



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN BOTÁNICA

**CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE
NUTRIMENTOS DE *Pinus pringlei* Shaw
INOCULADO CON HONGOS
ECTOMICORRÍZICOS Y SUPERVIVENCIA EN
CAMPO**

ARACELI LÓPEZ GUTIÉRREZ

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada: CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE NUTRIMENTOS DE *Pinus pringlei* Shaw INOCULADO CON HONGOS ECTOMICORRÍZICOS Y SUPERVIVENCIA EN CAMPO realizada por la alumna ARACELI LÓPEZ GUTIÉRREZ bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

BOTÁNICA

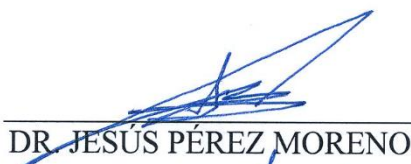
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. EBANDRO USCANGA MORTERA

DIRECTOR DE
TESIS



DR. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESOR



M. EN C. ANTONIO GACÍA ESTEVA

ASESOR



DR. VÍCTOR MANUEL CETINA ALCALÁ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, abril de 2017

CRECIMIENTO Y CONTENIDO DE NUTRIMENTOS DE *Pinus pringlei* Shaw INOCULADO CON HONGOS ECTOMICORRÍZICOS Y SUPERVIVENCIA EN CAMPO

Araceli López Gutiérrez, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

Todas las pináceas requieren de manera obligada para sobrevivir en condiciones de campo de la simbiosis ectomicorrízica. Sin embargo, tradicionalmente no ha sido considerada en la producción de plantas forestales en áreas Neotropicales. La hipótesis planteada es de si existe un incremento en la calidad de planta y en la supervivencia en campo de *P. pringlei* inoculado con hongos ectomicorrízicos. El experimento se llevó a cabo en Texcoco, México, en dos sitios: i) invernadero del Colegio de Postgraduados y ii) en campo, en un terreno en la comunidad de San Pablo Ixayoc. Se inocularon plantas de *P. pringlei* con los hongos ectomicorrízicos *Hebeloma alpinum*, *Laccaria trichodermophora* y *Thelephora terrestris*. Se evaluó el efecto de dicha inoculación en el crecimiento y transferencia nutrimental vegetal. Se efectuó una caracterización morfológica y molecular de las raíces ectomicorrizadas y una evaluación de su supervivencia en campo, y se compararon con plantas no inoculadas. Se observó que los tres hongos ectomicorrízicos inoculados originaron incrementos en términos de crecimiento y contenido nutrimental en *P. pringlei*. Se registró una movilización nutrimental significativa principalmente de K, Fe y Zn. La caracterización morfo-anatómica y molecular demostró la presencia de *H. alpinum*, *L. trichodermophora* y *T. terrestris* en las raíces ectomicorrizadas. Las plantas inoculadas principalmente con *H. alpinum* y *T. terrestris* presentaron mayor supervivencia en condiciones de campo. Se reporta por primera ocasión el efecto benéfico de los hongos ectomicorrízicos en el crecimiento, movilización nutrimental, principalmente de K, Fe y Zn; e incremento en las tasas de supervivencia en campo en *P. pringlei*, una especie nativa de México.

Palabras clave: Simbiosis ectomicorrízica, reforestación, Potasio, Hierro, Cinc.

NUTRIENT GROWTH AND CONTENT OF *Pinus pringlei* Shaw
INOCULATED WITH ECTOMYCORRHYTIC FUNGI AND FIELD
SURVIVAL

Araceli López Gutiérrez, M. C.
Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

All of the Pinaceae require the ectomycorrhizal symbiosis to survive under field conditions. However, their use traditionally has not been considered in the production of forest plants in Neotropical areas. The hypotheses raised in this study was that there is an increase in plant quality and survival in the field of *P. pringlei* inoculated with ectomycorrhizal fungi. The experiment was carried out in Texcoco, Mexico, in two sites: i) greenhouse of the Colegio de Postgraduados; and ii) in the field, in the communities of San Pablo Ixayoc. *P. pringlei* plants were inoculated with the ectomycorrhizal fungi: *Hebeloma alpinum*; *Laccaria trichodermophora*; and *Thelephora terrestris*. The effect of this inoculation on plant nutrient growth and transference was evaluated. A morphological and molecular characterization of ectomycorrhizal roots and an evaluation of their field survival were carried out, and compared with non-inoculated plants. The three inoculated ectomycorrhizal fungi originated increases in terms of growth and nutrient content in *P. pringlei* plants. A significant nutritional mobilization mainly of K, Fe and Zn was registered. The morpho-anatomical and molecular characterization demonstrated the presence of *Ha*, *Lt* and *Tt* in ectomycorrhizal roots. Two-year old plants inoculated mainly with *H. alpinum* and *T. terrestris* showed higher survival in the field compared to non-inoculated plants. The beneficial effect of ectomycorrhizal fungi on growth, nutritional mobilization, mainly on K, Fe and Zn; and increases in field survival rates in *P. pringlei*, a species native to Mexico, is reported for the first time.

Key words: Symbiosis ectomycorrhiza, reforestation, Potassium, Iron, Zinc.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme vivir cada día y permitirme conocer a gente maravillosa en mi camino.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por otorgamiento de la beca para continuar con mis estudios de Maestría en Ciencias.

Agradezco al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, al Área de Microbiología de Suelos, al Posgrado en Botánica y a cada académico que contribuyó en mi formación profesional.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno, por dirigir la presente investigación, hacerme parte de su equipo de trabajo, compartirme su conocimiento sobre el asombroso mundo de los hongos, por su amistad y palabras de aliento recibidas durante los momentos difíciles que me sirvieron para crecer personal y profesionalmente.

Al Dr. Ebandro Uscanga Mortera, por aceptar ser parte de esta investigación, por compartir sus conocimientos y su asesoría académica, además de aconsejarme y guiarme en este proceso de mi formación profesional y personal.

Al M. en C. Antonio García Esteva, por aceptar apoyarme en esta investigación, brindarme su confianza, amistad y apoyo incondicional en todo proceso de formación personal y profesional, y sobre todo por que siempre fue una mano amiga en la que pude confiar.

Al Dr. Víctor Manuel Cetina Alcalá, por su apoyo en esta investigación, por compartir sus conocimientos y brindarme su amistad en este proceso de formación profesional.

Al Dr. Faustino Hernández Santiago, por su apoyo en este trabajo de investigación y mi formación profesional, además de su amistad y apoyo incondicional durante los momentos difíciles.

A la Dra. Libia Trejo Téllez, por su valioso apoyo en mi formación profesional y en el análisis de las muestras vegetales.

A María del Rosario Cardoso Villanueva por su valioso apoyo en el análisis molecular de las ectomicorrizas y por su amistad durante mi estancia en el Colegio.

A Don Genaro y Sr. Margarito por su valioso apoyo en campo y sus enseñanzas.

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio de micorrizas y fijación por su apoyo incondicional durante la realización de la presente investigación.

Muchas gracias

DEDICATORIA

A Dios, por guiar mi vida y darme la fuerza para salir adelante. *“Aunque camine por el valle de sombras no temeré porque tu estas conmigo”* (Salmo 23:4).

A mi madre, **Erminia Eloisa Gutiérrez Antonio**, por su cuidado y cariño durante toda mi vida, porque es mi ejemplo a seguir, por ser una mujer fuerte, independiente y alegre. Gracias madre por darme mis alas para volar.

A la memoria de mi padre, **Francisco Jorge López Torres †** por sus enseñanzas y por la valentía que siempre forjó en mi.

A mis primas y hermanas **Cindy** y **Diana** por ser mi alegría.

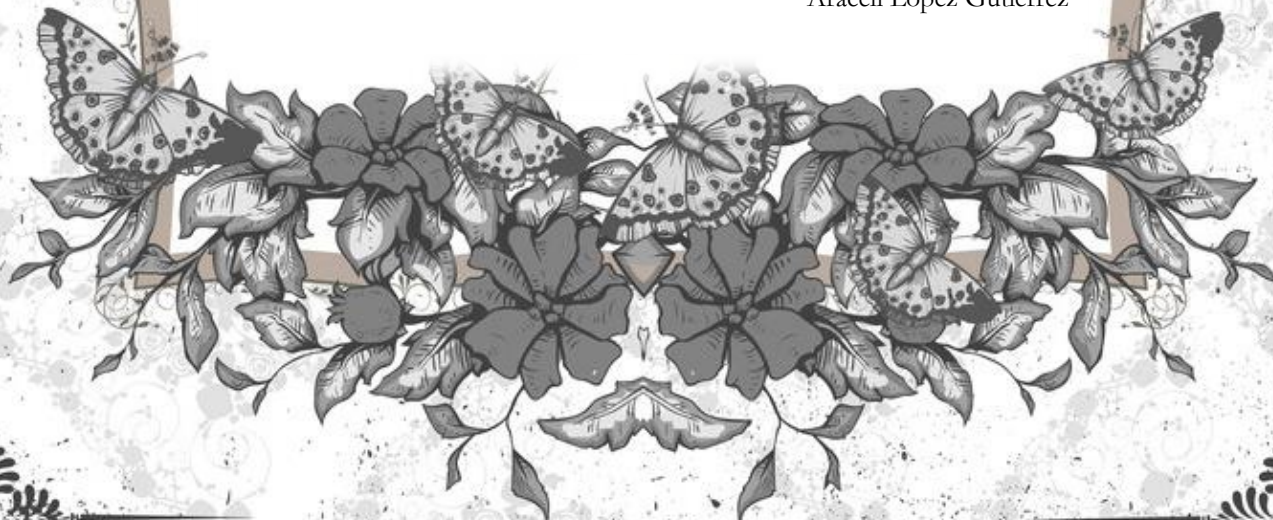
Al **Dr. Fidencio Servín Juárez**, por su motivación, consejos y apoyo para seguir estudiando.

Al **Dr. Jesús Pérez Moreno** por sus sabios consejos y risas compartidas, una gran persona que me inspira a ser mejor y amar lo que hago.

A mis amigos que me hicieron parte de ellos al llegar a Texcoco: **Domingo, Rodrigo, Vicente, Adrian, Jonathan, Esteban y Edwin**.

A mis amigos con los que compartí experiencias de vida y me enseñaron mucho: **Eneida, Josué, Hipólito, Paulina, Santos, Francisco, Abigail, Jorge, Rosario, Karina, Faustino, Claudia, Gerardo, Julia, Karen, Alejandra, Erick y Azareel**.

Sinceramente,
Araceli López Gutiérrez



CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO II.....	3
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	3
2.1. Objetivo General.....	3
2.2 Objetivos particulares.....	3
2.3 Hipótesis.....	4
CAPITULO III.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1 DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO <i>Pinus</i> EN MÉXICO.....	5
3.2 ESTADO ACTUAL DE LOS BOSQUES EN MÉXICO.....	5
3.2.1 Calidad de planta.....	7
3.2.2 Índice de Calidad de Dickson.....	9
3.3 DESCRIPCIÓN DE <i>Pinus pringlei</i>	10
3.3.1 Taxonomía.....	10
3.3.2 Descripción morfológica.....	10
3.3.3 Distribución y ecología.....	13
3.3.4 Importancia.....	14
3.4 IMPORTANCIA DE LOS HONGOS.....	15
3.4.1 Ecología.....	15
3.4.2 Diversidad de hongos en México.....	16
3.4.3 Hongos Silvestres Comestibles.....	16
3.5 HONGOS ECTOMICORRÍZICOS.....	18
3.5.1 Los hongos ectomicorrízicos en la nutrición de especies forestales.....	21
3.5.2 Aplicaciones biotecnológicas de los hongos ectomicorrízicos en especies forestales.....	23
3.6 ASPECTOS TAXONÓMICOS Y ECOFISIOLÓGICOS DE TRES HONGOS ECTOMICORRÍZICOS.....	26
3.6.1 <i>Hebeloma alpinum</i> (J. Favre) Bruchet, Bull. Mens. Soc. linn. Lyon 39 (Suppl.):68 (1970).....	26
3.6.2 <i>Laccaria trichodermophora</i> G.M. Muell., Mycotaxon 20(1): 112 (1984).....	27
3.6.3 <i>Thelephora terrestris</i> Ehrh., Pl. Crypt. Linn. Exsicc.: no. 178 (1787).....	28
CAPITULO IV.....	30
CRECIMIENTO, CONTENIDO Y TRANSFERENCIA DE NUTRIMENTOS EN <i>Pinus pringlei</i> Shaw INOCULADO CON HONGOS ECTOMICORRÍZICOS EN INVERNADERO.....	30
4.1 RESUMEN.....	30
4.2 INTRODUCCIÓN.....	31

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.3.1 Material biológico y montaje del experimento	32
4.3.2 Variables evaluadas	35
4.3.2.1 Crecimiento vegetal.....	35
4.3.2.2 Análisis de nutrimentos en tejido vegetal.....	37
4.3.2.3 Relaciones nutrimentales parte aérea:raíz	37
4.3.2.4 Colonización micorrízica	37
4.3.2.5 Calidad de planta	38
4.3.2.6 Análisis molecular.....	39
4.3.2.7 Caracterización morfo-anatómica de las ectomicorrizas	39
4.3.3 Diseño experimental y análisis estadístico	40
4.4 RESULTADOS	41
4.4.1 Altura, diámetro del tallo y peso seco	41
4.4.2 Contenido de nutrientes	42
4.4.2.1 Macronutrientes	42
4.4.2.2 Micronutrientes	43
4.4.3 Relaciones de nutrientes parte aérea:raíz	46
4.4.4 Colonización micorrízica	47
4.4.5 Calidad de planta	48
4.4.6 Análisis molecular	49
4.4.7 Caracterización morfo-anatómica de las ectomicorrizas:	50
4.4.7.1 Hebeloma alpinum	50
4.4.7.2 Laccaria trichodermophora	50
4.4.7.3 Thelephora terrestris.....	51
4.5 DISCUSIÓN	54
4.6 CONCLUSIONES	60
CAPITULO V	61
SUPERVIVENCIA EN CAMPO DE <i>Pinus pringlei</i> Y PERSISTENCIA DE LAS ECTOMICORRIZAS	61
5.1 RESUMEN	61
5.2 INTRODUCCIÓN	62
5.3 MATERIALES Y MÉTODOS	63
5.3.1 Área de estudio	63
5.3.2 Establecimiento del experimento	64
5.3.3 Diseño experimental y variables evaluadas.....	66
5.3.3.1 Supervivencia de plantas y persistencia de las ectomicorrizas	66
5.4 RESULTADOS	67
5.4.1 Supervivencia.....	67
5.4.2 Persistencia de la ectomicorriza	69
5.5 DISCUSIÓN	70
5.6 CONCLUSIONES	72
LITERATURA CITADA	73
CAPITULO VI	84
CONCLUSIONES GENERALES	84

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Peso seco, altura y diámetro de tallo en plantas de <i>Pinus pringlei</i> , 390 días después de la siembra, inoculadas o no, con tres hongos ectomicorrízicos.	42
Cuadro 2. Contenido de macronutrientes en <i>Pinus pringlei</i> , inoculadas o no, con tres hongos ectomicorrízicos, 390 días después de la siembra.	44
Cuadro 3. Contenido de micronutrientes en <i>Pinus pringlei</i> , inoculadas o no, con tres hongos ectomicorrízicos, 390 días después de la siembra.	45
Cuadro 4. Relaciones parte aérea: raíz de macro y micronutrientes de plantas de <i>Pinus pringlei</i> , 390 días después de la siembra, inoculadas o no con tres hongos ectomicorrízicos.	46
Cuadro 5. Número de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas y muertas de <i>Pinus pringlei</i> , 390 días después de la siembra, inoculadas o no con tres hongos ectomicorrízicos.	47
Cuadro 6. Índice de Calidad de Dickson aplicado a tres plantas de <i>Pinus pringlei</i> por cada tratamiento, 390 días después de la siembra.	48
Cuadro 7. Identificación de los morfotipos de ectomicorrizas en plantas de <i>Pinus pringlei</i> , por su afinidad filogenética en GenBank.	49
Cuadro 8. Supervivencia de plantas de <i>Pinus pringlei</i> , durante un año después del trasplante a campo.	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Detalle de conos, escamas, acículas y semillas de <i>Pinus pringlei</i> Shaw (Tomado de Shaw, 1909).....	11
Figura 2. Fotografías de las estructuras de <i>Pinus pringlei</i> . a) escamas; b) disposición de los conos; c) acículas; d) semillas; e) corteza y f) fascículo de <i>Pinus pringlei</i> Shaw (Tomado The Gymnosperm Database, 2017).	12
Figura 3. Distribución natural de <i>Pinus pringlei</i> en México. Modificado de USGS (2016).	14
Figura 4. <i>Hebeloma alpinum</i> . a) Fotografía de esporas tomadas en un microscopio electrónico de barrido y b) esporomas en fresco. Tomado de Carrasco-Hernández <i>et al.</i> (2015).....	26
Figura 5. Ejemplar de <i>Laccaria trichodermophora</i> , fotografía: Michael Kuo.	28
Figura 6. Ejemplar de <i>Thelephora terrestris</i> . Fotografía: Eduardo Duro.	29
Figura 7. Árbol de <i>Pinus pringlei</i> de Santa Catarina Estetla, Oaxaca de donde se obtuvieron las semillas.....	33
Figura 8. Preparación del inóculo. a) fase de separación de píleos y estípites; b) secado del material fúngico; c) molido de píleos deshidratados; d) Inóculo; e) almacenamiento del inóculo en viales.....	34
Figura 9. Siembra e inoculación de <i>Pinus pringlei</i> . a) Tubetes con sustrato y b) inoculación al momento de la siembra.	35
Figura 10. Evaluación de crecimiento. a) altura del tallo; b) diámetro del tallo; c)separación de vástago y raíz; y d) peso seco de vástago.....	36
Figura 11. Observación de raíces micorrizadas. a) corte del cepellón en dos partes iguales; b) lavado de raíces en tamices, c) conteo de raíces en el microscopio y d) raíces micorrizadas.	38
Figura 12. Observación de las ectomicorrizas para su descripción morfoanatómica.	40
Figura 13. <i>Pinus pringlei</i> a 390 días después de la siembra. Plantas no inoculadas y plantas inoculadas con <i>Hebeloma alpinum</i>	41
Figura 14. Ectomicorrizas de <i>Pinus pringlei</i> con <i>Hebeloma alpinum</i> (<i>Ha</i>) y <i>Laccaria trichodermophora</i> (<i>Lt</i>). a) y b) raíces ectomicorrizas con <i>Ha</i> mostrando abundante micelio externo y primer plano; c) sección transversal de la ectomicorriza de <i>Ha</i> mostrando manto (m), red de Hartig (Hn) y micelio externo (em); d) manto	

plectenquimatoso de <i>Ha.</i> e) y f) raíces micorrizas simples y dicotómicas de <i>Lt</i> y primer plano. Barras = 500 μm en a) y b); 50 μm en c) y d); 1 mm en e) y f).	52
Figura 15. Ectomicorrizas de <i>Pinus pringlei</i> con <i>Laccaria trichodermophora</i> (<i>Lt</i>) y <i>Thelephora terrestris</i> (<i>Tt</i>). A) sección transversal de la ectomicorriza de <i>Lt</i> que muestra el manto (m), red de Hartig (Hn) y micelio externo (em); B) manto plectenquimatoso de <i>Lt</i> ; C) y d) raíces micorrízicas de <i>Tt</i> , mostrando rizomorfos (flecha) y primer plano; E) sección transversal de la ectomicorriza de <i>Tt</i> mostrando m, Hn y em; Y f) <i>Tt</i> manto plectenquimatoso. Barras = 50 μm en a), b) y e), 10 μm en f) (10 μm); 1 mm en c) y d).	53
Figura 16. Localización de San Pablo Ixayoc y el terreno utilizado para realizar la plantación de <i>P. pringlei</i> . Fotografías tomadas de Google Earth 2016.	63
Figura 17. Mapa de distribución de las plantas de los cuatro tratamientos en el terreno.	64
Figura 18. Trasplante de <i>P. pringlei</i> en campo. a) cajetes; b) planta micorrizada; c) siembra realizada por una persona de la comunidad y c) planta establecida en campo.	65
Figura 19. Evaluación de persistencia de las ectomicorrizas. a) proceso de extracción de las raíces con tubos de PVC y b) tubos conteniendo una porción de tierra con raíces para su posterior análisis.	66
Figura 20. Plantas de <i>Pinus pringlei</i> después de un año del trasplante a campo. a) plantas no inoculadas, b) planta inoculada con <i>Laccaria trichodermophora</i> , c) planta inoculada con <i>Thelephora terrestris</i> y d) planta inoculada con <i>Hebeloma alpinum</i>	68
Figura 21. Ectomicorrizas halladas en el muestreo en campo de las raíces de <i>Pinus pringlei</i> . a y b) <i>Cenococcum aff. geophilum</i> y c y d) especies no identificadas.	69

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

En México, los pinos tienen un alto valor ecológico por los servicios ambientales que ofrecen como la captura de carbono, proveen oxígeno, retienen agua y humedad, sirven como hábitat y alimento para la fauna silvestre (Sánchez-González, 2008). Además, son un recurso forestal con alto valor económico, por ser fuente principalmente de madera para aserrío, leña, resinas y de semillas comestibles. La pérdida de los bosques de pino y en general de la superficie arbórea, es ocasionada por la tala excesiva sin ningún tipo de planeación, plagas, incendios forestales, cambio de uso de suelo y aumento de las áreas urbanas. Por lo tanto, existe la necesidad de restituir la cobertura vegetal a través de los programas de reforestación, especialmente con especies nativas o adecuadas a cada sitio de trasplante y de esta forma contribuir con la conservación de la biodiversidad (Benítez *et al.*, 2002). La reforestación es una actividad que requiere contar con plantas de buena calidad, asegurar su traslado adecuado de las plantas a la zona de trasplante y técnicas adecuadas para el trasplante (PRONARE, 2014). El manejo de las plantas en vivero es una fase importante (Grossnickle, 2012) que involucra la recolección de semilla, siembra y mantenimiento de las plantas (Benítez *et al.*, 2002). Sin embargo, actualmente los viveros se enfrentan a problemas técnicos, económicos y de organización, lo que genera deficiencia en la calidad de las plantas y que consecuentemente las hace susceptibles a factores como la sequía, causa principal de muerte. A nivel nacional sólo un 40 % de las áreas reforestadas cuentan con un nivel aceptable de supervivencia (Wightman y Cruz, 2003). Desde el siglo XX, investigadores forestales han examinado críticamente las características que confieren a la planta mayor supervivencia, tales como: altura, diámetro del tallo, masa de raíz y la nutrición de las plantas; así como el rendimiento, tolerancia al frío o sequía y crecimiento después del trasplante. Los niveles

óptimos de estos atributos pueden aumentar la velocidad con la que la planta de semillero supera el estrés del trasplante, de esta manera se asegura el éxito del establecimiento de las plantas (Grossnickle, 2012).

La simbiosis ectomicorrízica es uno de los principales componentes de los bosques templados (Pérez-Moreno y Ferrera-Cerrato, 1997); y se define como la asociación mutualista que se establece entre hongos de suelo y las raíces principalmente de los pinos (Tedersoo *et al.*, 2010; Brundrett, 2009; Smith y Read, 2008) que confiere a la planta beneficios nutrimentales, mejor captación de agua, hormonas, protección contra patógenos (Nagy y Fossdal, 2013), tolerancia a salinidad, bajas temperaturas (Taylor y Alexander, 2005; Smith y Read, 2008) y sequía (Lehto y Zwiazek, 2011). Es por tales beneficios que actualmente en diversos países se ha implementado la inoculación con hongos ectomicorrízicos en la producción de planta con fines de reforestación (Pérez-Moreno, 2010). La inoculación con hongos ectomicorrízicos (HECM) puede ser una práctica de vivero para conseguir la calidad de las plantas, Sin embargo, dado el poco conocimiento acerca de la compatibilidad entre especies hongo-planta y su adaptabilidad a las condiciones ambientales y edáficas de los sitios del trasplante.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1. Objetivo General

Incrementar el conocimiento del uso de hongos ectomicorrízicos como inoculantes para la producción de planta forestal con fines de recuperación de áreas degradadas o del establecimiento de plantaciones forestales.

2.2 Objetivos particulares

Evaluar el efecto de la inoculación con hongos ectomicorrízicos en el desarrollo de *P. pringlei* en términos de altura y diámetro del tallo, biomasa del vástago y de la raíz, contenido nutrimental de la planta y colonización micorrízica.

Evaluar el efecto de la inoculación con hongos ectomicorrízicos en el desarrollo de *Pinus pringlei* en términos de supervivencia y la persistencia de hongos ectomicorrízicos después de un año del trasplante a campo.

2.3 Hipótesis

Existe un incremento en la biomasa del vástago y la raíz, la altura del vástago y diámetro del tallo y contenido nutrimental en plantas de *Pinus pringlei* inoculadas con hongos ectomicorrízicos, en comparación con plantas no inoculadas.

Existe un mayor porcentaje de supervivencia en las plantas de *Pinus pringlei* inoculadas con hongos ectomicorrízicos en comparación con plantas no inoculadas. Asimismo, dichos hongos ectomicorrízicos persistiran a través del tiempo.

