



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**Formación de Ectomicorrizas de *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae* a partir de la inoculación con esporas en excretas de dos especies de ratones silvestres (*Peromyscus alstoni* y *P. maniculatus*).**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Francisco Pérez Flores

Codirectores: Dra. Citlalli Castillo Guevara

M. en C. Gema L. Galindo Flores

Comité tutorial: Dr. Arturo Estrada Torres

Dra. Mariana Cuautle Arenas

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2011

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece a las siguientes instituciones y personas que intervinieron en la realización de este trabajo:

Al posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por la realización de estudios de maestría. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número de registro 266776. Al Centro de Investigación en Ciencias Biológicas donde se llevó acabo la parte experimental del trabajo. A mis codirectores de tesis, la M. en C. Gema Lilia Galindo Flores y la Dra. Citlalli Castillo Guevara por haberme guiado en la realización de esta tesis. A los miembros de mi comité tutorial el Dr. Arturo Estrada Torres, Dra. Mariana Cuautle Arenas, Dr. Carlos Lara Rodríguez y al Dr. Roguer Guevara Hernández por las revisiones y comentarios realizados a este trabajo.

Agradezco a los investigadores que laboran en el CICB y CTBC por las opiniones emitidas a este trabajo durante los seminarios en los cuales participé. Al M. en C. Alejandro Kong, Dra. Guadalupe Santiago, M. en C. Laura Hernández, Dra. Yolanda Nava, Dra. Mónica Montiel, Dr. José Luis Martínez, Dra. Adriana Montoya, Dra. Mercedes Rodríguez por haber ayudado en algunas dudas sobre el proyecto. A las amistades que hice en el laboratorio haciendo mi estancia más placentera. Finalmente quiero agradecer a mi familia. A mis padres Emilia Flores Pérez y José Facundo Pérez Ibañez y mi hermano Geovani Pérez Flores por apoyarme en todo momento así como a mis abuelos, tíos y primos. Muchas gracias a todos.

## RESUMEN

Al consumo de hongos (esporomas, esporas y micelio) se le conoce como micofagia. Este hábito ha sido documentado en varias partes del mundo tanto para invertebrados como vertebrados, enfocándose principalmente a hongos hipogeos y con escasos estudios involucrando hongos epigeos. En el presente estudio se evaluó la actividad de las esporas de los hongos epigeos *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus*, y su capacidad de formar micorrizas después de ser consumidas por *Peromyscus alstoni* y *Peromyscus maniculatus*. Para evaluar la capacidad de micorrización de las esporas de estas dos especies de hongos se inocularon en plántulas de *Pinus montezumae* se evaluó la extensión de raíz que estuvo colonizada por los hongos así como el desempeño de las plántulas a los dos, cuatro y seis meses después de ser inoculadas. El paso de las esporas de *S. tomentosus* por el tracto digestivo de ambas especies de ratones no afectó la actividad de las esporas. En contraste, la actividad de las esporas de *L. trichodermophora* aumentó después de ser consumidas por ambas especies de ratones. Con respecto a la micorrización, las plántulas inoculadas con esporas de *S. tomentosus* que pasaron por tracto digestivo de *P. alstoni* presentaron mayores porcentajes de micorrización que las plántulas inoculadas con esporas que pasaron por tracto digestivo de *P. maniculatus* y plántulas inoculadas con esporas que no pasaron por tracto digestivo. Para el caso de *L. trichodermophora*, la micorrización fue mayor en plántulas inoculadas con esporas que no pasaron por tracto digestivo que en plántulas inoculadas con esporas que pasaron por el tracto digestivo de ambas especies de ratones. En conclusión, con los resultados obtenidos, se sugiere que *P. alstoni* podría dispersar las esporas de *S. tomentosus* teniendo un efecto positivo al aumentar su capacidad de micorrización. Sin embargo, estas dos especies de ratones tienen un efecto negativo al disminuir la micorrización de *L. trichodermophora* al tiempo de evaluación.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 1  |
| 2. ANTECEDENTES.....  | 4  |
| 3. JUSTIFICACIÓN.....   | 5  |
| 4. HIPÓTESIS.....   | 6  |
| 5. OBJETIVOS.....   | 6  |
| 5.1 Objetivo general.....   | 6  |
| 5.2 Objetivos específicos.....  | 6  |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 7  |
| 6.1 Sitio de estudio.....   | 7  |
| 6.2 Sistema estudiado.....  | 7  |
| 6.2.1 <i>Laccaria trichodermophora</i> .....  | 7  |
| 6.2.2 <i>Suillus tomentosus</i> .....   | 8  |
| 6.2.3 <i>Peromyscus alstoni</i> .....   | 9  |
| 6.2.4 <i>Peromyscus maniculatus</i> .....   | 9  |
| 6.2.5 <i>Pinus montezumae</i> .....   | 10 |
| 6.3 Recolección de material biológico y mantenimiento de ratones silvestres ..  | 13 |
| 6.4 Pruebas de alimentación.....  | 14 |
| 6.5 Procesamiento de excretas.....  | 16 |
| 6.5.1 Recolección de excretas.....  | 16 |
| 6.5.2 Procesamiento de muestras.....  | 16 |
| 6.6 Cuantificación de esporas.....  | 16 |
| 6.7 Evaluación de la actividad metabólica esporal.....  | 17 |
| 6.8 Cuantificación de esporas activas.....  | 18 |
| 6.9 Inoculación de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> con esporas provenientes<br>de las excretas de los ratones..... | 18 |
| 6.10 Diseño experimental.....   | 19 |
| 6.11 Evaluación de variables.....   | 20 |
| 6.12 Análisis estadísticos.....   | 20 |
| 7. RESULTADOS.....  | 21 |
| 7.1 Actividad metabólica esporal.....   | 21 |
| 7.2 Supervivencia.....  | 23 |
| 7.3 Colonización micorrízica.....   | 25 |
| 7.4 Altura.....   | 29 |

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 7.5 Biomasa radicular ..... | 31 |
| 7.6 Biomasa aérea .....     | 33 |
| 8. DISCUSIÓN .....          | 35 |
| 9. CONCLUSIONES .....       | 40 |
| 10. PERSPECTIVAS .....      | 41 |
| 11. REFERENCIAS .....       | 42 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Prueba de alimentación con <i>Laccaria trichodermophora</i> ..... | 14 |
| Tabla 2. Prueba de alimentación con <i>Suillus tomentosus</i> .....        | 15 |
| Tabla 3. Diferentes tratamientos de inoculación.....                       | 19 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Ilustración de los cinco participantes en la interacción tripartita estudiada...  | 12 |
| Figura 2. Efecto de la micofagia en la proporción de esporas activas de los hongos <i>Laccaria trichodermophora</i> y <i>Suillus tomentosus</i> ..... | 21 |
| Figura 3. Esporas de <i>Laccaria trichodermophora</i> y <i>Suillus tomentosus</i> teñidas con sales de tetrazolio (MTT).....                          | 22 |
| Figura 4. Supervivencia de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> a los 2, 4 y 6 meses posterior a la inoculación.....                                  | 24 |
| Figura 5. Porcentaje de micorrización en plántulas de <i>Pinus montezumae</i> a los 2, 4 y 6 meses posterior a la inoculación.....                    | 27 |
| Figura 6. Micorrización en los diferentes tratamientos de inoculación.....  | 28 |
| Figura 7. Altura de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> a los 2, 4 y 6 meses posterior a la inoculación.....   | 30 |
| Figura 8. Biomasa radical de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> a los 2, 4 y 6 meses posterior a la inoculación.....                                | 32 |
| Figura 9. Biomasa aérea de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> a los 2, 4 y 6 meses posterior a la inoculación.....                                  | 33 |

