ingleby K. (1984). Fruitbody production by sheathing mycorrhizal fungi: effects of 'host' genotypes and propagating soils. *For Ecol Manage.* 9:221-227.
- Lehto T., Brosinsky A., Heinonen-Tanski H., Repo T. (2008). Freezing tolerance of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Mycorrhiza*. 18:385-392.

- Machón P., Pajares J.A., Díez J.J., Alves-Santos F.M. (2009). Influence of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* on pre-emergence, post-emergence and late damping-off by *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides* on Stone pine seedlings. *Symbiosis*. 49: 101-109.
- Marmeisse R., Gryta H., Jargeat P., Fraissinet-Tachet L., Gay G., Debaud J.C. (1999). Hebeloma. In: Cairney J. W.G., Chambers S.M., Eds, *Ectomycorrhizal Fungi Key genera in Profile*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 89-127.
- Martín-Pinto P., Pajares J., Díez J. (2006). In vitro effects of four ectomycorrhizal fungi, *Boletus edulis*, *Rhizopogon roseolus*, *Laccaria laccata* and *Lactarius deliciosus* on *Fusarium* damping off in *Pinus nigra* seedlings. *New Forests*. 32:323-334.
- Martin T.P., Harris J.R., Eaton G.K., Miller O.K. (2003). The efficacy of ectomycorrhizal colonization of pin and scarlet oak in nursery production. *J. Environ. Hort.* 21:45-50.
- Massicotte H.B., Melville L.H., Peterson R.L. (2005). Building a basidiocarp: a case study of *Laccaria* spp. fruitbodies in the extraradical mycelium of *Pinus ectomycorrhizas*. *Mycologist* 19:141-149.
- Miyazaki Y., Sunagawa M., Higashibata A., Ishioka N., Babasaki K., Yamazaki T. (2010). Differentially expressed genes under simulated microgravity in fruiting bodies of the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Federation of European Microbiological Societies FEMS, Microbiol Lett* 307:72-79.
- Molina R., Chamard J. (1983). Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. II. Effects of fertilizer forms and level on ectomycorrhizal development and growth of container-grown Douglas-fir and ponderosa pine seedlings. *Can J For Res.* 13:89-95.

- Montoya A., Hernández N., Mapes C, Kong A., Estrada-Torres A. (2008). The collection and sale of wild mushrooms in a community of Tlaxcala, México. *Economic Botany* 62: 413-424.
- Montoya A., Hernández-Totomoch O., Estrada-Torres A., Kong A. (2003). Traditional knowledge about mushrooms in a Nahuatl community in the state of Tlaxcala, México. *Mycologia* 95:793-806.
- Mueller G.M. (1997). The mushroom genus *Laccaria* in North America. [http://www.fieldmuseum.org/research\\_collections/botany/botany\\_sites/fungi/species/species-list.side.html](http://www.fieldmuseum.org/research_collections/botany/botany_sites/fungi/species/species-list.side.html) (consultado el 2 de julio de 2010).
- Nara K. (2006). Ectomycorrhizal networks and seedling establishment during early primary succession. *New Phytologist* 169: 169-178.
- Noble R., Fermor T.R., Lincoln S., Dobrovin-Pennington A., Evered C., Mead A. (2003). Primordia initiation of mushroom (*Agaricus bisporus*) strains on axenic casing materials. *Mycologia* 95:620-629.
- Obase K., Tamai Y., Yajima T., Miyamoto T. (2007). Mycorrhizal associations in woody plant species at the Mt. Usu volcano, Japan. *Mycorrhiza*. 17:209-215.
- Obase K., Tamai Y., Yajima T., Miyamoto T. (2009). Mycorrhizal synthesis of four ectomycorrhizal fungi in potted *Populus maximowiczii* seedlings. *Mycoscience* 50:143-145.
- Ohga S., Iida S. (2001). Effect of electric impulse on sporocarp formation of ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in Japanese red pine plantation. *J For. Res.* 6:37-41.
- Ohta A. (1998). Fruit-body production of two ectomycorrhizal fungi in the genus *Hebeloma* in pure culture. *Mycoscience* 39:15-19.

- Ohta A., Fujiwara N. (2003). Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture. *Mycoscience* 44:295-300.
- Pérez-Moreno J., Martínez-Reyes M., Yescas-Pérez A., Delgado-Alvarado A., Xoconostle-Cázares B. (2008). Wild mushroom markets in Central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany* 62:425-436.
- Pérez -Moreno J., Read D.J. (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytol.* 145:301–309.
- Pérez-Moreno J., Read D.J. (2001a) Exploitation of pollen by mycorrhizal mycelial systems with special reference to nutrient recycling in boreal forests. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 268:1329–1335.
- Pérez-Moreno J., Read D.J. (2001b) Nutrient transfer from soil nematodes to plants: a direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. *Plant Cell Environ.* 24:1219–1226.
- Rincón A., Parladé J., Pera J. (2007). Influence of the fertilisation method in controlled ectomycorrhizal inoculation of two Mediterranean pines. *Ann. For. Sci.* 64:577-583.
- Ruiz-Díez B., Rincón A.M., de Felipe M.R., Fernández-Pascual M. (2006). Molecular characterization and evaluation of mycorrhizal capacity of *Suillus* isolates from Central Spain for the selection of fungal inoculants. *Mycorrhiza* 16:465–474.
- Rzedowski J. (1978). *Vegetación de México*. Limusa. México.
- Sakamoto Y. (2010). Protein expression during *Flammulina velutipes* fruiting body formation. *Mycoscience* 51:163-169.
- Sanchez C., Moore D., Díaz- Godínez G. (2006). Microscopic observations of the early development of *Pleorotus pulmonaris* fruit bodies. *Mycología* 98:682-689.

- Sanmee R., Lumyong P., Dell B., Lumyong S. (2010). In vitro cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand. *Mycoscience* 51:15-22.
- Smith A.H., Evenson V.S., Mitchel D.H. (1983). The veiled species of *Hebeloma* in the Western United States. University of Michigan Press: Ann Arbor, MI. 219 p.
- Takahide A.I., Nara K., Tanaka M., Kinoshita A., Hogetsu T. (2008). Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist*. 180:491-500.
- Trocha L.K., Oleksyn J., Turzanska E., Rudawska M., Reich P.B. (2007). Living on the edge: Ecology of an incipient *Betula*-fungal community growing on brick walls. *Trees* 21:239–247
- Turjaman M., Yutaka T., Hendrik S., Suwido H.L., Joo Y.Ch., Mitsuru O., Keitaro T. (2005). Inoculation with the ectomycorrhizal fungi *Pisolithus arhizus* and *Scleroderma* sp. improves early growth of *Shorea pinanga* nursery seedlings. *New Forests* 30:67–73.
- Valencia A.S. (2004). Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 33-53.
- Valenzuela E., Ramirez C., Moreno G., Polette M., Garnica S., Peredo H., Grinbergs J. (1996). Agaricales más comunes recolectados en el Campus Isla teja de la Universidad Austral de Chile. *Bosque*. 17:51-63.
- Villareal L., Pérez-Moreno J. (1989). Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micol Neotrop Apl* 2:77-114.
- Wood D.A., (1976). Primordium formation in axenic cultures of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. *J Gen Microbiol*. 95:313-323.

- Yamada A., Kobayashi H., Ogura T., Fukada M. (2007). Sustainable fruit-body formation of edible mycorrhizal *Tricholoma* species for 3 years in open pot culture with pine seedling host. *Mycoscience* 48:104-108.
- Yamada A., Ogura T., Ohmasa M. (2001a). Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza* 11:59-66.
- Yamada A., Ogura T., Ohmasa M. (2001b). Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis. II. Morphology of mycorrhizas in open-pot soil. *Mycorrhiza* 11:67-81.
- Yamanaka K., Namba K., Tajiri A. (2000). Fruit body formation of *Boletus reticulatus* in pure culture. *Mycoscience* 41:189-191.
- Zadworny M., Zbigniew G., Koczorowska E., Werner A. (2008). Conidia of *Trichoderma virens* as a phosphorus source for mycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 19:61–66.

## CAPITULO IV

### **Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* s. l.**

#### **4.1. RESUMEN**

Debido a que la ectomicorriza es una simbiosis de gran importancia para el funcionamiento de los bosques, la inoculación micorrízica tiene una gran importancia en México. En el país hay más de 100 especies de hongos silvestres comestibles ectomicorrízicos con potencial de uso como inoculantes. Se evaluó el efecto de la inoculación con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* s.l. en el crecimiento y contenido de macro y micronutrientes en plantas de *Pinus greggii* en vivero. El peso seco de la parte aérea y, raíz, así como la altura y el diámetro del tallo fueron mayores en las plantas inoculadas, con respecto a las plantas no inoculadas. El contenido de todos los nutrientes evaluados fue mayor en las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas. El contenido de P y Mg en la parte aérea de la planta fue 6.7 y 6.9, veces mayor, respectivamente en las plantas inoculadas, comparadas con las no inoculadas. Además, *H. mesophaeum* ocasionó una alta eficiencia en la translocación de P y Mg a la parte aérea. Se registró un alto porcentaje de micorrización (79.5%), de la cual más de la mitad se observó en la parte media del cepellón. La inoculación con *H. mesophaeum* tiene entonces un gran potencial de uso en la producción de plantas de *P. greggii* en invernadero.

**Palabras clave:** macronutrientes, pinos, hongos silvestres comestibles, esporomas.

## 4.2. INTRODUCCIÓN

La micorriza es una de las simbiosis de mayor importancia en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas terrestres. Específicamente las ectomicorrizas son un componente de enorme importancia ecofisiológica para el mantenimiento de los ecosistemas forestales. Al incrementar el área de absorción de las raíces, los hongos ectomicorrízicos originan un efecto benéfico en las plantas asociadas al aumentar la absorción de nutrimentos, principalmente N y P; en retribución, los hongos reciben C de ellas (Read y Pérez-Moreno, 2003). Adicionalmente, las ectomicorrizas son de considerable interés dado que algunos de los Basidiomycota y Ascomycota que las forman producen esporomas comestibles. Dichos hongos constituyen un recurso forestal no maderable de enorme importancia a nivel internacional para la conservación forestal, ya que son una fuente alimenticia o una alternativa de ingreso económico para las comunidades locales. En el caso específico de México se conocen más de 200 especies de hongos silvestres comestibles, de las cuales alrededor de 50% establecen ectomicorrizas con árboles de importancia forestal (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989).

Actualmente, la producción de inoculantes basados en hongos ectomicorrízicos ha cobrado una enorme importancia en los países con tradición forestal. En países como México, este tipo de acercamiento ha recibido escasa atención, a pesar de su enorme potencial. Por lo que es necesaria la generación de conocimientos vinculados con la utilización de hongos ectomicorrízicos nativos con plantas de interés forestal. *Pinus greggii* Engelm es una especie forestal de gran importancia en los programas de reforestación del país (Ramírez-Herrera *et al.* 2005). Por su parte, *Hebeloma mesophaeum* s.l. (Pers.) Quél., es un hongo ectomicorrízico que tiene una gran importancia como especie comestible en diversas partes

del centro de México (Pérez-Moreno et al. 2008). La hipótesis a evaluar en el presente trabajo fue que la inoculación del hongo comestible ectomicorrízico *H. mesophaeum* coloniza las raíces de *P. greggii* y, como consecuencia, incrementa su crecimiento y su contenido de N, P, K, Ca y Mg, tanto en su parte aérea como en su raíz.

### **4.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.3.1. Material vegetal e inóculo**

Las semillas de *P. greggii* utilizadas fueron superficialmente esterilizadas antes de la siembra, empleando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %. Los esporomas utilizados para el inóculo procedían del mercado de Ozumba, estado de México (Fig. 4.1a). La preparación del inóculo consistió en cortar los píleos de los estípites de *H. mesophaeum*, deshidratarlos a 35 °C y molerlos. Posteriormente los píleos molidos se tamizaron, empleando una malla de 1.19 mm (Duvesa, México, D.F.), para homogeneizar el tamaño de las partículas. El inóculo así obtenido se almacenó a 5 °C hasta que fue empleado.

#### **4.3.2. Montaje del experimento y evaluación de variables**

El sustrato utilizado consistió en una mezcla de arena, corteza y suelo en una proporción 2:2:1, misma que fue esterilizada con vapor de agua a 1.3 kg/cm<sup>2</sup> y 125 °C durante 5 h. Posteriormente el sustrato se transfirió a tubetes de plástico negro de 140 mL. Cada planta se inoculó con 10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> esporas de *H. mesophaeum*. Aplicándose a una profundidad de 3 cm de la parte superior del tubete y la semilla fue colocada a una profundidad de 1.0 cm. Las plantas permanecieron en el invernadero desde la siembra hasta 421 días después de la inoculación. Se regaron cada tercer día con agua purificada. Durante la cosecha del experimento se midió la altura y el diámetro del tallo en todas las plantas. Se seleccionaron al azar 10 plantas inoculadas con *H. mesophaeum* y 10 plantas sin inocular para evaluar el

peso seco de la raíz y el peso de la parte aérea. Todas las muestras se secaron a 70 °C por 48 horas y se pesaron (Balanza Ohaus, Montana, USA).