CAPITULO III

REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO *Pinus* EN MÉXICO

De las seis familias de coníferas del mundo, cuatro están en México; la familia Pinaceae es una de ellas. Dicha familia es la de mayor diversidad, con cuatro géneros, 61 especies, 74 taxa y 30 especies endémicas (Gernandt y Pérez-de la Rosa, 2014).

El género *Pinus* contiene 120 especies en el mundo y se encuentra distribuida en las regiones árticas de Norteamérica y Eurasia, y las zonas tropicales y subtropicales de Centroamérica (Farjon and Styles, 1997; Price *et al.*, 1998). México es el segundo centro de diversificación del género *Pinus* con aproximadamente 49 especies, de las cuales alrededor del 50% son endémicas (Sánchez-González, 2008; Gernandt y Pérez-de la Rosa, 2014). Se encuentran distribuidas en la mayor parte del territorio nacional, excepto en los estados de Tabasco, Campeche y Yucatán, en altitudes que van desde cerca de la costa hasta los límites arbóreos de los volcanes más altos del Eje Neovolcánico Transversal del sur-centro del país, es decir varía entre los 1 500 a los 3 000 m, pero pueden alcanzar hasta los 4 000 m (Gernandt y Pérez-de la Rosa, 2014). Los estados con mayor diversidad son Coahuila con 28, Nuevo León con 24, Hidalgo con 24 y Oaxaca con 23 especies.

3.2 ESTADO ACTUAL DE LOS BOSQUES EN MÉXICO

Un tercio de la superficie terrestre esta cubierta por bosques (3 999 millones de ha). Sin embargo, debido al crecimiento poblacional y cambio de uso de suelo, a la fecha los bosques han disminuido en más de un 50 %, particularmente en los trópicos de América y África (FAO, 2016). En México tan solo del 2005 al 2010 se devastaron 755 mil ha de bosques y selvas (FRA, 2010) a

causa del cambio de uso de suelo, extracción excesiva de madera, incendios, plagas y enfermedades las cuales han afectado seriamente la calidad y superficie de los bosques y selvas. A pesar de que México es el segundo centro de diversificación de *Pinus*, son 20 las especies enlistadas en alguna categoría de riesgo en la Nom-059-Semarnat-2010 (Gernandt y Pérez-de la Rosa, 2014) y 42 especies en la lista roja de especies amenazadas de la IUCN y de las cuales 17 son endémicas (IUCN, 2014). En México en el año 2014 se reforestaron 18 172 ha y se plantaron 6 662 296 árboles (PRONARE, 2014) producidos en 341 viveros forestales, en donde se producen 30 especies de coníferas, principalmente del género *Pinus*, tales como *P. pseudostrobus*, *P. montezumae*, *P. devoniana*, *P. greggii*, *P. douglasiana*, *P. ayacahuite*, *P. oaxacana*, *P. oocarpa*, *P. patula*, *P. cembroides*, 72 especies de latifoliadas como *Quercus rugosa* y *Q. microphylla*, entre otras (CONAFOR, 2016).

Las actividades de reforestación es importante en los ecosistemas forestales, debido a que contribuyen a restaurar hábitats deteriorados. La cobertura vegetal brinda protección al suelo, favorece la intercepción de la lluvia y evita la erosión por escurrimientos superficiales. Además las plantas capturan CO₂ y producen oxígeno, y en muchos casos se pueden aprovechar con fines comerciales debido a la materia prima que producen. Aunque actualmente se implementan programas de reforestación, su éxito se ha obstaculizado por la baja supervivencia de las plantas después del trasplante a campo del 0 al 20 %. Un grave problema que se presenta en los viveros mexicanos consiste en que, generalmente, las plantas producidas son de muy baja calidad (Muñoz *et al.*, 2015). Una de las causas es debido a que no se incorporan a los hongos ectomicorrízicos, los cuáles establecen una relación simbiótica obligada con las raíces de los pinos desde etapas muy tempranas en condiciones naturales.

En los programas de reforestación, es necesario utilizar especies que estén adaptadas a las condiciones climáticas y edáficas del sitio, una previa preparación del suelo a donde se pretenden plantar, cuidado después del trasplante y sobre todo la calidad de planta (Muñoz *et al.*, 2015).

3.2.1 Calidad de planta

La calidad de planta influye en la supervivencia y su establecimiento de las plantas después del trasplante (Sáenz *et al.*, 2014). La calidad de planta se define como la capacidad que tienen los individuos para adaptarse y desarrollarse en las condiciones climáticas y edáficas del sitio donde se establecen (Rodríguez, 2008), por ejemplo:

- i) Calidad genética del germoplasma, que hace referencia al origen de la semilla u otros materiales de reproducción.
- ii) La calidad morfológica y fisiológica de la planta depende de sus características genéticas.
- iii) La calidad sanitaria se refiere a las técnicas utilizadas en invernadero al momento de propagarlas evitando la contaminación con agentes patógenos (Prieto *et al.*, 2009).

Para determinar la calidad de la planta se realiza en base a variables morfológicas y fisiológicas; entre las primeras se incluyen:

- i) La altura de la planta, influye en la competencia de la planta con la vegetación herbácea y arbustiva que la rodea. Se recomienda una altura entre 15 y 20 cm.
- ii) Diámetro del tallo, esta variable define la robustez del tallo y se asocia con el vigor y supervivencia de las plantas. Plantas con diámetro mayor a 5 mm son más resistentes al doblamiento y toleran mejor daños por plagas y fauna nociva; aunque esto varía con la especie.

- iii) Volumen del sistema radical, La raíz principal debe ser recta, con raíces secundarias fibrosas y abundantes puntos de crecimiento, las cuales son de color blanco lechosos. La raíz es el medio a través del cual la planta absorbe agua y nutrimentos.
- iv) Peso seco del vástago y raíz, refleja el desarrollo que logró la planta en vivero. La biomasa tiene correlación con la supervivencia y el crecimiento de las plantas en campo. La biomasa de la parte aérea es un indicador de la superficie fotosintética y del área de transpiración, además representa su capacidad para almacenar carbohidratos.
- v) Presencia de yema terminal, la formación de la yema apical ocurre cuando la planta disminuye su metabolismo, debido a reducción del agua suministrada, incremento de la dosis de potasio y exposición de la planta a condiciones ambientales naturales. Si la planta continúa en un ambiente favorable de humedad y condiciones de invernadero, su crecimiento no disminuirá, lo que afectará su establecimiento en campo, ya que será muy alta y corre el riesgo de ser trozada por el viento.
- vi) Color del follaje, dependerá de la especie, pero muchas veces el color nos indica el estado nutricional de la planta, lo cual es de importancia para determinar si una planta está saludable o presenta alguna deficiencia que pueda repercutir en su supervivencia en campo.
- vii) La sanidad, las plantas deben estar libres de heridas, plagas, enfermedades, follaje seco, daños físicos por viento, pisoteo, etc. Una planta sana puede desarrollarse en campo sin alteraciones morfo-fisiológicas (Prieto *et al.*, 2009).
- viii) En el caso de los pinos la presencia de las ectomicorrizas es crucial para su desarrollo, nutrición y absorción de agua, que podría hacer la diferencia entre su adaptación en campo después del trasplante.

Si bien, es importante que exista un equilibrio entre la altura y diámetro de la parte aérea, así como la proporción de masa de la parte aérea y la radical, Sin embargo, las características pueden variar

dependiendo de la especie. En los atributos fisiológicos se consideran: resistencia al frío, potencial hídrico, contenido nutricional y de carbohidratos, tolerancia a sequía, fotosíntesis y micorrización (Prieto et al., 2009).

La exigencia de la calidad de las plantas se incrementa cuando hay limitantes en el medio donde se pretende realizar la repoblación o reforestación. Por tal motivo, es necesario desarrollar técnicas culturales desde el vivero, el tipo de sustrato, tipo de contenedor, la calidad de las semillas, fertilización, condiciones climáticas del vivero, riego, así como el transporte y plantación de las plantas en campo (Villar *et al.*, 2000). Al utilizar plantas de calidad en las reforestaciones, se incrementa la posibilidad de éxito. Por lo tanto conocer que factores influyen en el buen desarrollo de la planta, es crucial.

3.2.2 Índice de Calidad de Dickson

Este índice agrupa variables relacionadas con la calidad de la planta. A mayor valor del índice, mejor calidad de la planta. El índice de Calidad de Dickson (ICD) se calcula con la fórmula siguiente:

$$\text{Índice de Calidad de Dickson (ICD)} = \frac{\text{Peso seco total (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{Peso seco parte aérea (g)}}{\text{Peso seco raíz (g)}}}$$

Desafortunadamente para las especies del género *Pinus* de México, aún no se han definido los índices de calidad por especie (Prieto *et al.*, 2009).

3.3 DESCRIPCIÓN DE *Pinus pringlei*

3.3.1 Taxonomía

Pinus pringlei es una especie endémica de México, comúnmente conocido como Ocote Escobetón, cedrón, Pino piña negra, Pino rojo, pino de Guerrero (Farjon, 2013; CONAFOR, 2017; Villaseñor *et al.*, 2013). El epíteto específico *pringlei* rinde homenaje a Ciro Guernsey Pringle (1838-1911), un botánico americano, explorador y el obtentor vegetal. Fue descrita por primera vez por George Russell Shaw en 1905, en la obra “Trees and Shrubs”.

3.3.2 Descripción morfológica

Los árboles de esta especie presentan alturas entre los 20 y 25 m, con más de 90 cm de diámetro a la altura del pecho. Su copa es de forma asimétrica y ovoide, de color verde brillante. Sus acículas son perennifolias de (15)18-25(30) cm de largo, gruesas, aserradas, rectas y rígidas, con conductos resinosos internos, con tres acículas por fascículo. El fascículo es persistente (Shaw, 1909). Posee conos finos, individuales o en pares, asimétricos, ligeros de 5-8 (12) cm de largo, con pedúnculo corto, grueso y persistentes. Escamas rectas y pequeñas, apófisis más o menos plana, el umbo es dorsal, plano y deprimido (Mirov, 1967; Del Castillo *et al.*, 2004) (Figura 1-2). Estróbilo amarillo o marrón leonado. Tiene una apariencia parecida a *P. oocarpa*, pero se distingue por su cono más elíptico, semiserótino (fruto tardío). Corteza joven escamosa y de color rojo. Florece en noviembre o principios de diciembre (Shaw, 1909).

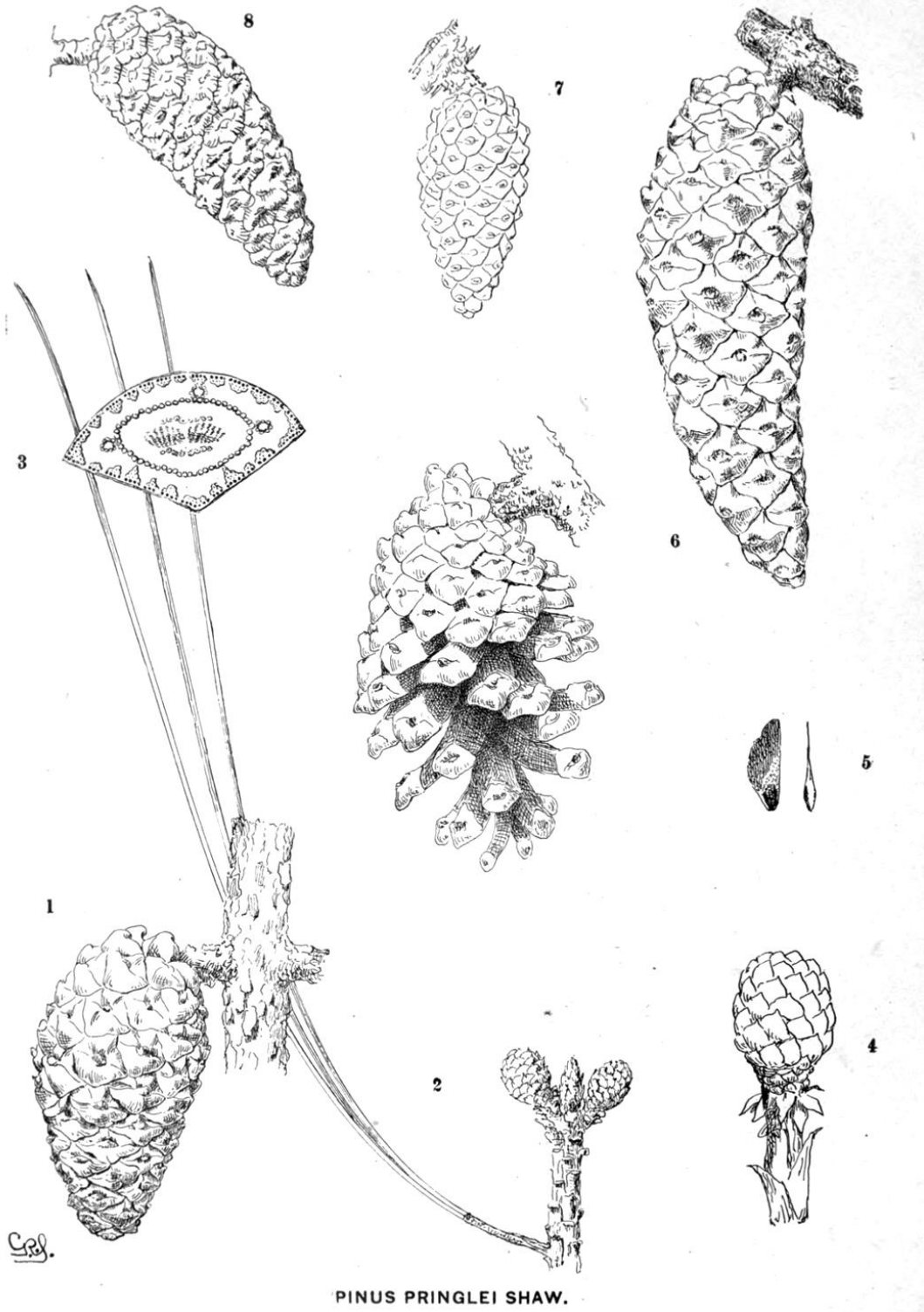


Figura 1. Detalle de conos, escamas, acículas y semillas de *Pinus pringlei* Shaw (Tomado de Shaw, 1909).

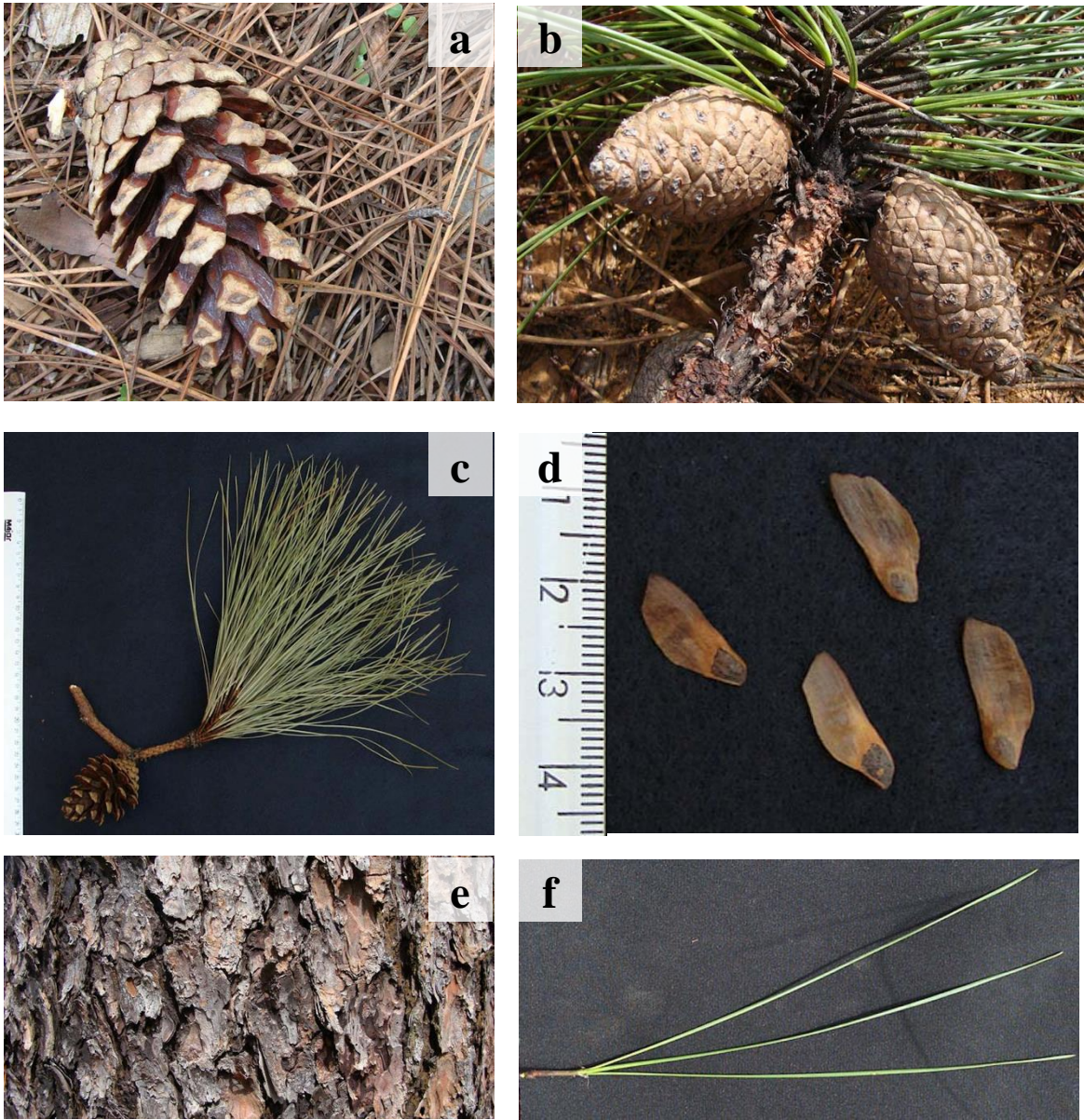


Figura 2. Fotografías de las estructuras de *Pinus pringlei*. a) escamas; b) disposición de los conos; c) acículas; d) semillas; e) corteza y f) fascículo de *Pinus pringlei* Shaw (Tomado The Gymnosperm Database, 2017).

3.3.3 Distribución y ecología

Pinus pringlei es una especie nativa de México que prospera en la Sierra Madre del Sur y regiones adyacentes del Eje Neovolcánico, en zonas subtropicales y templadas. Se distribuye limitadamente en los estados de Michoacán, Guerrero, Estado de México, Morelos y Oaxaca (Figura 3). Habita en bosques de pino, pino-encino y pastizales, se asocia con numerosas especies de pinos (*P. lawsonii*, *P. devoniana*, *P. oocarpa*, *P. douglasiana*, *P. maximinoi*, *P. pseudostrobus* y *P. patula*). Se desarrolla en altitudes que van de los 1500 a 2800 m. Se desarrolla en suelos de tipo Andosol, desde poco profundos en lomeríos y hasta 1.5 m en los valles, con pH neutro o ligeramente ácido. El intervalo de temperaturas en las que se desarrollan es de -4 a 40 °C, siendo la media de 16.7 °C. La precipitación requerida va de los 1000 a 2000 mm (Del Castillo *et al.*, 2004; Farjon, 2013). Esta especie es tolerante a condiciones de sequía, sin embargo pasa lo contrario con las heladas (Dvorak, 2000).

Es una especie resistente a la enfermedad de chancro resinoso ocasionada por el hongo *Fusarium circinatum* que suele atacar a las plantas en etapas tempranas, en condiciones de invernadero (Hodge y Dvorak, 2000) y a la enfermedad Diplodia pinea o muerte regresiva ocasionada por el hongo *Sphaeropsis sapinea* (Dvorak, 2000).

En la lista roja de la IUCN-2015-4, dicha especie se encuentra clasificada en la categoría de preocupación menor. Aunque el descenso de sus comunidades va en aumento cada año.

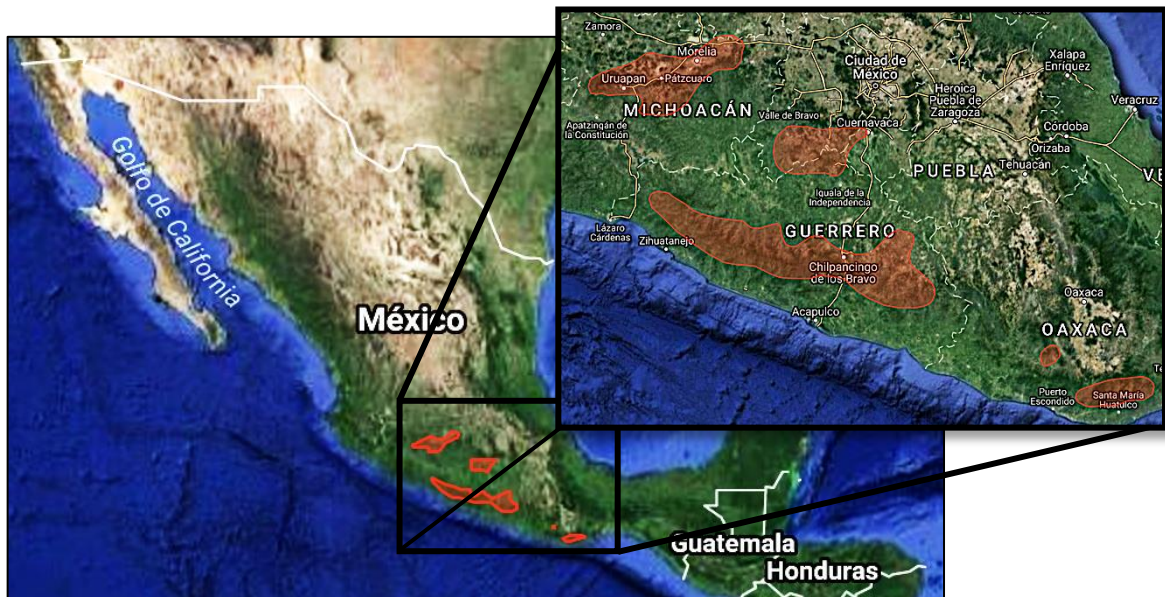


Figura 3. Distribución natural de *Pinus pringlei* en México. Modificado de USGS (2016).

3.3.4 Importancia

Los árboles de *P. pringlei* tienen potencial para jardines y parques, son fuente de madera para aserrío, resina, triplay, pulpa para papel, construcción de muebles caseros e industriales, casas, tarimas, plataformas, pisos, palos de escoba, lomos de cerillos, cajas de empaque y artesanías (CONAFOR, 2017).

P. pringlei cuenta con una madera y resina de excelente calidad (Lockhart, 1990; Dvorak *et al.*, 1997; López *et al.*, 2001; Sotomayor-Castellanos y Ramírez-Pérez, 2014). Produce una madera atractiva de un color uniformemente marrón pálido debido a sus anillos de crecimiento relativamente poco visibles, su textura es fina y con buena densidad (Malan, 1994), tiene alta densidad de madera (en el núcleo en promedio tiene 604 kg/m^3 y en la madera exterior en promedio 731 kg/m^3) (Dungey *et al.*, 2003). La incidencia de los nudos parecen ser similares a la encontrada en *P. patula*, la cual es una especie ampliamente utilizada para obtención de madera en muchos

países del mundo, sin embargo, la madera resultante de *P. pringlei* tiende a deformarse menos (Malan, 1994). La madera de *P. pringlei* tiende a contener mayor cantidad de resina que *P. patula*.

3.4 IMPORTANCIA DE LOS HONGOS

3.4.1 Ecología

Los hongos tienen una distribución cosmopolita, aunque hay especies de áreas restringidas. Se encuentran en todo el globo terrestre y viven en sitios que presentan materia orgánica, agua y una temperatura apropiada comprendida entre 4 y 60 °C. Pueden vivir en climas ecuatoriales, tropicales, subtropicales, templados y fríos, desde el nivel del mar hasta altitudes de 4 000 m, así mismo se desarrollan desde los lugares más húmedos hasta los sitios semidesérticos y aún desérticos en las épocas en que puede haber una ligera humedad en el suelo (Herrera y Ulloa, 2013).

Debido a que los hongos carecen de clorofila, su nutrición es por absorción y dependiendo de las sustancias orgánicas que aprovechen, pueden ser saprobios, parásitos o simbioses. Los saprofitos utilizan sustancias orgánicas, descomponen la celulosa, pectina y lignina provenientes de los residuos vegetales (Alexander, 1997). Las enzimas que descomponen la lignina también contribuyen a la descomposición de xenobióticos como plaguicidas, fertilizantes químicos e hidrocarburos que se encuentran contaminando el suelo (Wainwright, 1992). Los hongos parásitos se desarrollan en otros organismos y se nutren de las sustancias que hay en sus células vivas o de las que tienen en sus líquidos orgánicos vitales como la linfa, la hemolinfa y la sangre de los animales, o la savia de los vegetales (Herrera y Ulloa, 2013). Los hongos simbióticos o formadores de micorriza, pueden aumentar la disponibilidad de nutrientes minerales necesarios para el

desarrollo de la planta, a cambio el hongo recibe carbohidratos y otras sustancias orgánicas resultantes de la fotosíntesis (Smith y Read, 2008).