## 1. INTRODUCCIÓN

La micofagia es el hábito de consumir estructuras fúngicas tales como esporomas, esporas y micelio (Lawrence 1989). Según Maser y cols. (2008) los mamíferos que realizan este hábito alimenticio (micófagos) pueden ser clasificados de acuerdo con el grado de dependencia que tienen del consumo de hongos durante el año. Ellos pueden ser considerados como micófagos obligados cuando obtienen todos, o casi todos, sus requerimientos nutricionales de los hongos, esto incluye la capacidad de almacenar este recurso para consumirlo en épocas cuando naturalmente el recurso es escaso o inexistente. El ratón californiano de espalda roja (*Clethrionomys californicus*) y el potoro de pies largos (*Potorous longipes*) (Ure y Maser 1982, Green y cols. 1999) son ejemplos de micófagos obligados. Los micófagos preferenciales, son aquellos que llegan a consumir material fúngico en gran cantidad cuando éste recurso está disponible. Ejemplos de este tipo de micófagos son la ardilla voladora del norte (*Glaucomys sabrinus*) y el potoro de nariz larga (*Potorous tridactylus*) (Maser y cols. 1985, Claridge y cols. 1993). Los micófagos oportunistas son aquellos que consumen hongos cuando accidentalmente los encuentran o alternativamente consumen hongos cuando su alimento habitual no está temporalmente disponible. Ejemplos de este tipo de micófagos son el ratón venado (*Peromyscus maniculatus*) y ardillas del genero *Tamias* (Cázares y Trappe 1994, Ashkannejhad 2003, en Ashkannejhad y Horton 2005). Finalmente, consumidores accidentales de hongos son aquellos en los cuales los hongos se encuentran infrecuentemente representados en su dieta siendo posible que estos mamíferos consuman material fúngico en el proceso de ingerir otro alimento. Este fenómeno comúnmente ocurre entre carnívoros donde su presa ha consumido hongos. Ejemplos de micófagos accidentales reportados son la lechuza aulladora (*Ninox connivens*) y el tigre de cola moteada (*Dasyurus maculatus*) en Australia y la lechuza moteada (*Strix occidentalis*) en Norteamérica (Maser y cols. 2008).

La mayoría de los hongos consumidos por micófagos son hipogeos (fructificación por abajo del suelo), aunque también se ha registrado el consumo en hongos epigeos (fructificación por arriba del suelo), en su mayor parte pertenecientes al orden de los Agaricales y Boletales (Bertolino y cols. 2004, Ashkannejhad y Horton 2005, Durán 2006).

Tanto hongos hipogeos y epigeos son parte importante en el funcionamiento de

los bosques ya que establecen asociaciones llamadas ectomicorrizas con las raíces de muchas especies de árboles incluyendo varias especies de interés forestal. La asociación ectomicorrízica es una interacción mutualista en la cual los hongos colonizan el tejido cortical de las raíces de las plantas. Se caracteriza por la formación de una estructura miceliar que cubre la raíz que se denomina manto, y una red de hifas intercelulares denominadas red de Hartig (Peterson y cols. 2004). Estas interacciones entre plantas y hongos son un mutualismo trófico en el que los hongos transfieren nutrientes minerales del suelo a las plantas mientras que, la planta proporciona compuestos orgánicos carbonados producto de la fotosíntesis a sus simbiontes fúngicos (Nava-Gutiérrez y Hernández-Cuevas 2003). La formación exitosa de la ectomicorriza no sólo depende del hongo y la planta, sino también de los factores ambientales, físicos, químicos y biológicos (Francis y Read 1994).

El consumo de calorías provisto por los esporomas es generalmente bajo, pero estos contienen importantes nutrientes, particularmente nitrógeno, minerales (Ca, Mg, K), y vitaminas, y por lo tanto se ha considerado que tiene alto valor nutricional para pequeños mamíferos (Fogel y Trappe 1978, Grönwall y Pehrson 1984). No obstante, Cork y Kenagy (1989) y Claridge y Cork (1994) encontraron que mucho del nitrógeno en algunos hongos hipogeos es concentrado en esporas y paredes celulares que no pueden ser digeridos por algunos mamíferos. Solo algunas especies de micófagos especialistas, por ejemplo el marsupial *Bettongia gainmardi*, puede transformar complejos polisacáridos en componentes de fácil asimilación, debido a la fermentación que se lleva a cabo en su intestino grueso (Johnson 1994).

Las especies hipogeas dependen casi totalmente de los animales que los consumen para la dispersión de sus esporas, ya que a lo largo de su historia evolutiva han perdido la capacidad de dispersión vía aérea. En ciertas épocas del año, es común que estos hongos produzcan estructuras reproductivas con atrayentes aromáticos que facilitan su localización por micófagos que al consumirlos ayudan a su proceso de dispersión (Estrada-Torres y Santiago-Martínez 2003). Por su parte, los esporomas de los hongos epigeos dependen del viento para la dispersión de sus esporas, aunque la participación de los animales micófagos podría favorecer una dispersión más efectiva y dirigida (Durán 2006).

Varios estudios han determinado que las esporas de especies hipogeas mantienen su viabilidad en las excretas de ciertos mamíferos y se ha demostrado que son una excelente fuente de inóculo micorrizógeno para diversas especies de plantas



(Castellano y Trappe 1985, Claridge y cols. 1999, Colgan y Claridge 2002, Ashkannejhad y Horton 2005). Además, se ha demostrado que la capacidad de este tipo de hongos para formar micorrizas se incrementa una vez que sus esporas han pasado por el tracto digestivo de algunas especies de roedores (Miller 1985). Algunos estudios han sugerido que el paso por el tracto digestivo promueve la germinación de las esporas (Cork y Kenagy 1989, Claridge y cols. 1992). En el caso de los hongos epigeos, Ashkannejhad y Horton (2005) demostraron que las esporas del hongo *Suillus tomentosus* mantienen su viabilidad después de pasar por el tracto digestivo del venado cola negra (*Odocoileus hemionus*) al inocularlas en plántulas de *Pinus contorta*.

## 2. ANTECEDENTES

El estudio de la micofagia se ha enfocado en el consumo de esporomas de hongos hipogeos y epigeos por mamíferos (Ure y Maser 1982, Maser y cols. 1985, Claridge y cols. 1993, Cázares y Trappe 1993, Green y cols. 1999, Ashkannejhad 2003, Bertolino y cols. 2004), su importancia como recurso alimenticio (Cork y Kenagy 1989, Claridge y Cork 1994, Fukushima y cols. 2001), la actividad (Colgan y Claridge 2002) y viabilidad de las esporas después de pasar por el tracto digestivo de los consumidores (Kotter y Farentinos 1984, Lamont y cols. 1985, Miller 1985, Cork y Kenagy 1989, Claridge y cols. 1992, Colgan y Claridge 2002, Ashkannejhad y Horton 2005), así como la importancia de este hábito alimenticio como sistema de dispersión (Frank y cols. 2009). Sin embargo, en nuestro país se han desarrollado pocas investigaciones sobre esta interacción.

En México se tiene registro de micofagia en cerdos (Trappe y Guzmán 1971), y en algunos roedores como el agouti mexicano (*Dasyprocta mexicana*) (Estrada-Croken y cols. 1996). En nidos de la rata montera (*Neotoma mexicana*) se registró la presencia de 11 especies de hongos de los géneros *Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Hygrophorus*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Rhodophyllus*, *Russula*, *Scleroderma* y *Strobilomyces*, sugiriendo que estos hongos son incluidos en su dieta. (Polaco y cols. 1982). No obstante, la información al respecto es escasa y poco precisa.