#### **4.3.3. Caracterización macro y micromorfológica de la ectomicorriza**

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

#### **4.3.4. Análisis nutrimental de las plantas**

El análisis de nutrimentos se realizó en las mismas plantas utilizadas para evaluar el peso seco a cada planta por separado, siendo analizados los siguientes elementos: (1) N por medio de digestión húmeda con ácido sulfúrico (Bremner, 1965), (2) P Olsen (fósforo disponible) mediante extracción con  $\text{NaHCO}_3$  0.5 M pH 8.5 y determinación colorimétrica a través de la formación del complejo de azul de molibdeno (Olsen et al., 1954), (3) K mediante extracción con acetato de amonio ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) 1N pH 7 por fotometría de llama, (4) Ca y (5) Mg mediante determinación por espectrofotometría de absorción atómica.

#### **4.3.5. Análisis estadístico**

El diseño experimental fue en bloques al azar, con 2 tratamientos (plantas inoculadas con *H. mesophaeum* y plantas no inoculadas) cada uno con 60 plantas. Los datos de porcentaje de colonización ectomicorrízica fueron transformados a  $(\% \text{colonización} + 0.05)^{1/2}$  previo a su análisis, siguiendo los procedimientos de Alves *et al.* (2010). Para todas las variables se realizó un análisis de varianza mediante PROC GLM, y se compararon las medias con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) empleando el Programa SAS versión 8 (SAS Institute, 1999).

### **4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **4.4.1. Crecimiento vegetal**

El peso seco total de las plantas inoculadas fue 2.9 veces mayor ( $p \leq 0.05$ ) que el de las no inoculadas. Un efecto similar se observó en el caso de la altura de las plantas y el diámetro del tallo (Fig. 4.1b). Es importante notar que la relación parte aérea:raíz no se modificó, mientras que la relación altura: diámetro sí tuvo cambios, 11.77 versus 7.19 en plantas inoculadas y no inoculadas, respectivamente (Cuadro 4.1). Efectos benéficos, en términos de la producción de biomasa de pinos, han sido reportados previamente como consecuencia de la inoculación con hongos ectomicorrízicos (Domínguez *et al.*, 2004; Duñabeitia *et al.*, 2004; Christophe *et al.*, 2010).

#### **4.4.2. Colonización micorrízica**

La colonización micorrízica solo se observó en plantas inoculadas y ésta fue alta (79.5%) (Cuadro 4.1). Altos porcentajes de hasta 80% de micorrización se han registrado en plantas

**Cuadro 4.1.** Peso seco, altura y diámetro del tallo en plantas de *Pinus greggii* inoculadas o no con *Hebeloma mesophaeum* 421 días después de la inoculación.

Tratamiento	Peso seco			Altura de las plantas	Diámetro del tallo
	Parte aérea	Raíz	Total		
	g			cm	mm
Plantas inoculadas	2.68 ± 0.98 a	2.11 ± 0.53 a	4.78 ± 0.86 a	26.74 ± 4.13 a	2.27 ± 0.27 a
Plantas no inoculadas	0.92 ± 0.57 b	0.71 ± 0.37 b	1.63 ± 0.90 b	11.15 ± 1.81 b	1.55 ± 0.20 b

Los datos mostrados son promedios ± desviación estándar. n=10 para peso seco y n=60 para altura y diámetro del tallo. Valores en la misma columna con la misma letra son iguales según Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

de pino inoculadas con hongos ectomicorrízicos de los géneros *Tuber*, *Rhizopogon* y *Suillus* (Parladé *et al.*, 1996; Duñabeitia *et al.*, 2004) y valores bajos de 18 a 22% con *H. mesophaeum* en *Betula pendula* han sido registrados por Trocha *et al.* (2007). En el caso de las plantas inoculadas en este trabajo, se observó un mayor ( $P \leq 0.05$ ) porcentaje de raíces cortas micorrizadas en la parte central del cepellón. Este porcentaje fue 1.6 y 3.0 veces mayor, comparado con la parte superior e inferior del cepellón, respectivamente (Cuadro 4.2). Se observó una mayor dinámica de renovación de raíces finas en las plantas inoculadas. Como consecuencia, se registró un mayor porcentaje de raíces cortas muertas en el caso de las plantas inoculadas (16.7%) comparado con el de las plantas no inoculadas (1.7%). Sin embargo, una alta proporción de las raíces cortas muertas en las plantas inoculadas correspondieron a raíces no micorrizadas (10.6%).

Las ramificaciones de las micorrizas de *H. mesophaeum* fueron simples o dicotómicas, de 2 a 3 mm de longitud y 0.5 mm de diámetro, la forma de las terminaciones fue recta y cilíndrica en la punta, de color café y en algunas partes blanca (Fig. 4.1e y f), no se

**Cuadro 4.2.** Porcentaje de raíces cortas micorrizadas y no micorrizadas, vivas y muertas en plantas de *Pinus greggii* inoculadas o no con *Hebeloma mesophaeum* en 3 áreas del cepellón 421 días después de la inoculación.

Tratamientos	Vivas		Muertas	
	Micorrizadas	No Micorrizadas	Micorrizadas	No Micorrizadas
	%			
Plantas inoculadas				
Parte superior cepellón ¶	25.7 b	1.5 a	2.5 a	5.0 a
Parte media cepellón	40.5 a	1.7 a	1.8 a	3.1 a
Parte inferior del cepellón	13.3 c	0.6 a	1.8 a	2.5 a
Total	79.5	3.8	6.1	10.6
Plantas no inoculadas				
Parte superior cepellón	0.0	21.0 a	0.0	0.5 a
Parte media cepellón	0.0	45.2 a	0.0	0.4 a
Parte inferior del cepellón	0.0	32.1 a	0.0	0.8 a
Total	0.0	98.3	0.0	1.7

Valores en la misma columna, con la misma letra, para cada categoría de planta, son iguales según Tukey ( $P \leq 0.05$ ),  $n=3$ . ¶ = las partes del cepellón se refieren a la profundidad del cepellón a partir del cuello de la raíz de la planta; superior= 0 a 5 cm, media = 5.1 a 10 cm e inferior= 10.1 a 15 cm.

observaron rizomorfos. La base de la ectomicorriza fue de 1 a 2 mm y el ápice de 0.5 a 1.4 mm con hifas emanantes abundantes de color blanco a lo largo de todas las raíces ectomicorrizadas (Fig. 4.1c y d). El manto fue plectenquimatoso, sin un arreglo específico. Estas características morfológicas son similares a las reportadas por Deemy (2008). A pesar de que esta es una caracterización morfológica seminal, es necesario una detallada caracterización morfoanatómica más profunda.

#### 4.4.3. Contenido nutrimental

El contenido de todos los macro y micronutrientes evaluados fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en las plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas (Cuadro 4.3). En el caso del N, los incrementos observados son de gran significancia ecofisiológica, debido a que es un elemento limitante en los ecosistemas forestales. El contenido de N en la parte aérea y

radical fue 2.1 y 2.6 veces mayor en las plantas inoculadas en comparación con las plantas no inoculadas. Esto concuerda con reportes previos que han registrado el incremento del contenido de N en plantas inoculadas con *Hebeloma* (Tibbet y Sanders, 2002) o con otros hongos ectomicorrízicos (Colpaert *et al.*, 1996; Turjaman *et al.*, 2006; Paul *et al.*, 2007). En *Hebeloma* se han identificado transportadores del amonio (la fuente preferida de N por los microorganismos) y enzimas que lo metabolizan como la glutamina sintetasa y el glutamato deshidrogenasa (Javelle *et al.*, 2003).

**Cuadro 4.3.** Contenido nutrimental en plantas de *Pinus greggii* inoculadas o no con *Hebeloma mesophaeum* 421 días después de la inoculación.

Parte de la planta	Contenido nutrimental				
	N	P	K	Ca	Mg
	g				
Aérea					
Plantas inoculadas	21.61a	0.60a	10.61a	5.15a	3.82a
Plantas no inoculadas	10.09b	0.09b	3.94b	2.29b	0.55b
Radical					
Plantas inoculadas	13.04a	0.56a	0.88a	8.34a	1.93a
Plantas no inoculadas	4.92b	0.12b	0.61b	2.61b	0.54b
Total					
Plantas inoculadas	34.65a	1.16a	11.48a	13.49a	5.75a
Plantas no inoculadas	15.01b	0.21b	4.55b	4.91b	1.09b
	relación				
Relación parte aérea : raíz					
Plantas inoculadas	1.66	1.07	12.06	0.62	1.98
Plantas no inoculadas	2.05	0.75	6.46	0.88	1.02

Valores en la misma columna con la misma letra son iguales según Tukey ( $P \leq 0.05$ ). n=10.

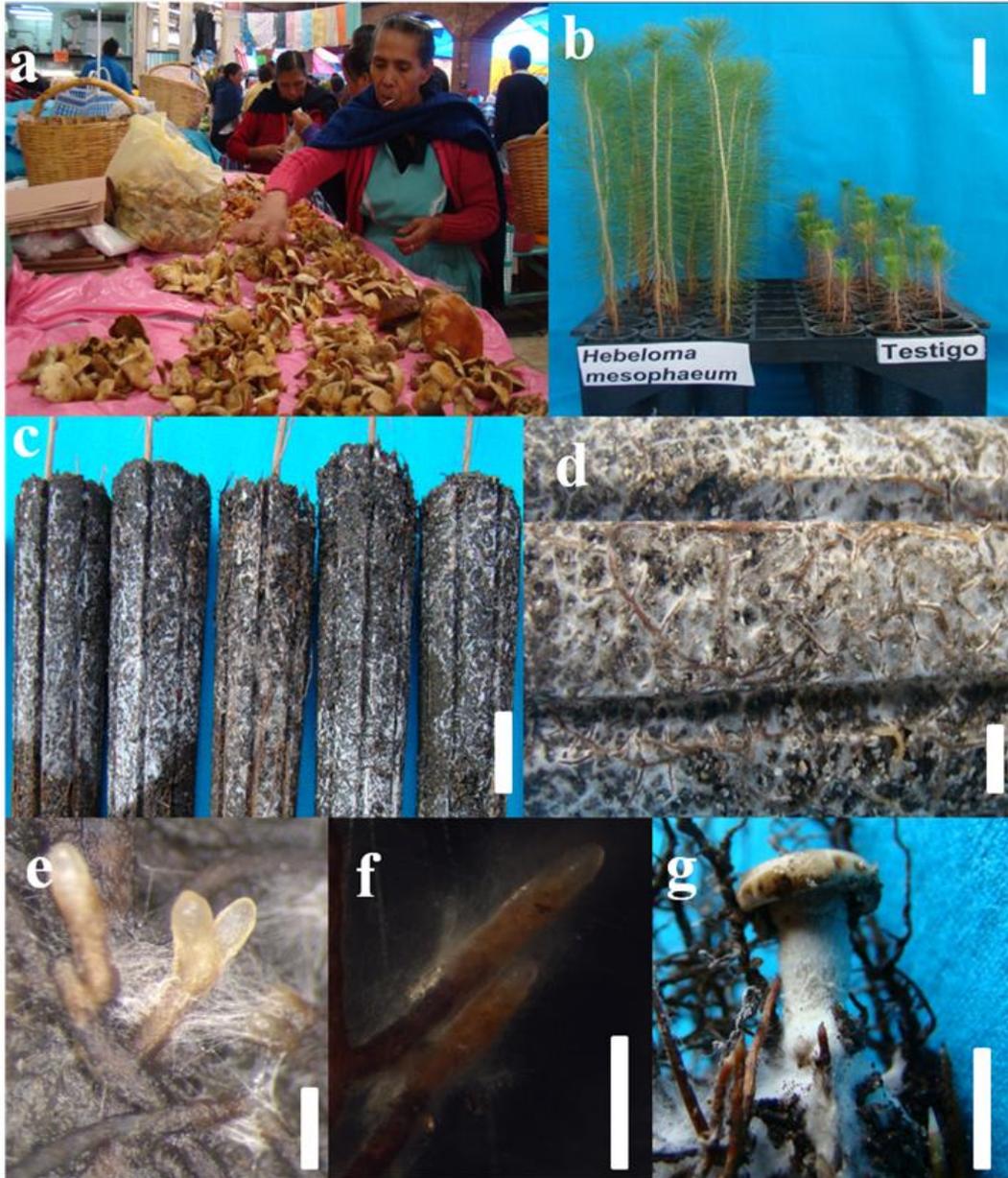
En el caso del P, Mg y K, el contenido total fue 5.5, 5.2 y 2.5 veces mayor ( $p \leq 0.05$ ) en las plantas inoculadas en comparación con las plantas no inoculadas, respectivamente (Cuadro 4.3). Se ha demostrado que el micelio externo ectomicorrízico tiene un importante papel activo en la adquisición de P, inorgánico y orgánico, a partir de fuentes no accesibles a la raíz (Pérez-Moreno y Read, 2000). Recientemente Louche *et al.* (2010), demostraron que

*Hebeloma libera* fosfatasa ácida, lo cual facilita la translocación de los ortofosfatos. Por otra parte, la translocación de Mg y K, ha sido escasamente estudiada para muchos hongos ectomicorrízicos. Sin embargo, se ha demostrado que especies como *Paxillus involutus* o *Scleroderma bermudense* son importantes en la translocación de dichos nutrientes, respectivamente (Jentsche *et al.*, 2000; 2001; Bandou *et al.*, 2006). La deficiencia de Mg y K ha sido reportada previamente en bosques centrales de Europa por Ubel y Heinsdorf (1997) y Jentsche *et al.* (2000). La relación parte aérea:raíz del contenido de P y Mg, fue 1.6 y 1.8 veces, respectivamente, mayor en plantas inoculadas respecto a las no inoculadas. Este último dato es un indicador de la alta eficiencia de *H. mesophaeum* no solo para tomar del suelo estos nutrientes, sino para movilizarlos hacia la parte aérea de las plantas inoculadas. Jentsche *et al.* (2001) demostraron que existe una fuerte interdependencia entre los flujos de N, K y Mg y la translocación de P dentro de las células del micelio ectomicorrízico. Esto se debe a que los fosfatos movilizados por el micelio externo de los hongos ectomicorrízicos usualmente se incorporan en las vacuolas fúngicas como polifosfatos, los cuales se encuentran fuertemente cargados negativamente. Esto origina un desbalance electrónico en las células fúngicas que facilita el flujo de cationes tales como  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  o aminoácidos básicos como la arginina. Se ha demostrado, además una asociación vacuolar de P con K y Mg, pero no con Ca (Bucking y Heyser, 1999).