Los hongos son de gran importancia ya que participan en las cadenas tróficas. El carbono y los nutrimentos acumulados en la biomasa fúngica son importantes en la dieta de un gran número de vertebrados e invertebrados (Maser *et al.*, 1978). Además, forman parte de un patrimonio cultural, ya que son utilizados como un recurso alimenticio, industrial, ornamental, medicinal y también fueron utilizados con fines mágicos, terapéuticos y en rituales sagrados/religiosos por los Olmecas, Zapotecas, Mayas y Aztecas (Carod-Artal, 2015).

3.4.2 Diversidad de hongos en México

Se estima que a nivel mundial existen 1.5 millones de especies de hongos (Hawksworth, 2001) de las cuáles se conocen sólo el 5 %. En el caso de los macromicetos se han registrado 21 679 especies y se estima que existen alrededor de 56 679 especies (Mueller *et al.*, 2007).

En México se estima que hay hasta 200 000 especies de hongos (Guzmán, 1998), de las cuales se han descrito 6 000 especies, siendo 4 000 macromicetos incluyendo basidiomicetes y ascomicetes; y 2 000 micromicetos (Mueller *et al.*, 2007).

3.4.3 Hongos Silvestres Comestibles

Los hongos silvestres han sido recolectados y consumidos por la gente durante miles de años (Boa, 2005). La tradición de consumo en Latinoamérica se restringe casi exclusivamente a México (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989), a la zona sur de Guatemala y en menor proporción en Honduras y algunas poblaciones del amazonas (Boa, 2005).

México ocupa el segundo lugar mundial con mayor diversidad de hongos y tradición respecto a la utilización, después de China (Moreno-Fuentes *et al.*, 2001), debido a que cuenta con un gran

acervo cultural con alrededor de 60 grupos étnicos con un amplio conocimiento tradicional sobre su entorno (Zamora y Torres, 2002; Navarrete, 2008). Representan un producto forestal no maderable, que se extrae como parte de la estrategia de subsistencia de las comunidades locales (Montoya *et al.*, 2014). Son valorados por sus características físicas, ecológicas y su gran valor cultural (Pérez-Moreno *et al.*, 2010) y proporcionan un complemento sustancial en la dieta de las personas (Boa, 2005; Pérez-Moreno *et al.*, 2008; Garibay-Orijel *et al.*, 2009). Se han descrito de 204 a 371 especies de hongos silvestres comestibles en México (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989; Garibay-Orijel y Ruan-Soto, 2014), alrededor de 48 % de las especies crecen en bosques de coníferas, 27 % en bosques de *Quercus*, 11 % en bosque mesófilo de montaña, 7 % en los bosques tropicales y 5 % en zonas agrícolas y urbanas (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989), siendo la parte central del país la mejor estudiada.

La recolecta y venta de hongos es una actividad que representa una alternativa como fuente de ingresos para varias comunidades aledañas a los bosques, sobre todo aquellas muy marginadas (Zamora y Torres, 2002; Boa, 2005; Montoya *et al.*, 2008) y además la comercialización en los mercados locales contribuye al mantenimiento del conocimiento ancestral (Pérez-Moreno *et al.*, 2008). Diversos estudios han registrado el número y las especies que se comercializan en los mercados locales de diferentes regiones de México. Por ejemplo:

Autores	Especies comercializadas	Sitios de comercialización
Mariaca <i>et al.</i> , 2001	34	Valle de Toluca
Montoya <i>et al.</i> , 2001	52	Tlaxcala
Pérez-Moreno <i>et al.</i> , 2008	92	Zona de los parques Nacionales Ixta-Popo y Zoquiapan
Estrada <i>et al.</i> , 2009	65	Sierra Nevada
Burrola-Aguilar <i>et al.</i> , 2012	38	Amanalco, Estado de México
Jiménez-Ruíz <i>et al.</i> , 2013	20	Valles Centrales, de Oaxaca

Sin embargo, el número de especies de hongos silvestres consumidos en cada región es aún mayor sin embargo, no se comercializan por la escasa disponibilidad de esporomas.

3.5 HONGOS ECTOMICORRÍZICOS

La colonización de la tierra por las eucariotas probablemente fue facilitado por una asociación simbiótica entre un organismo fotosintético y un hongo (Heckman *et al.*, 2001).

El término micorriza fue descrito por primera vez por Anton B. Frank en 1885 para describir la simbiosis mutualista que se establece entre las raíces de aproximadamente 95 % de las plantas terrestres y 20 000 especies de hongos del suelo (Comandini *et al.*, 2012; Rinaldi *et al.*, 2008). Los hongos micorrízicos son la principal vía a través de la cuál la mayoría de las plantas obtienen nutrientes minerales, resistencia a las enfermedades, sequía y las temperaturas extremas.

De acuerdo a como el hongo ECM interactúa con la raíz y a la familia a la que pertenece la planta, las micorrizas se clasifican en siete grupos: micorriza arbuscular, micorriza ericoide, arbutoide, monotropoide, orquideoide, ectendomicorriza y ectomicorriza (Smith y Read, 2008). Las dos más importantes desde el punto de vista agronómico y forestal son: la micorriza arbuscular y la ectomicorriza respectivamente (Alarcón, 2007). El origen de la simbiosis ectomicorrízica aún se especula, sin embargo se cree que aparecieron por primera vez en el Cretácico hace 130 millones de años en plantas de la familia Pinaceae, que hoy en día son casi exclusivamente ectomicorrízicas. Las evidencias contundentes se tienen de raíces de *Pinus* sp. fosilizadas de aproximadamente 50 millones de años del periodo Eoceno (Smith y Read, 2008). La simbiosis ectomicorrízica es una de las asociaciones más destacadas y ecológicamente cruciales en los hábitats terrestres. Implica varios miles de especies de hongos agrupados dentro de los filos Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota (Rinaldi *et al.*, 2008) y aproximadamente 3 % de las plantas vasculares (Smith y Read, 2008). Esta asociación sostiene el crecimiento de los bosques en las zonas boscosas templadas, tropicales y subtropicales (Boa, 2005).

La diferenciación ectomicorrízica implica cambios drásticos en la morfología, anatomía y fisiología de la raíz, dando lugar a estructuras simbióticas altamente integradas. La formación de estas estructuras se basa en procesos ontogénicos estrictamente regulados que implican la señalización entre ambos simbioses. La formación de las ectomicorrizas ha sido ampliamente estudiada a niveles citológicos y bioquímicos, pero los mecanismos por los que el hongo y la planta se comunican durante la formación y los mecanismos moleculares implicados en la diferenciación de la estructura simbiótica sigue siendo en gran parte desconocido (Marmeisse *et al.*, 2004).

Las ectomicorrizas se caracterizan por formar tres estructuras:

- i) Manto: es una agregación de hifas que se encuentran envolviendo el exterior de la raíz, actúa como una barrera física para evitar la pérdida de agua y la desecación de la raíz (Rincón *et al.*, 2007, Smith y Read, 2008).
- ii) Red de Hartig: es una estructura funcional y estructural entre el hongo y las células de la raíz (Díez, 2005), son hifas que rodean, sin penetrar las células corticales, es el lugar del intercambio bidireccional de nutrientes.
- iii) Micelio externo: son hifas que emanan y exploran el suelo (Marmeisse *et al.*, 2004), son responsables de la movilización de los nutrientes del suelo y agua (Díez, 2005).

La mayoría de los hongos ectomicorrízicos tienen un amplio rango de plantas hospederas (Molina *et al.*, 1992), desarrollan poca o ninguna especificidad como *Amanita muscaria*, *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Paxillus involutus*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius* y *Thelephora terrestris*, las cuales tienen la capacidad de formar asociaciones micorrízicas con gran variedad de plantas de diferentes géneros y familias (Cairney y Chambers, 1999). Por lo contrario, el género *Suillus* se asocia sólo con la familia Pinaceae y el género *Rhizopogon* solo forma asociaciones con especies del género *Pinus* y un caso más extremos como *Suillus plorans* que sólo se ha encontrado asociado con *Pinus cembra* (Estrada-Torres, 2007).

La colonización se puede llevar a cabo a través de las esporas que viajan con el viento teniendo la posibilidad de establecerse en cualquier raíz o de micelio ya establecido en el suelo que colonizan las nuevas raíces de las plantas (Estrada-Torres, 2007). Las esporas de ciertos hongos pueden colonizar raíces de plantas en etapas muy tempranas de desarrollo, como especies del género *Laccaria*, *Hebeloma*, *Thelephora* y *Tomentella* que se asocian exclusivamente con plantas leñosas pioneras y en estadios tempranos (Obase *et al.*, 2009), algunos otros se establecen con plantas adultas como los géneros *Ramaria*, *Lactarius*, *Cantharellus*, *Boletus*, por mencionar algunos. Por

lo tanto, en las poblaciones de hongos ectomicorrízicos existen estrategias de colonización secuencial y reemplazo de especies.

En los ecosistemas forestales naturales, el sistema radical de una planta se asocia frecuentemente con muchas especies de hongos ectomicorrízicos, la diversidad de estas comunidades fúngicas cambia durante el curso del envejecimiento del bosque (Smith *et al.*, 2002), como en respuesta a diversas alteraciones del ecosistema y la deposición de nitrógeno (Avis *et al.*, 2003).

En el mundo se conocen más de 550 especies de hongos potencialmente ectomicorrizógenas (Estrada-Torres, 2007; Cunningham *et al.*, 2011). De las especies de hongos silvestres comestibles en México, alrededor del 50% tienen un valor agregado pues son ectomicorrízicos (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989).

Muchas de las especies ectomicorrízicas no pueden ser cultivadas, a excepción de las trufas (*Tuber spp.*), por lo tanto, una alternativa para evitar la pérdida de diversidad de especies fúngicas es mediante prácticas biotecnológicas como la inoculación de especies forestales, que al mismo tiempo nos proporcionen una alternativa para el aprovechamiento maderable.

3.5.1 Los hongos ectomicorrízicos en la nutrición de especies forestales

A través de la estructura especializada e integrada que se desarrolla en la raíz a partir de la simbiosis ectomicorrízica con las raíces de las plantas, se originan diversos efectos benéficos para la planta asociada, como la habilidad de absorber y transportar nutrimentos orgánicos e inorgánicos principalmente nitrógeno, fósforo, potasio y calcio que la planta no puede adquirir directamente del suelo (Pérez-Moreno y Read, 2004; Smith y Read, 2008), especialmente en suelos en donde los nutrimentos están presentes en pequeñas cantidades. Por otra parte como retribución el hongo recibe compuestos de carbono (Read y Pérez-Moreno, 2003; Marmeisse *et al.*, 2004; Smith y Read,

2008). Los hongos ectomicorrízicos juegan un papel clave en la salud y vigor de los árboles sobre todo en ambientes estresantes (Steinfeld *et al.*, 2003; Marmeisse *et al.*, 2004).

Los huéspedes de los hongos ectomicorrízicos son principalmente especies arbóreas en las familias *Pinaceae*, *Cupressaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae* y *Salicaceae* (Malloch *et al.*, 1980), distribuidos en bosques tropicales, templados y boreales (Smith y Read, 2008). Sin embargo, se necesita más información sobre los hongos micorrízicos nativos que podrían utilizarse para inocular plantas en vivero y de esta manera mejorar la supervivencia de los árboles y el rendimiento en campo después del trasplante (Steinfeld *et al.*, 2003).

En suelos contaminados con metales pesados se pensaría que la micorrización sería una desventaja. Sin embargo, se ha estudiado que los hongos tienen un efecto positivo, debido a que el manto que cubre a las raíces modera la absorción de los metales pesados (Bücking y Heyser, 1994; Turnau *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2014). La mejora de la tolerancia está ligada a la concentración del tejido o vástago, junto con un aumento de la acumulación del metal en el sistema radical, sin embargo, este efecto no puede ser generalizado para todas las asociaciones ectomicorrízicas. Ciertas especies de hongos ectomicorrízicos reducen directamente la toxicidad del metal a través de funciones como la compartimentación, la quelación y los mecanismos de complejación intracelular y extracelular (Bellion *et al.*, 2007). El micelio extramatricial es el mejor componente funcional ya que el micelio muerto podría ser utilizado como sustrato por otros organismos (Högberg y Högberg, 2002), lo que contribuye a la biodiversidad de microorganismos en la rizosfera que ponen a disposición los macro y micronutrientes para las plantas (Marschner, 1986),

La eficacia de la absorción de metales pesados, transporte y distribución en las plantas a menudo aumenta por las ectomicorrizas, lo que resulta en un mejor estado fisiológico y crecimiento (Luo *et al.*, 2014). Por ejemplo, se ha demostrado que en altas concentraciones de Zn, el hongo *Suillus*

bovinus confiere mayor tolerancia a *P. sylvestris* (Bücking y Heyser, 1994). Sin embargo, es necesario estudiar este proceso con diferentes especies de plantas y hongos.

3.5.2 Aplicaciones biotecnológicas de los hongos ectomicorrízicos en especies forestales

La deforestación es un factor causante del cambio climático global (Pérez-Moreno, 2012). Sin embargo, la reforestación tiene diversas limitaciones, como una baja supervivencia de las plantas en campo debido a la falta de simbiontes ectomicorrízicos que se encuentran de forma natural en las raíces de la mayoría de las especies forestales que se producen en vivero, cuya presencia es obligada (Pérez-Moreno y Martínez-Reyes, 2014). Por lo tanto la inoculación con hongos ectomicorrízicos es una alternativa precisa que debe ser aplicada a la brevedad.

En México, la utilización de hongos micorrízicos ha tenido poco impulso debido a que no se tienen estandarizadas las técnicas de inoculación que sean eficientes en la producción masiva de plantas forestales. Hay muchos viveros que aún desconocen esta técnica biotecnológica a pesar de su enorme potencial (Martínez-Reyes *et al.*, 2012). Por lo tanto, los programas de reforestación en México informan que sólo el 10% de los árboles sobreviven después del trasplante (Orozco *et al.*, 2010). El desarrollo de técnicas para el desarrollo y aprovechamiento forestal, además de contribuir con la conservación de la diversidad de los hongos y especies de pinos, contribuye de manera eficiente a incrementar la producción y productividad forestal. Ante tal panorama, es necesario generar estas técnicas biotecnológicas que nos ayuden a tal objetivo, sobre todo con las especies de árboles que tienen potencial maderable como los pinos. Un criterio para la selección de hongos ectomicorrízicos que ha tenido trascendencia recientemente es su comestibilidad debido a su enorme importancia social, económica y ambiental (Pérez-Moreno y Martínez-Reyes, 2014). La inoculación con hongos ectomicorrízicos seleccionados a menudo han sido identificados como una

práctica cultural prometedora en vivero para mejorar la calidad de las plantas y su rendimiento después del trasplante (Rincón *et al.*, 2007).

Se ha documentado que la inoculación con ciertos hongos ectomicorrízicos mejora significativamente el crecimiento, producción de biomasa y nutrición con algunos de los nutrimentos en diferentes especies de pinos:

Autor	Especie forestal	Hongos ectomicorrízicos inoculados
Browning y Whitney, 1991	<i>Pinus banksiana</i>	<i>Laccaria bicolor</i> , <i>Laccaria proxima</i> o <i>Hebeloma cylindrosporum</i>
Bending y Read, 1995	<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Suillus bovinus</i> o <i>Thelephora terrestris</i>
Calvaruso <i>et al.</i> , 2011		<i>Laccaria bicolor</i>
Perladé <i>et al.</i> , 2004	<i>Pinus halapensis</i>	<i>Rhizopogon luteolus</i> o <i>R. roseolus</i>
Nuñez <i>et al.</i> , 2004		<i>Tuber melanosporum</i>
Rincón <i>et al.</i> , 2007		<i>Amanita ovoide</i> , <i>R. roseolus</i> o <i>Suillus collinitus</i>
Sudhakara-Reddy y Natarajan, 1997	<i>Pinus patula</i>	<i>L. laccata</i> o <i>T. terrestris</i>
Perea-Estrada <i>et al.</i> , 2009		<i>Hebeloma</i> spp. <i>Laccaria</i> spp. <i>Clavulina</i> aff. <i>cinerea</i>
Carrasco-Hernández <i>et al.</i> , 2011		Especies de hongos de los géneros <i>Laccaria</i> y <i>Hebeloma</i>
Rincón <i>et al.</i> , 2001	<i>Pinus pinea</i>	Especies de los géneros <i>Hebeloma</i> , <i>Pisolithus</i> , <i>Laccaria</i> , <i>Melanogaster</i> , <i>Rhizopogon</i> y <i>Scleroderma</i>
Parladé <i>et al.</i> , 2004		<i>Rhizopogon luteolus</i> o <i>R. roseolus</i>
Perea-Estrada <i>et al.</i> , 2009	<i>Pinus hartwegii</i>	<i>Hebeloma</i> spp. <i>Laccaria</i> spp. <i>Clavulina</i> aff. <i>cinerea</i>
Chávez <i>et al.</i> , 2009	<i>Pinus radiata</i>	<i>Rhizopogon luteolus</i> , <i>Suillus bellinii</i> y <i>S. luteus</i>
Chávez <i>et al.</i> , 2014		<i>S. luteus</i> o <i>R. luteolus</i>

Carrasco-Hernández <i>et al.</i> , 2011	<i>Pinus pseudostrabus</i>	Especies de hongos de los géneros <i>Laccaria</i> y <i>Hebeloma</i>
Barroetaveña <i>et al.</i> , 2012	<i>Pinus ponderosa</i>	<i>R. roseolus</i> , <i>S. luteus</i> , <i>Hebeloma mesophaeum</i> o <i>Tricholoma muricatum</i>
Martínez-Reyes <i>et al.</i> , 2012	<i>Pinus greggii</i>	<i>H. mesophaeum</i>
Méndez-Neri <i>et al.</i> , 2011		<i>H. mesophaeum</i> , <i>L. laccata</i> o <i>Suillus</i> aff. <i>pseudobrevipes</i>
Rentería-Chávez <i>et al.</i> , 2017		<i>L. laccata</i> , <i>L. bicolor</i> o <i>H. leucosarx</i>
Parladé <i>et al.</i> , 1996	<i>Pinus pinaster</i>	Especies de los géneros <i>Melanogaster</i> , <i>Rhizopogon</i> , <i>Tuber</i> y <i>Scleroderma</i>
Sousa <i>et al.</i> , 2012		<i>T. terrestris</i> , <i>R. vulgaris</i> , <i>P. tinctorius</i> , <i>S. citrinum</i> , <i>S. bovinus</i> , <i>L. laccata</i> y <i>L. deterrimus</i>
Oliveira <i>et al.</i> , 2012		Especies de los géneros <i>Thelephora</i> , <i>Rhizopogon</i> , <i>Pisolithus</i> , <i>Scleroderma</i> , <i>Suillus</i> y <i>Laccaria</i>
Sánchez-Zabala <i>et al.</i> , 2013		<i>Lactarius deliciosus</i> , <i>L. quieticolor</i> , <i>Pisolithus arhizus</i> o <i>Suillus luteus</i>

Estos resultados enfatizan la importancia de seleccionar especies de hongos compatibles con las especies arbóreas de interés, así como el tipo de inóculo adaptado a las condiciones ambientales del trasplante. La adecuada selección pueden ser una importante ventaja inicial para el establecimiento exitoso de las plántulas fuera del vivero (Rincón *et al.*, 2007). Actualmente se han desarrollado medios sintéticos donde se cultivan algunos hongos ectomicorrízicos, lo que ha facilitado su manipulación (Pérez-Moreno *et al.*, 2002). Uno de los retos actuales es revisar la biología básica de los hongos ectomicorrízicos, así como la dinámica de sus poblaciones en ecosistemas forestales naturales y determinar su potencial biotecnológico.

3.6 ASPECTOS TAXONÓMICOS Y ECOFISIOLÓGICOS DE TRES HONGOS ECTOMICORRÍZICOS

3.6.1 *Hebeloma alpinum* (J. Favre) Bruchet, *Bull. Mens. Soc. linn. Lyon* 39 (Suppl.):68 (1970)

Macromorfología: *Basidioma:* Píleo convexo de color marrón oscuro con un diámetro de 1.2-5.2 cm. Estípite cilíndrico, color crema, 1.2-5.7 cm de largo y 0.4-1.8 cm de ancho. Láminas son libres de color marrón oscuro. Basidiosporas con forma elíptica con ornamentación lacunosa. Al igual que *H. leucosarx* y *H. mesophaeum*, las esporas son marrones con una longitud promedio de 8.8 μm y 4.7 μm respectivamente (Figura 4) (Carrasco-Hernández *et al.*, 2015).

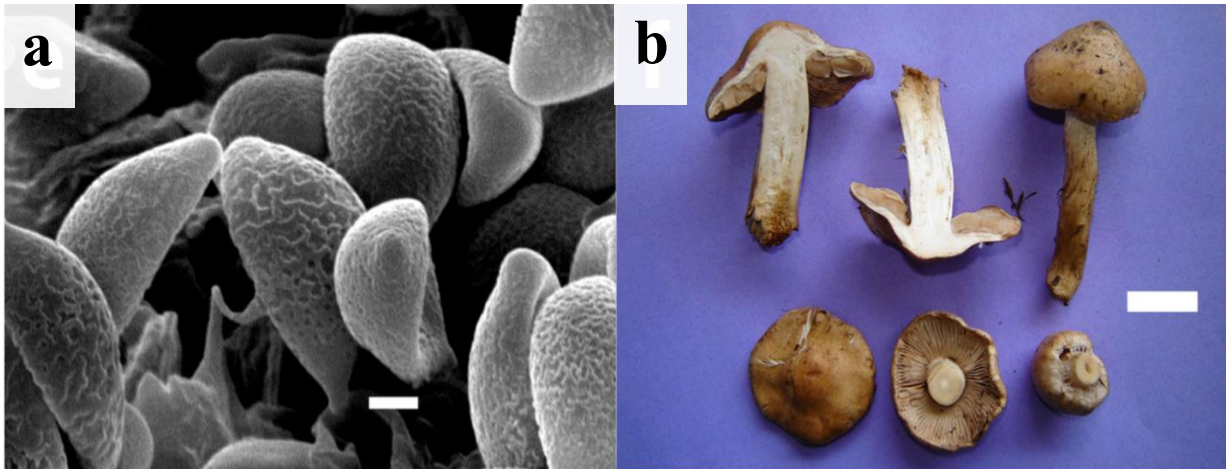


Figura 4. *Hebeloma alpinum*. a) Fotografía de esporas tomadas en un microscopio electrónico de barrido y b) esporomas en fresco. Tomado de Carrasco-Hernández *et al.* (2015).

Ecofisiología. *Hebeloma* es un género de hongo ectomicorrízico que se distribuye en diferentes hábitats en el hemisferio norte y en todo el mundo (Marmeisse *et al.*, 1999), se ha estimado que son alrededor de 250 a 600 especies del género (Cairney y Chambers, 1999).

En estudios previos se ha obtenido que el inóculo basado en los esporomas secos de *H. alpinum* han tenido éxito en la formación de ectomicorrizas con *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* (Carrasco-Hernández *et al.*, 2015), por lo tanto se considera que tiene un enorme potencial para inocular árboles de importancia forestal en invernadero, debido a que es una especie pionera, es decir se asocia con plantas en estadios primarios (Obase *et al.*, 2009), también tiene la capacidad de desarrollarse en sitios pobres nutrimentalmente (Trocha *et al.*, 2007). En todo el mundo el género *Hebeloma* se ha considerado como venenoso o tóxico (Bonet *et al.*, 2004), sin embargo, en el centro de México hay un complejo de especies de *Hebeloma* que se utilizan como alimento en grandes cantidades y tiene una gran importancia económica, social y cultural (Pérez-Moreno *et al.*, 2010). Carrasco-Hernández *et al.* (2015) identificaron tres especies comestibles y ampliamente comercializadas en el país: *H. alpinum*, *H. mesophaeum* y *H. leucosarx*.

3.6.2 *Laccaria trichodermophora* G.M. Muell., *Mycotaxon* 20(1): 112 (1984)

Macromorfología: *Basidioma:* Píleo de 2-6.6 cm de ancho, convexo a plano, de vez en cuando levantado, a menudo deprimido, no estriado, finamente fibriloso, llegando a ser fibriloso-escamoso a escamoso, naranja pardusco, ocasionalmente rojizo marrón, más oscuro en el centro; margen incurvado o decurvado, volviéndose a menudo plano a veces enrollado; contexto de 1-2 mm de grosor, estrechándose en el margen, color de piel, rosáceo. Láminas moderadamente anchas o amplias, relativamente delgadas a gruesas, sinuado a adnado, color carne, rosa vinaceo, color salmón pálido, con la edad se convierte en vinaceo. Estípites de 2.2-12.5 x 0.2-1.1 cm, cilíndrico a subclavado, ocasionalmente o ligeramente bulboso, fibriloso, incospicuo a moderadamente longitudinalmente estriado, naranja parduzca a marrón rojizo; contexto relleno, haciéndose hueco, similar al color del contexto de píleo. Micelio basal generalmente blanco, ocasionalmente violeta (Figura 5).

Ecofisiología: Es una especie que se encuentra con mucha frecuencia en los bosques aledaños al centro de México. Tiene un valor agregado ya que además de ser un hongo ectomicorrízico, es comestible (Montoya *et al.*, 2014) y por lo tanto representa una fuente de obtención de ingresos cuando se comercializan en los mercados locales. El género *Laccaria* posee especies que establecen una simbiosis con plantas en estadios ontogénicos (Estrada-Torres, 2007).