Entre los estudios directos y sistemáticos enfocados a la determinación de especies micófagas, su interacción con el recurso fúngico, la variación espacial y temporal de esta relación, y la importancia que los animales micófagos podrían tener en la dispersión y establecimiento de las plantas que se asocian con los hongos ectomicorrizógenos se encuentran los siguientes: Durán (2006) demostró que ocho de once especies de ratones silvestres registradas para la zona de La Malinche, incluyen hongos ectomicorrizógenos en su dieta y que los hongos de las familias *Russulaceae* y *Boletaceae* presentan evidencias de consumo a lo largo de su temporada de fructificación. D' Alva y cols. (2007) comprobaron que los ratones *Peromyscus alstoni* y *P.maniculatus* obtienen básicamente agua y muy pocos nutrimentos del hongo *Russula occidentalis* y demostraron que es viable mantener estas especies en cautiverio y manipularlas experimentalmente. Sierra (2007) demostró que las esporas de *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* se mantienen activas después del paso por el tracto digestivo de los ratones *Peromyscus maniculatus* y *Neotomodon alstoni* (aquí citado como *Peromyscus alstoni*).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Existe poco conocimiento acerca de la micofagia, por lo cual es necesario estudiar y comprender las interacciones entre animales micófagos, hongos ectomicorrizógenos y plantas hospederas, que afectan en gran medida el funcionamiento del ecosistema forestal.

En México, particularmente, en el Parque Nacional La Malinche, una zona rica en especies de hongos potencialmente ectomicorrizógenos y de roedores que se alimentan de ellos, se ha encontrado la mayor riqueza de esporas de hongos ectomicorrizógenos en las excretas del ratón de los volcanes (*N. alstoni* aquí citado como *P. alstoni*) y del ratón venado (*P. maniculatus*). No obstante, se ignora qué efecto tiene sobre su capacidad de formación de ectomicorrizas que las esporas de las especies epigeas formadoras de ectomicorrizas pasen por el tracto digestivo de los ratones silvestres antes mencionados. La micofagia podría no afectar la capacidad micorrizógena de las especies de hongos consumidos. Alternativamente podría haber efectos positivos cuando el consumo de los hongos aumenta o potencializa la formación de ectomicorrizas, o en caso contrario efectos negativos si el consumo disminuye esta capacidad.

Esta información contribuirá al conocimiento de la función ecológica de estos ratones silvestres como posibles dispersores o depredadores de las especies epigeas formadoras de ectomicorrizas. Por lo anterior, resulta de gran interés estudiar este sistema, que además ofrece explorar aspectos sobre la dispersión de esporas de hongos epigeos por ratones micófagos, línea de investigación poco estudiada en México.

#### **4. HIPÓTESIS**

Se mantiene la actividad de las esporas después del paso por el tracto digestivo de estos ratones, entonces se esperaría que se mantenga su capacidad de micorrización en plántulas de *Pinus montezumae*, así como, su efectividad en el hospedero.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

Determinar si el paso de las esporas de *L. trichodermophora* y *S. tomentosus* a través del tracto digestivo de los ratones silvestres, *P. alstoni* y *P. maniculatus*, modifica la actividad esporal, capacidad de formar ectomicorrizas en plántulas de *P. montezumae* y su efectividad en el hospedero.

##### **5.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar la actividad esporal de *L. trichodermophora* y *S. tomentosus* obtenidas a partir de excretas después del paso por el tracto digestivo de *P. alstoni* y *P. maniculatus*.
2. Evaluar el porcentaje de colonización ectomicorrízica, supervivencia y crecimiento de plántulas de *P. montezumae* al inocularlas con esporas de *L. trichodermophora* y *S. tomentosus* obtenidas de excretas de *P. alstoni* y *P. maniculatus*.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Sitio de estudio

La captura de los ratones y la recolección de esporomas de los hongos ectomicorrizógenos se llevó a cabo en la Cañada Grande del Parque Nacional La Malinche, localizada en la ladera este del volcán del mismo nombre, en el municipio de Huamantla, Tlaxcala a 19° 05' y 19° 22' N; 97° 53' y 98° 12' O y a 3000-3200 msnm. La precipitación media anual es de 800 mm y la temperatura media anual es de 15° C. El clima es templado y húmedo la mayor parte del año, con una temporada seca y fría de octubre a febrero (Díaz-Ojeda 1992). Se seleccionaron dos ambientes representativos de la Cañada Grande: (1) pastizal (19° 14' 39" Norte, 97° 59' 27" Oeste, a 3131 msnm) con individuos dispersos de *Pinus montezumae* y rodeado por bosques de *Abies religiosa* y (2) bosque de oyamel (19° 14' 40" Norte, 98° 10' 17" Oeste, a 3264 msnm) con *Abies religiosa* como el principal elemento arbóreo, cohabitando con *Pinus montezumae* en las partes bajas y con *Pinus hartwegii* en las partes altas (Acosta y Kong 1991). En este ambiente, también se encuentran algunos manchones de pastizal entremezclado. Según Acosta y Kong (1991), asociados con estos bosques se pueden encontrar numerosas especies de hongos, principalmente ectomicorrizógenos. Así mismo, Durán (2006) encontró en estas zonas fuertes evidencias de micofagia relacionadas con hongos de la familia Boletaceae y Russulaceae.

### 6.2 Sistema estudiado

#### 6.2.1 *Laccaria trichodermophora*

Esta especie pertenece al orden Agaricales y a la familia Tricholomataceae (Hawksworth y cols. 1995). Forma ectomicorrizas en etapas tempranas con numerosas especies de árboles, incluyendo muchas de gran importancia ecológica y económica de los géneros *Pinus*, *Quercus* y *Eucalyptus* entre otros (Kropp y Mueller 1999).

*L. trichodermophora* presenta fructificaciones estipitadas, anuales, dispersas a gregarias. Con píleos hemisféricos, convexos a plano-covexos, de 0.5 - 5 cm de diámetro y a veces algo deprimidos en el centro. Cutícula en condiciones de humedad higrófana, estriada, de color marrón-rojiza, marrón-anaranjada o marrón-rosada. Margen incurvado a plano-decurvado, concoloro a la superficie pelieica, estriado por transparencia en tiempo húmedo y a veces acanalado-lobulado. Láminas adnadas o

sinuadas, subdecurrentes por un fino filamento, espaciadas, con lamélulas y de color rosáceo. Arista entera y de igual color a las láminas. Estípites cilíndricos, curvado o algo sinuoso, de 2.6 (- 8) x 0.2 - 0.6 cm, liso o acanalado, fibroso longitudinalmente, pruinoso en el ápice, presentando la misma coloración que el píleo o ligeramente más claro, de base subbulbosa a bulbosa y blanquecina por restos miceliares. El contexto es del mismo color que la cutícula.

Las esporas son anchamente elipsoidales a ovoides, de 7 - 9 x 6 - 7.5  $\mu\text{m}$ , sin considerar la ornamentación, hialinas con espinas de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  y no amiloides. Trama laminar regular. Basidios claviformes y tetraspóricos. Cistidios marginales cilíndricos, poco visibles. Cutícula filamentosa formada por hifas cilíndricas con fíbulas (Moreno y cols. 1986).

Es una especie cosmopolita que fructifica durante el verano y el otoño (Moreno y cols. 1986). Las esporas de este género se han encontrado en las excretas de algunos mamíferos (Bertolino y cols. 2004, Ashkannejhad y Horton 2005), en tanto esporas de diversas especies del orden Agaricales han sido observadas en excretas de varios roedores registrados La Malinche (Durán 2006). Específicamente en este estudio se observaron esporas de *Laccaria trichodermophora* en excretas de *Peromyscus alstoni*, sugiriendo que este hongo epigeo forma parte de la dieta de este roedor al menos en su temporada de fructificación.

### **6.2.2 *Suillus tomentosus***

Esta especie pertenece al orden Boletales y a la familia Boletaceae (Hawksworth y cols. 1995). Las especies del género *Suillus* exhiben un alto grado de especificidad hospedera con coníferas, siendo hongos ectomicorrizógenos que se asocian exclusivamente con especies de la familia Pinaceae (Singer 1986, Molina y cols. 1992). Se distribuyen en el hemisferio norte coincidiendo con la distribución y diversidad de pináceas.