En el presente trabajo se observó la formación de esporomas de *H. mesophaeum* (Fig. 4.1g), 392 días después de la inoculación. Diversos estudios han reportado la producción de esporomas de hongos comestibles ectomicorrízicos tales como *Cantharellus cibarius*, *L. laccata*, *Hebeloma cylindrosporum* y *H. sarcophyllum* (Debaud y Gay 1987; Danell y Camacho 1997; Wang y Hall, 2004)

#### **4.5. CONCLUSIONES**

Las plantas inoculadas presentaron conspicuos incrementos en biomasa de la parte aérea, raíz y contenido de N, P, K, Ca y Mg, con respecto a las plantas no inoculadas. *H. mesophaeum* fue particularmente eficiente en la movilización de P y Mg a la parte aérea de las plantas de *P. greggii* inoculadas. Se registró un alto porcentaje de colonización por *H. mesophaeum*, la mayoría de la cual se observó en la parte central del cepellón. Se observó la formación de esporomas del hongo inoculado 392 días después de la inoculación. Debido a los altos porcentajes de micorrización y al efecto benéfico registrado se considera que el hongo comestible ectomicorrizico *H. mesophaeum* tiene potencial de utilización en programas de inoculación de *P. greggii* bajo condiciones en vivero.



**Figura 4.1.** *Hebeloma mesophaeum* (Hm) y *Pinus greggii* (Pg). **a** Venta del hongo comestible Hm en el mercado de Ozumba, México. **b** Efecto de la inoculación de Hm en el crecimiento de Pg, plantas inoculadas (izquierda) o no (derecha). **c, d** Plantas micorrizadas mostrando el abundante micelio externo de Hm. **e, f** Morfología de la raíz ectomicorrizada de Pg con Hm. **g** Esporoma maduro de Hm asociado con las raíces de Pg. Barras b y c 4 cm, d y g 1 cm, e y f 1 mm.

#### 4.6. LITERATURA CITADA

- Agerer R. (1994). Characterization of ectomycorrhiza. In: Techniques for the Study of Mycorrhiza. Norris J.R., Read D.J., and Varma A.K. (eds.). Academic Press. London, U.K. pp:25-73.
- Alves L., Oliveira V. L., Germano N. S. F. (2010). Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of eucalypt. Brazilian Journal of Microbiology 41: 676-684.
- Bandou E., Lebailly F., Muller F., Dulormne M., Toribio A. (2006). The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. Mycorrhiza 16:559-565.
- Bremner J.M. (1965). Total nitrogen, In. C. A. Black (ed.) Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9: 1149-1178. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- Bücking H., Heyser W. (1999). Elemental composition and function of polyphosphates in ectomycorrhizal fungi - an X-ray microanalytical study. Mycol. Res. 103:31-39.
- Christophe C., Turpault M., Uroz S., Leclerc E., Kies A., Frey-Klett P. (2010). *Laccaria bicolor* S238N improves Scots pine mineral nutrition by increasing root nutrient uptake from soil minerals but does not increase mineral weathering. Plant Soil 328:145-154.
- Colpaert J. V., Van Laere A., Van Assche J. A. (1996). Carbon and nitrogen allocation in ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Pinus sylvestris* L. seedlings. Tree Physiology 16:787-793.
- Danell E., Camacho F.J. (1997). Successful cultivation of the golden chanterelle. Nature 385:303.

- Debaud J.C, Gay G. (1987). In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytologist*. 105:429-436.
- Deemy. (2008). Characterization and determination of ectomycorrhizae. (www.deemy.de) (consultada el 5 de noviembre de 2010).
- Domínguez N., J. A., R. Planelles, J. A. Rodríguez B., Y J. A. Saiz de Omeñaca. (2004). Influencia de la micorrización con trufa negra (*Tuber melanosporum*) en el crecimiento, intercambio gaseoso y nutrición mineral de plántulas de *Pinus halepensis*. *Invest. Agrar. Sist. Recur. For.* 13:317-327.
- Duñabeitia M. K., Hormilla S., Garcia-Plazaola J. I., Txarterina K., Arteche U., Becerril J. M. (2004). Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza* 14:11-18.
- Javelle A., Morel M., Rodríguez-Pastrana B. R., Botton B., André B., Marini A. M., Brun A. Chalot M. (2003). Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Microbiology* 47:411-430.
- Jentschke G., Brandes B., Kuhn A. J., Schröder W. H., Becker J. S., Godbold D. L. (2000). The mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* transports magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. *Plant and Soil*. 220:243-246.
- Jentschke G., Brandes B., Kuhn A. J, Schröder W. H., Godbold D.L. (2001). Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist* 149:327–337.

- Louche J., Arif A. M., Cloutier-Hurteau B., Sauvage F. X., Quiquampoix H., Plassard C. (2010). Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiol Ecol* 73:323-335.
- Olsen S.R., Cole C.V., Watanabe F. S., Dean L. A. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circular 939:1-19. Gov. Printing Office Washington D.C.
- Paul L. R., Chapman B. K., Chanway C. P. (2007). Nitrogen fixation associated with *Suillus tomentosus* tuberculate ectomycorrhizae on *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Annals of Botany* 99:1101-1109.
- Parladé J., Pera J., Alvarez I. F. (1996). Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6:237-245.
- Pérez-Moreno J., Martínez-Reyes M., Yescas-Pérez A., Delgado-Alvarado A., Xoconostle-Cázares B. (2008). Wild mushroom markets in Central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany* 62:425-436.
- Pérez-Moreno, J., Read D. J. (2000). Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist*. 145:301-309.
- Ramírez H. C., Vargas H. J. J., López-Upton J. (2005). Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. *Acta Botánica Mexicana* 72:1-16.
- Read D. J., Pérez-Moreno J. (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytologist* 157:475-492.

- SAS Institute. (1999). SAS User's Guide, versión 8.0. SAS Institute Inc., Cary, N. C. 595 p.
- Tibbett M., Sanders F. E. (2002). Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany* 89:783-789.
- Trocha L. K., Oleksyn J., Turzanska E., Rudawska M., Reich P. B. (2007). Living on the edge: Ecology of an incipient *Betula*-fungal community growing on brick walls. *Trees* 21:239-247.
- Turjaman M., Tamai Y., Segah H., Limin S. H., Osaki M., T. K. (2006). Increase in early growth and nutrient uptake of *Shorea seminis* seedlings inoculated with two ectomycorrhizal fungi. *Journal of Tropical Forest Science* 18:243-249.
- Übel E., Heinsdorf D. (1997). Results of long-term K and Mg fertilizer experiments in afforestation. *For Ecol Manag.* 91:47-52.
- Villarreal L., Pérez-Moreno J. (1989). Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micol Neotrop Apl* 2:77-114.
- Wang Y, Hall I. R. (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany* 82:1063-1073.

## CAPITULO V

### **Micorrización, crecimiento y transferencia de nutrimentos en *Pinus greggii* Engelm y *P. montezumae* Lamb. inoculados con tres hongos comestibles, solos o combinados, en invernadero**

#### **5.1. RESUMEN**

Las ectomicorrizas incrementan la translocación de nutrimentos del suelo a sus plantas asociadas. Algunos de estos nutrimentos no están disponibles en forma directa para las plantas hospederas, sin embargo cuando éstas están asociadas a los hongos micorrízicos, debido a la mayor área de exploración del micelio y las enzimas que poseen las hifas, se incrementa la translocación de nutrimentos minerales y orgánicos hacia las plantas asociadas. En este capítulo se reporta que, en términos generales, el contenido total de N, P, K, Ca y Mg, fue significativamente superior en plantas de *P. greggii* y *P. montezumae* inoculadas respecto a las plantas sin inocular, independientemente de si las plantas fueron inoculadas solas o combinadas con *L. laccata s.l.*, *H. mesophaeum s.l.* y *B. edulis s.l.* El porcentaje de raíces micorrizadas vivas de *L. laccata* y *H. mesophaeum* fue superior en el área media (5.1 a 10 cm de profundidad), en comparación con el área superior e inferior del cepellón, en ambas especies de pinos. Existió una conspicua colonización micorrízica en el caso de *L. laccata* y *H. mesophaeum* tanto en *P. greggii* como en *P. montezumae*. En contraste la colonización con *Boletus edulis* fue muy reducida de 3.7 y 0.1%, respectivamente. La eficiencia de translocación de P y Mg a la parte aérea dependió de la planta hospedera más que de la especie fúngica inoculada.

**Palabras clave:** interacción nutrimental, P, Mg, pinos, colonización micorrízica

## 5.2. INTRODUCCIÓN

Una de las relaciones más importantes entre plantas y microorganismos es la micorriza. La simbiosis ectomicorrízica es un mutualismo que se establece entre especies de plantas principalmente árboles (angiospermas y gimnospermas) y hongos, principalmente Basidiomycetes y Ascomycetes (Smith y Read, 2008). Se ha demostrado que la inoculación con hongos ectomicorrízicos origina beneficios a diversas especies de plantas de interés forestal. Actualmente, uno de los criterios de selección de los hongos a emplearse para inocular árboles es su comestibilidad. A nivel mundial, existen más de 1,100 especies de hongos silvestres comestibles (Boa, 2004) y México es uno de los países con mayor biodiversidad de hongos silvestres comestibles en el mundo, debido a que se tienen registrados más de 200 especies de hongos silvestres comestibles (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989). A nivel mundial se conocen alrededor de 200 especies de hongos comestibles ectomicorrízicos que están ampliamente distribuidos (Wang y Hall, 2004). Se ha estimado, que 10 a 15% de la producción total de los fotosintatos de las plantas asociadas de ecosistemas templados es transferido a los simbiosiontes fúngicos (Vogt *et al.*, 1991); y que las hifas externas proporcionan hasta 80% del P y 25% del N requeridos por la planta (Sylvia, 1999). A nivel mundial se han realizado diversos estudios en la translocación de nutrientes por los hongos ectomicorrízicos, principalmente en los casos de N y P (Smith y Read, 2008). Sin embargo, existe poca información con otros nutrientes minerales, como por ejemplo Ca y Mg (Marschner y Dell, 1994; Jentschke *et al.*, 2000). El objetivo del presente trabajo fue evaluar en invernadero el efecto simple o combinado de la inoculación de *Laccaria laccata s.l.*, *Hebeloma mesophaeum s.l.* y *Boletus edulis s. l.*, en el crecimiento y contenido nutrimental (N, P, K, Ca y Mg) de *Pinus greggii* y *P. montezumae*, para determinar si existía una mayor colonización por *Laccaria laccata* y *Hebeloma*

*mesophaeum* en comparación con *Boletus edulis* tanto en *Pinus greggii* como en *P. montezumae* y si la inoculación, sola o combinada, de *L. laccata*, *H. mesophaeum* y *B. edulis*, incrementaba el crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* y *P. montezumae*, con énfasis en la translocación de Ca y Mg.