Figura 5. Ejemplar de *Laccaria trichodermophora*, fotografía: Michael Kuo.

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

Macromorfología: Crecimiento cespitoso, suave, de color marrón oscuro y después negro; Píleo en forma aplanada, fibroso-estrigoso de 2-5 cm de lado. El estípote se proyecta de forma lateral, extendidos. Margen similar al pileo. Himenio inferior radiado-fungoso, escamoso, los estípotes confluyen en el centro; esporas (10) 6-7 μm (Saccardo, 1888). La forma de crecimiento es solitario y en algunas ocasiones gregario (Figura 6).

Ecofisiología: *T. terrestris* es un simbiote muy común que se asocia con diversas especies de angiospermas y gimnospermas, principalmente coníferas. Es un colonizador que se asocia con las

plantas en los primeros estadios ontogénicos, y prolifera en los viveros, ya que es una especie muy bien adaptada a las condiciones de altos niveles de nutrientes y humedad. En México aún no hay reportes aún de su comestibilidad, aunque el género parece contener al menos tres especies comestibles, *T. vialis*, *T. aurantiotincta* y *T. gambajun* con gran importancia para generar medicamentos, alimento y subsistencia económica. *T. terrestris* es la más conocida entre los investigadores de micorrizas, ya que es muy común en viveros de árboles en muchas partes del mundo (Cairney y Chambers, 2013).



Figura
de

6.
Ejemplar

Thelephora terrestris. Fotografía: Eduardo Duro.

CAPITULO IV

CRECIMIENTO, CONTENIDO Y TRANSFERENCIA DE NUTRIMENTOS EN *Pinus pringlei* Shaw INOCULADO CON HONGOS ECTOMICORRÍZICOS EN INVERNADERO

4.1 RESUMEN

Los hongos ectomicorrízicos (HECM) viven en simbiosis obligada con las pináceas, pero su empleo no es considerado en los programas de reforestación. La hipótesis planteada es que existe un incremento en la calidad de planta y el porcentaje de supervivencia de *P. pringlei* inoculados con HECM. El experimento se llevó a cabo en Texcoco, México, en el invernadero del Colegio de Postgraduados. En plantas de *P. pringlei* se aplicaron cuatro tratamientos de inoculación: i) *Hebeloma alpinum* (*Ha*), ii) *Laccaria trichodermophora* (*Lt*), iii) *Thelephora terrestris* (*Tt*), y iv) plantas sin inocular. Se evaluó la producción de biomasa seca del vástago y raíz, altura y diámetro del tallo, contenido de macronutrientes y micronutrientes; y colonización ectomicorrízica, así como la caracterización morfológica y la identificación molecular de los HECM. Los tres HECM inoculados propiciaron mayor crecimiento, contenido de nutrientes, movilización significativa de K, Fe y Zn. Las secuencias de ADN de las ECM tuvieron una afinidad filogenética de 99 % con las descritas en GenBank para *Ha*, *Lt* y *Tt*. Las tres especies de HECM incrementaron el crecimiento de *P. pringlei*, favorecieron la movilización de nutrientes especialmente K, Fe y Zn.

Palabras clave: Hongos ectomicorrízicos, reforestación, Hierro, Cinc, Manganeso.

4.2 INTRODUCCIÓN

La simbiosis ECM es la más importante desde el punto de vista aplicado en los sistemas forestales (Siddiqui y Kataoka, 2011), ya que se establecen entre 3 % de las plantas vasculares que se encuentran dominando los bosques templados y boreales del planeta (Smith y Read, 2008; Brundrett, 2009, Tedersoo *et al.*, 2010; van der Heijden *et al.*, 2015) y más de 20 000 especies de hongos principalmente Basidiomicetes y Ascomicetes (Comandini *et al.*, 2012; Rinaldi *et al.*, 2008), los cuales tienen un valor agregado como un producto forestal no maderable debido a que algunas especies son comestibles (Yun y Hall, 2004). El principal beneficio de la simbiosis ECM es el intercambio nutrimental donde los hongos reciben de la planta hospedera de 20 a 25 % de la producción total de fotosintatos (Hobbie *et al.*, 2006) a cambio de nutrientes principalmente fósforo y nitrógeno, así mismo. México es el segundo centro de diversificación del género *Pinus* con 49 especies de las 120 del mundo, de las cuales 55 % son endémicas (Sánchez-González, 2008; Garibay-Orijel *et al.*, 2013; Gernandt y Pérez-de la Rosa, 2014). Actualmente, las especies nativas ha cobrado gran interés y paulatinamente se han ido incorporado en los programas de reforestación, debido a que están mejor adaptadas a las condiciones del sitio y muchas de ellas se encuentran en peligro de extinción (Farjon, 2013). *Pinus pringlei* es una especie amenazada debido a su reducida y fragmentada distribución en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Puebla, Estado de México y Tlaxcala. Tradicionalmente se conoce como cedrón, ocote, pino rojo y escobetón (Farjon, 2013; Villaseñor *et al.*, 2013). Cabe mencionar que *P. pringlei* no tiene un aprovechamiento forestal maderable en curso, sin embargo, tiene alto potencial debido a la alta calidad de su madera y resina (Lockhart, 1990; López *et al.*, 2001; Sotomayor-Castellanos y Ramírez-Pérez, 2014), además de las propiedades curativas para aliviar asma, pulmonía y tos.

Por tal motivo, se desarrolló el presente estudio con el objetivo de evaluar el efecto en el crecimiento, contenido y movilización de nutrimentos y micorrización de *Pinus pringlei*, al ser inoculado con tres HECM: *Hebeloma alpinum* (J. Favre) Bruchet, *Laccaria trichodermophora* G. M. Muell y *Thelephora terrestris* Ehrh.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Material biológico y montaje del experimento

Se utilizaron semillas de *P. pringlei* procedentes de la comunidad de Santa Catarina Estetla, Municipio de Santa María Peñoles, estado de Oaxaca (Figura 7), las cuales se esterilizaron con H₂O₂ a 30 % previo a su siembra. Esporomas de hongos silvestres comestibles de *Ha* y *Lt* se adquirieron en el mercado de Ozumba, Estado de México, el cual es un punto importante de comercialización de hongos silvestres comestibles desde épocas prehispánicas (Pérez-Moreno *et al.* 2010), donde se recolectan en bosques de pino circundantes a la comunidad. El inóculo de *Ha* y *Lt* se preparó a partir de los píleos deshidratados a 35 °C durante 48 h, los cuáles se molieron y almacenaron a 5 °C hasta su uso (Figura 8). Para *Tt* se utilizó sustrato infectado previamente con este hongo. El sustrato utilizado consistió en una mezcla de arena, corteza de pino y suelo forestal, en una proporción 2:2:1, se esterilizó con vapor de agua durante 5 h previo a su utilización. Para la siembra se emplearon tubetes de 130 cm³ desinfectados con alcohol. Se colocaron de dos a tres semillas por tubete a una profundidad aproximada de 0.5 cm. Simultáneo a la siembra, el sustrato se inoculó con las especies fúngicas consideradas para cada tratamiento. Cada planta fue inoculada al momento de la siembra con una concentración de 10⁶ a 10⁸ esporas en el caso de *Ha* y *Lt*, en caso

de *Tt* se utilizó 5 g de sustrato infectado (Figura 9). Las plantas inoculadas o no inoculadas se mantuvieron en condiciones de invernadero durante 390 días.



Figura 7. Árbol de *Pinus pringlei* de Santa Catarina Estetla, Oaxaca de donde se obtuvieron las semillas.



Figura 8. Preparación del inóculo. a) fase de separación de píleos y estípites; b) secado del material fúngico; c) molido de píleos deshidratados; d) Inóculo; e) almacenamiento del inóculo en viales.

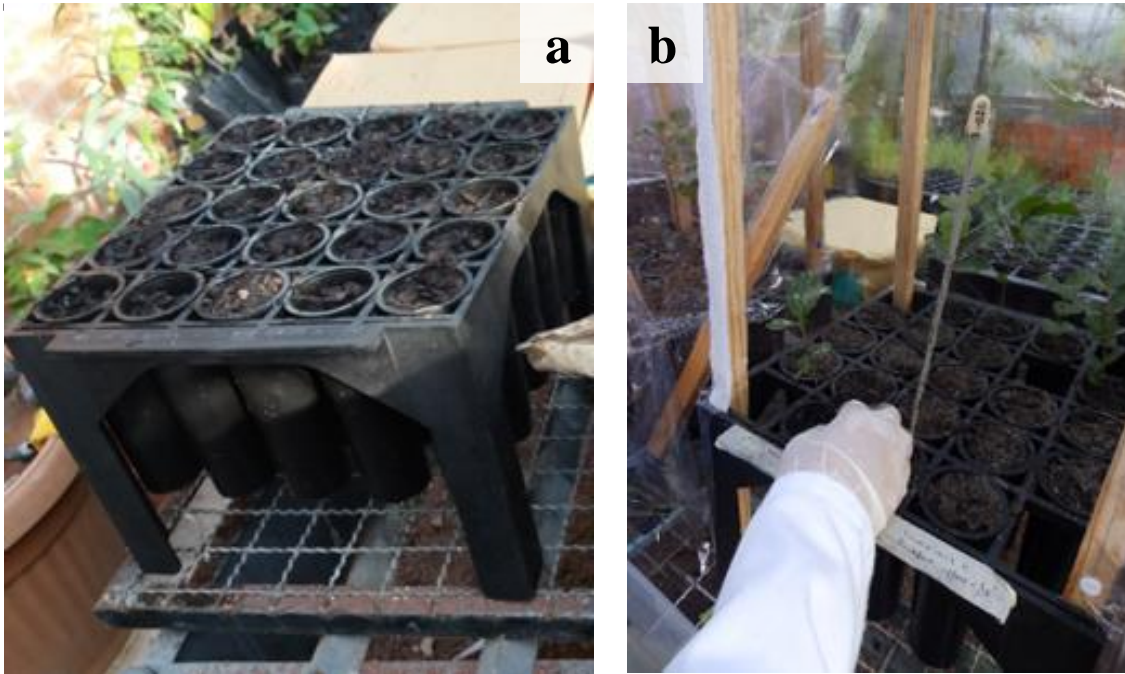


Figura 9. Siembra e inoculación de *Pinus pringlei*. a) Tubetes con sustrato y b) inoculación al momento de la siembra.

4.3.2 Variables evaluadas

4.3.2.1 Crecimiento vegetal

En todas las plantas se efectuaron mediciones de la altura desde la base del tallo hasta el ápice del mismo y del diámetro en la base del tallo, 390 días después de la siembra. Al mismo tiempo, se determinó el peso seco de la parte aérea y de la raíz en cinco plantas elegidas al azar, por cada tratamiento, por lo cual las muestras se deshidrataron a 70 °C por 48 h (Figura 10).



Figura 10. Evaluación de crecimiento. a) altura del tallo; b) diámetro del tallo; c) separación de vástago y raíz; y d) peso seco de vástago.

4.3.2.2 Análisis de nutrimentos en tejido vegetal

El análisis de nutrimentos se realizó en tres plantas, previamente utilizadas en la evaluación del peso seco. El N se determinó por digestión húmeda (Bremner, 1965); el P total, según el método de Allen *et al.* (1997); el K, mediante extracción con acetato de amonio por fotometría de llama; y el Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B mediante extracción con acetato de amonio por fotolorimetría con azometina.

4.3.2.3 Relaciones nutrimentales parte aérea:raíz

Se calculó la relación entre el contenido nutrimental de la parte aérea y de la raíz de las plantas inoculadas. Posteriormente, se estimó la relación entre estos resultados y la relación parte aérea:raíz de las plantas no inoculadas. La relación así obtenida es un indicador de la eficiencia de la movilización de cada nutrimento por parte del hongo ectomicorrízico, no sólo al sistema radical sino hacia la parte aérea de la planta.

4.3.2.4 Colonización micorrízica

En cinco plantas seleccionadas aleatoriamente se separó el vástago de la raíz, la cual se remojó durante 24 h, después se lavaron con agua a presión, empleando tres tamices de diferente diámetro de abertura (1.19, 0.180 y 0.085 mm) para coleccionar la mayor cantidad de raíces. A continuación se cuantificó el número total de raíces micorrizadas, no micorrizadas y muertas, para estimar el porcentaje de colonización ectomicorrízica siguiendo las técnicas propuestas por Marx *et al.* (1994) (Figura 11).

4.3.2.5 Calidad de planta

Se evaluó en tres plantas elegidas al azar, ya que implicaba sacrificarlas. El índice de Calidad de Dickson (ICD) reúne varios atributos morfológicos en un solo valor y se usa como índice de calidad: a mayor valor del índice, resultará una mejor calidad de planta. Se estimó con la fórmula:

$$\text{Índice de Calidad de Dickson (ICD)} = \frac{\text{Peso seco total (g)}}{\frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro (mm)}} + \frac{\text{Peso seco parte aérea (g)}}{\text{Peso seco raíz (g)}}$$

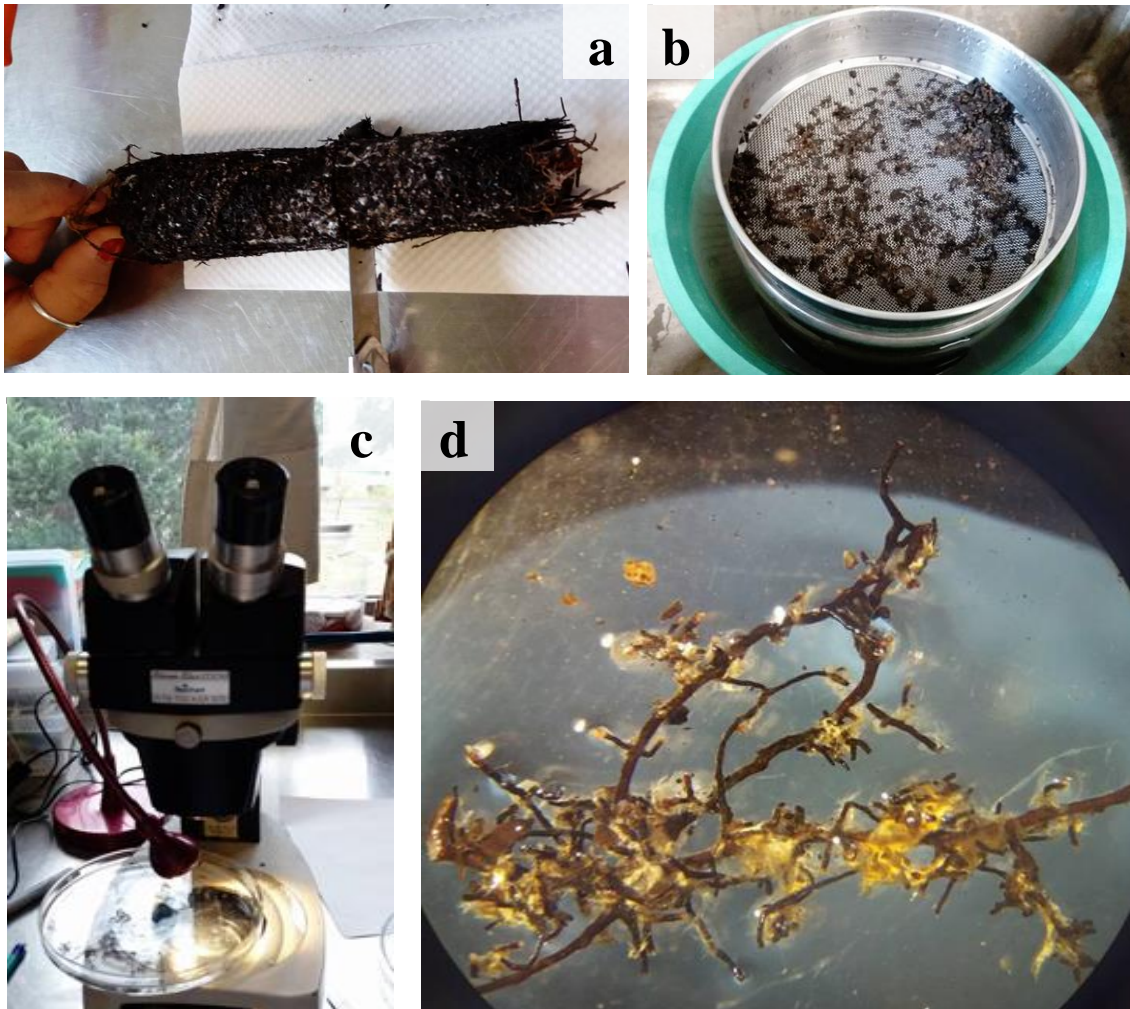


Figura 11. Observación de raíces micorrizadas. a) corte del cepellón en dos partes iguales; b) lavado de raíces en tamices, c) conteo de raíces en el microscopio y d) raíces micorrizadas.

4.3.2.6 Análisis molecular

Para comprobar que efectivamente los HECM inoculados al inicio de la siembra fueran los que establecieron la simbiosis ectomicorrizica con las raíces de *P. pringlei*, se efectuó la identificación molecular de los morfotipos. El ADN se aisló de puntas de raíces ectomicorrizadas, utilizando 200 mg molidos en nitrógeno líquido. Se utilizó el Kit Power Soil DNA Isolation kit marca Mo Bio con número de catálogo 12888-50, se extrajo el ADN total y se almacenó a -20 °C. La región de los interespaciadores ribosomales (ITS) se amplificó mediante PCR, usando la combinación de iniciadores ITS4 e ITS5. El programa empleado para la amplificación por PCR fue: cinco minutos de desnaturalización inicial a 94 °C, seguido de 30 ciclos (30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 45 segundos a 72 °C), con una extensión final de 72 °C por cinco minutos. Procesamiento de producto de PCR, secuencia con química BigDye V3.1 y lectura de secuencia por electroforesis en secuenciador automático de 16 capilares 3130xl Genetic Analyzer. La identidad taxonómica de los morfotipos de micorriza se determinaron por la afinidad filogenética de sus secuencias consenso al compararlas contra las bases de datos del GenBank mediante el programa BLAST.

4.3.2.7 Caracterización morfo-anatómica de las ectomicorrizas

Se analizaron las características de las raíces micorrizadas, tales como: longitud, diámetro, color, tipo de ramificación, presencia de rizomorfos y el tipo de exploración del micelio externo siguiendo los criterios establecidos en Deemy (2017). Para el análisis anatómico se realizaron cortes transversales de las raíces, para observar las estructuras diagnósticas de las ectomicorrizas como el manto, red de Hartig y micelio externo (Agerer y Rambold 2014). Se tomaron fotografías en un estereoscopio Olympus BX51 de las raíces cortas micorrizadas (Figura 12).



Figura 12. Observación de las ectomicorrizas para su descripción morfoanatómica.

4.3.3 Diseño experimental y análisis estadístico

En el bioensayo en invernadero se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 15 repeticiones por tratamiento. Se tuvieron cuatro tratamientos, tres de los cuales consistieron en plantas inoculadas con *Ha*, *Lt* y *Tt* y un tratamiento consistió en plantas sin inocular. En total el experimento en invernadero tuvo 60 unidades experimentales. A las variables evaluadas se les realizó un análisis de varianza y posteriormente una prueba de comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS® (2009).

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Altura, diámetro del tallo y peso seco

Independientemente del HECM inoculado, existió mayor altura, diámetro del tallo, peso seco de la parte aérea, de la raíz y total en las plantas inoculadas con respecto a las plantas no inoculadas (Figura 13). El peso seco de la parte aérea fue 8.6, 8.8 y 9.6 veces mayor en plantas inoculadas con *Ha*, *Lt* y *Tt*, respectivamente en comparación con plantas no inoculadas. En contraste, la diferencia del peso seco de la raíz entre plantas inoculadas y no inoculadas fue menor que en la parte aérea, siendo 3.6, 4.1 y 4.4 veces mayor en plantas inoculadas con *Ha*, *Lt* y *Tt*, respectivamente, en relación a plantas no inoculadas (Cuadro 1).

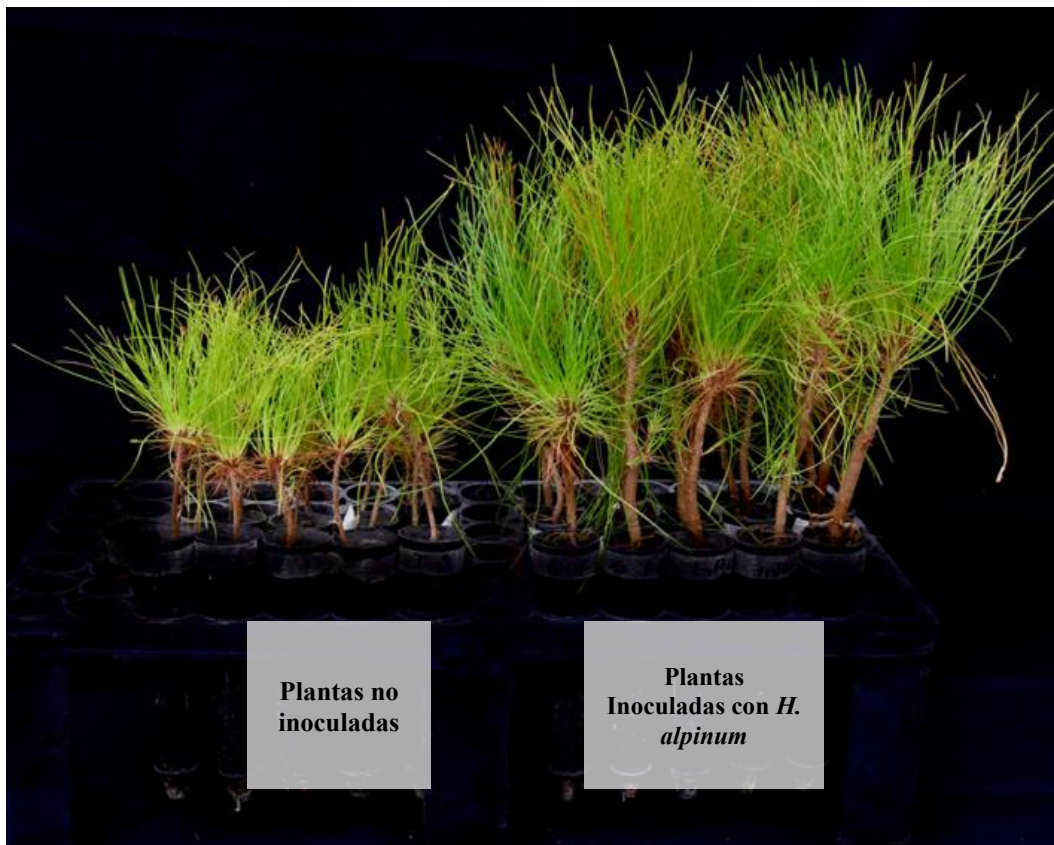


Figura 13. *Pinus pringlei* a 390 días después de la siembra. Plantas no inoculadas y plantas inoculadas con *Hebeloma alpinum*.

Cuadro 1. Peso seco, altura y diámetro de tallo en plantas de *Pinus pringlei*, 390 días después de la siembra, inoculadas o no, con tres hongos ectomicorrízicos.

Tratamientos	Peso seco (mg)			Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)
	Parte aérea	Raíz	Total		
Plantas inoculadas con					
<i>Hebeloma alpinum</i>	4032.00±110.02a	2904.00±203.63a	6936.00±247.07a	13.93±0.61a	6.15±0.35a
<i>Laccaria trichodermophora</i>	4150.00±384.55a	3346.00±128.71a	7496.00±412.88a	14.95±0.65a	6.85±0.32a
<i>Thelephora terrestris</i>	4492.00±509.15a	3630.00±283.07a	8122.00±682.86a	15.44±0.70a	6.63±0.42a
Plantas no inoculadas	470.00± 43.24b	818.00± 87.26b	1288.00±118.76b	9.67±0.31b	3.36±0.15b

Los valores son promedio ± error estándar de la media, n=5 para peso seco y n=15 para altura y diámetro del tallo. Valores con la misma letra en la misma columna son iguales según Tukey ($p \leq 0.05$).

4.4.2 Contenido de nutrientes

4.4.2.1 Macronutrientes

El contenido de macronutrientes fue mayor en las plantas inoculadas con cualquiera de los tres HECM, tanto en la parte aérea, raíz y total, con respecto a las plantas no inoculadas (Cuadro 2).

Los nutrimentos que se encontraron en proporciones mayores en plantas inoculadas respecto a plantas no inoculadas en la parte aérea fueron K, N y P.

De manera similar en el caso de la raíz, los nutrimentos en mayores proporciones fueron Ca, P y N. Dentro de los tres HECM inoculados, el que originó mayores incrementos en contenido total

en relación a plantas no inoculadas fue *Tt*, en contenido de K, N, P y Ca, en proporciones 7.8, 6.4, 6.0 y 5.3 veces mayor, respecto a plantas no inoculadas y *Lt* en contenido de Mg en proporción 4.8 veces mayor, respecto a plantas no inoculadas.