El píleo mide de 5 a 10 cm, de obtuso a convexo, delgado (8 a 15 mm), de un amarillo pálido que cambia a verde azulado o azul cuando se corta, no tiene olor específico. Los tubos constan de 1 a 2 cm de profundidad con las mismas coloraciones que el píleo (Singer y cols. 1960). El himenio, compuesto por tubos, suele ser de colores claros y brillantes: amarillo y verde. La cutícula es de colores variados, viscosos y pegajosos, característica que diferencia este género. Los estípites

son en algunos casos fibrosos. Sus esporas son ovaladas y de color café o café claro y miden entre 7-10 x 3-4  $\mu\text{m}$ . En el esporoma nunca, o muy rara vez, se pueden encontrar fíbulas pero son comunes en el micelio (Pantidou y Groves 1966).

Se ha demostrado el consumo de especies del género *Suillus* por algunos mamíferos (Bertolino y cols. 2004, Ashkannejhad y Horton 2005). Durán (2006) encontró evidencias de consumo de esporocarpos de especies de la familia Boletaceae en el volcán La Malinche.

### **6.2.3 *Peromyscus alstoni***

Esta especie pertenece al orden Rodentia y a la familia Cricetidae (Stephen y col. 1985), y es comúnmente llamada ratón de los volcanes. Tiene una distribución restringida a las montañas de la Cordillera Volcánica Transversal de México (Hall 1981). Habita en las partes altas de la montaña, por encima de los 2,500 msnm en el zacatón, entre cuyos macollos la población es abundante. Ocasionalmente y en números más reducidos se les encuentra en áreas pedregosas, anegadas, zonas abiertas o perturbadas de pino (Nowak y Paradiso 1983). Sus hábitos alimenticios incluyen hojas, tallos y brotes de hierbas (Ceballos y Galindo 1984), aunque también se alimentan de semillas, frutos, hongos y algunas plantas rastreras que conforman el sotobosque de sus ambientes (Hunt y Maser 1985, Prieto 1988). En épocas de lluvias, los artrópodos parecen ser la base de su dieta (Álvarez y Mayo-Aceves 1993).

La longitud de la cabeza y cuerpo mide entre 100 a 130 mm, y el peso del adulto es de 40 a 60 g. El lomo tiene una coloración grisácea aunque ocasionalmente se torna café. Las partes interiores son blancas, la cola es bicolor (oscura en la parte alta y blanca en la punta) y relativamente cubierta de pelo, las orejas son largas y sin pelo (Nowak y Paradiso 1983).

### **6.2.4 *Peromyscus maniculatus***

Esta especie pertenece al orden Rodentia y a la familia Muridae (Wagner 1845). Es llamado comúnmente ratón ciervo. Se extiende por toda Norteamérica con excepción del sureste de Estados Unidos y el extremo norte del continente. Habita en bosques mixtos, pastizales abiertos y desiertos de muy poca vegetación (Nowak y Paradiso 1983). Tiene una cola bicolor (blanco y negro), las orejas son usualmente más cortas que las patas traseras, la parte de la espalda es parduzca y brillante, la parte baja y

patas son blancas. La longitud total promedio es de 155 a 220 mm, incluyendo la cola, ésta última de 80 a 110 mm, las patas traseras de 19 a 23 mm, las orejas de 18 mm y tiene un peso de 13 a 23 g (Linzey y Linzey 1973). Son estrictamente nocturnos y habitan bajo tierra o entre las cavidades de las rocas. Los nidos son bolas de pasto seco y otros materiales como plumas y pelo de conejo. No hibernan. El período de gestación varía de 22 a 27 días, alcanzando la madurez sexual cuando el macho pierde su coloración “azul”. Tienen un tiempo de vida aproximado de 1 a 2 años, aunque en cautiverio alcanzan los 8 años (Linzey 1998). Su alimentación consta básicamente de semillas, polen, frutos, hongos y algunas plantas rastreras que conforman el sotobosque de sus ambientes (Hunt y Maser 1985, Prieto 1988) aunque también consumen pequeños insectos (Linzey y Linzey 1973).

### **6.2.5 *Pinus montezumae***

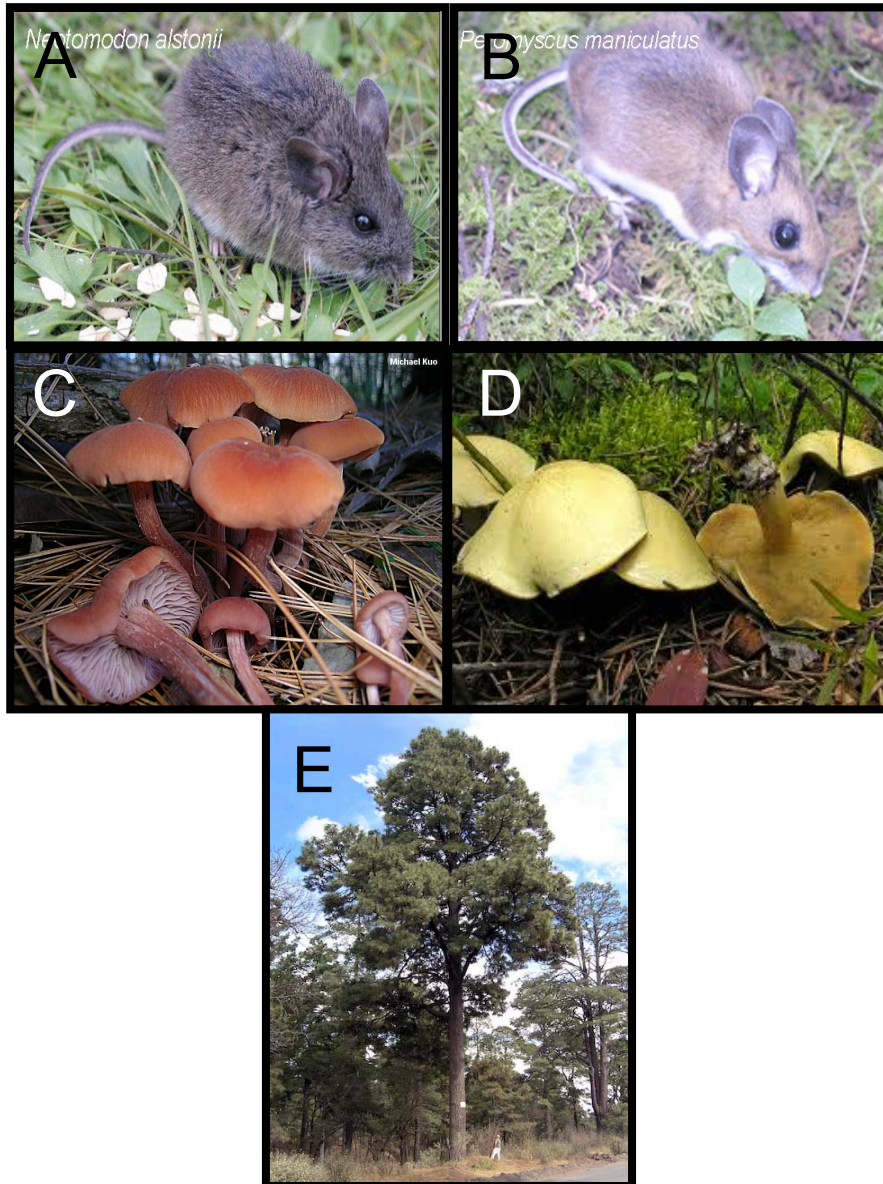
Esta especie pertenece al orden Pinales y a la familia Pinaceae. Ocupa el tercer lugar en abundancia de las coníferas en México y es una especie dominante en el Parque Nacional La Malinche (Cortés y cols. 2004). Se ha comprobado en condiciones de vivero que se asocia con hongos de los géneros *Laccaria* y *Suillus* en etapas juveniles formando ectomicorrizas (Xochitiotzin 2000, Hernández 2003).

Se distribuye fundamentalmente en montañas de la gran cordillera transversal de México, entre 1900-3200 msnm. En México se ha reportado en los estados de Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Veracruz, México, Morelos, el Distrito Federal, Michoacán, Jalisco, Guerrero, Oaxaca y Chiapas. En Guatemala se encuentra en los departamentos de Huehuetenango y Quiché (Perry 1991).