### **5.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.3.1. Material biológico y condiciones de crecimiento**

Esta investigación se realizó en un invernadero del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, estado de México. Para este trabajo se seleccionaron dos especies de pino de gran importancia ecológica y económica en México: *Pinus montezumae* Lamb y *P. greggii* Engelm. ex Parl. ampliamente utilizadas en programas de reforestación para recuperar suelos degradados en diferentes partes del país. *P. montezumae* se distribuye sobre la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur y Sierra Madre de Chiapas hasta Guatemala. Esta especie presenta una estrategia de crecimiento llamada “grass stage” o cespitosa. Mediante esta estrategia durante los primeros años los árboles jóvenes crecen muy lentamente, generalmente de 15 a 30 cm. Este grueso y denso crecimiento de las hojas formado a nivel del suelo aparentemente protege al joven tallo del daño de los incendios. Adicionalmente, es una especie muy resistente a heladas y condiciones de alta montaña (CONAFOR, 2010). *P. greggii* se distribuye sobre la Sierra Madre Oriental; en ensayos de plantaciones ha demostrado altas tasas de crecimiento en altura y diámetro y una amplia capacidad para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, especialmente en terrenos degradados y con problemas de sequía (López-Upton *et al.*, 2004; Ramírez-Herrera *et al.*, 2005). El tratamiento a las semillas fue el mismo que el señalado en el capítulo anterior.

### 5.3.2. Preparación de inoculantes.

Como resultado de estudios previos efectuados en el Parque Nacional Izta-Popo-Zoquiapan (ubicado en la parte central de México entre 18° 59' y 19° 16' 25'' N y 98° 34' 54'' y 98° 16' 25'' W), con bosques de *Abies religiosa*, *Pinus hartwegii*, *P. montezumae* y *P. patula*, se seleccionaron tres especies de hongos ectomicorrízicos comestibles con potencial para inocular especies útiles para reforestación en México. Éstos fueron *Hebeloma mesophaeum*, *Laccaria laccata* y *Boletus edulis*. Las especies de los géneros *Hebeloma* y *Laccaria*, tienen un alto potencial para ser usadas en programas de inoculación de plantas de vivero debido a que se asocian con una amplia gama de hospederos, incluyendo las especies del género *Pinus*. Las especies de los géneros *Hebeloma* y *Laccaria* son pioneras que pueden colonizar eficientemente a las plántulas y son relativamente fáciles de aislar (Santiago-Martínez *et al.*, 2003; Marmeeisse *et al.*, 1999). *Boletus edulis* Bull. ex Fr. *sensu stricto*, *B. aereus* Bull. ex Fr, *B. aestivalis* Fr., *B. pinophilus* Pilfit et Dermek y *B. reticulatus* Boud. son un grupo de hongos ectomicorrízicos comestibles y que con frecuencia se agrupan como *B. edulis sensu lato* (Hall *et al.*, 1998). *Boletus edulis s.l.* es un hongo comestible muy popular en Europa, Norte América y Asia. Los esporomas de *B. edulis* tienen un sabor fuerte y diferente de otros hongos; su sabor se mantiene o se incrementa después de secarse o cocinarse a altas temperaturas; lo que provoca una gran demanda para sopas y guisos. En Europa, Norte América y Asia, miles de toneladas son consumidas cada año. *B. edulis* es usado también como medicina en China (Hall *et al.*, 1998). Dentro de los criterios considerados en la selección de hongos en el presente trabajo se encontraron además: *i*) abundancia de esporomas, *ii*) costo en el mercado; y *iii*) facilidad de producir inoculante a partir de pileos molidos. Durante años anteriores se realizaron exploraciones en varios mercados y zonas forestales del centro de

México: “La Merced”, “Jamaica” y “Central de Abastos” en la ciudad de México; “Texcoco”, “Netzahualcoyotl”, “Ozumba”, “Amecameca”, “Chalco”, “San Rafael” y “Colonia Ávila Camacho” en el estado de México; “San Martín Texmelucan” en el estado de Puebla y “Tetela del Volcan” en el estado de Puebla; donde se observó que algunos de ellos son centros de acopio nacionales, regionales o locales, como es el caso del mercado de Ozumba, donde se comercializan hongos comestibles de los bosques aledaños a esta región. Todos los cuerpos fructíferos utilizados en esta investigación se compraron en el mercado de Ozumba, estado de México. Los inoculantes de los hongos ectomicorrízicos fueron preparados en el Laboratorio de Microbiología, del Programa de Edafología, del Colegio de Postgraduados, tal y como se describe en el capítulo anterior.

### **5.3.3. Inoculación de plantas**

El sustrato utilizado y el tamaño de envases se describen en el capítulo anterior. Se utilizó 1.0 g de inóculo por planta para *H. mesophaeum* y *L. laccata* y 0.5 g de *B. edulis*, dependiendo del tratamiento. En todos los casos las plantas fueron inoculadas con al menos  $10^7$  a  $10^8$  esporas. Para el caso de *Boletus* se utilizó una menor cantidad de inóculo debido a que el inoculante consistía exclusivamente en himenio y a que éste es fácilmente separable del contexto del píleo, lo cual no ocurrió para las otras especies. El experimento fue mantenido en invernadero durante 421 días.

### **5.3.4. Diseño experimental, variables y análisis estadístico**

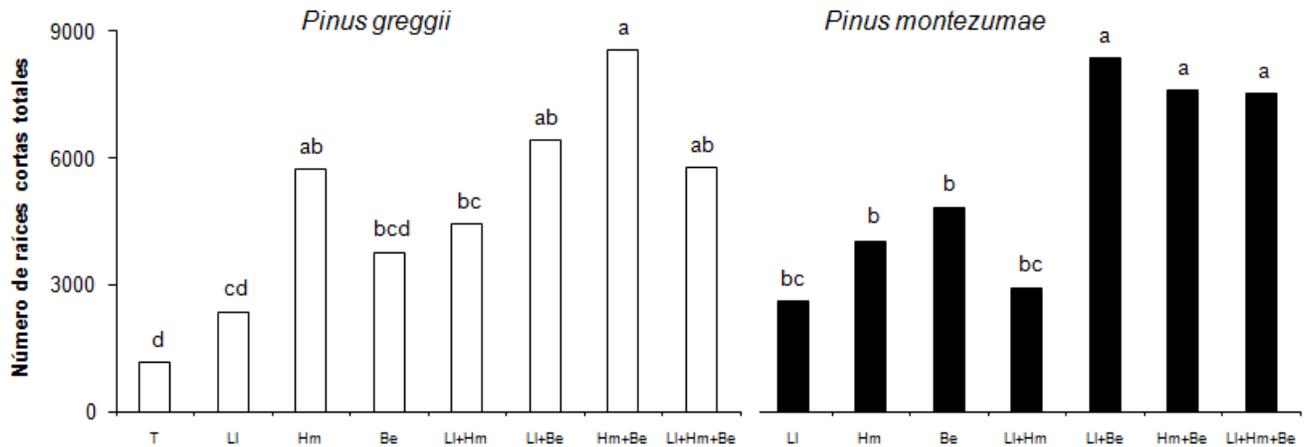
El diseño experimental fue en bloques al azar. La unidad experimental consistió de 20 plantas, con tres repeticiones cada una. Se tuvieron 8 tratamientos para cada especie de pino: 1. *Laccaria laccata* (Ll), 2. *Hebeloma mesophaeum* (Hm), 3. *Boletus edulis* (Be), 4.

*Laccaria laccata* + *Hebeloma mesophaeum* (Ll+Hm), 5. *Laccaria laccata* + *Boletus edulis* (Ll+Be), 6. *Hebeloma mesophaeum* + *Boletus edulis* (Hm+Be), 7. *Laccaria laccata* + *Hebeloma mesophaeum* + *Boletus edulis* (Ll+Hm+Be) y 8. Testigo sin inocular (T). En total el experimento consistió de 480 plantas para cada especie de pino (*Pinus greggii* y *P. montezumae*), lo cual originó 960 plantas. La evaluación de variables, la caracterización macro y micromorfológica de la ectomicorriza, el análisis nutrimental de las plantas y el análisis estadístico se efectuó tal y como se describe en el capítulo anterior.

## **5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.4.1. Crecimiento vegetal**

Se observó en todas las variables evaluadas (altura, diámetro, peso seco aéreo y radical), un crecimiento significativamente superior en las plantas inoculadas respecto a las plantas no inoculadas para ambas especies de pino independientemente de la especie de hongo inoculado (Cuadro 5.1). El número total de raíces en promedio por planta varió de 1176 en el testigo, a 8563 en Hm + Be en *P. greggii* y de 1009 en el testigo a 8370 en el tratamiento de inoculación combinada con Ll + Be en *P. montezumae* (Fig. 5.1). En general el número de raíces cortas totales para *P. greggii* y *P. montezumae* fue mayor en las plantas inoculadas con respecto a las no inoculadas. En el caso de *P. montezumae*, el número de raíces cortas totales fue significativamente mayor en los tratamientos donde se realizó la inoculación combinada con respecto a los tratamientos donde solo se inoculó una especie, con la excepción del tratamiento de coinoculación *L. laccata* con *H. mesophaeum* (Fig. 5.1)



**Figura 5.1.** Número de raíces cortas totales de *Pinus greggii* y *Pinus montezumae*, 421 días después de la inoculación con 3 especies de hongos comestibles ectomicorrízicos de los géneros *Laccaria*, *Hebeloma* y *Boletus*, solos o combinados. T=Testigo; LI=*L. laccata*; Hm=*H. mesophaeum* y Be=*B. edulis*. Valores en la misma columna, para cada especie de pino, con la misma letra son iguales según Tukey ( $P \leq 0.05$ ). n=3.

En términos generales se observó un mayor crecimiento en las plantas inoculadas, especialmente en las plantas donde existió coinoculación. Sudhakara y Natarajan (1997) inocularon plantas de *Pinus patula* simultáneamente con *L. laccata* y *Thelephora terrestris* y encontraron que el número total de micorrizas, la altura y el peso seco de las plantas fue mayor en las plantas con inoculación combinada que con inoculación individual.

**Cuadro 5.1.** Peso seco de la parte aérea, raíz, total, altura y diámetro del tallo en plantas de *Pinus greggii* y *P. montezumae*, inoculadas o no con tres especies de hongos comestibles ectomicorrízicos, solos o combinados, 421 días después de la inoculación.

<b>Tratamiento</b>	<b>PSA</b>	<b>PSR</b>	<b>PST</b>	<b>ALT</b>	<b>DIA</b>
	g			cm	mm
<b><i>Pinus greggii</i></b>					
Testigo (T)	0.92 a	0.71 a	1.63 a	11.15 a	1.55 a
<i>Laccaria laccata</i> (Ll)	3.42 b	2.60 b	6.03 b	27.63 b	2.38 b
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	2.68 b	2.11 b	4.78 b	26.77 b	2.27 b
<i>Boletus edulis</i> (Be)	3.06 b	1.62 b	4.68 b	29.38 b	2.39 b
Ll+Hm	3.70 b	2.99 b	6.69 b	27.99 b	2.29 b
Ll+Be	4.51 b	2.27 b	6.79 b	28.25 b	2.32 b
Hm+Be	5.99 b	2.14 b	8.13 b	31.85 b	2.31 b
Ll+Hm+Be	4.39 b	3.24 b	7.63 b	26.93 b	2.25 b
<b><i>Pinus montezumae</i></b>					
Testigo (T)	0.65 a	0.46 a	1.12 a	1.52 a	2.62 a
<i>Laccaria laccata</i> (Ll)	2.18 b	1.31 b	3.49 b	2.39 b	4.44 b
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	2.03 b	1.84 b	3.86 b	2.49 b	4.26 b
<i>Boletus edulis</i> (Be)	2.01 b	1.02 b	3.03 b	2.95 b	4.42 b
Ll+Hm	2.57 b	2.85 b	5.42 b	2.09 b	4.49 b
Ll+Be	3.16 b	1.40 b	4.55 b	2.61 b	4.97 c
Hm+Be	3.12 b	2.12 b	5.24 b	2.63 b	4.55 b
Ll+Hm+Be	2.67 b	1.67 b	4.34 b	2.93 b	4.37 b

PSA=Peso seco de la parte aérea; PSR=Peso seco de la raíz; PST=Peso seco total; ALT=Altura de las plantas; DIA=Diámetro del tallo; Para el caso de peso seco n=10; en el caso de ALT y DIA n=60. Valores en la misma columna con la misma letra son iguales según Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

#### 5.4.2. Colonización micorrízica

La colonización micorrízica en ambas especies de pino solo se observó en plantas inoculadas con alguna especie de hongo. En términos generales los valores de colonización por micorrizas vivas totales fueron superiores a 30% para la mayoría de los

tratamientos inoculados (Cuadros 5.2 y 5.3). En *P. greggii* el valor más alto en porcentaje de colonización (90.6 %), se encontró en pinos inoculados con Ll +Hm (Cuadro 5.2). Parladé *et al.* (1999) encontraron que el máximo porcentaje que se obtuvo con la coinoculación de *L. bicolor* y *Rhizopogon spp.* en plantas de *Pseudotsuga menziesii* y *Pinus pinaster* fue de 50%. En el caso de *P. montezumae*, el valor con el máximo porcentaje de colonización se registró cuando se inoculó *L. laccata* (Cuadro 5.3). Sin embargo, en ambas especies de pino se encontraron valores muy altos de colonización cuando se inoculó con las especies de *Laccaria* y *Hebeloma* solas (Cuadro 5.2 y 5.3). Resultados similares, altas colonizaciones, se encontraron en plantas de *Populus maximowiczii* en asociación con *H. mesophaeum* (Obase *et al.*, 2009). Wang y Hall (2004) sugirieron que porcentajes de colonización micorrízica de 25% a 33% son indicadores de un nivel aceptable de infección de las plantas.