4.4.2.2 Micronutrientes

Las plantas inoculadas con cualquiera de los tres HECM mostraron mayor contenido de micronutrientes, tanto en la parte aérea, la raíz y total, con respecto a las plantas no inoculadas (Cuadro 3). Los nutrimentos que se encontraron en mayores proporciones en plantas inoculadas respecto a plantas no inoculadas en la parte aérea fueron Fe, Cu y Zn; en el caso de la raíz, los nutrimentos en mayores proporciones fueron Cu, Mn y B. Las plantas inoculadas con *Ha* presentaron mayor contenido de Cu y Zn en la raíz y total, en comparación con las plantas inoculadas con *Tt*, *Lt* y plantas no inoculadas. Las plantas inoculadas con *Lt* mostraron mayor contenido de Fe en la parte aérea y Mn en la raíz en comparación con las plantas inoculadas con *Ha*, *Tt* y plantas no inoculadas. Las plantas inoculadas con *Tt* presentaron mayor contenido de Mn en la parte aérea y total, Fe y B en la raíz y total, en comparación con las plantas inoculadas con *Lt*, *Ha* y plantas no inoculadas. (Cuadro 3).

Cuadro 2. Contenido de macronutrientes en *Pinus pringlei*, inoculadas o no, con tres hongos ectomicorrízicos, 390 días después de la siembra.

Macronutriente / Parte de la planta	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con		
		<i>Hebeloma alpinum</i>	<i>Laccaria trichodermophora</i>	<i>Thelephora terrestris</i>
N		mg por planta		
Parte aérea	1.63±0.09 b	11.46±0.52 a	12.37±1.73 a	15.82±3.06 a
Raíz	4.38±0.66 b	18.61±1.89 a	16.55±0.76 a	22.47±3.00 a
Total	6.01±0.71 b	30.07±1.97 a	28.91±1.70 a	38.29±5.51 a
P				
Parte aérea	0.41±0.02 b	2.73±0.12 a	2.80±0.39 a	3.35±0.65 a
Raíz	0.64±0.10 b	2.60±0.26 a	2.87±0.13 a	3.01±0.40 a
Total	1.05±0.11 b	5.33±0.29 a	5.67±0.38 a	6.36±0.96 a
K				
Parte aérea	0.95±0.05 b	8.17±0.37 a	7.81±1.09 a	8.57±1.66 a
Raíz	0.36±0.05 b	1.11±0.11 a	1.27±0.06 a	1.52±0.20 a
Total	1.31±0.09 b	9.28±0.39 a	9.08±1.08 a	10.10±1.80 a
Ca				
Parte aérea	1.69±0.09 b	8.62±0.39 a	9.42±1.32 a	9.54±1.84 a
Raíz	7.25±1.09 b	27.37±2.77 a	36.14±1.66 a	38.70±5.17 a
Total	8.94±1.14 b	35.99±2.81 a	45.55±1.83 a	48.24±6.53 a
Mg				
Parte aérea	1.65±0.09 b	9.35±0.42 a	9.58±1.34 a	10.93±2.11 a
Raíz	4.92±0.74 b	15.74±1.59 a	22.04±1.01 a	20.27±2.71 a
Total	6.57±0.79 b	25.09±1.66 a	31.62±1.45 a	31.21±4.39 a

Los valores son promedios \pm error estándar de la media, n=3. Valores con la misma letra en la misma fila son iguales según Tukey ($P \leq 0.05$).

Cuadro 3. Contenido de micronutrientes en *Pinus pringlei*, inoculadas o no, con tres hongos ectomicorrízicos, 390 días después de la siembra.

Macronutriente / Parte de la planta	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con		
		<i>Hebeloma alpinum</i>	<i>Laccaria trichodermophora</i>	<i>Thelephora terrestris</i>
Fe		mg por planta		
Parte aérea	0.047±0.003 b	0.32±0.01 a	0.36±0.05 a	0.33±0.06 a
Raíz	3.304±0.497 b	11.21±1.14 a	10.79±0.50 a	11.46±1.53 a
Total	3.351±0.500 b	11.53±1.14 a	11.15±0.48 a	11.80±1.57 a
Cu				
Parte aérea	0.001±0.001 a	0.01±0.01 a	0.01±0.01 a	0.01±0.01 a
Raíz	0.009±0.002 c	0.09±0.01 a	0.07±0.01 ab	0.05±0.01 b
Total	0.010±0.003 c	0.10±0.01 a	0.08±0.01 ab	0.06±0.01 b
Zn				
Parte aérea	0.021±0.001 b	0.17±0.01 a	0.16±0.02 a	0.17±0.03 a
Raíz	0.076±0.012 b	0.34±0.03 a	0.33±0.02 a	0.31±0.04 a
Total	0.097±0.013 b	0.51±0.04 a	0.49±0.02 a	0.48±0.07 a
Mn				
Parte aérea	0.697±0.038 b	1.63±0.07 b	1.64±0.23 b	5.25±1.01 a
Raíz	0.173±0.026 c	0.59±0.06 b	2.30±0.11 a	0.61±0.08 b
Total	0.870±0.064 c	2.22±0.10 b	3.95±0.23 ab	5.86±1.07 a
B				
Parte aérea	0.027±0.002 b	0.13±0.01 a	0.12±0.02 a	0.13±0.02 a
Raíz	0.020±0.003 b	0.07±0.01 a	0.09±0.01 a	0.10±0.01 a
Total	0.047±0.005 b	0.20±0.01 a	0.21±0.02 a	0.22±0.03 a

Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=3. Valores con la misma letra en la misma fila son iguales según Tukey ($P \leq 0.05$).

4.4.3 Relaciones de nutrientes parte aérea:raíz

En las plantas inoculadas, se observó una movilización de los macronutrientes de la raíz hacia la parte aérea de la planta, por parte de los tres HECM. Sin embargo, la mayor transferencia se registró en el caso de: i) K en plantas inoculadas con los tres HECM y ii) Mg en las plantas inoculadas *Ha* (Cuadro 4). El mismo efecto se observó con los micronutrientes Fe y Zn por parte de los tres hongos evaluados. Pero el Fe, fue movilizado mayormente por *Lt*. En cuanto a *Tt* efectuó una movilización de todos los micronutrientes, sin embargo, en cuanto al Cu y Mn ninguno de los otros dos hongos fueron capaces de efectuar dicho proceso (Cuadro 4).

Cuadro 4. Relaciones parte aérea: raíz de macro y micronutrientes de plantas de *Pinus pringlei*, 390 días después de la siembra, inoculadas o no con tres hongos ectomicorrízicos.

Tratamiento	Peso seco (g)	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	B
Plantas inoculadas con:											
<i>H. alpinum</i>	1.4	0.6	1.0	7.4	0.3	0.6	0.02	0.1	0.5	2.8	1.9
<i>L. trichodermophora</i>	1.2	0.7	0.1	6.1	0.3	0.4	0.03	0.1	0.5	0.7	1.3
<i>T. terrestris</i>	1.2	0.7	1.1	5.6	0.2	0.5	0.02	0.2	0.5	8.6	1.3
Plantas no inoculadas (PNI)	0.5	0.4	0.6	2.6	0.2	0.3	0.01	0.1	0.2	4.0	1.3
Relación plantas inoculadas: PNI											
<i>H. alpinum</i> : PNI	2.8	1.5	1.7	2.8	1.5	2.0	2.0	1.0	2.5	0.7	1.4
<i>L. trichodermophora</i> : PNI	2.4	1.8	1.7	2.3	1.5	1.3	3.0	1.0	2.5	0.1	1.0
<i>T. terrestris</i> : PNI	2.4	1.8	1.8	2.1	1.0	1.7	2.0	2.0	2.5	2.1	1.0

4.4.4 Colonización micorrízica

El porcentaje de micorrización fue mayor independientemente del hongo ECM inoculado, con valores de 96 %, 97 % y 97 % en plantas inoculadas con *Ha*, *Lt* y *Tt* respectivamente, en comparación con las plantas no inoculadas. Independientemente del micobionte se registró mayor número de raíces micorrizadas y totales en plantas inoculadas en relación a plantas no inoculadas. Plantas inoculadas con *Tt* registraron un mayor número de raíces micorrizadas y totales en comparación con plantas inoculadas con *Ha* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de raíces cortas micorrizadas, no micorrizadas y muertas de *Pinus pringlei*, 390 días después de la siembra, inoculadas o no con tres hongos ectomicorrízicos.

Tratamientos	Número de raíces			
	Micorrizadas	No micorrizadas	Muertas	Total
Plantas inoculadas con				
<i>H. alpinum</i>	5612.20± 412.22b	107.20± 20.60b	139.60± 61.72b	5859.00±361.61b
<i>L. trichodermophora</i>	7436.40±1012.55ab	86.00± 15.81b	156.00± 63.20b	7678.40±946.08ab
<i>T. terrestris</i>	9483.00± 548.86a	99.60± 4.89b	167.40± 52.39b	9750.00±573.04a
Plantas no inoculadas	50.00± 3.97c	1618.20±249.38a	1769.40±306.40a	3437.60±294.44c

Los valores son promedio ± error estándar de la media, n=5. Dentro de la misma columna, valores con la misma letra son iguales de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

4.4.5 Calidad de planta

De acuerdo al ICD se encontró que las plantas inoculadas con cualquiera de los tres HECM, tuvieron mejor calidad de planta, en comparación con las plantas no inoculadas. Sin embargo, los valores más altos fueron para *Tt* con dos plantas con un ICD de 3, el valor más alto (Cuadro 6).

Cuadro 6. Índice de Calidad de Dickson aplicado a tres plantas de *Pinus pringlei* por cada tratamiento, 390 días después de la siembra.

Tratamiento	Rep.	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Peso seco (g)			ICD	Clasificación
				Aéreo	Raíz	Total		
Plantas inoculadas con								
<i>Hebeloma alpinum</i>	1	18	6.1	3.9	3.4	7.3	2	M
	2	12.5	7.8	4.0	2.4	6.4	2	M
	3	13.3	9.5	4.5	3.1	7.5	3	A
<i>Laccaria trichodermophora</i>	1	20.1	8.2	5.4	3.5	8.9	2	M
	2	12.5	8.2	4.6	3.1	7.6	3	A
	3	16.3	6.5	3.3	3.5	6.8	2	M
<i>Thelephora terrestris</i>	1	16	6.7	2.9	2.7	5.6	2	M
	2	15.5	8.2	5.8	3.6	9.4	3	A
	3	19.1	9.6	4.9	4.4	9.2	3	A
Plantas no inoculadas								
	1	10.7	2.1	0.6	1.2	1.7	0	B
	2	9.7	2.4	0.6	0.7	1.3	0	B
	3	10.8	2.5	0.5	0.8	1.3	0	B

Rep.: repeticiones por tratamiento, A: calidad alta, M: calidad media y B: calidad baja.

4.4.6 Análisis molecular

La identidad taxonómica de los simbiontes presentes en las plantas ectomicorrizadas tuvieron una afinidad filogenética de 99 %, 99 % y 98 % comparadas con secuencias existentes en la base de datos GenBank para Ha, Lt y Tt (Cuadro 7).

Cuadro 7. Identificación de los morfotipos de ectomicorrizas en plantas de *Pinus pringlei*, por su afinidad filogenética en GenBank.

GenBank 1	Organismo	e	%Id	Coincidencias en NCBI	GenBank 2
KY628057	<i>Hebeloma alpinum</i>	0	99	<i>Hebeloma alpinum</i>	KT071013.1
		0	99	<i>Hebeloma alpinum</i>	KT071016.1
KY628059	<i>Laccaria trichodermophora</i>	0	99	<i>Laccaria trichodermophora</i>	KT875034.1
		0	99	<i>Laccaria trichodermophora</i>	KT875033.1
		0	99	<i>Thelephora terrestris</i>	HM189965.1
KY628058	<i>Thelephora terrestris</i>	0	99	<i>Thelephora terrestris</i>	HM189958.1
		0	99	<i>Thelephora terrestris</i>	KP814379.1
		0	99	<i>Thelephora terrestris</i>	GQ267490.1

GenBank 1: número de acceso en GenBank de las secuencias del presente trabajo, e: probabilidad de error en la identificación, % Id: porcentaje de similitud entre las secuencias; GenBank 2: número de acceso en GenBank de las secuencias más similares a las muestras del presente trabajo.

4.4.7 Caracterización morfo-anatómica de las ectomicorrizas:

4.4.7.1 Hebeloma alpinum

El sistema de ramificación de las ectomicorrizas fue de tipo ausente o dicotómica, cilíndricas de 1 a 5 mm de longitud y 0.2 mm de diámetro. Las puntas no ramificadas fueron rectas con extremos cilíndricos o estrechos, en sus etapas juveniles presentaron una superficie de color marrón o blanco, con la base más oscura y la punta blanquecina; en su etapa madura se observaron ectomicorrizas de color café oscuro. El manto presentó buena visibilidad, la textura de la superficie fue suave y color plateado, densamente algodonosa. Presentó hifas emanantes abundantes de color blanco a crema o blanquecino, no presentaron arreglo de distribución dado que se observaron cubriendo toda la raíz micorrizada. El tipo de exploración fue de distancia corta de acuerdo a Agerer (2001). No existió presencia de rizomorfos y esclerocios. La anatomía externa e interna del manto fue plectenquimatosa, el arreglo de las hifas no presentó un patrón, con forma simple y de superficie lisa. Las hifas emanantes fueron ligeramente onduladas, simples, sin constricción en el septo; los septos estuvieron dispuestos a distancias considerables. Las células corticales en el corte transversal fueron cilíndricas. La red de Hartig se extendió en las dos o tres filas de células epidérmicas, sin llegar a la endodermis (Figura 14 a-d).

4.4.7.2 Laccaria trichodermophora

El sistema de ramificación de las ectomicorrizas fue ausente o dicotómica, con forma cilíndrica de 0.9 a 5 mm de longitud y de 0.5 mm de diámetro. Las puntas no ramificadas fueron sinuosas con extremos distales cilíndricos, en etapas juveniles de color café y las puntas café claro, en etapa madura se tornaron color café oscuro o marrón. El manto presentó buena visibilidad, con ausencia de transparencia; la textura de la superficie fue lisa a ligeramente algodonosa. Presentó hifas emanantes escasas con tipo exploración de contacto según las descripciones de Agerer (2001). No

existió presencia de rizomorfos ni esclerocios. La anatomía externa e interna del manto fue plectenquimatosa, el arreglo de las hifas no presentó un patrón; la superficie de las células fue lisa. Las hifas emanantes fueron tortuosas con una envoltura gelatinosa, con forma simple y de superficie lisa. Las células corticales en el corte transversal fueron elípticas, ovaladas o cilíndricas. La red de Hartig se extendió en una o dos filas de las células epidérmicas, sin llegar a la endodermis (Figuras 14 e y f y 15 a y b).

4.4.7.3 *Thelephora terrestris*

El sistema de ramificación de las ectomicorrizas fue de tipo ausente o dicotómico, cilíndricas y con terminación inflada de 0.5 a 6 mm de largo y de 0.2 a 1 mm de diámetro. Las puntas no ramificadas fueron sinuosas con extremos inflados. En etapas juveniles se observó una superficie de color marrón, amarillo, gris o blanco con la punta blanquecina; mientras que en etapa madura la micorriza presentó un color café o café oscuro. El manto presentó buena visibilidad, con ausencia de transparencia, la textura de la superficie fue suave y algodonosa de color marrón brillante. Se observaron hifas emanantes en abundancia de color marrón brillante en etapas jóvenes de desarrollo, sin arreglo de distribución y el tipo de exploración fue de distancia media según Agerer (2001). Se observaron rizomorfos cilíndricos o redondeados con márgenes pilosos de color marrón, amarillo o blanquecino y presencia de fíbulas. La anatomía externa e interna del manto fue plectenquimatoso, el arreglo de las hifas no presentó un patrón, con forma simple y de superficie lisa. Las hifas emanantes fueron ligeramente onduladas, con forma simple y presencia de fíbulas. El corte trasversal de la raíz micorrizada, las células corticales fueron cilíndrica. La red de Hartig se extendió en tres filas de las células epidérmicas, sin llegar a la endodermis (Figura 15 c-f).

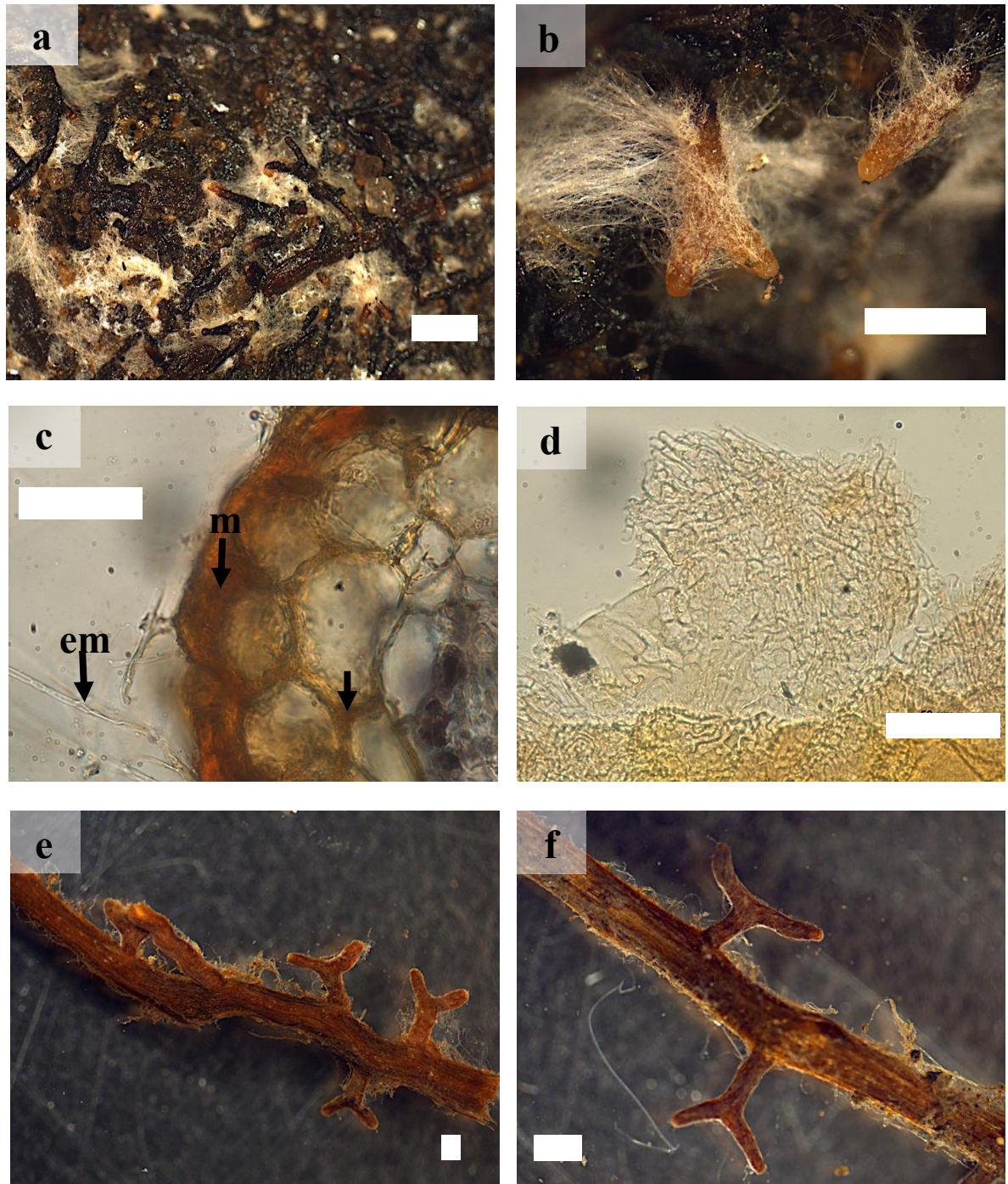


Figura 14. Ectomicorrizas de *Pinus pringlei* con *Hebeloma alpinum* (*Ha*) y *Laccaria trichodermophora* (*Lt*). a) y b) raíces ectomicorrizas con *Ha* mostrando abundante micelio externo y primer plano; c) sección transversal de la ectomicorriza de *Ha* mostrando manto (m), red de Hartig (Hn) y micelio externo (em); d) manto plectenquimatoso de *Ha*. e) y f) raíces micorrizas simples y dicotómicas de *Lt* y primer plano. Barras = 500 μ m en a) y b); 50 μ m en c) y d); 1 mm en e) y f).

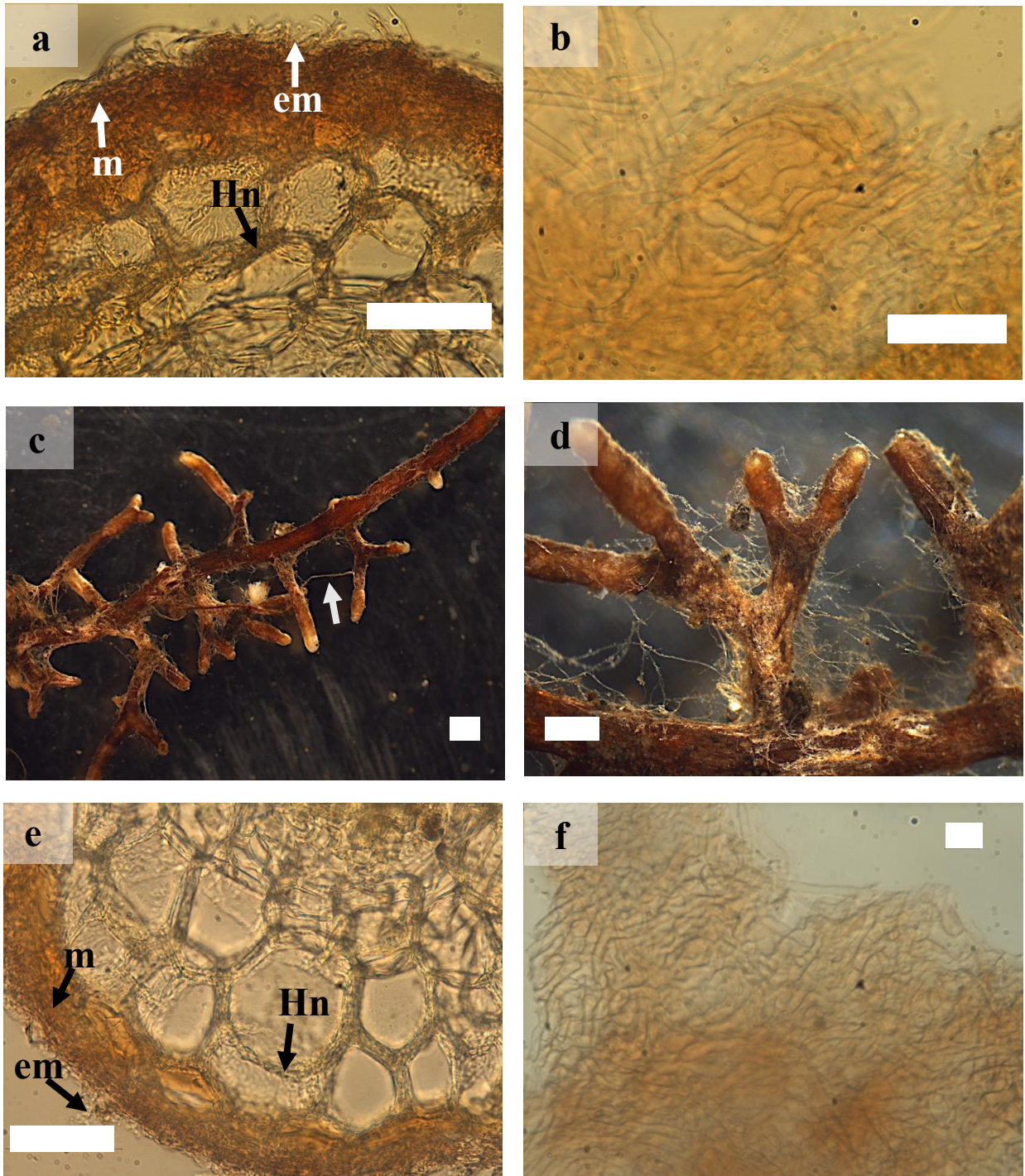


Figura 15. Ectomicorrizas de *Pinus pringlei* con *Laccaria trichodermophora* (*Lt*) y *Thelephora terrestris* (*Tt*). A) sección transversal de la ectomicorrigia de *Lt* que muestra el manto (m), red de Hartig (Hn) y micelio externo (em); B) manto plectenquimatoso de *Lt*; C) y d) raíces micorrízicas de *Tt*, mostrando rizomorfos (flecha) y primer plano; E) sección transversal de la ectomicorrigia de *Tt* mostrando m, Hn y em; Y f) *Tt* manto plectenquimatoso. Barras = 50 μm en a), b) y e), 10 μm en f) (10 μm); 1 mm en c) y d).