Es un árbol de 10-25 m de altura, de forma variable, con el tronco erecto, algunas veces ramificado, la corteza escamosa o en placas irregulares, grisáceo-parda, las ramillas ásperas, con la base de las brácteas irregularmente espatuladas, contiguas, las yemas y los brotes pequeños, anchos. Hojas erectas, extendiéndose en fascículos de (4) 5, de 15-28 cm de largo, 0.8-1.1 mm de ancho, los márgenes ligeramente aserrados, con 4-9 líneas estomáticas, visibles en la superficie dorsal, la vaina del fascículo de 1-2.8 cm de largo. Microstróbilos en agrupaciones terminales de 8-20, ovoides a cilíndricos, de 1-2.5 cm de largo, rodeados por una roseta de brácteas y escamas lanceoladas pubescentes; megatróbilos (conos) sésiles o cortopedunculados, en grupos de 2-3 alrededor de la ramilla o en ocasiones solitarios, persistentes a los 3-4 años, ovoide-cónicos o ligeramente cilíndricos, frecuentemente



incurvados, de 9-15 (-18.5) cm de largo, 5-8.5 cm de ancho, con la base truncada o redondeada, las escamas ovulíferas pardas, tornándose grisáceas con el tiempo, de 2-2.5 cm de largo x 0.5-1.5 cm de ancho, el umbo ligeramente engrosado, frecuentemente piramidal, la espina débil, caediza; semilla alada, más o menos triangular, parda o negra, de 3-6 mm de largo, el ala de 18-30 mm de largo (Perry 1991).



**Figura 1.** Ilustración de los cinco participantes en la interacción tripartita estudiada: A. *Peromyscus alstoni*; B. *Peromyscus maniculatus*; C. *Laccaria trichodermophora*; D. *Suillus tomentosus*; E. *Pinus montezumae*.

### **6.3 Recolección de material biológico y mantenimiento de ratones silvestres**

En el mes de julio del 2009, se realizaron cuatro estancias cortas en las cercanías de la Estación Científica La Malinche, ubicada en la Cañada Grande del Parque Nacional La Malinche, para la captura de las dos especies de ratones en dos tipos de vegetación que son pastizal, donde se encuentra la mayor población de *P. alstoni*, y bosque de oyamel, donde se encuentra mayor población de *P. maniculatus* (Durán 2006). Para este propósito, se utilizaron trampas Sherman cebadas con avena y vainilla, distribuyendo las trampas en transectos de 7 trampas en fondo, cada transecto constaba de 5 trampas colocadas cada 2 metros y a 2 metros de distancia entre cada transecto. En total se colocaron 35 trampas en cada sitio; se marcaron los sitios en donde se colocaron las trampas y al siguiente día se recolectaron. Los roedores se identificaron con ayuda de claves taxonómicas (Ceballos y Galindo 1984) y del personal del área de Ecología del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, dejándose en libertad las especies diferentes a las requeridas. Se capturaron 30 ratones con un esfuerzo de muestreo de 10 noches: 16 individuos de *P. alstoni* y 14 de *P. maniculatus*.

Para evitar la mortalidad de los ratones debido a las bajas temperaturas en La Malinche, las pruebas de alimentación se realizaron en el Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB), de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, localizado en el municipio de San Felipe Ixtacuixtla, Tlaxcala.

Los ratones se colocaron en jaulas de acrílico (36 x 28 x16 cm) con una rejilla metálica como tapa, un orificio en la parte superior destinado a la colocación del bebedero y aserrín como sustrato. Se separaron los ratones por especie, colocándose de 4 a 6 individuos por jaula.

Los esporomas de las dos especies de hongos se recolectaron en Cañada Grande del Parque Nacional La Malinche. Una vez recolectados se envolvieron en papel encerado y se transportaron en una canasta para mantenerlos frescos hasta el laboratorio donde fueron limpiados con una brocha pequeña. Una parte se usó inmediatamente para las pruebas de alimentación y otra parte se almacenó para su posterior uso a 4° C para su preservación. Estudios previos han mostrado que este método de almacenaje no afectan en la germinación de las esporas, ya sea positiva o negativamente (Cork y Kenagy 1989, Colgan y Claridge 2002).

#### 6.4 Pruebas de alimentación

Después de colocarlos en las jaulas, los ratones permanecieron bajo una dieta de alimento comercial (alimento balanceado) en forma de “pellets” y agua *at libitum* durante tres semanas, para disminuir las probabilidades de contaminación en las excretas con esporas de otros hongos que hubieran sido ingeridos antes de su captura. Durante el período de eliminación de residuos de esporas consumidas previamente, dos individuos murieron por causas desconocidas y uno más por canibalismo, quedando finalmente para el inicio del experimento sólo 14 individuos de *P. alstoni* y 13 individuos de *P. maniculatus* (ver en Tabla 3 la asignación de tratamientos).

Para las pruebas de alimentación, se consideraron dos factores: Factor 1: especie de ratón, *Peromyscus alstoni* y *Peromyscus maniculatus*, Factor 2: especie de hongo ectomicorrizógeno, *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus*.

Debido a la disponibilidad del hongo, las pruebas de alimentación se dividieron en dos etapas, la primera con el hongo *L. trichodermophora* y la segunda con *S. tomentosus*.

En la primera etapa, durante cuatro semanas, se dieron 6 g del píleo del hongo por ratón además de “pellets” de alimento balanceado, esto último debido a que se conoce que los roedores obtienen básicamente agua y muy pocos nutrientes de los esporomas de algunas especies fúngicas (D’Alva 2007). También se consideró un grupo control para cada especie, en este grupo los ratones fueron alimentados sólo con “pellets” de alimento balanceado (Tabla 1).

**Tabla 1.-** Pruebas de alimentación con *Laccaria trichodermophora*. Pa/Lt= *Peromyscus alstoni* alimentado con *Laccaria trichodermophora* más un “pellet” por ratón de alimento balanceado. Pm/Lt= *Peromyscus maniculatus* alimentado con *Laccaria trichodermophora* más un “pellet” por ratón de alimento balanceado. Pa= *Peromyscus alstoni* alimentado con “pellets” de alimento balanceado. Pm= *Peromyscus maniculatus* alimentado con “pellets” de alimento balanceado.

| Especie de hongo                 | Especie de ratón          |                               |
|----------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
|                                  | <i>Peromyscus alstoni</i> | <i>Peromyscus maniculatus</i> |
| <i>Laccaria trichodermophora</i> | 7* Pa/Lt                  | 7 Pm/Lt                       |
| Sin hongo                        | 7 Pa                      | 6 Pm                          |
| Total                            | 14 Pa                     | 13 Pm                         |

\* Número de ratones en cada tratamiento

Posterior a esta primera fase, los ratones se alimentaron durante tres semanas sólo con “pellets” y agua *at libitum* para eliminar todas las esporas de *L. trichodermophora* del tracto digestivo de los ratones y evitar así la contaminación de la siguiente prueba de alimentación. Esto se comprobó mediante observaciones al microscopio y conteo de esporas en muestras tomadas directamente de las excretas de los ratones.

La segunda fase del experimento consistió en alimentar a los ratones durante cuatro semanas con la misma dosis de pileo del hongo *S. tomentosus* y “pellets” de alimento comercial, como se había explicado anteriormente. Esta fase inició con el mismo número de individuos por especie que la fase anterior (ver Tabla 3). Sin embargo, al término de la primera semana se murieron 5 individuos de cada especie por causas desconocidas y las tres semanas restantes del experimento se realizaron sólo con 9 individuos de *P. alstoni* y 8 de *P. maniculatus* (ver en Tabla 2 la asignación de tratamientos).