**Cuadro 5.2.** Porcentaje de raíces cortas micorrizadas y no micorrizadas, vivas y muertas, 421 días después de la inoculación en *Pinus greggii* con tres especies de hongos comestibles ECM solos o combinados.

Tratamientos	Profundidad cepellón ¶ (cm)	Vivas		Muertas	
		Micorrizadas	No Micorrizadas	Micorrizadas	No Micorrizadas
		%			
Testigo (T)	1	0.0	21.0	0.0	0.5
	2	0.0	45.2	0.0	0.4
	3	0.0	32.1	0.0	0.8
	Total	0.0 c	98.3a	0.0d	1.7a
<i>Laccaria laccata</i> (Ll)	1	28.4	3.8	4.8	1.7
	2	38.1	0.9	0.5	0.3
	3	16.5	3.8	0.7	0.5
	Total	83.0a	8.5bc	6.0cd	2.5a
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	1	25.7	1.5	2.5	5.0
	2	40.5	1.7	1.8	3.1
	3	13.3	0.6	1.8	2.5
	Total	79.5 <sup>a</sup>	3.8bc	6.1bcd	10.6a
<i>Boletus edulis</i> (Be)	1	1.6	11.7	2.9	17.0
	2	2.1	31.0	0.0	7.3
	3	0.0	20.7	0.0	5.7
	Total	3.7c	63.4a	2.9d	30.0a
Ll+Hm	1	43.7	1.2	1.6	1.1
	2	29.5	1.4	1.2	0.5
	3	17.4	1.1	0.8	0.5
	Total	90.6 <sup>a</sup>	3.7bc	3.6cd	2.1a
Ll+Be	1	22.4	0.2	8.5	3.6
	2	26.3	0.3	11.5	4.5
	3	10.3	0.3	9.3	2.8
	Total	59.0ab	0.8c	29.3abc	10.9a
Hm+Be	1	15.2	3.1	14.5	5.0
	2	21.7	0.3	15.5	0.6
	3	10.0	0.3	6.9	6.9
	Total	46.9b	3.7bc	36.9a	12.5a
Ll+Hm+Be	1	13.2	6.6	13.6	11.0
	2	12.3	3.0	10.1	2.8
	3	9.1	3.8	8.4	6.1
	Total	34.6b	13.4b	32.1ab	19.9a

Valores en la misma columna con la misma letra son iguales según Tukey ( $p \leq 0.05$ ),  $n=3$   
 ¶ = Profundidad del cepellón a partir del cuello de la raíz de la planta; 1=0 a 5 cm, 2=5.1 a 10 cm y 3=10.1 a 15 cm. Se consideró como 100% a la sumatoria de raíces cortas vivas y muertas independientemente de si estaban o no micorrizadas.

**Cuadro 5.3.** Porcentaje de raíces cortas micorrizadas y no micorrizadas, vivas y muertas, 421 días después de la inoculación en *Pinus montezumae* con tres especies de hongos comestibles ECM solos o combinados.

Tratamientos	Profundidad cepellón ¶ (cm)	Vivas		Muertas	
		Micorrizadas	No Micorrizadas	Micorrizadas	No Micorrizadas
		%			
Testigo (T)	1	0.0	24.0	0.0	3.1
	2	0.0	29.9	0.0	7.9
	3	0.0	34.3	0.0	0.8
	Total	0.0c	88.2a	0.0c	11.8a
<i>Laccaria laccata</i> (Ll)	1	23.1	0.5	1.5	0.3
	2	32.2	0.8	2.7	0.7
	3	29.5	1.7	5.8	1.0
	Total	84.9 <sup>a</sup>	3.1c	10.0abc	2.0a
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	1	30.7	1.8	0.7	0.9
	2	40.6	3.2	0.1	0.6
	3	10.9	10.0	0.1	0.4
	Total	82.2 <sup>a</sup>	15.0bc	0.9bc	1.9a
<i>Boletus edulis</i> (Be)	1	0.0	8.1	0.0	15.1
	2	0.0	27.3	0.0	19.1
	3	0.1	12.5	0.0	17.8
	Total	0.1c	47.9ab	0.0c	52.0a
Ll+Hm	1	23.5	1.9	4.5	8.2
	2	14.6	6.9	0.0	1.5
	3	20.1	13.4	3.0	2.4
	Total	58.2b	22.2bc	7.5abc	12.1a
Ll+Be	1	20.3	0.8	4.3	3.6
	2	25.1	1.3	3.6	4.5
	3	24.2	0.9	7.4	4.0
	Total	69.6ab	3.0c	15.3ab	12.1a
Hm+Be	1	23.4	0.7	4.7	0.7
	2	30.4	0.3	9.7	0.6
	3	18.1	0.6	9.7	1.1
	Total	71.9ab	1.6c	24.1a	2.4a
Ll+Hm+Be	1	23.5	0.7	6.6	2.7
	2	33.3	0.4	4.9	0.8
	3	18.4	0.7	7.6	0.4
	Total	75.2ab	1.8c	19.1a	3.9a

Valores en la misma columna con la misma letra son iguales según Tukey ( $p \leq 0.05$ ),  $n=3$ , ¶=Profundidad del cepellón a partir del cuello de la raíz de la planta; 1= 0 a 5 cm, 2=5.1 a 10 cm y 3=10.1 a 15cm. Se consideró como 100% a la sumatoria de raíces cortas vivas y muertas independientemente de si estaban o no micorrizadas.

La colonización por *B. edulis* fue muy baja para ambas especies de pinos. El porcentaje de raíces micorrizadas vivas fue de 3.7 y 0.1 para *P. greggii* y *P. montezumae*, respectivamente. Los valores de raíces muertas micorrizadas para ambas especies de pinos, variaron de 0.9 a 36.9%, dependiendo de las especies de hongos involucrados (Cuadro 5.2 y Cuadro 5.3). Cuando se inoculó *B. edulis* en combinación con *L. laccata* y *H. mesophaeum* el porcentaje de raíces micorrizadas vivas fue de cero (Cuadro 5.4), excepto en L1 + Be en *P. montezumae* que fue de 0.2% (Cuadro 5.4).

El porcentaje de raíces micorrizadas vivas de *L. laccata* y *H. mesophaeum* fue mayor en el área media del cepellón (5.1 a 10 cm de profundidad) para ambas especies de pinos. Un factor que podría haber influido en esta distribución, es la cantidad de espacio aéreo, la cual fue diferencial en las tres secciones evaluadas. Se observó una compactación especialmente en la sección inferior del cepellón (probablemente como consecuencia del riego), lo cual podría haber limitado la respiración del hongo estudiado y reducir su colonización.

#### **5.4.3. Contenido nutrimental**

Los resultados del análisis nutrimental se pueden observar en los Cuadros 5.5 y 5.6. En términos generales el contenido total de N, P, K, Ca y Mg, fue significativamente superior en las plantas inoculadas respecto a las plantas sin inocular en ambas especies de pino, sin embargo, existieron diversas excepciones, por ejemplo: *i*) en el caso del K en el contenido en la raíz de *P. montezumae*; *ii*) en P en el contenido en la raíz de *P. greggii* cuando se inoculó solo con *B. edulis* y en su combinación con *L. laccata* y *H. mesophaeum*; y *iii*) en el caso del contenido de Ca en la raíz de *P. montezumae*. En estos casos, en términos generales no existieron diferencias entre plantas inoculadas y no inoculadas. Calvaruso *et al.* (2010) observaron que plantas micorrizadas con *L. bicolor* produjeron 73% más

biomasa y asimilaron significativamente más K que las plantas no micorrizadas, así mismo dichos autores reportaron que las proporciones de K y Mg movilizadas y asimiladas por *P. sylvestris* fueron el doble que las no micorrizadas. Esto puede deberse a que las hifas que crecen lejos del manto ectomicorrízico, en los alrededores del suelo, son muy eficientes en rebuscar nutrientes, debido a su alta capacidad a penetrar micrositios que no son accesibles a las plantas (Marschner y Dell, 1994; Wallander y Hagerberg *et al.*, 2002), lo cual es un indicador de la enorme importancia de la búsqueda de simbiontes ectomicorrízicos eficientes para la translocación de estos nutrimentos.

**Cuadro 5.4.** Porcentaje de colonización micorrízica total y por especie fúngica, según características morfoanatómicas en los tratamientos en los que se inoculó simultáneamente más de una especie fúngica en *Pinus greggii* y *P. montezumae*, 421 días después de la inoculación.

Tratamientos	Especie fúngica	Colonización micorrízica			
		Micorrizadas vivas		Micorrizadas muertas	
		<i>Pinus greggii</i>	<i>Pinus montezumae</i>	<i>Pinus greggii</i>	<i>Pinus montezumae</i>
		%			
Ll+Hm	Ll	63.5 a	19.9 a	1.5 a	1.0 a
	Hm	26.1 a	38.2 a	2.1 a	6.5 a
	Total	89.6	58.1	3.6	7.5
Ll+Be	Ll	59.0 b	69.4 a	29.3 a	15.3 a
	Be	0.0	0.2	0.0	0.0
	Total	59.0	69.6	29.3	15.3
Hm+Be	Hm	46.9 b	71.9 a	36.9 a	24.1 b
	Be	0.0	0.0	0.0	0.0
	Total	46.9	71.9	36.9	24.1
Ll+Hm+Be	Ll	15.1 a	2.3 b	15.5 a	0.8 b
	Hm	19.5 a	73.0 b	16.6 a	18.3 a
	Be	0.0	0.0	0.0	0.0
	Total	34.6	75.3	32.1	19.1

Valores en la misma columna con la misma letra son iguales según Tukey ( $p \leq 0.05$ ),  $n=3$ . Se consideró como 100% a la sumatoria de raíces cortas vivas y muertas independientemente de si estaban o no micorrizadas.

**Cuadro 5.5.** Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en plantas de *Pinus greggii* y *P. montezumae*, inoculadas o no con hongos comestibles ectomicorrízicos (ECM) solos o combinados, 421 días después de la inoculación.

Tratamientos	N			P			K		
	Parte aérea	Raíz	Total	Parte aérea	Raíz	Total	Parte aérea	Raíz	Total
	mg								
<i>P. greggii</i>									
T	10.09d	4.92b	15.01c	0.09e	0.12c	0.21c	3.94d	0.61c	4.55d
Ll	23.64cb	15.03a	38.67b	0.51d	0.59ab	1.10b	12.94c	2.30a	15.24c
Hm	21.61cd	13.04ab	34.65b	0.60cd	0.56ab	1.16b	10.61c	0.88c	11.48c
Be	34.85abc	10.75ab	45.60ab	0.49d	0.43bc	0.92b	11.33c	1.12c	12.45c
Ll+Hm	25.04bc	18.31a	43.35ab	0.83bc	0.97a	1.81a	11.47c	1.28bc	12.75c
Ll+Be	28.16bc	11.79ab	39.96b	0.93b	0.55abc	1.48ab	15.13bc	1.19bc	16.32bc
Hm+Be	47.75a	11.39ab	59.14a	1.33a	0.48bc	1.81a	24.77a	1.39abc	26.16a
Ll+Hm+Be	35.76ab	16.23a	51.98ab	1.11ab	0.93a	2.04a	20.21ab	2.12ab	22.33ab
<i>P. montezumae</i>									
T	8.82c	3.89b	12.71b	0.10d	0.11d	0.21d	2.79c	1.07a	3.86d
Ll	19.27abc	9.68ab	28.95a	0.52c	0.41bcd	0.93c	7.85b	1.26a	9.11c
Hm	17.96bc	10.86ab	28.82a	0.56c	0.58abc	1.13bc	8.40b	1.30a	9.70bc
Be	23.72ab	9.64ab	33.36a	0.67c	0.34cd	1.01c	8.38b	1.33a	9.71bc
Ll+Hm	20.74ab	17.73a	38.47a	0.69bc	0.95a	1.65ab	10.68b	1.42a	12.10abc
Ll+Be	30.13a	10.78ab	40.91a	0.45c	0.45bcd	0.90c	12.22ab	1.85a	14.07ab
Hm+Be	29.98a	14.19a	44.17a	1.04a	0.83ab	1.87a	15.28a	1.72a	17.00a
Ll+Hm+Be	26.60ab	11.46ab	38.06a	0.99ab	0.70abc	1.69ab	10.91ab	0.90a	11.81bc

T =Testigo, Ll =*Laccaria laccata*, Hm =*Hebeloma mesophaeum*, Be =*Boletus edulis*. Valores en la misma columna, para cada especie de pino, con la misma letra son iguales según Tukey ( $P \leq 0.05$ ). n=10.

**Cuadro 5.6.** Contenido de calcio y magnesio en plantas de *Pinus greggii* y *P. montezumae*, inoculadas o no con hongos comestibles ectomicorrízicos (ECM) solos o combinados, 421 días después de la inoculación.