4.5 DISCUSIÓN

Hasta donde conocemos, esta es la primera ocasión en la que se evaluó el efecto de la inoculación de hongos ECM en el crecimiento, contenido y transferencia de nutrientes en *Pinus pringlei*. Las tres especies de hongos inoculados son pioneras (Obase *et al.*, 2009) y tienen una amplia variedad de hospederos (Estrada-Torres, 2007; Cairney y Chambers, 2013) y formaron ectomicorrizas con dicho fitobionte. Se ha demostrado que la selección de los micobiontes apropiados para cada especie forestal es fundamental para su adaptación en campo (Aggangan *et al.*, 2013). Los tres hongos inoculados demostraron un efecto benéfico en términos de crecimiento en comparación con las plantas no inoculadas. Previamente, hay estudios que han reportado efectos benéficos al inocular pináceas con especies pertenecientes a los géneros de *Hebeloma*, *Laccaria* y *Thelephora*. Por ejemplo *Picea sitchensis* inoculado con *Tt* (Thomas *et al.*, 1982) o con *Laccaria laccata* (Thomas y Jackson, 1983); *Pinus banksiana* y *Picea mariana* inoculados con *L. bicolor*, *L. proxima*, *H. cylindrosporum* y *Tt* (Browning y Whitney, 1991); *Pinus sylvestris* inoculado con *Tt* (Bending y Read, 1995); *Pinus patula* inoculado con *L. laccata* y *Tt* (Sudhakara-Reddy y Natarajan, 1997); *Pinus pinea* inoculado con *H. crustuliniforme* y *L. laccata* (Rincón *et al.*, 2001); *Pinus contorta* var. *latifolia* inoculado con *Tt* (Karst *et al.*, 2009); *Pinus patula* y *P. hartwegii* inoculados con *Hebeloma* y *Laccaria* (Perea-Estrada *et al.*, 2009); *Pinus pseudostrobus* y *P. patula* inoculados con *Ha*, *H. mesophaeum*, *H. leucosarx*, *L. laccata*, *L. bicolor* y *L. proxima* (Carrasco-Hernández *et al.*, 2011); *Pinus ponderosa* inoculada con *H. mesophaeum* (Barroetaveña *et al.*, 2012); *Pinus greggii* inoculado con *H. mesophaeum* (Martínez-Reyes *et al.*, 2012) y *L. laccata* (Méndez-Neri *et al.*, 2011), inoculado con *L. laccata*, *L. bicolor* y *H. leucosarx* (Rentería-Chávez *et al.*, 2017).

La importancia de los HECM en la asimilación de nutrientes del suelo ha sido previamente documentada (Smith y Read, 2008; Quoreshi y Khasa, 2008; Siddiqui y Kataoka, 2001; Garcia *et al.*, 2016). En diversos estudios previos con otras especies de pinos se ha demostrado el incremento de algunos macronutrientes y micronutrientes como consecuencia de la inoculación con HECM (Carrasco-Hernández *et al.*, 2011; Martínez-Reyes *et al.*, 2012; Méndez-Neri *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2012; Garcia *et al.*, 2014; Zong *et al.*, 2015; Rentería-Chávez *et al.*, 2017). De manera similar, en el presente trabajo se registró un mayor contenido de macronutrientes y micronutrientes en plantas de *P. pringlei* inoculadas en comparación con plantas no inoculadas con cualquiera de los tres micobiontes evaluados. Sin embargo, *Ha* incrementó principalmente el contenido de Cu y Zn, *Lt* el de Mg y *Tt* el de todos los macronutrientes principalmente K y el de los micronutrientes Fe y Mn.

EL K⁺ es uno de los macronutrientes más importantes para las plantas y puede constituir hasta 10 % de la biomasa seca (Garcia y Zimmermann, 2014). Se ha demostrado que tan pronto se agotan las reservas de potasio en la semilla, las plantas mueren (Barker y Pilbeam, 2015). El mantenimiento de una concentración elevada de K⁺ en las células vegetales es vital para diversos procesos fisiológicos de la planta (Adams y Shin, 2014) tales como la turgencia de las células, en el crecimiento, osmorregulación, regulación estomática (Fournier *et al.*, 2005, Arqueró *et al.*, 2006; Martineau *et al.*, 2017), promoción del crecimiento de las raíces laterales (Armengaud *et al.*, 2004), es activador de diversas enzimas relacionadas con la síntesis de proteínas y almidón y participa en el metabolismo respiratorio y fotosintético (Marschner, 2010). Jentschke *et al.*, (2001) demostraron que en *Picea abies* de 5 a 6 % de la captación total de K fue mediante el micelio de *Paxillus involutus*. Garcia *et al.*, (2014) demostraron en *P. pinaster* que la simbiosis ECM con *H. cylindrosporum* mejoró notablemente la adquisición de K⁺ en condiciones de baja disponibilidad de dicho elemento. Otros estudios han demostrado que los rizomorfos de *Rhizopogon* (Wallander y

Pallon, 2005) y *Suillus granulatus* (Wallander *et al.*, 2003) son acumuladores de K, por lo tanto contribuyen a su transporte a la raíz. Se han identificado genes que codifican a transportadores de este elemento en las hifas de los HECM *H. cylindrosporum* y *Laccaria bicolor* (Trk, Ktr, HKT Corratgé *et al.*, 2007; Corratgé-Faillie *et al.*, 2010).

En términos generales, existen pocos estudios que demuestren la translocación de micronutrientes por parte de las ECM. En este estudio se comprobó la eficiencia de los tres HECM empleados en la transferencia de Fe y Zn en plantas de *P. pringlei* inoculadas con cualquiera de los tres HECM utilizados, de la raíz a la parte aérea de la planta. El Fe^{2+} es uno de los elementos más limitantes en la naturaleza, sin embargo es esencial para el crecimiento celular (Cowley, 2007). En plantas está involucrado en la síntesis de clorofila y es necesario para la conversión de NO_3 y N_2 atmosférico en formas que pueden ser utilizadas por las plantas. Interviene en el transporte de electrones tanto en la fotosíntesis y la respiración. Este elemento no se remobiliza de las hojas maduras hacia las jóvenes dentro de la planta, por lo que cuando hay deficiencia las hojas jóvenes presentan clorolisis intervenal (MacAdam, 2009). Existen pocos estudios que demuestren la movilización de Fe por parte de los HECM en gimnospermas. Leyval y Reid (1991) demostraron que en condiciones de deficiencia de Fe en el suelo, *Pisolithus tinctorius* en asociación con *Pinus elliottii* mejora la absorción de hierro en comparación con plantas no micorrizadas. Sin embargo, en condiciones suficientes de Fe existe una menor absorción de este elemento por parte de las raíces micorrizadas. Kottke *et al.*, (1998) en tres rodales de *Picea abies* demostraron que *Xerocomus badius* tiene potencial para almacenar Fe y Zn en comparación con otras especies de ECM encontradas. Rineau *et al.*, (2008) estudiaron puntas de ECM de *Lactarius subdulcis* y *Xerocomus* sp. muestreadas en ecosistemas forestales naturales y demostraron que *L. subdulcis* presentó mayor eficacia para producir 100 veces mayor cantidad de oxalatos y entonces tuvo mayor capacidad de acceder al hierro en comparación con *Xerocomus* sp. Se ha encontrado que para movilizar el Fe^{2+}

los hongos ECM producen moléculas de bajo peso molecular que actúan como quelantes, denominados sideróforos. Por ejemplo el micelio externo de *H. crustuliniforme* produce sideróforos pertenecientes al grupo de las ferricrocinas (Van Hees *et al.*, 2006; Rineau *et al.*, 2008).

El Zn^{2+} es un componente esencial catalítico y estructural de muchas enzimas, en particular las que participan en la producción de ARN a partir de ADN (transcripción). Una deficiencia de Zn interfiere en el alargamiento del tallo de las dicotiledóneas (MacAdam, 2009) y un acceso descontrolado ocasiona que las proteínas y enzimas sean disfuncionales (Leonhardt *et al.*, 2014). El efecto de la inoculación ectomicorrízica sobre la absorción y distribución del Zn depende de la especie fúngica y la concentración externa de Zn. Por ejemplo, Bücking *et al.*, (1994) demostraron que *Suillus bovinus* en condiciones de baja concentración externa de Zn, condujo a una mayor absorción de este nutrimento en la raíz y en el tallo y en condiciones de alta concentración externa de Zn, *S. bovinus* fue capaz de reducir la traslocación Zn hacia el tallo de *P. sylvestris*. Así mismo, Zong *et al.*, (2015) demostraron que la inoculación separada con *Pisolithus sp.*, *Cenococcum geophilum* y *L. laccata* con *Pinus densiflora* inhibieron la acumulación de Zn en los brotes, en condiciones externas altas de Zn. Los HECM implementan mecanismos para proteger a los árboles forestales que crecen en condiciones elevados de Zn, i) la compartimentación (Turnau *et al.*, 2001), ii) la complejación intracelular y extracelular y iii) la quelación (Bellion *et al.*, 2007; Leonhardt *et al.*, 2014). Por ejemplo *H. crustuliniforme* en asociación con *Picea abies* secuestra el Zn en las paredes celulares de las hifas del manto y de la red de Hartig y almacena Zn en el citoplasma y vacuolas del tejido fúngico (Frey *et al.*, 2000). En *Russula atropurpurea* existen péptidos cíclicos que quelatan al Zn, principalmente metalotioneínas ricas en cisteína (Leonhardt *et al.*, 2014), transportadores de Zn (RaCDF1 y RaCDF2, Sácky *et al.*, 2016) y dos péptidos secuestradores de Zn en los esporocarpos (RaZBP1 y RAZBP2, Leonhardt *et al.*, 2014). Adicionalmente se han encontrado transportadores de Zn en el micelio externo de *H. cylindrosporum* (HcZnT1, Bolchi *et*

al., 2011) y *T. melanosporum* (TmelZrt1 y TmelZrc1, Bolchi *et al.*, 2011) y en el micelio externo y esporocarpos de *H. meshophaeum* (HmMT1, Sácky *et al.*, 2014).

Los porcentajes de colonización encontrados en el presente trabajo fueron altos y van del 96 al 98 %. Porcentajes similares han sido repostados previamente, por ejemplo: Thomas *et al.*, (1982) reportan porcentajes de 76 a 100 % en *P. sitchensis* inoculadas con *Tt* o *L. laccata*; Rincón *et al.*, (2001) de 80 a 90% en *P. pinea* con *H. crustiliniforme*; Jonsson *et al.*, (2001) 95 a 99% en *P. sylvestris* con *H. crustiliniforme*; Karst *et al.*, (2009) de 85 % en *P. contorta* var. *latifolia* con *Tt*; Zong *et al.*, (2015) de 90 % en *P. densiflora* con *L. laccata*. Otros autores han reportado colonizaciones menores a las observadas en este estudio, por ejemplo: Hilszczanska *et al.*, (2008) de 55 % en *P. sylvestris* con *Tt*; Rincón *et al.*, (2001) de 11 a 40% en *P. pinea* con *L. laccata*; Carrasco-Hernández *et al.*, (2011) de 23 % en *P. patula* y para *P. pseudostrobus* de 72 % con *Ha*; Barroetaveña *et al.*, (2012) de 11 % en *P. ponderosa* con *H. mesophaeum*; Sousa *et al.*, (2012) de 50 % en *P. pinaster* con *Tt*; Rentería-Chávez *et al.*, (2017) de 30 % en *P. greggii* inoculado con *L. bicolor*, *L. laccata* y *H. leucosarx*.

La altura y diámetro de la planta es un buen indicador de sus dimensiones futuras en campo, aunque no lo es para la supervivencia. Se considera un indicador insuficiente, y es conveniente relacionarlo con otros criterios para que refleje su utilidad real. Una altura suficiente permite a la planta competir adecuadamente con la vegetación del sitio de trasplante, sin embargo dependerá de las condiciones del sitio. Las plantas con diámetro mayor a 5 mm, son más resistentes al doblamiento y toleran mejor los daños de plantas y fauna nociva, pero esto varía de acuerdo a la especie (Mexal y Landis, 1990). Sin embargo, es necesario incorporar información fisiológica de la planta para completar el análisis de la calidad de planta producida en vivero.

La diferenciación de las ECM implica cambios drásticos en la morfología, anatomía y fisiología de la raíz, dando lugar a estructuras altamente integradas (Marmeisse *et al.*, 2004) como el manto,

micelio externo y la red de Hartig, estructuras diagnósticas de la simbiosis ectomicorrízica. La descripción morfo-anatómica de las ectomicorrizas ha recibido poca atención, además de que las raíces micorrizadas de una especie de hongo puede mostrar diferencias morfológicas en función de la planta hospedera. Esta herramienta taxonómica nos puede proporcionar información útil en relación con la biomasa de las raíces, la longitud de la raíz o el volumen del suelo. La diferenciación de las raíces micorrizadas nos permite conocer importantes características predictivas y relevantes para la clasificación ecológica de los HECM (Agerer, 2006). Las técnicas moleculares son una herramienta complementaria que ha proporcionado nuevas formas de estudiar la interacción de las comunidades de HECM entre sí y con su entorno. Este método permite identificar genotipos individuales de hongos de una manera confiable y rápida (Horton y Bruns, 2001). Hasta el momento no existe una descripción morfológica de las ectomicorrizas de *Ha*, *Lt* y *Tt* en simbiosis con *P. pringlei*. Sin embargo, se han realizado de *Ha* con *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* (Carrasco-Hernández *et al.*, 2015) y *Tt* con *Eucalyptus globulus* (Ingleby y Mason, 1996). Las descripciones anteriormente realizadas para *Ha* presentaron ligeras diferencias en el tamaño de las raíces ectomicorrizadas en comparación con las caracterizadas para *P. pringlei*.

Finalmente las especies de HECM utilizadas en este estudio, demuestran un alto potencial como inoculantes para la obtención de plantas de buena calidad de *P. pringlei*, la cual es una especie forestal con un alto potencial para ser aprovechada industrialmente por las propiedades físicas y mecánicas de su madera (Sotomayor-Castellanos y Ramírez-Pérez, 2014) y por la alta producción y calidad de su resina (López *et al.*, 2001).

H. alpinum y *L. trichodermophora* constituyen un recurso forestal no maderable con gran importancia cultural, social y económica en el Centro de México, ya que son aprovechados como alimento (Pérez-Moreno *et al.*, 2010; Montoya *et al.*, 2014, Carrasco-Hernández *et al.*, 2015). En el caso de *Thelephora*, dentro del género se encuentra *Thelephora gambajun*, especie con alto valor

alimentario, económico y ecológico en China que cuenta con propiedades antioxidantes y medicinales y alto contenido de aminofenol que se utiliza en la producción de paracetamol (Yang *et al.*, 2004; Mortimer *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016). En una provincia de China en el 2002 *T. gambajum* tuvo producciones de hasta de 10 mil toneladas (He *et al.*, 2011) con precios de 120-200 dólares (Mortimer *et al.*, 2012).

4.6 CONCLUSIONES

Se documenta por primera ocasión, la inoculación con *Hebeloma alpinum*, *Laccaria trichodermophora* y *Thelephora terrestris* con *Pinus pringlei*. Se realiza la identificación molecular y caracterización morfoanatómica de las ectomicorrizas establecidas en las raíces de *Pinus pringlei* tras la inoculación con dichas especies fúngicas. Las plantas inoculadas presentaron incrementos significativos en altura y diámetro del tallo, producción de biomasa seca de raíz y vástago, así como contenido de macro y micronutrientes, respecto a las plantas no inoculadas. Las tres especies demostraron eficacia en la movilización de K, Fe y Zn de la raíz a la parte aérea vía ectomicorriza. Por lo tanto debido a los alto porcentajes de colonización y la calidad de planta registrada, se considera que las tres especies de hongos ectomicorrízicos tienen potencial para su uso como fuente de inóculo en los programas de producción de planta de *Pinus pringlei* en México.

CAPITULO V
SUPERVIVENCIA EN CAMPO DE *Pinus pringlei* Y PERSISTENCIA DE LAS
ECTOMICORRIZAS

5.1 RESUMEN

Debido al proceso acelerado de la pérdida de cobertura vegetal en los bosques mexicanos, es necesario implementar programas de reforestación que den resultados positivos y que contribuyan con el objetivo de repoblar las zonas afectadas, ya que actualmente las tasas de mortalidad son altas después del trasplante. Actualmente, el uso de hongos y pinos nativos ha sido menos explorado. Por tal motivo se plantea el presente trabajo en campo, donde se evaluó la efectividad de la inoculación con tres HECM (*H. alpinum*, *L. trichodermophora* y *T. terrestris*) en la supervivencia de plantas de *P. pringlei*. De igual manera se evaluó la persistencia de las ECM inoculadas al año del trasplante. La plantación se llevó a cabo en un terreno ubicado en San Pablo Ixayoc, Texcoco, Estado de México. Se observó que las plantas inoculadas tuvieron mayor tasa de supervivencia, por lo tanto se demuestra que los HECM son indispensables para mitigar el estrés después del trasplante y es preciso incorporarlos en los programas de manejo forestal para garantizar el éxito de la reforestación y conservación de los bosques nativos, así como promover la introducción de especies fúngicas de importancia económica, social y cultural. Además, se observó que las tres especies persistieron después de un año del trasplante.

5.2 INTRODUCCIÓN

Los bosques proveen servicios ambientales como la retención de agua, aire limpio, conservación de la biodiversidad y la mitigación de los efectos del cambio climático. Además, contribuyen al bienestar humano como un medio de subsistencia, primordialmente en las zonas rurales del mundo. Un tercio de la superficie terrestre esta cubierta por bosques (3 999 millones de ha). Sin embargo, debido al crecimiento poblacional y cambio de uso de suelo, a la fecha los bosques han disminuido en más de un 50 %, particularmente en los trópicos de América y África (FAO 2016). En México tan solo del 2005 al 2010 se devastaron 755 mil ha de bosques y selvas (FRA 2010), por tal motivo, una de las estrategias implementadas para la restauración de los bosques mexicanos son los programas de reforestación, principalmente con algunas especies de pinos. No obstante, su éxito se ha obstaculizado por la baja supervivencia de las plantas después del trasplante a campo, una de las razones es debido a que en la producción de planta en vivero no se incorporan a los HECM, los cuáles establecen una relación simbiótica obligada con las raíces de los pinos cuando crecen en condiciones naturales (Pérez-Moreno y Martínez-Reyes, 2014).

México es el segundo centro de diversificación del género *Pinus* con más de 49 especies de las aproximadamente 120 en el mundo (Sánchez-González, 2008; Garibay-Orijel *et al.*, 2013; Gernandt y Pérez-de la Rosa, 2014). Los beneficios que reciben las plantas al establecer una simbiosis con los hongos ectomicorrízicos en campo, son: protección contra patógenos, tolerancia a factores ambientales extremos, como sequía, salinidad y altas temperaturas (Smith y Read, 2008; Kernaghan, 2005; Taylor y Alexander, 2005; Pérez-Moreno y Read, 2004). El objetivo del presente estudio fue evaluar la supervivencia y la persistencia de los hongos ectomicorrízicos inoculados a *Pinus pringlei* en campo, después de un año del trasplante.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Área de estudio

El terreno se encuentra ubicado en la comunidad de San Pablo Ixayoc, Municipio de Texcoco, Estado de México; en las faldas del Monte Tláloc, a una altitud de 2,980 m, en las coordenadas 19° 26' 49.07'' N y 98° 46' 11.49'' O (Fig. 16). El terreno es triangular con 40 m de cada lado sin elevaciones. Durante los últimos 40 años había tenido uso agrícola. La vegetación aledaña al terreno es de pino-encino.



Figura 16. Localización de San Pablo Ixayoc y el terreno utilizado para realizar la plantación de *P. pringlei*. Fotografías tomadas de Google Earth 2016.

5.3.2 Establecimiento del experimento

El 28 de septiembre de 2015 a un año después de la siembra, 10 plantas de cada uno de los cuatro tratamientos fueron trasplantadas aleatoriamente y fueron distribuidas, en un arreglo tresbolillo a una distancia de 4 m entre cada unidad experimental (Figura 17).

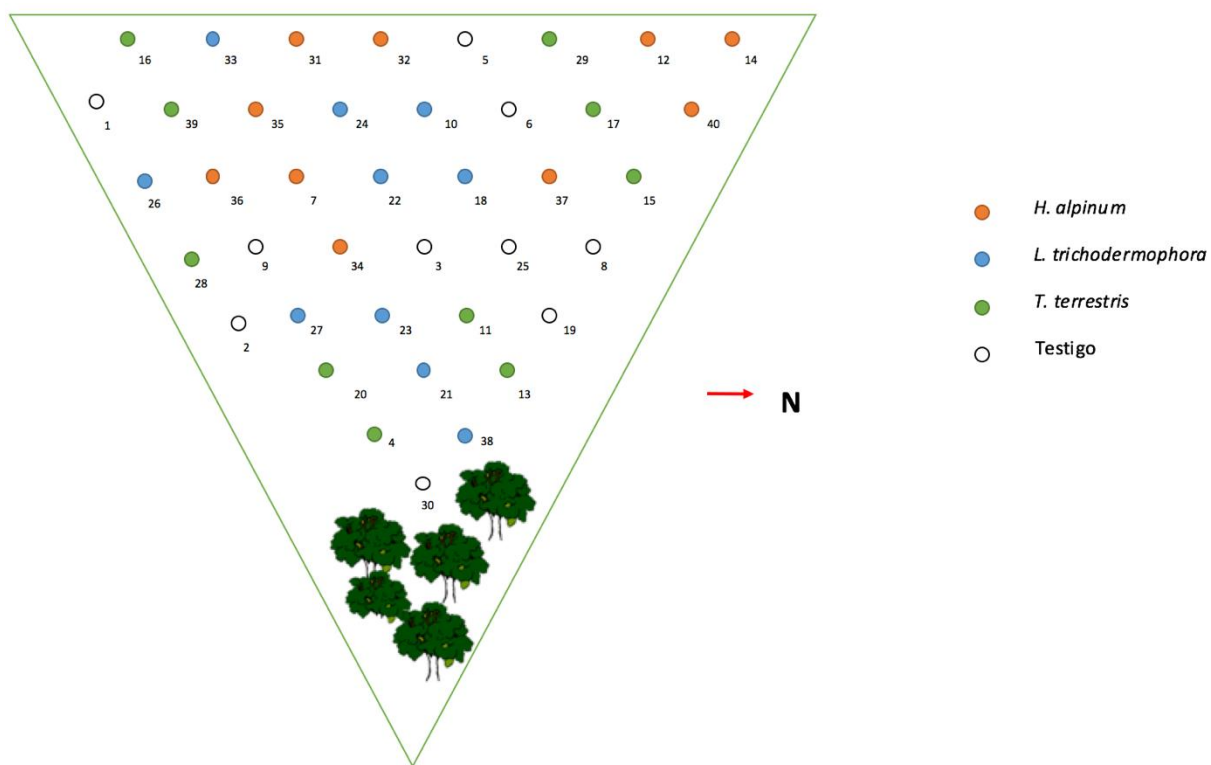


Figura 17. Mapa de distribución de las plantas de los cuatro tratamientos en el terreno.

Para la siembra se cavaron cajetes de 40x40 cm por lado y una profundidad de 25 cm. Cada dos meses, durante nueve meses se realizaron evaluaciones de la supervivencia en cada uno de los

tratamientos. La edad total de las plantas al final de esta evaluación en campo entonces fue de dos años, la cual fue la duración total del experimento (Figura 18).

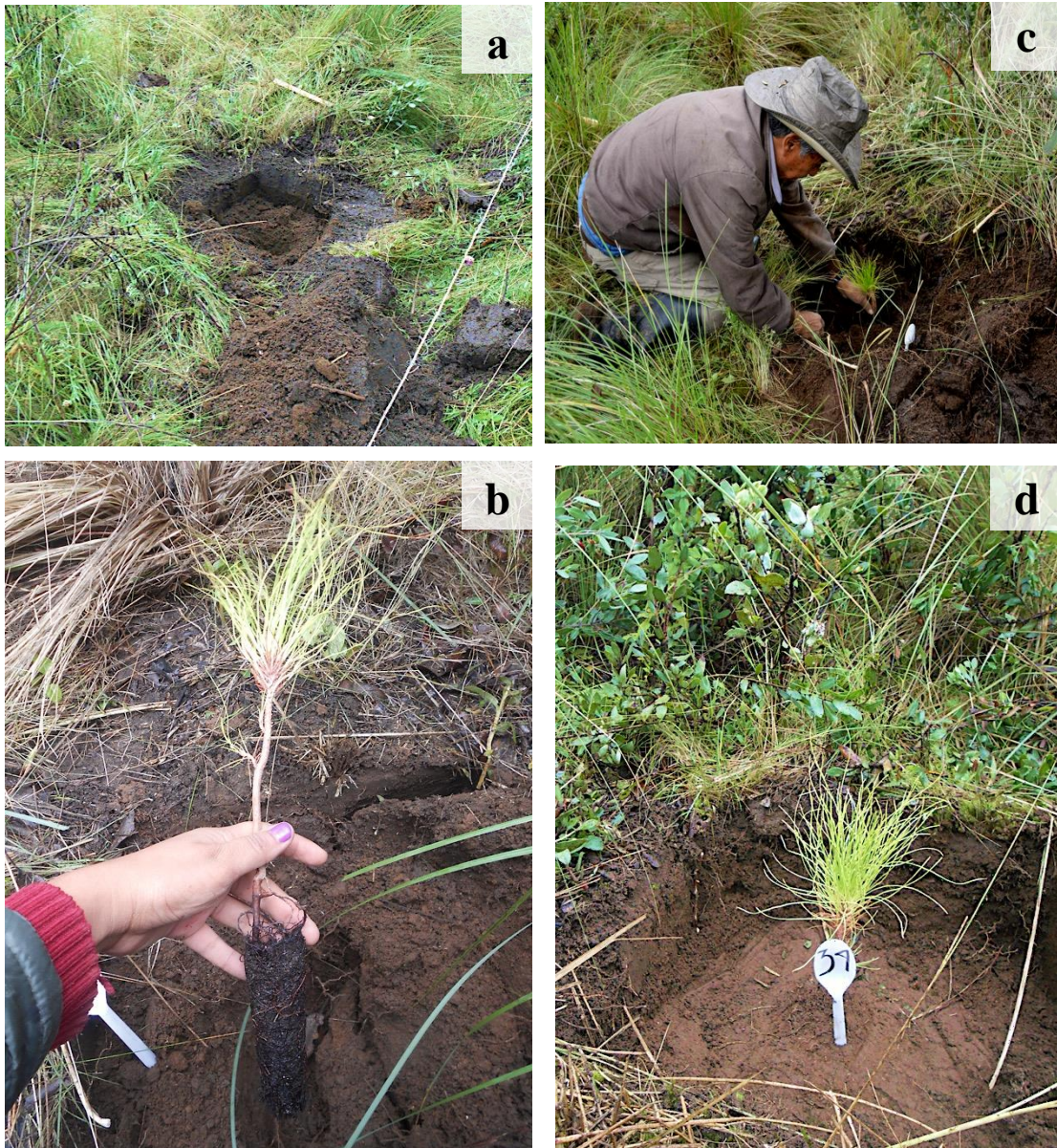


Figura 18. Trasplante de *P. pringlei* en campo. a) cajetes; b) planta micorrizada; c) siembra realizada por una persona de la comunidad y c) planta establecida en campo.