**Tabla 2.-** Pruebas de alimentación con *Suillus tomentosus*. Pa/St= *Peromyscus alstoni* alimentado con *Suillus tomentosus* más un “pellet” por ratón de alimento balanceado. Pm/St= *Peromyscus maniculatus* alimentado con *Suillus tomentosus* más un “pellet” por ratón de alimento balanceado. Pa= *Peromyscus alstoni* alimentado con “pellets” de alimento balanceado. Pm= *Peromyscus maniculatus* alimentado con “pellets” de alimento balanceado.

| Especie de hongo          | Especie de ratón          |                               |
|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|
|                           | <i>Peromyscus alstoni</i> | <i>Peromyscus maniculatus</i> |
| <i>Suillus tomentosus</i> | 5* Pa/St                  | 4 Pm/St                       |
| Sin hongo                 | 4 Pa                      | 4 Pm                          |
| Total                     | 9 Pa                      | 8 Pm                          |

\* Número de ratones en cada tratamiento

La duración del ensayo fue de 14 semanas en total. Al término de este tiempo, los especímenes fueron liberados al mismo hábitat en donde fueron capturados.

## **6.5 Procesamiento de excretas**

### **6.5.1 Recolección de excretas**

Las excretas de los roedores se recolectaron diariamente durante la limpieza de las jaulas, guardándolas en pequeños sobres de papel encerado, etiquetados con la fecha y tratamiento, y se almacenaron en refrigeración a 4° C hasta el término de las pruebas de alimentación. Se consideraron 81 g de excretas frescas por tratamiento.

### **6.5.2 Procesamiento de muestras**

Las excretas se transfirieron a matraces Erlen-meyer de 250 ml y se les añadió 40 ml de agua destilada, la solución se agitó durante 30 min aproximadamente hasta disolver las excretas completamente. Las muestras se pasaron posteriormente por un tamiz de 0.5 mm de diámetro de apertura y después por otro de 0.177 mm de diámetro, para eliminar restos de materia orgánica y de aserrín. Enseguida, se aforaron a 400 ml y se transfirieron a frascos de vidrio de 1000 ml debidamente tapados y etiquetados con los datos de los diferentes tratamientos, manteniéndolos en refrigeración a 4° C. A partir de estas muestras de excretas se llevaron a cabo los conteos totales de esporas y las diluciones para las siguientes pruebas.

Como grupo control se utilizaron esporomas de *L. trichodermophora* y de *S. tomentosus* que no pasaron por el tracto digestivo de los ratones. Éstos se licuaron añadiendo 40 ml de agua destilada a una velocidad media durante 3 min, enseguida se colocaron en frascos de 1000 ml aforando a 400 ml y se almacenaron en refrigeración a 4° C. Estudios previos han mostrado que esta forma de procesamiento no afecta el índice de germinación de las esporas de hongos (Claridge y cols. 1992, Colgan y Claridge 2002).

## **6.6 Cuantificación de esporas**

Con la finalidad de conocer el número de esporas presentes por ml en cada uno de los tratamientos, se realizó una cuantificación de esporas por el método de la cámara de NeuBauer. Con una pipeta Pasteur, se colocó una gota de la muestra sobre la cámara de NeuBauer y se observó en un microscopio de campo claro con el objetivo de 40X; se contaron las esporas observadas en cada uno de los 16 cuadros que conforman cada una de las cuatro retículas periféricas y en los 25 cuadros que conforman la retícula central. Se sumó el número de esporas contadas en cada retícula y se dividió entre cinco para obtener un promedio. Como las retículas tienen 1 mm<sup>2</sup> de superficie y 0.1

mm de profundidad, el número promedio obtenido es el que se encuentra en  $0.1 \text{ mm}^3$  de la muestra, es decir 0.0001 ml. El número de esporas por ml se obtiene con la siguiente fórmula:

$$X = \frac{\text{Promedio No. de esporas (1ml)}}{0.0001}$$

Esta determinación permite conocer el número de esporas promedio por unidad de volumen y con ello determinar que la cantidad de esporas a inocular sea la misma (Sot y cols. 1996).

### **6.7 Evaluación de la actividad metabólica esporal**

En las esporas de los hongos es posible reconocer dos fases o estados: actividad o reposo, una espora activa es aquella que presenta respiración mitocondrial activa, es decir, presencia de actividad metabólica (Torres-Martínez 1992), en cambio una espora en reposo es aquella que suspende temporalmente esta actividad, definiendo el estado de reposo como un período de interrupción reversible del desarrollo fenotípico de un organismo (Sussman 1966a, b). Dicho estado de reposo se puede modificar al someterse a un cambio de luz, temperatura, sustancias químicas o compuestos naturales que se encuentran en el medio que las rodea (Torres-Martínez 1992).

Para conocer el porcentaje de esporas activas se utilizó la técnica de tinción esporal con sales de tetrazolio (MTT) (Santiago-Martínez y Estrada-Torres 1999). En la técnica de MTT, las mitocondrias de las esporas activas se tiñen de morado debido a la liberación de succinato-deshidrogenasa, una de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos que en los hongos está restringida a algunos sitios en las mitocondrias activas y que reacciona con las sales de tetrazolio (Miller y cols. 1992) Las sales de tetrazolio forman un compuesto de color rojo violeta conocido como formazán cuando son reducidas por las mitocondrias que están respirando activamente (Santiago-Martínez y Estrada-Torres 1999). Para esta técnica se prepararon los siguientes reactivos:

- a) MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-y 1)-bromuro de 2,5-difeniltetrazolio) al 1%: 0.5 g de MTT aforados en 50 ml de alcohol al 96%.
- b) Tampón fosfato sódico 0.005 M a pH 7.
- c) Ácido succínico 0.05 M: 0.295 g de ácido succínico en 50 ml de agua destilada.

Los reactivos se conservaron en refrigeración (4° C), pero antes de iniciar el proceso de tinción, tanto las muestras de las excretas como los reactivos se mantuvieron a temperatura ambiente.

Se prepararon 12 tubos de ensayo de cada tratamiento con la siguiente mezcla: 1 ml de muestra (0.20 g/ml de excreta disuelta), 1 ml de buffer de referencia, 1 ml de solución de ácido succínico y 1 ml de MTT al 1%. Enseguida, los tubos se incubaron dos horas a 37°C en baño maría. Después del período de incubación se tomó una alícuota por cada tubo y se observó al microscopio óptico con la ayuda de la cámara de NeuBauer. Se consideraron esporas activas aquéllas que presentaron tinción de color rojo violeta que corresponden con el formazán formado por la reducción del MTT por la succinato-deshidrogenasa. Las esporas del tratamiento control de ambas especies fueron procesadas de la misma manera que las obtenidas de las excretas.

### **6.8 Cuantificación de esporas activas**

La cuantificación de esporas activas y no activas, del control y de los tratamientos, se llevó a cabo por microscopía óptica de campo claro a 40 X mediante la utilización de la cámara de NeuBauer siguiendo la técnica de conteo propuesta por Sot y cols. (1996) ya previamente descrita.

### **6.9 Inoculación de plántulas de *Pinus montezumae* con esporas provenientes de las excretas de los ratones.**

Esta parte de la investigación se realizó en el invernadero del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Las semillas de *P. montezumae* fueron donadas por el banco de germoplasma del vivero de San Luis Tlaxialtemalco, Xochimilco, D. F. y proceden de San Andrés Hueyacatitla, Puebla, sitio que presenta condiciones climatológicas similares a las de la Cañada Grande en el Parque Nacional La Malinche.

Las semillas se desinfectaron en un proceso que consta de dos etapas: en la primera se agitaron por un lapso de una hora en una mezcla de peróxido de hidrógeno al 30% (esta proporción favorece la escarificación), después se lavaron con agua destilada y se colocaron en una solución fungicida (Benomil 1g/l) y se mantuvieron en refrigeración por 24 h, con la finalidad de romper el estado de latencia de las semillas. En la segunda etapa se lavaron con agua destilada y se colocaron en una



solución bactericida (cloranfenicol 30mg/l) por un tiempo de 30 min; en seguida se lavaron con agua destilada hasta eliminar el rastro de cualquier sustancia.