Tratamientos	Ca			Mg		
	Parte aérea	Raíz	Total	Parte aérea	Raíz	Total
mg						
<b><i>Pinus greggii</i></b>						
Testigo (T)	2.29d	2.61b	4.91c	0.55d	0.54b	1.09c
<i>Laccaria laccata</i> (Ll)	7.03bc	9.36a	16.38ab	1.75bc	1.99a	3.73b
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	5.15cd	8.34a	13.49ab	3.82a	1.93a	5.75a
<i>Boletus edulis</i> (Be)	5.18cd	7.56ab	12.74b	1.32cd	1.59ab	2.91b
Ll+Hm	5.63bc	10.08a	15.71ab	1.57c	2.03a	3.60b
Ll+Be	8.16ab	7.92ab	16.08ab	2.09bc	1.70ab	3.79b
Hm+Be	10.97a	8.88a	19.85a	2.62b	1.42ab	4.04b
Ll+Hm+Be	7.15bc	10.87a	18.02ab	1.95bc	2.46a	4.40ab
<b><i>Pinus montezumae</i></b>						
Testigo (T)	1.66d	1.89c	3.55c	0.18d	0.45c	0.63d
<i>Laccaria laccata</i> (Ll)	4.18bc	5.02bc	9.20b	1.34abc	1.01bc	2.35bc
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	4.09bc	6.34abc	10.44ab	1.02bc	1.18bc	2.20bc
<i>Boletus edulis</i> (Be)	2.82cd	4.45bc	7.27bc	0.97c	0.90bc	1.87c
Ll+Hm	5.03b	10.78a	15.82a	1.58ab	2.19a	3.77a
Ll+Be	5.84ab	6.04abc	11.88ab	1.04bc	1.23abc	2.26bc
Hm+Be	7.10a	8.76ab	15.86a	1.82a	1.53ab	3.35ab
Ll+Hm+Be	5.25ab	6.12abc	11.37ab	1.47abc	1.17bc	2.63abc

Valores en la misma columna, para cada especie de pino, con la misma letra son iguales según Tukey ( $P \leq 0.05$ ). n=10.

Domínguez-Núñez *et al.* (2004) reportaron que la influencia de la micorrización con *Tuber melanosporum* en *Pinus halepensis*, redujo la concentración de Ca, dado que la tasa de Ca asimilado fue significativamente superior en plantas no micorrizadas (20.2 mg/g) respecto a las plantas inoculadas (15.9 mg/g).

**Cuadro 5.7.** Relación parte aérea : raíz en plantas *Pinus greggii* y *P. montezumae*, inoculadas o no con hongos comestibles ectomicorrízicos (ECM) solos o combinados, 421 días después de la inoculación.

Relación parte aérea : raíz	Contenido nutrimental				
	N	P	K	Ca	Mg
	relación				
<b><i>Pinus greggii</i></b>					
Testigo	2.05	0.75	6.46	0.88	1.02
<i>Laccaria laccata</i> (Ll)	1.57	0.86	5.63	0.75	0.88
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	1.66	1.07	12.06	0.62	1.98
<i>Boletus edulis</i> (Be)	3.24	1.14	10.12	0.69	0.83
Ll+Hm	1.37	0.86	8.96	0.56	0.77
Ll+Be	2.39	1.69	12.71	1.03	1.23
Hm+Be	4.19	2.77	17.82	1.24	1.85
Ll+Hm+Be	2.20	1.19	9.53	0.66	0.79
<b><i>Pinus montezumae</i></b>					
Testigo	2.27	0.91	2.61	0.88	0.40
<i>Laccaria laccata</i> (Ll)	1.99	1.27	6.23	0.83	1.33
<i>Hebeloma mesophaeum</i> (Hm)	1.65	0.97	6.46	0.65	0.86
<i>Boletus edulis</i> (Be)	2.46	1.97	6.30	0.63	1.08
Ll+Hm	1.17	0.73	7.52	0.47	0.72
Ll+Be	2.79	1.00	6.61	0.97	0.85
Hm+Be	2.11	1.25	8.88	0.81	1.19
Ll+Hm+Be	2.32	1.41	12.12	0.86	1.26

*H. mesophaeum* fue muy eficiente en la translocación de P y Mg a la parte aérea de *P. greggii*, mientras que *L. laccata*, no mostró la misma eficiencia de translocación en esta especie de pino. Sin embargo, en el caso de *P. montezumae* tanto *L. laccata* como *H. mesophaeum* fueron muy eficientes para translocar P y Mg (Cuadro 5.7).

## 5.6. CONCLUSIONES

Existió una conspicua colonización micorrízica originada por *L. laccata* y *H. mesophaeum* tanto en *P. greggii* como en *P. montezumae*. En contraste la colonización con *Boletus edulis* fue muy reducida de 3.7 y 0.1%, respectivamente, lo cual podría ser un indicador de una diferente dinámica de colonización por *Boletus edulis*.

Tanto la inoculación sola como combinada de *L. laccata*, *H. mesophaeum* y *Boletus edulis* produjo incrementos en términos de crecimiento y contenido nutrimental (N, P, K, Ca y Mg en *P. greggii* y *P. montezumae*.

En el caso de las plantas inoculadas con *Boletus edulis* se registró una baja colonización (de

La eficiencia de translocación de P y Mg a la parte aérea de plantas inoculadas con *L. laccata* y *H. mesophaeum*, dependió de la planta hospedera. En *P. montezumae* ambos hongos fueron muy eficientes mientras que en *P. greggii* solo *H. mesophaeum* mostró alta eficiencia.

## 5.7. LITERATURA CITADA

- Boa E. (2004). Wild edible fungi: A global overview of their use and importance to people. Non-wood forest products 17. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. 161 p.
- Calvaruso Ch., Turpault M-P., Uroz S., Leclerc E., Kies A., Frey-Klett P. (2010). *Laccaria bicolor* S238N improves Scots pine mineral nutrition by increasing root nutrient uptake from soil minerals but does not increase mineral weathering. *Plant Soil* 328:145-154.
- CONAFOR, 2010. Comisión Nacional Forestal. <http://www.conafor.gob.mx> (Consultado el 15 de noviembre de 2010)
- Domínguez-Núñez J.A., Planelles R., Rodríguez B. J. A., Saiz de Omeñaca J. A. (2004). Influencia de la micorrización con trufa negra (*Tuber melanosporum*) en el crecimiento, intercambio gaseoso y nutrición mineral de plántulas de *Pinus halepensis*. *Invest. Agrar. Sist. Recur. For.* 13: 317-327.
- Hall I. R., Lyon A. J. E., Wang Y., Sinclair L. (1998). Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies 2. *Boletus edulis*. *Economic Botany* 52:44-56.
- Jentschke G., Brandes B., Kuhn A. J., Schröder W. H., Becker J. S., Godbold D. L. (2000). The mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* transports magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. *Plant and Soil* 220:243-246.
- López Upton J., Ramírez H. C., Plascencia E. F. O., Jasso M. J. (2004). Variación en crecimiento de diferentes poblaciones de las dos variedades de *Pinus greggii*. *Agrociencia* 38:457-464.

- Marmeisse R., Gryta H., Jargeat P., Fraissinet-Tachet L., Gay G., Debaud J.C. (1999). *Hebeloma*. In: Cairney J. W.G., Chambers S.M., Eds, Ectomycorrhizal Fungi Key genera in Profile. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 89-127.
- Marschner H., Dell B. (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159:89–102.
- Obase K., Tamai Y., Yajima T., Miyamoto T. (2009). Mycorrhizal synthesis of four ectomycorrhizal fungi in potted *Populus maximowiczii* seedlings. *Mycoscience* 50:143-145.
- Parladé J., Alvarez I. F., Pera J. (1999). Coinoculation of containerized Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings with the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* and *Rhizopogon* spp. *Mycorrhiza* 8:189-195.
- Ramírez H. C., Vargas H. J. J., López-Upton J. (2005). Distribución y conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. *Acta Botánica Mexicana* 72:1-16.
- Santiago-Martínez G., Estrada-Torres A., Varela L., Herrera T. (2003). Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia* 37:575-534.
- Smith S. E, Read D. J. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*. 3rd. Edition. Academic Press, London. U. K.
- Sudhakara M. R., Natarajan K. (1997). Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza* 7:133-138.
- Sylvia D. M. (1999). Mycorrhizal symbiosis. In: Principles and Applications of Soil Microbiology. Sylvia, D. W., J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel y D. A. Zuberer (eds.). Prentice Hall, Nueva Jersey. pp: 408-426.

- Villarreal L., Pérez-Moreno J. (1989). Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micología Neotropical Aplicada* 2: 77-114.
- Vogt K. A., Publicover D. A., Vogt D. J. (1991). A critique of the role of ectomycorrhizas in forest ecology. *Agric. Ecosystems Environ.* 35:171-190.
- Wallander H., Hagerberg D. (2004) Do ectomycorrhizal fungi have a significant role in weathering of minerals in forest soil? *Symbiosis* 27:249–257
- Wang Y., Hall I. R. (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany* 82: 1063-1073.

## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES GENERALES

Existió una preferencia de formación de esporomas en función del hospedero; por ejemplo se observó una frecuencia 2.9 veces mayor de formación de esporomas de *Laccaria laccata* en *Pinus montezumae* en relación a *Pinus greggii*. En el caso de *Hebeloma mesophaeum* solo se registraron esporomas asociados con *P. greggii*.

La aparición de los primeros esporomas ocurrió 284 y 392 días después de la inoculación para *Laccaria* y *Hebeloma*, respectivamente. Cuando los pinos se inocularon exclusivamente con una sola especie de hongo se registraron altos porcentajes de colonización, superiores a 75%, asociados con la formación de esporomas de *L. laccata* y de *H. mesophaeum*.

Las plantas de *P. greggii* inoculadas con *H. mesophaeum* presentaron conspicuos incrementos en biomasa de la parte aérea, raíz y contenido de N, P, K, Ca y Mg, con respecto a las plantas no inoculadas. Dentro de los nutrientes evaluados, *H. mesophaeum* fue particularmente eficiente en la movilización de P y Mg a la parte aérea de las plantas inoculadas de *P. greggii*.

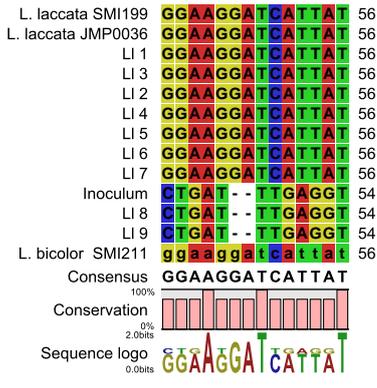
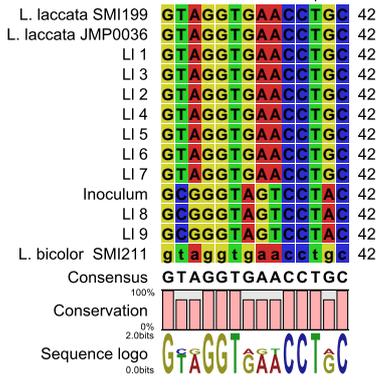
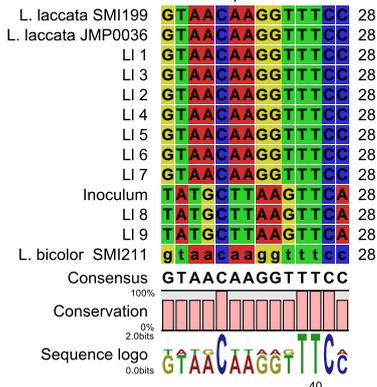
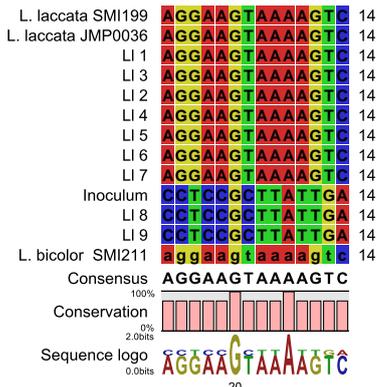
Existió una conspicua colonización micorrízica originada por *L. laccata* y *H. mesophaeum* tanto en *P. greggii* como en *P. montezumae*. En contraste, la colonización con *B. edulis* fue muy reducida de 3.7 y 0.1%, respectivamente.