5.3.3 Diseño experimental y variables evaluadas

Para el trasplante a campo se seleccionaron 10 plantas de cada tratamiento con colonizaciones superiores a 95 % de cada hongo ectomicorrízico para ser trasplantadas. En total se sembraron 40 plantas de forma aleatoria.

5.3.3.1 Supervivencia de plantas y persistencia de las ectomicorrizas

Se realizaron visitas bimestrales al terreno para evaluar la supervivencia de las plantas, durante un año. No se les realizó ningún tipo de riego, ni fertilización después del trasplante.

Para evaluar la persistencia de los HECM en las raíces, al año después del trasplante se realizaron dos perforaciones con ayuda de tubos de PVC con diámetro de 5 cm, en cada costado de las plantas vivas (Figura 19). Después la tierra contenida en los tubos se extrajo y se colocó en tamices de diferente diámetro de abertura (1.19, 0.180 y 0.085 mm) para colectar la mayor parte de raíces cortas. Posteriormente se analizaron las raíces recuperadas en un microscopio estereoscopio para corroborar la colonización ectomicorrízica.



Figura 19. Evaluación de persistencia de las ectomicorrizas. a) proceso de extracción de las raíces con tubos de PVC y b) tubos conteniendo una porción de tierra con raíces para su posterior análisis.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Supervivencia

Se observó que independientemente del tratamiento la supervivencia se redujo conforme transcurrió el tiempo. Existió una diferencia dramática entre plantas inoculadas y no inoculadas nueve meses después del trasplante. Existió una diferencia dramática entre plantas inoculadas y no inoculadas a partir de los 10 meses después del trasplante (Figura 20). Mientras que en el caso de las plantas no inoculadas todas murieron, en plantas inoculadas existió una variación de supervivencia de 30 a 50 % dependiendo del micobionte inoculado. Plantas inoculadas con *Ha* y *Tt* presentaron 50 % de supervivencia, mientras que las plantas inoculadas con *Lt* presentaron solo 30 % de supervivencia (Cuadro 8). Al año del trasplante se observó que las raíces aún permanecían micorrizadas con los hongos inicialmente inoculados.

Cuadro 8. Supervivencia de plantas de *Pinus pringlei*, durante un año después del trasplante a campo.

Tratamientos	Supervivencia (%)					
	2	4	6	8	10	12
	Meses después del trasplante					
Plantas sin inocular	80	50	50	50	0	0
Plantas inoculadas con						
<i>H. alpinum</i>	90	80	80	80	50	50
<i>L. trichodermophora</i>	90	70	70	70	30	30
<i>T. terrestris</i>	100	80	80	80	50	50



Figura 20. Plantas de *Pinus pringlei* después de un año del trasplante a campo. a) plantas no inoculadas, b) planta inoculada con *Laccaria trichodermophora*, c) planta inoculada con *Thelephora terrestris* y d) planta inoculada con *Hebeloma alpinum*.

5.4.2 Persistencia de la ectomicorriza

Al año del trasplante de las plantas a campo, se observó que las raíces aún permanecían micorrizadas. Sin embargo, había raíces micorrizadas con *Cenococcum* aff. *geophilum* y dos especie no identificadas (Figura 21).

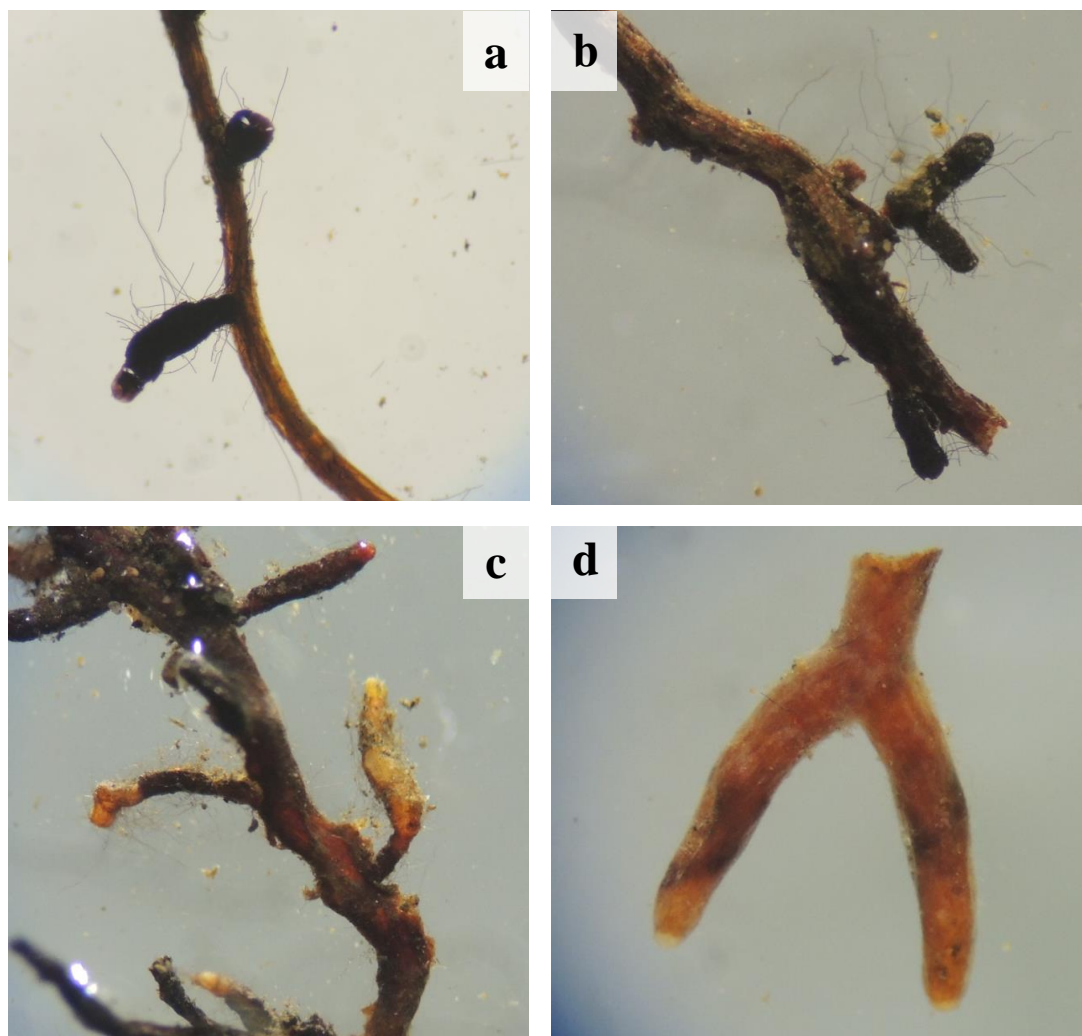


Figura 21. Ectomicorrizas halladas en el muestreo en campo de las raíces de *Pinus pringlei*. a y b) *Cenococcum* aff. *geophilum* y c y d) especies no identificadas.

5.5 DISCUSIÓN

En el presente trabajo la inoculación con HECM fue crucial en la supervivencia de las plantas de *P. pringlei* trasplantadas a campo. Por lo que se demuestra que la supervivencia de las plantas depende fuertemente de los HECM, aún en sitios altamente perturbados (Sánchez-Zabala *et al.*, 2013; Simard *et al.*, 2012). Por lo tanto, la inoculación ectomicorrízica en la producción de planta en viveros es un punto clave para la reforestación o plantaciones exitosas. Estudios previos han demostrado que los HECM incrementan la supervivencia en pinos: *Pinus ponderosa* presentó 41 a 93 % de supervivencia al ser inoculado con *Rhizopogon rubescens* (Steinfeld *et al.*, 2003); *Pinus halepensis* inoculado con *Rhizopogon roseolus* y *Suillus collinitus*, tuvo un porcentaje de supervivencia de 16 a 77 % (Rincón *et al.*, 2007); *P. densiflora* inoculado con *Pisolithus* sp., *C. geophilum* y *L. laccata* después de 6 meses del trasplante tuvieron 50 % de supervivencia en contraste con 6 % de las plantas no inoculadas (Zong *et al.*, 2015).

En términos generales la evaluación de la supervivencia en campo en pinos Neotropicales inoculados con especies nativas ha recibido escasa atención a pesar de su importancia, ya que se han utilizado generalmente micobiontes exóticos o inoculantes comerciales. Entre los micobiontes nativos inoculados en el presente trabajo existieron diferencias con respecto a la supervivencia de las plantas de *P. pringlei* en campo, las plantas inoculadas con *Tt* y *Ha* tuvieron mayor supervivencia que las plantas inoculadas con *Lt*. Debido a que las especies *Tt* y *Ha* produjeron abundante micelio externo y *Tt* adicionalmente presentó abundantes rizomorfos. El manto fúngico actúa como una barrera física que evita la pérdida de agua y desecación de las raíces (Smith y Read, 2008), explora el suelo en grandes volúmenes para acceder al agua y nutrientes (Pérez-Moreno y Read, 2004), además establece lazos vivientes entre árboles de la misma o de diferente especie, para la transferencia de compuestos (Simard *et al.*, 2012). Así mismo, los rizomorfos son cordones

hifales que actúan como extensiones funcionales del sistema radical (Pérez-Moreno y Read, 2004), los cuales juegan un papel crucial en el almacenamiento y transporte de agua a la planta hospedera a grandes distancias. Cairney (2005) y Brownlee *et al.* (1983) señalaron que, el grupo de hifas que forman los rizomorfos puede perder sus paredes transversales y así formar grandes vasos que movilizan importantes cantidades significativas de agua y nutrimentos. Las plantas inoculadas con hongos que forman rizomorfos como *Tt*, son más tolerantes a la sequía (Parladé *et al.*, 1996, Duddridge *et al.*, 1980). La liberación lenta de agua del manto y rizomorfos a la planta en condiciones de sequía podrían amortiguar el estrés hídrico (Steinfeld *et al.*, 2003) y contribuir entonces sustancialmente a la supervivencia de los árboles en campo (Lehto y Zwiazek, 2011).

La sucesión ecológica es un proceso que implica colonización secuencial y reemplazo de especies. En los HECM se puede observar una serie de cambios en la composición de especies a lo largo de los procesos de colonización de las raíces (Estrada-Torres, 2007).

Los morfotipos que se encontraron en las raíces al año del trasplante correspondían a los hongos ECM inoculados inicialmente y posiblemente dos morfotipos más (*Cenococcum aff. geophilum* y otra no identificada). Lo que podría indicar que indica que i) al año del trasplante se está iniciando la sucesión de especies, ya que poco a poco los HECM inoculados en invernadero están siendo desplazados por los hongos nativos. Sin embargo, es necesario establecer un método de muestreo de raíces más eficiente para poder dar explicaciones del proceso de sucesión, si se está efectuando este fenómeno y en qué porcentaje se encuentra establecido en la planta.

5.6 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se documenta por primera ocasión que existe un efecto positivo de *Hebeloma alpinum*, *Laccaria trichodermophora* y *Thelephora terrestris* en la supervivencia en campo de *Pinus pringlei* y su persistencia en las raíces del mismo un año después del trasplante. Este estudio nos proporciona una herramienta biotecnológica eficiente aplicable con los tres hongos ectomicorrízicos y *Pinus pringlei* que haría más eficiente los programas de producción de planta forestal de *Pinus pringlei* y de reforestación. En México no existen estudios con *Pinus pringlei* debido a que es una especie que no se aprovecha industrialmente, sin embargo, tiene alto potencial por las características que presenta su madera, por lo tanto representa una alternativa para aprovechamiento forestal.

Se demuestra que las especies fúngicas inoculadas permanecen hasta un año con la planta hospedera, por lo tanto durante su proceso de adaptación de *Pinus pringlei*, sigue estando en simbiosis.

LITERATURA CITADA

- Adams, E., R. Shin. 2014. Transport, signaling and homeostasis of potassium and sodium in plants *Journal of Integrative Plant Biology* 56:231-249.
- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial system according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11:107-114.
- Agerer, R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress* 5:56-107.
- Aggangan, S. N., H. K. Moon, and S. H. Han. 2013. Growth and nutrient accumulation of *Eucalyptus pellita* F. Muell. in response to inoculation with edible ectomycorrhizal mushrooms. *Asia Life Sciences* 22:95-112.
- Agerer, R., and G. Rambold. 2014. 2004-2015. DEEMY-An information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. Disponible en: <http://www.deemy> (consulta: junio 2016).
- Alarcón, A. 2007. Micorriza arbuscular. In: R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcón (eds.). Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo. Trillas. 90-119 p.
- Alexander, M. 1997. Introduction to soil microbiology. John Wiley & Sons. New York. 467pp.
- Allen, S. E., H. M. Grimshaw, J. A. Parkinson, and E. Quarmby. 1997. Chemical analysis of ecological materials. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.
- Armengaud, P., R. Breitling, A. Amtmann. 2004. The potassium-dependent transcriptome of arabidopsis reveals a prominent role of jasmonic acid in nutrient signaling. *Plant Physiology* 136:2556-2576.
- Arquero, O., D. Barranco, M. Benlloch. 2006. Potassium starvation increases stomatal conductance in olive trees. *HortScience* 41:433-436.
- Avis, P. G., D. J. McLaughlin, B. C. Dentinger, P. B. Reich. 2003. Long-term increase in nitrogen supply alters above-and below-ground ectomycorrhizal communities and increases the dominance of *Russula spp.* in a temperate oak savanna. *New Phytologist* 160:239-253.
- Barker, V. A., and D. J. Pilbeam. 2015. Handbook of Plant Nutrition. Boca Raton, FL: CRC Press.
- de las plántulas en vivero. *Bosque* 33:163-169.
- Barroetaveña, C., V. N. Bassani y M. Rajchenberg. 2012. Inoculación micorrízica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. *Bosque* 33:163-169.
- Bellion, M., M. Courbot, C. Jacob, F. Guinet, D. Blaudez, and M. Chalot. 2007. Metal induction of a *Paxillus involutus* metallothionein and its heterologous expression in *Hebeloma cylindrosporum*. *New Phytologist* 174:151-158.
- Bending, G. D., and D. J. Read. 1995. The structure and function of vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytology* 130:401-409.
- Benítez, G., Equihua M. y Pulido-Salas T. M. 2002. Diagnóstico de la situación de los viveros oficiales de Veracruz y su papel para apoyar programas de reforestación y restauración. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 8(1): 5-12.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. in: Black CA (ed) Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9:1149-1178. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.

- Boa, E. 2005. Los hongos silvestres comestibles: perspectiva global de su uso e importancia para la población. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Food & Agricultural Org. 160 pp.
- Bolchi, A., R. Ruotolo, G. Marchini, E. Vurro, L. S. di Toppi, A. Kohler, E. Tisserant, F. Martin, and S. Ottonello. 2011. Genome-wide inventory of metal homeostasis-related gene a functional phytochelatin synthase in the hypogeous mycorrhizal fungus *Tuber melanosporum*. *Fungal Geneicst and Biology* 48:573-584.
- Bücking, H., and W. Heyser. 1994. The effect of ectomycorrhizal fungi on Zn uptake and distribution in seedlings of *Pinus sylvestris* L. *Plant and Soil* 167:203-212.
- Burrola-Aguilar, C., O. Montiel, R. Garibay-Orijel, y L. Zizumbo-Villarreal. 2012. Conocimiento tradicional y aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres en la región de Amanalco, Estado de México. *Revista Mexicana de Micología* 35:1-16.
- Brownlee, C., J. A. Duddrige, A. Malibari, and D. J. Read. 1983. The structure and fuction of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing patways for assimilate and wáter transpor. *Plant and Soil* 71:433-443.
- Browning, H. R. M., and R. D. Whitney. 1991. Responses of Jack pine and black spruce seedlings to inoculation with selected species of ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Forest Research* 21:701-706.
- Brundrett, M. C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320:37-77.
- Bonet, J. A., C. R. Fischer and C. colinas. 2004. The relationship between forest age and aspect on the production of sporocarps of ectomycorrhizal fungi in *Pinus sylvestris* forests of central Pyrenees. *Forest Ecology and Management* 203:157-175.
- Cairney, J. W. G. and S. M. Chambers. 1999. Ectomycorrhizae fungi: Key genera in profile. Ed. Springer. Berlin. 369 pp.
- Cairney, G. W. J. 2005. Basidiomycetes mycelua in forest soil: dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. *Mycol. Res.* 109:7-20.
- Cairney, J. W. G. and S. M. Chambers. 2013. Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile. Springer Science & Business Media. 369 pp.
- Calvaruso C., M. P. Turpault, S. Uroz, P. Frey-Klett. 2011. *Laccaria bicolor* S238N improves scots pine mineral nutrition by increasin root nutrient uptake from soil minerals but does not increase mineral weathering. *Plant and Soil* 328: 145-154.
- Carrasco-Hernández, V., J. Pérez-Moreno, V. Espinosa-Hernández, J. J. Almaraz-Suárez, R. Quintero-Lizaola, y M. Torres-Aquino. 2011. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural* 84:83-96.
- Carrasco-Hernández, V., J. Pérez-Moreno, R. Quintero-Lizaola, T. Esponzoza-Solares, A. Loezana-Fernández, y H. V. Espinoza. 2015. Edible species of the fungal genus *Hebeloma* and two Neotropical pines. *Pak. J. Bot.* 47:319-326.
- Carod-Artal, F. J. 2015. Alucinógenos en las culturas precolombinas mesoamericanas. *Neurología* 30:42-49.
- Chávez D., M., G. C. Pereira, y A. H. Machuca. 2009. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. *Bosque* 30:4-9.

- Chávez, D., G. Pereira, A. Machuca. 2014. Estimulación del crecimiento en plántulas de *Pinus radiata* utilizando hongos ectomicorrícicos y saprobios como biofertilizantes. *Bosque* 35 (1):57-63.
- Comandini, O., C. A. Rinaldi, and W. T. Kuype. 2012. Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity: a continuous challenge. *In: Mycorrhiza: Occurrence in natural and restored*. Nova Science Publishers, Inc. pp. 165-200.
- CONAFOR, 2017. *Pinus pringlei*. Disponible en: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/979Pinus%20pringlei.pdf> (Consultado en febrero de 2017).
- CONAFOR, 2016. Producción de árboles forestales en México. Disponible en: <http://www.gob.mx/reforestacion/articulos/produccion-de-arboles-forestales-en-mexico> (Consultado en junio de 2016).
- Corratgé, C., S. Zimmermann, R. Lambilliotte, C. Plassard, R. Marmeisse *In: J. B. Thibaud, B. Lacombe, and H. Sentenac*. 2007. Molecular and functional characterization of a Na⁺-K⁺ transporter from the Trk family in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *J. Biol. Chem.* 282:26057–26066.
- Corratgé-Faillie, C., M. Jabnour, S. Zimmermann, A. A. Véry, C. Fizames, and H. Sentenac. 2010. Potassium and sodium transport in non- animal cells: the Trk/Ktr/HKT transporter family. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:2511–2532.
- Cowley, D. E. 2007. Microbial siderophores in the plant rhizosphere. *In: Barton, L. L., and J. Abadía, eds. Iron Nutrition In Plants and Rhizospheric Microorganisms*. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 169-189.
- Cunningham, A. B. and X. Yang. 2011. Mushrooms in forest and woodlands. Earthscan. London, UK. pp. 5-20.
- Díez, J. 2005. Invasion biology of Australian ectomycorrhizal fungi introduced with eucalypt plantations into the Iberian Peninsula. *Biological Invasions* 7:3-15.
- Del Castillo, R. F., J. A.P érez de la Rosa, A. G. Vargas, G. R. Rivera. 2004. Coníferas. *In: García-Mendoza A. J., Ordóñez, M. J. y Briones-Salas M. (eds.), Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, pp. 141-158.
- DEEMY. 2017, An information System for Characterization and Determination of Ectomicorrhizae. Disponible en: <http://www.deemy> (consultado en Enero 2017).
- Dvorak, W. S., J. K. Donahue, and G. R. Hodge. 1997. Quince años de conservación genética Ex situ de especies forestales mexicanas y de america central por la cooperativa camcore. *Recursos Genéticos Forstales* 24: 16-22.
- Dvorak, W. S. 2000: *Pinus pringlei* in Kituti P., and I. Fier (ed.). Conservation and testing of tropical and subtropical forest tree species by the CAMCORE cooperative College of Natural Resources, NCSU, Raleigh, NC, USA. pp. 174-187.
- Duddridge, J. A., A. Malibaru, D. J. Read. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287:834-836.
- Dungey H. S., Carson C. B., King N. G. 2003. Potential and niches for inter-specific hybrids with *Pinus radiata* in New Zealand. *New Zealand Journal of Forestry Science* 33:295-318.
- Estrada-Torres A. 2007. Ecología de los hongos ectomicorrízicos. *In: R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcón (eds.) Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. Trillas. 120-133 pp.

- Estrada, E., G. Guzmán, D. Cibrián, y R. Ortega. 2009. Contribución al conocimiento etnomicológico de los hongos comestibles silvestres de mercados regionales y comunidades de la Sierra Nevada (México). *Interciencia* 34:25-33.
- FAO. 2016. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2015 ¿Cómo están cambiando los bosques del mundo?. Disponible en: <http://fao.org/3/a-i4793s.pdf> (Consultado en mayo del 2016).
- Farjon, A., and T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropical Monograph. The New York Botanical Garden. USA. pp 20-30.
- Farjon A. 2013. *Pinus pringlei*. En: IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species [en línea]. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/details/42403/0> (revisado el 12 de febrero de 2016).
- Pérez-Moreno, J., and Ferrera-Cerrato, R. 1997. Mycorrhizal interactions with plants and soil organisms in sustainable agroecosystems. FAO.
- Fournier, J. M., A. M. Roldán, C. Sánchez, G. Alexandre, M. Benlloch. 2005. K⁺ starvation increases water uptake in whole sunflower plants. *Plant Science* 168:823–829.
- FRA 2010. Evaluación de los recursos forestales mundiales. Informe principal. Estudio FAO: Montes. Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/013/i1757s/i1757s.pdf> (Consultado en abril 2016).
- Frey B, Zierold K, Brunner I. 2000. Extracellular complexation of Cd in the Hartig net and cytosolic Zn sequestration in the fungal mantle of *Picea abies-Hebeloma crustuliniforme* ectomycorrhizas. *Plant, Cell and Environment* 23:1257-1265.
- García, K., and D. S. Zimmermann. 2014. The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. *Frontiers in Plant Science* 5:1-9.
- García, K., A. Delteil, G. Conéjero, A. Becquer, C. Plassard, H. Sentenac. 2014. Potassium nutrition of ectomycorrhizal *Pinus pinaster*: overexpression of the *Hebeloma cylindrosporum HcTrk1* transporter affects the translocation of both K⁺ and P in the host plant. *New Phytol.* 201: 951–960.
- García, K., J. Doidy, S. D. Zimmermann, D. Wipf, and P-E. Courty. 2016. Take a trip through the plant and fungal transportome of mycorrhiza. *Trends in Plant Science* (21) 11:937-950.
- Garibay-Orijel, R., J. Córdova., J. Cifuentes., R. Valenzuela, A. Estrada-Torres and A. Kong. 2009. Integrating wild mushrooms use into a model os sustainable management for indigenous community forest. *For. Ecol. Manag.* 258:122-131.
- Garibay-Orijel R., E. Morales-Marañón., M. Domínguez-Gutiérrez, y A. Flores-García. 2013. Caracterización morfológica y genética de las Ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84:153-169.
- Garibay-Orijel, R. y F. Ruan-Soto. 2014. Listado de los hongos silvestres consumidos como alimento tradicional en México. In: Moreno-Fuentes, A., Garibay-Orijel, R. (Eds.), La etnomicología en México, Estado del Arte. CONACYT-UAEH-UNAM, Mexico, pp. 100-109.
- Gernandt, D. S., y J. A. Pérez-de la Rosa. 2014. Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Rev. Mex. Biodivers.* 85:126-133.
- Google Earth. 2016. Disponible en: <https://www.google.com.mx/maps/place/San+Pablo+Ixayoc,+M%C3%A9xico/@19.4722563,98.8100267,2877m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x85d1ddc9c54973f5:0x7c75143528b97e27!8m2!3d19.4705428!4d-98.8004489> (Consultado en Enero 2017).