Las plántulas de *P. montezumae* se obtuvieron a través de los métodos convencionales usados en los viveros, utilizando como sustrato una mezcla de vermiculita/turba en una proporción 2:1. Cuando las plántulas tuvieron 50 días fueron trasplantadas a contenedores forestales de plástico con capacidad de 250 ml. Posteriormente, se inocularon con un volumen equivalente a 10<sup>6</sup> esporas provenientes de los diferentes tratamientos y el control.

### 6.10 Diseño experimental

Para evaluar la actividad de las esporas se hizo un diseño aleatorizado de medidas independientes, teniendo 12 repeticiones por tratamiento. Para los tratamientos de inoculación se realizó un diseño de dos factores 3 X 3, arreglado en bloques al azar, contemplando nueve tratamientos como se muestra en la Tabla 3.

**Tabla 3.-** Diferentes tratamientos de inoculación. U= Universal (plántulas no inoculadas), Pa= Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus alstoni*. Pm=Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus maniculatus*, Lt= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Laccaria trichodermophora*, St= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Suillus tomentosus*. Pa/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pa/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pm/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*. Pm/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*.

| <b>Tratamiento con especie de ratón</b> |  |  |                          |
|---|--|--|--------------------------|
| <b>Tratamiento con especie de hongo</b> | Excretas de<br><i>Peromyscus alstoni</i> | Excretas de<br><i>Peromyscus maniculatus</i> | Sin excretas de<br>ratón |
| <i>Laccaria trichodermophora</i>        | Pa/Lt                                    | Pm/Lt  | Lt                       |
| <i>Suillus tomentosus</i>               | Pa/St                                    | Pm/St  | St                       |
| Sin hongo                               | Pa                                       | Pm   | U                        |

Se consideraron 30 plántulas para cada tratamiento por bloque y cuatro bloques, con un total de 120 plántulas por tratamiento.

Para conocer el efecto de la inoculación con las esporas en las excretas, se realizaron tres evaluaciones bimestrales. Se eligieron dos plántulas por tratamiento por bloque para evaluar el porcentaje de colonización micorrízica, la biomasa de la parte aérea y del sistema radical, contemplando en total ocho plántulas para cada variable. Para evaluar la altura y el porcentaje de supervivencia se eligieron 10 plántulas por tratamiento por bloque. Al seleccionar las plántulas para cada tratamiento se hizo una cuadrícula para elegirlos al azar (muestreo aleatorio simple).

### **6.11 Evaluación de variables.**

Para calcular el porcentaje de micorrización se contaron las raíces secundarias colonizadas y no colonizadas de cada plántula. Para determinar la biomasa aérea y biomasa radical, cada plántula se separó la parte aérea y la radical, ambas se colocaron en bolsas de papel de estraza y se secaron en una estufa a 60° C durante dos días hasta alcanzar peso constante. Para estimar la altura, se midió la plántula desde la base del tallo a la acícula más larga. La supervivencia se evaluó contando las plántulas vivas en tres diferentes tiempos (2, 4 y 6 meses después de la inoculación).

### **6.12 Análisis estadísticos**

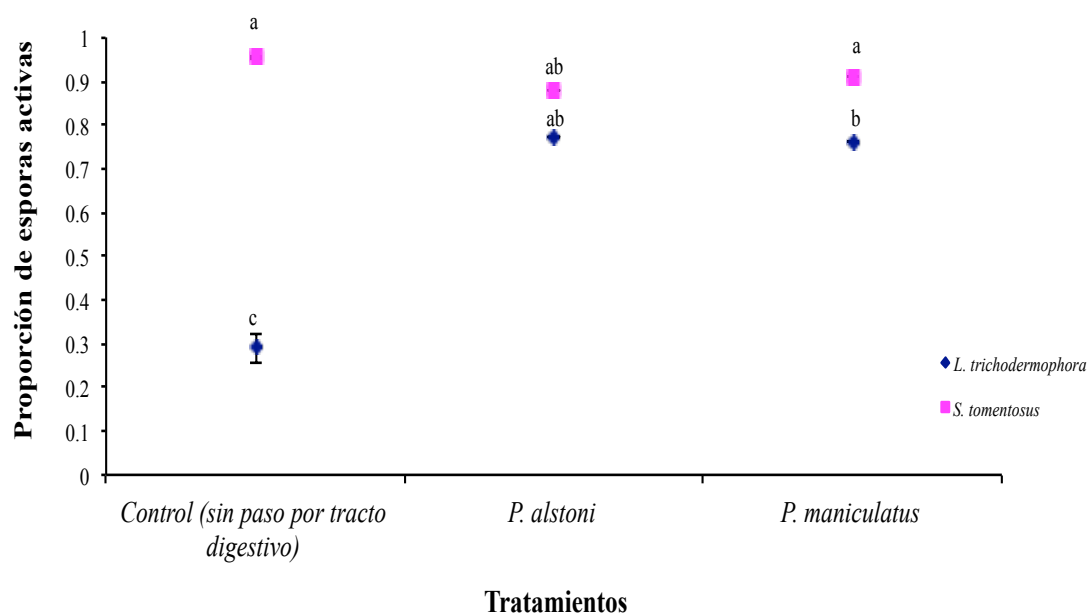
Los datos obtenidos en proporciones de esporas activas se analizaron con un ANOVA de dos vías para datos no paramétricos mediante un modelo cuasibinomial con el programa R (Verzani 2005).

Los datos del porcentaje de colonización y supervivencia fueron analizados mediante  $X^2$  y tablas de contingencia. Para las variables de crecimiento (altura, biomasa radicular y biomasa aérea) se utilizó un análisis de varianza de dos vías para un diseño de bloques al azar (Zar 1984).