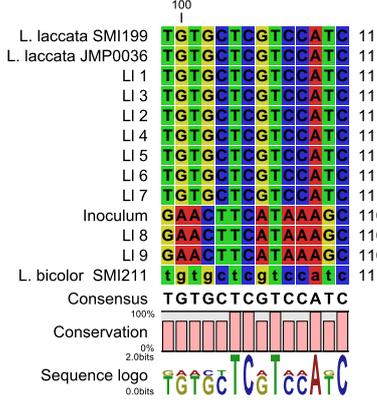
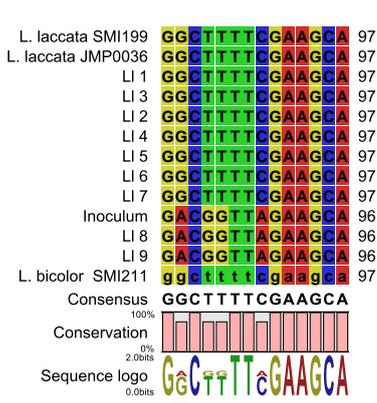
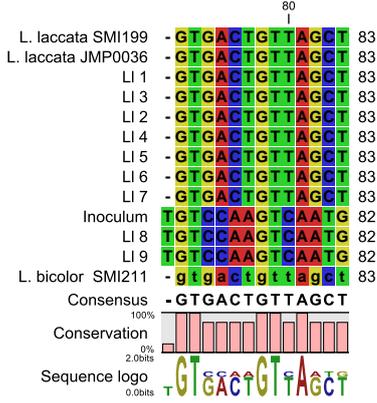
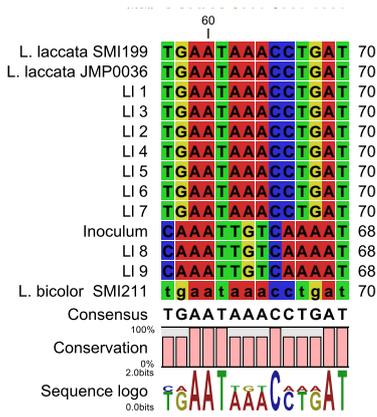
Tanto la inoculación sola como la combinada de *L. laccata*, *H. mesophaeum* y *B. edulis* produjeron incrementos en términos de crecimiento y contenido nutrimental (N, P, K, Ca y Mg) en *P. greggii* y *P. montezumae*.

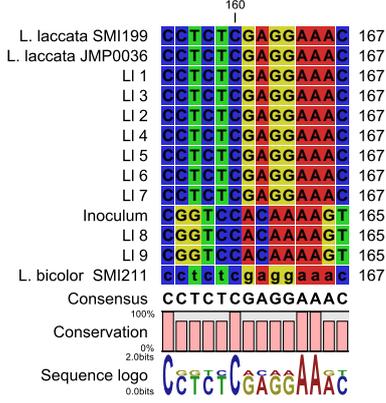
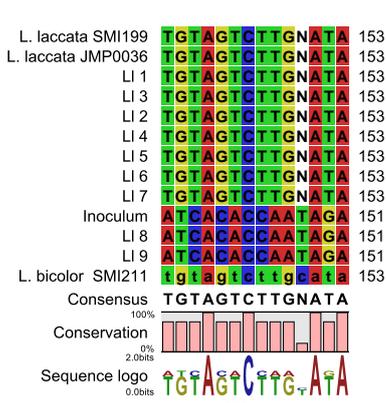
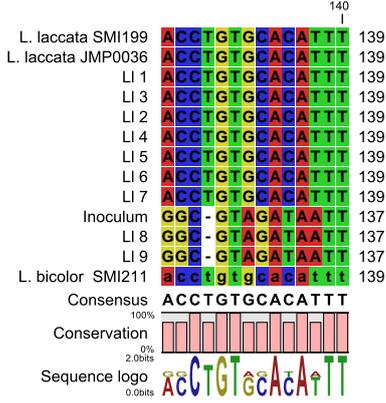
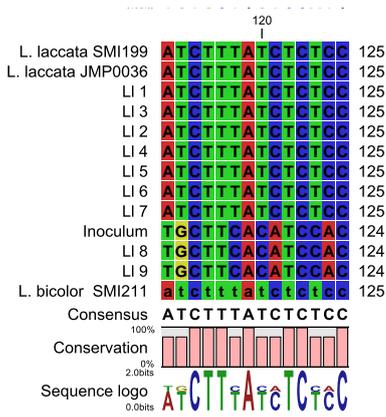
Debido a los altos porcentajes de micorrización encontrados y al efecto benéfico registrado en términos de crecimiento y contenido nutrimental se considera que tanto la inoculación con *L. laccata* como con *H. mesophaeum* tienen un amplio potencial de uso en la producción de plantas de *P. greggii* y *P. montezumae* en condiciones de vivero.

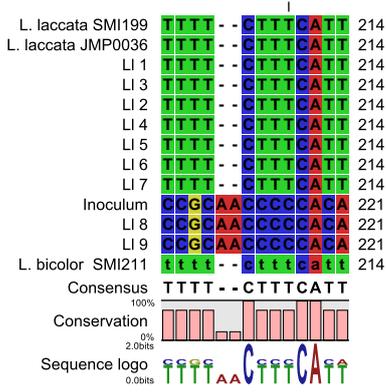
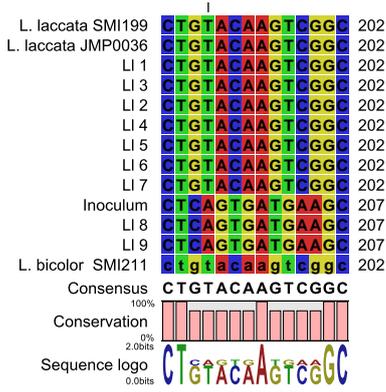
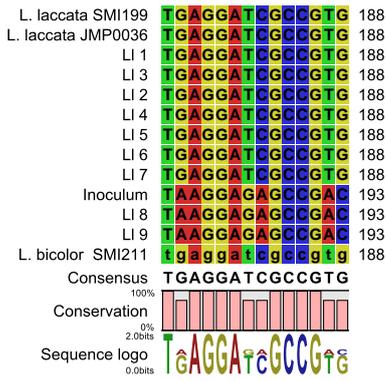
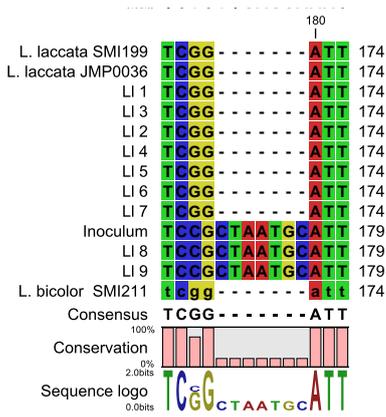
## **Anexo 1**

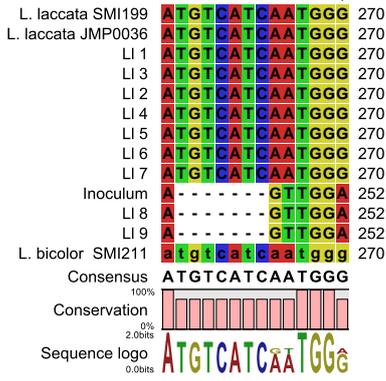
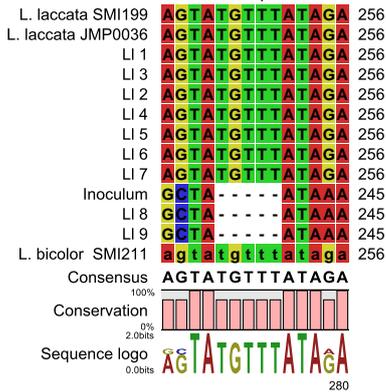
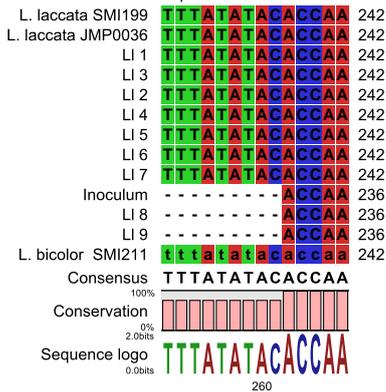
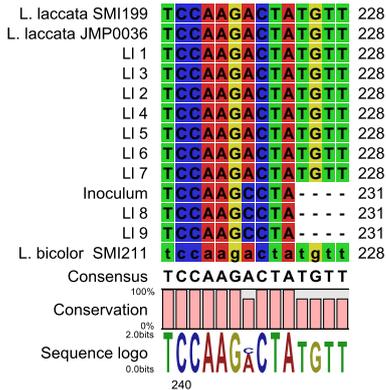
Homología de ITS de inóculos y esporomas obtenidos posterior a la inoculación. Se utilizó el método de alineamiento múltiple con penalización para deleciones. Se incluyeron secuencias identificadas en especies de *Laccaria laccata* disponibles en la base de datos.

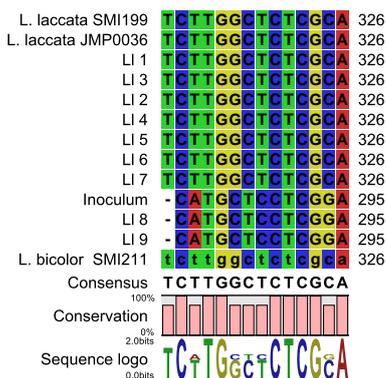
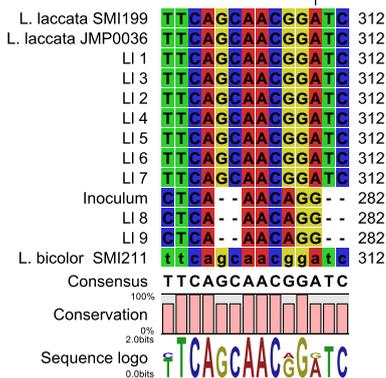
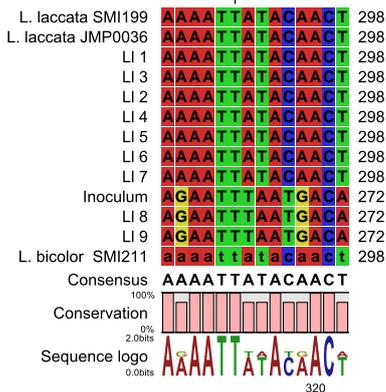
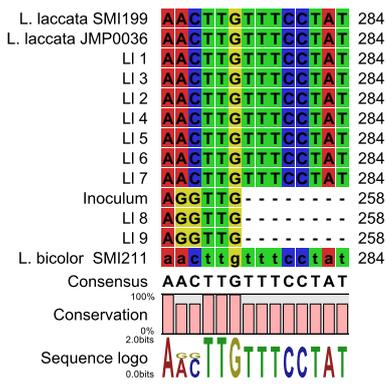


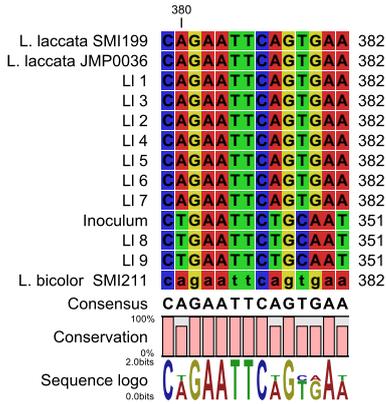
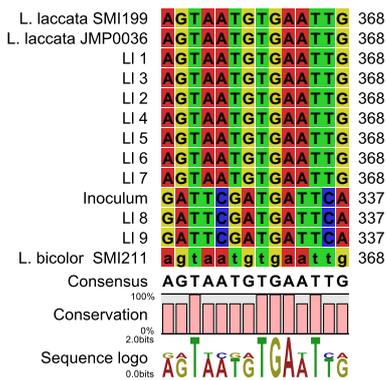
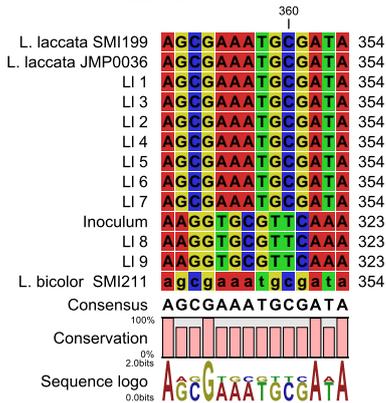
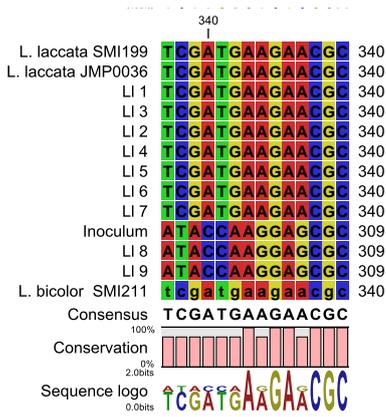