- Guzmán, G. 1998. Análisis creativo y cuantitativo de la diversidad de los hongos en México. *La diversidad biológica de Iberoamérica* 2: 111-175.
- Grossnickle, S. C. 2012. Why seedlings survive: influence of plant attributes. *New Forests* 43: 711-738.
- Hawksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research* 12: 1422-1432.
- He J, Zhou Z, Yang H, Xu J. 2011. Integrative management of commercialized wild mushroom: a case study of *Thelephora gambajun* in Yunnan, Southwest China. *Environmental Management* 48:98-108.
- Heckman, S. D., M. D. Geiser, R. B. Eidell, L. R. Stauffer, L. N. Kardos, and S. B. Hedges. 2001. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293:1129-1133.
- Herrera, T., y M. Ulloa. 2013. El reino de los hongos: micología básica aplicada. S. L. Fondo de Cultura Económica de España. México, D. F. 552 pp.
- Hilszczanska, D., M. Malecka, Z. Sierota. 2008. Changes in nitrogen level and mycorrhizal structure Scots pine seedlings inoculated with *Thelephora terrestris*. *Annals of Forest Science* 65:409.
- Hobbie, E. A. 2006. Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. *Ecology* 87:563-569
- Högberg, M. N., and P. Högberg. 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces, together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist* 154:791-795.
- Hodge, G. R., W. S. Dvorak. 2000. Differential responses of Central American and Mexican pine species and *Pinus radiata* to infection by the pitch canker fungus. *New Forests* 19: 241-258.
- Horton, T. R., T. D. Bruns. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 10:1855-1871.
- IUCN. 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 3.1. Disponible en: www.redlist.org (Consultado en marzo 2016).
- Ingleby, K., and P. A. Mason. 1996. Ectomycorrhizas of *Thelephora terrestris* formed with *Eucalyptus globulus*. *Mycological Society of America* (88) 4:548-553.
- Jentschke, G., B. Brandes, A. J. Kuhn, W. H. Schröder, D. L. Godbold. 2001. Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytology* 149:327-338.
- Jiménez-Ruiz, M., J. Pérez-Moreno, J. J. Almaráz-Suárez and M. Torres-Aquino. 2013. Hongos silvestres con potencial nutricional, medicinal y biotecnológico comercializados en valles centrales, Oaxaca. *Rev. Mex. Cienc. Agrícola*. (4)2:199-213.
- Jonsson, L. M., M. C. Nilsson, D. A. Wardle, and O. Zackrisson. 2001. Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos* 93:353-364.
- Karst, J., M. D. Jones, R. Turkington. 2009. Ectomycorrhizal colonization and intraspecific variation in growth responses of lodgepole pine. *Plant Ecology* 200:161-165.
- Kernaghan, G. 2005. Mycorrhizal diversity: Cause and effect?. *Pedobiologia* 49: 511-520.
- Kottke, I., X. M. Qian, K. Pritsch, I. Haug, F. Oberwinkler. 1998. *Xerocomus badius*-*Picea abies*, an ectomycorrhiza of high activity and element storage capacity in acidic soil. *Mycorrhiza* 7:267-275.
- Lehto, T., and J. Zwiazek. 2011. Ectomycorrhizas and water relations of trees. *Mycorrhiza* 21:71-90.

- Leonhardt, T., J. Sácky, P. Simek, J. Santrucek, P. Kotrba. 2014. Metallothionein-like peptides involved in sequestration of Zn in the Zn-accumulating ectomycorrhizal fungus *Russula atropurpurea*. *Metallomics* 5:1693-1701.
- Leyval, C., and C. P. P. Reid. 1991. Utilization of microbial siderophores by mycorrhizal and non-mycorrhizal pine roots. *New Phytol.* 119:93-98.
- Lockhart, L. A. 1990. The xylem resin terpene composition of *Pinus greggii* Engelm. and *Pinus Pringlei* Shaw. *Silvae Genetica* 39:5-6.
- López U. J., V. F. Velazco, J. M. Jasso, C. H. Ramírez, y J. J. H. Vargas. 2001. Hibridación natural entre *Pinus oocarpa* y *P. pringlei*. *Acta Botánica Mexicana* 57: 51-66.
- Luo, Z. B., C. Wu, C. Zhang, H. Li, U. Lipka, and A. Polle. 2014. The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. *Environmental and Experimental Botany* 108:47-62.
- MacAdam, J. W. 2009. *Structure and Function of Plants*. Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Malan, F. S. 1994. The Wood properties and quality of *Pinus pringlei* Shaw and *P. greggii* Engel. Compared with that of *P. patula* and *P. elliottii* grown in South Africa. *South African Forestry Journal* 171: 43-52.
- Malloch, D.W., K. A. Pirozynski, P. H. Raven. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants. *PNAS USA* 77: 2113-2118.
- Mariaca, R., L.C. Silva, C.A. Castaños, 2001. Proceso de recolección y comercialización de hongos comestibles silvestres en el Valle de Toluca, México. *Ciencia Ergo Sum* 8:30-40.
- Marmeisse, R., H. Gryta, P. Jargeat, L. Fraissinet-Tachet, G. Gay and J. C. Debaud. 1999. *Hebeloma*. In: *Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile*. Springer Berlin Heidelberg. 89-127 pp.
- Marmeisse, R., A. Guidot, G. Gay, R. Lambilliotte, and H. Sentenac. 2004. *Hebeloma cylindrosporum* - A model species to study ectomycorrhizal symbiosis from gene to ecosystem. *New Phytologist* 163:481-498.
- Marschner, H. 1986. *Mineral nutrition in higher plants*, Academic Press INC, San Diego.
- Marschner, H. 2010. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. London: Academic Press.
- Martineau, E., J. C. Domec, A. Bosc, P. Denoroy, V. F. Asensio, J. J. Lavres, L. Jordan-Meille. 2017. The effects of potassium nutrition on water use in field-grown maize (*Zea mays* L.). *Environmental and Experimental Botany* 134:62-71.
- Martínez-Reyes, M., J. Pérez-Moreno, L. Villarreal-Ruiz, R. Ferrera-Cerrato, B. Xoconostle-Cázares, J. J. Vargas-Hernández y M. Honrubia-García. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. Inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 18:183-192.
- Marx, D. H., J. L. Rühle, and C. E. Cardell. 1994. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. In: Noris, J. R., D. J. Read and A. K. Varma (eds.). *Techniques for mycorrhizal research, Methods in Microbiology*. Academic Press. London, U K. 383-411 pp.
- Maser, C., J. P. Trappe and R. A. Nussbaum. 1978. Fungal-small mammal interrelationships with emphasis in Oregon coniferous forest. *Ecology* 79:799-809.
- Méndez-Neri, M., J. Pérez-Moreno, R. Quintero-Lizaola, E. Hernández-Acosta y A. Lara-Herrera. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana* 29:73-81.

- Mexal, J. G., and T. D. Landis. 1990. Target seedling concepts: height and diameter. In *Target seedling symposium, meeting of the western forest nursery associations, general technical report RM-200*. 17-35 pp.
- Mirov, N. T. 1967. The genus *Pinus*. Ed. The Ronald Press Company. New York. 602 p.
- Molina, R., H. B. Massicotte, and J.M. Trappe. 1992. Ecological role of specificity phenomena in ectomycorrhizal plant communities: potentials for interplant linkages and guild development. In: Read, D. J., D. H. Lewis, A.H. Fitter, I. J. Alexander, (Eds.), *Mycorrhizas in Ecosystems*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 106–112 pp.
- Mortimer, P. E., S. C. Karunarathna, Q. Li, H. Gui, X. Yang, X. Yang, J. He, L. Ye, J. Guo, H. Li, P. Sysouphanthong, D. Zhou, J. Xu, K. D. Hyde. 2012. Prized edible Asian mushrooms: ecology, conservation and sustainability. *Fungal Diversity* 56:31-47.
- Montoya, A., A. Estrada-Torres, A. Kong, and L. Juárez-Sánchez. 2001. Commercialization of wild mushrooms during market days of Tlaxcala, Mexico. *Micología Aplicada Internacional* 13:31-40.
- Montoya, A., N. Hernández, C. Mapes, A. Kong and A. Estrada-Torres. 2008. The collection and sale of wild mushrooms in a community of Tlaxcala, Mexico. *Econ. Bot.* 62(3): 413–424.
- Montoya A., A. Kong, R. Garibay-Orijel, C. Méndez-Espinoza, E. T. Rodham and A. Estrada-Torres. 2014. Availability of wild edible fungi in La Malinche National Park, México. *Journal of Mycology* 1-15.
- Moreno-Fuentes, A., R. Garibay-Orijel, J. Tovar-Velasco, y J. Cifuentes. 2001. Situación actual de la Etnomicología en México y en el Mundo. *Etnobiología* 1:75-84.
- Mueller, G. M., J. P. Schmit, P. R. Leacock, B. Buyck, J. Cifuentes, D. E. Desjardin, R. E. Halling, K. Hjortstam, T. Iturriaga, K. H. Larsson, D. J. Lodge, T. W. May, D. Minter, M. Rajchenberg, S. A. Redhead, L. Ryvarde, J. M. Trappe, R. Watling y Q. Wu. 2007. Global diversity and distribution of macrofungi. *Biodiversity and Conservation* 16:37-48.
- Muñoz, H. J. F., J. T. R. Sáenz, V. M. C. Avalos, J. J. M. García, J. H. Ramos, y G. E. Manzanilla. 2015. Calidad de planta en el vivero forestal La Dieta, Municipio Zitácuaro, Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 6:72-89.
- Nagy, N. E., and Fossdal, C. G. 2013. Host responses in Norway spruce roots induced to the pathogen *Ceratocystis polonica* are evaded or suppressed by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Plant Biology* 15: 99-110.
- Navarrete, L. F. 2008. Los pueblos indígenas de México. CDI, México D. F. 141 p.
- Núñez D. J. A., R. Planelles, J. A. Rodríguez-Barreal, 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 halapensis*. *Invest Agrar: Sist Recur For* 13: 317-327.
- Obase, K., Y. Tamai, T. Yajima, and T. Miyamoto. 2009. Mycorrhizal associations in Woody plant species at the Mt. Usu Volcano, Japan. *Mycorrhiza* 17:209-215.
- Oliveira, S. R., A. R. Franco, y P. M. Castro L. 2012. Combined use of *Pinus pinaster* plus and inoculation with selected ectomycorrhizal fungi as an ecotechnology to improve plant performance. *Ecological Engineering* 43:95-103.
- Orozco, G. A., F. H. J. Muños, S. A. Rueda, R. J. A. Sígala, R. J. A. Prieto, y M. J. J. García. 2010. Diagnóstico de la calidad de planta en los viveros forestales del estado de Colima. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 1:134-145.
- Parladé, J., J. Pera, and F. I. Alvarez. 1996. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6:237-245.

- Parladé J., J. Luque, J. Pera, A. Rincón. 2004. Field performance of *Pinus pinaea* and *P. halapensis* seedlings inoculated with *Rhizopogon spp.* And outplanted in formerly arable land. *Ann. For. Sci.* 61: 507-514.
- Perea-Estrada, V., M., J. Pérez-Moreno, L. R. Villarreal, A. T. Santos, M. B. De la I, V. M. A. Cetina, y L. C. Tijerina. 2009. Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Rev. Fitotec. Mex.* 32:93-102.
- Pérez-Moreno, J., J. Alvarado-Lopez y R. Ferrera-Cerrato (Eds.). 2002. Producción y control de calidad de inoculantes agrícolas y forestales. Colegio de Postgraduados y Comité Mexicano de Inoculantes Agrícolas y Forestales. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 107 pp.
- Pérez-Moreno, J. y J. D. Read. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivos que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247.
- Pérez-Moreno, J., M. Martínez-Reyes., A. Yescas-Pérez., A. Delgado-Alvarado., and B. Xoconostle-Cázares. 2008. Wild mushroom market in central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany* 62:425-436.
- Pérez-Moreno, J., A. F. Loezana, V. Carrasco-Hernández, y A. Yescas-Pérez. 2010. Los hongos comestibles silvestres del parque nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACyT. Montecillo, Texcoco, Estado de México. pp: 167.
- Pérez-Moreno, J. 2012. Los hongos comestibles ectomicorrízicos y su biotecnología. *In:* Sánchez, J., E., and G. Mata (eds). Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: Investigación y desarrollo en un entorno multicultural. ECOSUR-INECOL, México. 19-28 pp.
- Pérez-Moreno, J., y M. Martínez-Reyes. 2014. Edible ectomycorrhizal mushrooms: biofactories for sustainable development. *In:* Guervara-Gonzalez, R. and I. Torres-Pacheco (eds.). Biosystems engineering: Biofactories for food production in the century XXI, Springer International Publishing Switzerland. 151-233 pp.
- Prieto R. J. A., R. L. García, B. S. Mejía, S. A. Huchín, y L. V. Aguilar. 2009. Producción de planta del género *Pinus* en vivero de clima templado frío. Campo experimental Valle del Guardiania INIFAP-SAGARPA. Durango, Dgo., México. Publicación Especial Núm. 28. 48 p.
- Price, A. R., A. Liston, and H. Strauss. 1998. Phylogeny and systematics of *Pinus* in: Ecology and Biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press. USA. pp 45-70.
- PRONARE, 2014. Programa Nacional de Reforestación y Cosecha de Agua. Disponible en: <http://es.slideshare.net/CocaColadeMexico/informe-programa-nacional-de-reforestacion-y-cosecha-de-agua> (Consultado en abril de 2016).
- Quoreshi, A. M., and D. P. Khasa. 2008. Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on root colonization, growth, and nutrient uptake of aspen and balsam poplar. *Biomass and Bioenergy* 32:381-391.
- Read, D. J. and J. Pérez-Moreno. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems-a journey towards relevance?. *New Phytol* 157:475-492.
- Rentería-Chávez M. C., J. Pérez-Moreno, V. M. Cetina-Alcalá, R. Ferrera-Cerrato, B. Xoconostle-Cázares. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Rineau, F., P. E. Courty, S. Uroz, M. Buée, and J. Garbaye. 2008. Simple microplate assays to measure iron mobilization and oxalate secretion by ectomycorrhizal tree roots. *Soil Biology and Biochemistry* 40:2460-2463.

- Rincón A., F. I. Alvarez, J. Pera. 2001. Inoculation of containersized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11:265-271.
- Rincón, A., M. R. de Felipe, and M. Fernández-Pascal. 2007. Inoculation of *Pinus halepensis* Mill. With selected ectomycorrhizal fungi improves seedling establishment 2 years after planting in a degraded gypsum soil. *Mycorrhiza* 18:23-32.
- Rinaldi, A. C., O. Comandini, and T. W. Kuyper. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33:1-45.
- Rodríguez, T. D. A. 2008. Indicadores de calidad de planta forestal. Mundi-Prensa. México, D. F. México. 156 p.
- Sáenz R. J. T., F. H. J. Muñoz, M. A. D. Pérez, S. A. Rueda, y R. J. Hernández. 2014. Calidad de planta de tres especies de pino en el vivero de “Morelia”, estado de Michoacán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 98-111.
- Sánchez-González, A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques* 14:107-120.
- Sánchez-Zabala, J., J. Majada, N. Martín-Rodríguez, C. González-Murua, U. Ortega, M. Alonso-Graña, O. Arana, and M. K. Duñabeitia. 2013. Physiological aspects underlying the improved outplanting performance of *Pinus pinaster* Ait. seedlings associated with ectomycorrhizal inoculation. *Mycorrhiza* 23: 627-640.
- Saccardo, P. A. 1888. Thelephora. *Sylloge Fungorum* 6: 536-548
- Sácky, J., T. Leonhardt, J. Borovicka, M. Gryndler, A. Briksí, P. Kotrba. 2014. Intracellular sequestration of zinc, cadmium and silver in *Hebeloma mesophaeum* and characterization of its metallothionein genes. *Fungal Genetics and Biology* 67:3-14.
- Sácky, J., T. Leonhardt, P. Kotrba. 2016. Functional analysis of two genes coding for distinct cation diffusion facilitators of the ectomycorrhizal Zn-accumulating fungus *Russula atropurpurea*. *Biometals* 29:349-363.
- Schmit, J. P., and G. M. Mueller. 2007. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and conservation*, 16(1), 99-111.
- Shaw R. G. 1909. The pines of México. Ed. Harvard University.
- Siddiqui, Z. A. R. Kataoka. 2011. Mycorrhizal inoculants: progress in inoculant production technology. In: I. Ahmad, F. Ahmad, J. Pichtel, eds. *Microbes and Microbial Technology: Agricultural and Environmental Applications*. New York: Springer 489-506 pp.
- Simard, W. S., K. J. Beiler, M. A. Bingham, J. R. Deslippe, L. J. Philip, and F. P. Teste. 2012. Mycorrhizal networks: Mechanism, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews* 26:39-60.
- Sudhakara-Reddy, M., and K. Natarajan. 1997. Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedling in nurse. *Mycorrhiza* 7:133-138.
- Smith, J. E., R. Molina, M. M. P. Huso, D. L. Luoma, D. McKay, M. A. Castellano, T. Lebel and Y. Valachovic. 2002. Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps in Young, rotation-age, and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade Range of Oregon, USA. *Canadian Journal of Botany*. 80:186-204.
- Smith, S. E., and D. H. Read. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Elsevier press. pp: 814.
- Sotomayor-Castellanos, J. R., y M. Ramirez-Pérez. 2014. Anisotropía del módulo de elasticidad y resistencia en compresión de la madera de *Pinus michoacana*, *Pinus douglasiana* y *Pinus pringlei*. *Acta Universitaria* 24:3-12.

- Sousa, R. N., R. A. Franco, S. Oliveira, and M. L. P. Castro. 2012. Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. *Journal of Environmental Management* 95:269-274.
- Steinfeld, D., M. P. Amaranthus, and E. Cazares. 2003. Survival of ponderosa pine (*Pinus ponderosa* Dougl. Ex Laws.) seedlings outplanted with *Rhizopogon* mycorrhizae inoculated with spores at the nursery. *Journal of Arboriculture* 29:197-207.
- Taylor, A. F. S., and I. Alexander. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19:102-112.
- Tedersoo, L., T. W. May, and M. E. Smith. 2010. Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20:217-263.
- The Gymnosperm Database. 2017. *Pinus pringlei*. Disponible en: http://www.conifers.org/pi/Pinus_pringlei.php (Consultado en febrero 2017).
- Thomas, G. W., C. A. Clarke, B. Mosse, and M. Jackson. 1982. Source of phosphate take up from two soils by mycorrhizal (*Thelephora terrestris*) and non-mycorrhizal *Picea sitchensis* seedlings. *Soil Biol. Biochem.* 14:73-75.
- Thomas, G. W., and R. M. Jackson. 1983. Growth responses of sitka spruce seedlings to mycorrhizal inoculation. *New Phytology* 95:223-229.
- Turnau, K., A. Berger, A. Loewe, W. Einig, R. Hampp, M. Chalot, P. Dizengremel, and I. Kottke. 2001. Carbon dioxide concentration and nitrogen input affect the C and N storage pools in *Amanita muscaria*-*Picea abies* mycorrhizae. *Tree Physiology* 21:93-99.
- Trocha, K. L., J. Oleksyn, E. Turzanska, M. Rudawska, P. B. Reich. 2007. Living on the edge: Ecology of an incipient *Betula*-fungal community growing on brick walls. *Trees* 21:239-247.
- USGS. 2016. Geosciences and Environmental Change Science Center. (Consulta: Marzo de 2016). Disponible en: <http://gec.cr.usgs.gov/data/little/>
- van der Heijden M. G. A, F. Martin, M. A. Selosse, I. R. Sanders. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytology* 205:1406-1423.
- Van Hees, P. A. W., A. Rosling, S. Essén, L. D. Godbold, L. D. Jones, and D. R. Finlay. 2006. Oxalate and ferricrocin exudation by the extramatrical mycelium of an ectomycorrhizal fungus in symbiosis with *Pinus sylvestris*. *New Phytologist* 169: 367-377.
- Villar, S. P., R. J. L. Peñuelas, y M. I. Carrasco. 2000. Influencia del endurecimiento por estrés hídrico y la fertilización en algunos parámetros funcionales relacionados con la calidad de la planta de *Pinus pinea*. Actas del 1er Simposio sobre el pino piñonero. Valladolid 1:211-218.
- Villarreal, L., y J. Pérez-Moreno. 1989. Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micol. Neotrop. Apl.* 2:77-114.
- Villaseñor, J. L., E. Ortiz, L. Alvarado, M. Mora, y G. Segura. 2013. Catálogo florístico taxonómico de los árboles de México. Informe final Proyecto JE012. Bases de datos SNIB-CONABIO. NMéxico, D. F. Disponible en : <http://bios.conabio.gob.mx/especies/6019364> (Consultado en Febrero de 2016).
- Wallander, H., S. Mahmood, D. Hagerberg, L. Johansson, and J. Pallon. 2003. Elemental composition of ectomycorrhizal mycelia identified by PCR-RFLP analysis and grown in contact with apatite or Wood ash in forest soil. *FEMS Microbiology Ecology* 44:57-65.
- Wallander, H., and J. Pallon. 2005. Temporal changes in the elemental composition of *Rhizopogon* rhizomorphs during colonization of patches with fresh organic matter or acid-washed sand. *Mycologia* 97:295-303.

- Wainwright, M. 1992. An introduction to fungal biotechnology. John Wiley & Sons. West Sussex. 202pp.
- Wightman, K. E. and B. S. Cruz. 2003. La cadena de la reforestación y la importancia en la calidad de las plantas. *Foresta veracruzana* (5): 45-51.
- Xu, D. P., J. Zheng, Y. Zhou, Y. Li, S. Li, H. B. Li. 2016. Extraction of natural antioxidants from *Thelephora gambajun* mushroom by an ultrasound-assisted extraction technique and evaluation of antiproliferative activity of the extract against human cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences* 17:1-15.
- Yang, W. M., J. K. Liu, L. Hu, Z. J. Dong, W. L. Wu, Z. H. Chen. 2004. Antioxidant properties of natural p-terphenyl derivatives from the mushroom *Thelephora gambajun*. *Zeitschrift für Naturforschung C* 59:359-362.
- Yun, W., and I. R. Hall. 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany* 82:1063-1073.
- Zamora, M., y J. M. Torres. 2002. Estado actual de la información sobre productos forestales no madereros. En: Morales, J. (Coord.). Estado de la información forestal en México. FAO. Santiago de Chile, pp: 179-279.
- Zong, K., J. Huang, K. Nara, Y. Chen, Z. Shen, and C. Lian. 2015. Inoculation of ectomycorrhizal fungi contributes to the survival of tree seedling in a copper mine tailing. *Journal of Forest Research* 20(6):493-500.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

El presente trabajo documenta la importancia ecológica y biotecnológica de los recursos forestales maderables y no maderables. Se documenta por primera vez la inoculación de *Hebeloma alpinum*, *Laccaria trichodermophora* y *Thelephora terrestris* con *Pinus pringlei*, donde se demostró que estos tres hongos beneficiaron en mayor crecimiento, producción de biomasa y contenido de macronutrientes y micronutrientes. A nivel mundial hay pocos trabajos que demuestran la removilización de micronutrientes a la parte aérea vía ectomicorrizas. En este trabajo por primera ocasión se estudió el efecto benéfico en *Pinus pringlei* en la removilización de K, Fe y Zn parte de los tres hongos ectomicorrízicos.

Así mismo por primera ocasión, se caracterizan las ectomicorrizas formadas de *Hebeloma alpinum*, *Laccaria trichodermophora* y *Thelephora terrestris* con *Pinus pringlei*, así como la identificación molecular de dichas ectomicorrizas formadas.

Este es uno de los pocos trabajos en donde se evalúa el efecto de las ectomicorrizas en la supervivencia de plantas de *Pinus pringlei* en campo. Por lo que se demuestra que los hongos ectomicorrízicos empleados no solo mejoran la calidad de *Pinus pringlei* en invernadero, si no también favorecen su supervivencia y establecimiento en campo. Por lo tanto, puede considerarse una práctica biotecnológica útil para la producción masiva de *Pinus pringlei*, una especie con alto potencial para aprovechamiento maderable, y de esta manera incorporarlo en los programas de reforestación o plantaciones forestales. *Hebeloma alpinum* y *Laccaria trichodermophora* son dos especies de hongos silvestres ectomicorrízicos que representan una importante fuente de alimentación y un fuerte potencial como inoculantes; por lo cual es fundamental conservar este recurso forestal no maderable e incorporarlos en los programas de reforestación y de esta manera contribuir a su conservación.