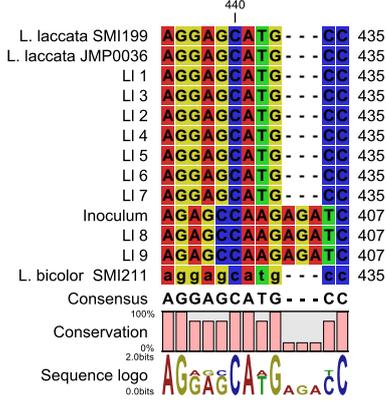
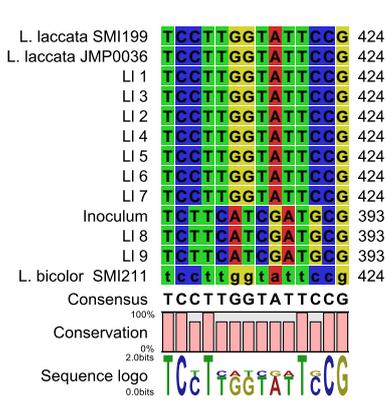
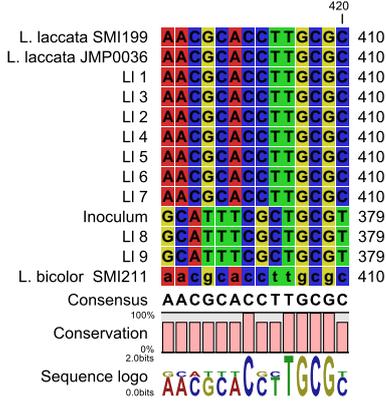
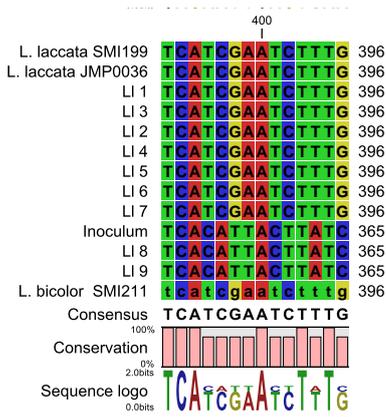


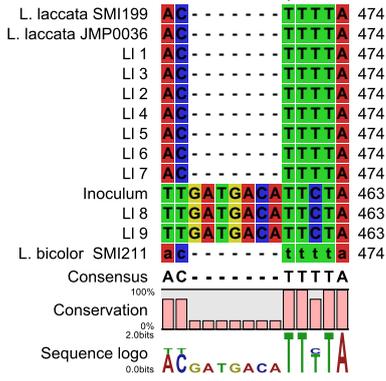
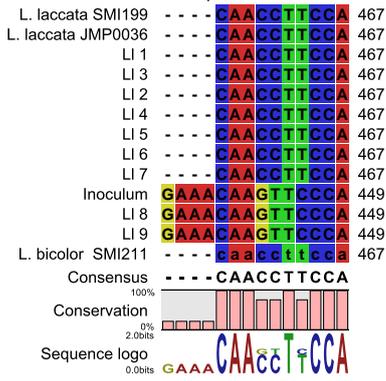
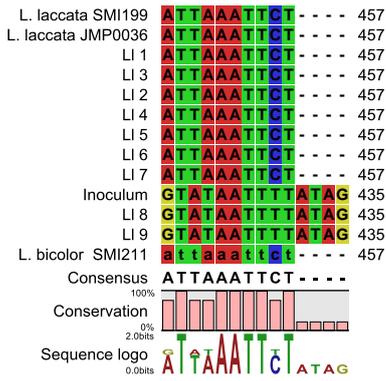
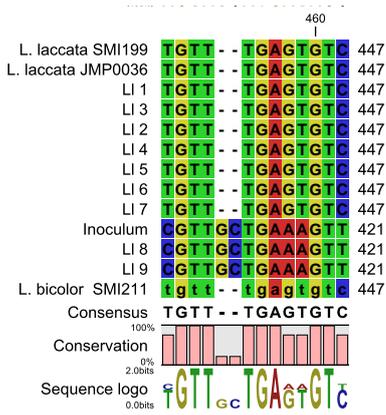


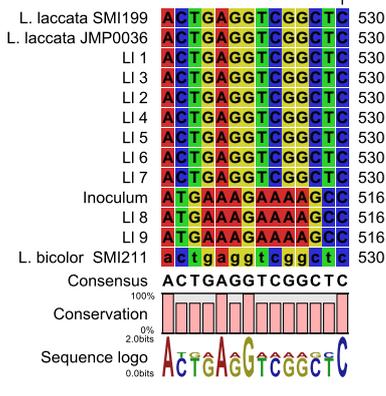
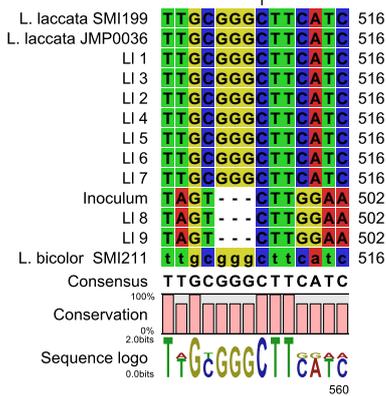
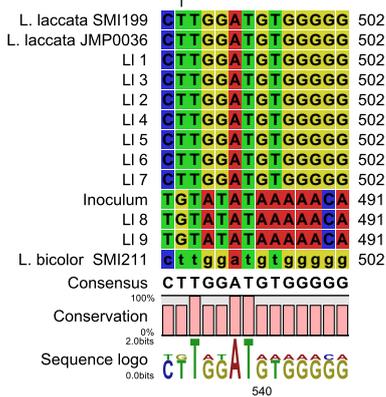
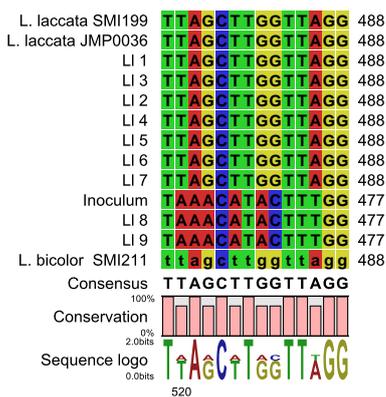


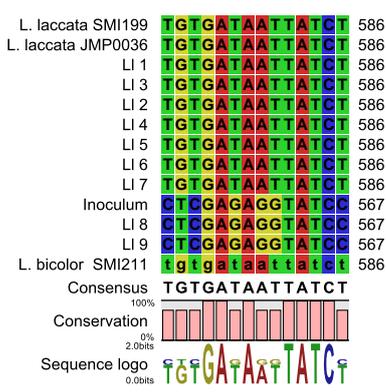
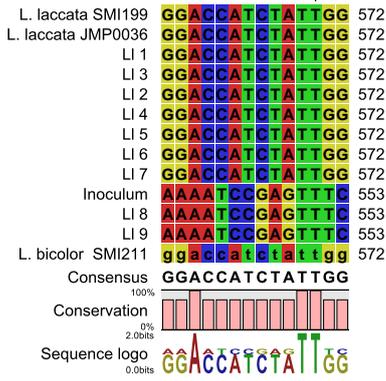
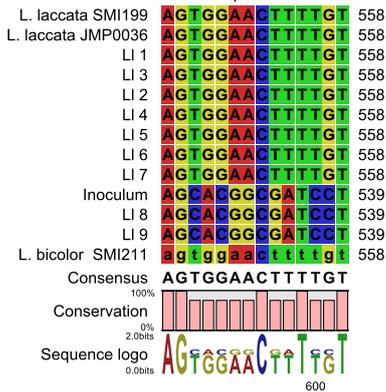
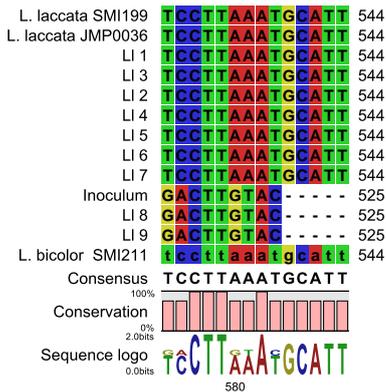


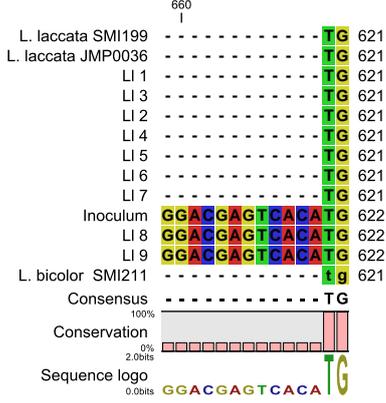
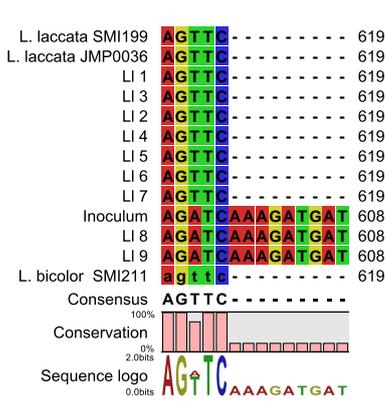
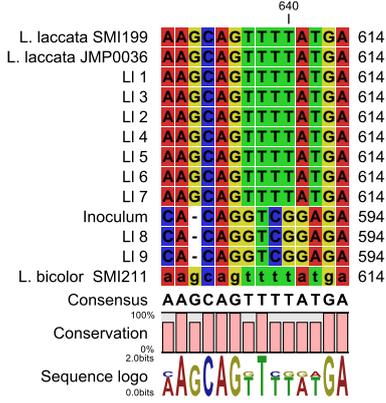
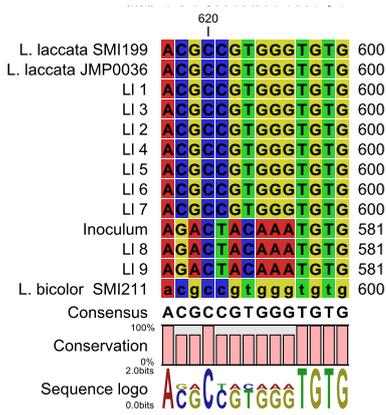


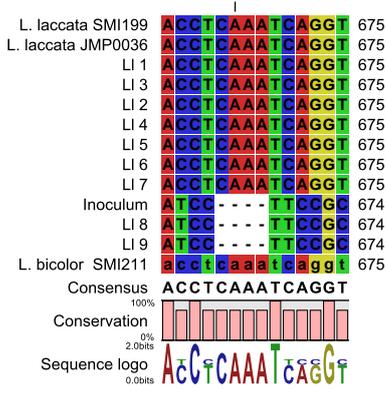
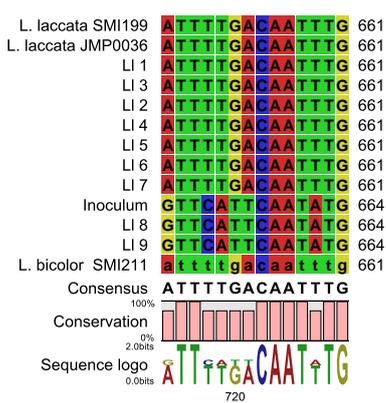
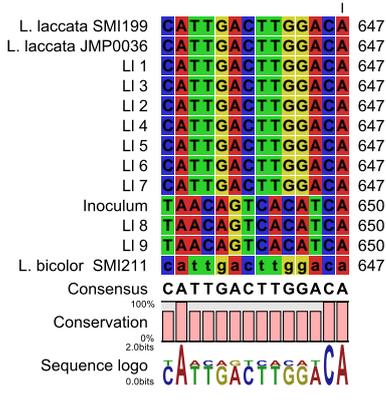
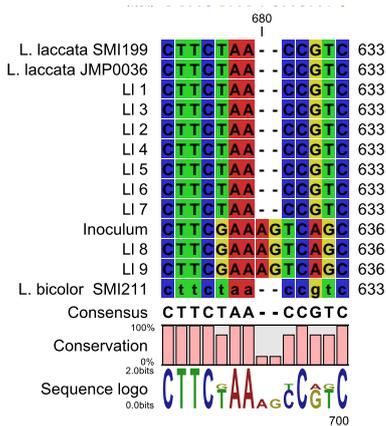


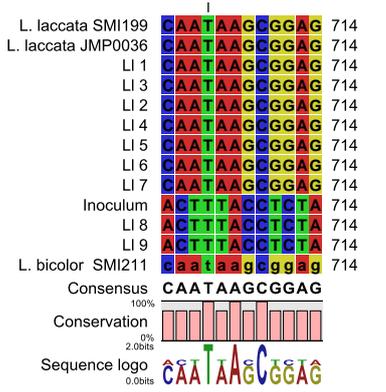
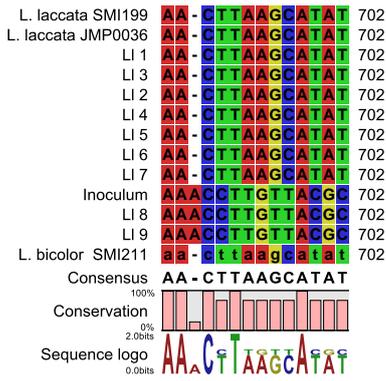
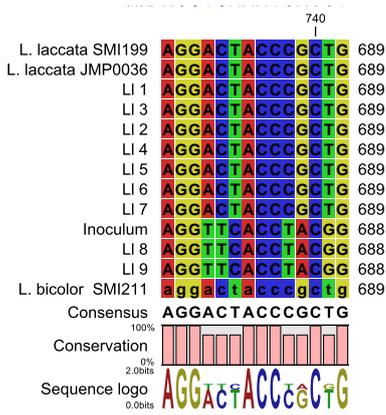












## **Anexo 2**

Homología de ITS de inóculos y esporomas obtenidos posterior a la inoculación. Se utilizó el método de alineamiento múltiple con penalización para deleciones. Se incluyeron secuencias identificadas en especies de *Hebeloma mesophaeum* disponibles en la base de datos.