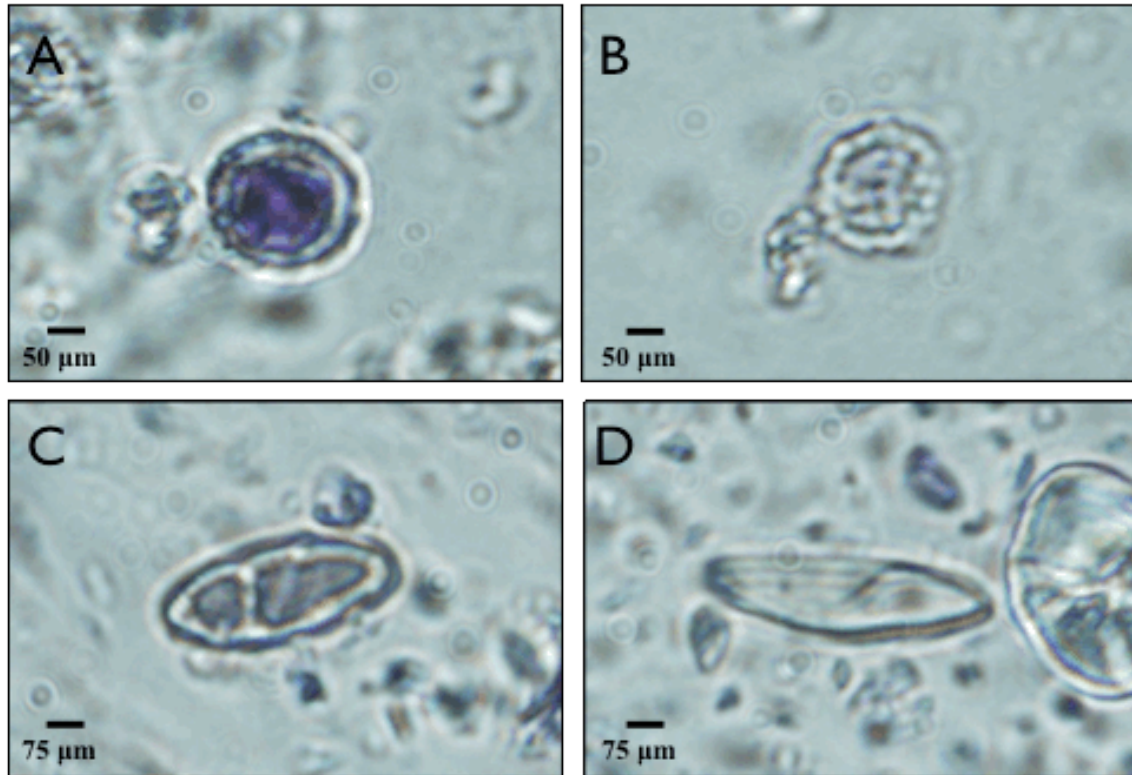
## 7. RESULTADOS

### 7.1 Actividad metabólica esporal

La proporción de esporas activas de *L. trichodermophora* aumentó más de 2.5 veces ( $P < 0.05$ , Figura 2) al pasar por el tracto digestivo de cualquiera de las especies de ratón (*P. alstoni* 0.772 y *P. maniculatus* 0.761) comparado con la proporción de esporas activas que no fueron ingeridas (0.289). Sin embargo, entre los dos tratamientos con ratones no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Por el contrario, no hubo diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) en la proporción de esporas activas de *S. tomentosus* entre el control (0.95) y tratamientos (0.87 para *P. alstoni* y 0.91 para *P. maniculatus*). Así mismo, entre los dos tratamientos con ratones no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ).



**Figura 2.-** Efecto de la micofagia en la proporción de esporas activas de los hongos *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus*. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas. Cada punto corresponde con la media de 12 réplicas  $\pm$  error estándar.



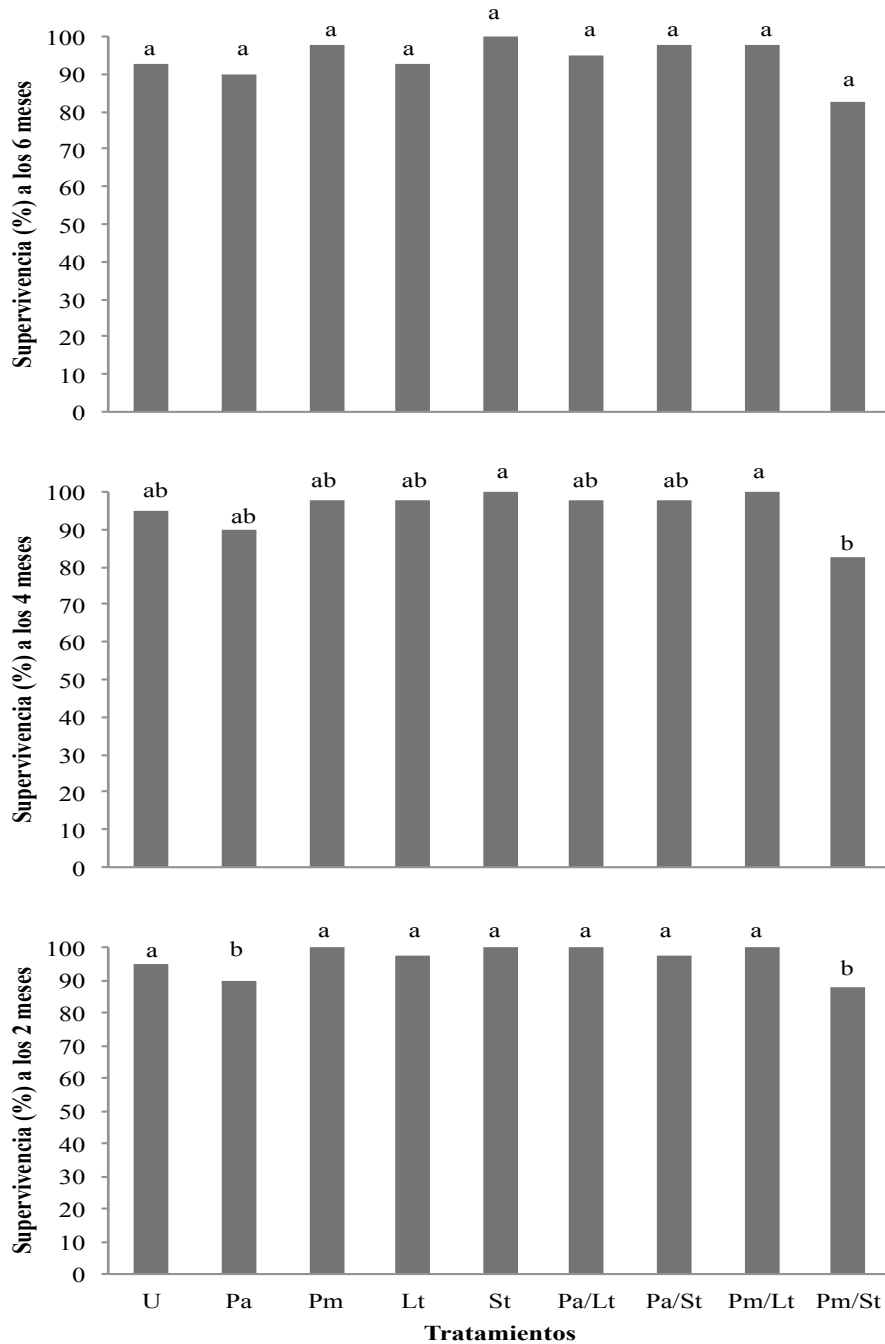
**Figura 3.** Esporas de *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* teñidas con sales de tetrazolio (MTT). **A.** Espora teñida de *Laccaria trichodermophora* (espora activa); **B.** Espora no teñida de *Laccaria trichodermophora* (espora no activa); **C.** Espora teñida de *Suillus tomentosus* (espora activa); **D.** Espora no teñida de *Suillus tomentosus* (espora no activa).

## 7.2 Supervivencia

La supervivencia de las plántulas a los dos meses después de la inoculación y trasplante muestra una variación entre tratamientos que va de 87.5% en las plántulas inoculadas con esporas de *S. tomentosus* que pasaron por el tracto digestivo de *P. maniculatus* a 100% en plántulas inoculadas con esporas de *L. trichodermophora* que pasaron por tracto digestivo de ambos ratones y los controles St y Pm. La supervivencia de las plántulas inoculadas con excretas de *P. alstoni* no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) con relación a las inoculadas con excretas de *P. maniculatus* alimentado con *S. tomentosus*, pero si con el resto de los tratamientos, cuyos porcentajes de supervivencia oscilaron entre 95 y 100% (Figura 4).

La supervivencia de las plántulas a los cuatro meses muestra una variación entre tratamientos que va de 82.5% en las plántulas inoculadas con esporas de *S. tomentosus* que pasaron por tracto digestivo de *P. maniculatus* a 100% en plántulas inoculadas con esporas de *L. trichodermophora* que pasaron por tracto digestivo de *P. maniculatus* y plántulas inoculadas con esporas del tratamiento control de *S. tomentosus*. La supervivencia de las plántulas inoculadas con esporas del tratamiento control de *S. tomentosus* y el tratamiento Pm/Lt presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) con relación a las inoculadas con esporas de *S. tomentosus* que pasaron por tracto digestivo de *P. maniculatus*. Este último tratamiento (Pm/St) a su vez no tuvo diferencias significativas con los demás tratamientos (Figura 4).

A los seis meses la supervivencia de las plántulas muestra una variación igual que los cuatro meses. No se presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos. (Figura 4).



**Figura 4.** Supervivencia de plántulas de *Pinus montezumae* a los 2, 4 y 6 meses posterior a la inoculación. U= Universal (plántulas no inoculadas), Pa= Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus alstoni*. Pm=Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus maniculatus*, Lt= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Laccaria trichodermophora*, St= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Suillus tomentosus*. Pa/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pa/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pm/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*. Pm/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas. Cada punto corresponde a la media de 10 réplicas.

### 7.3 Colonización micorrízica

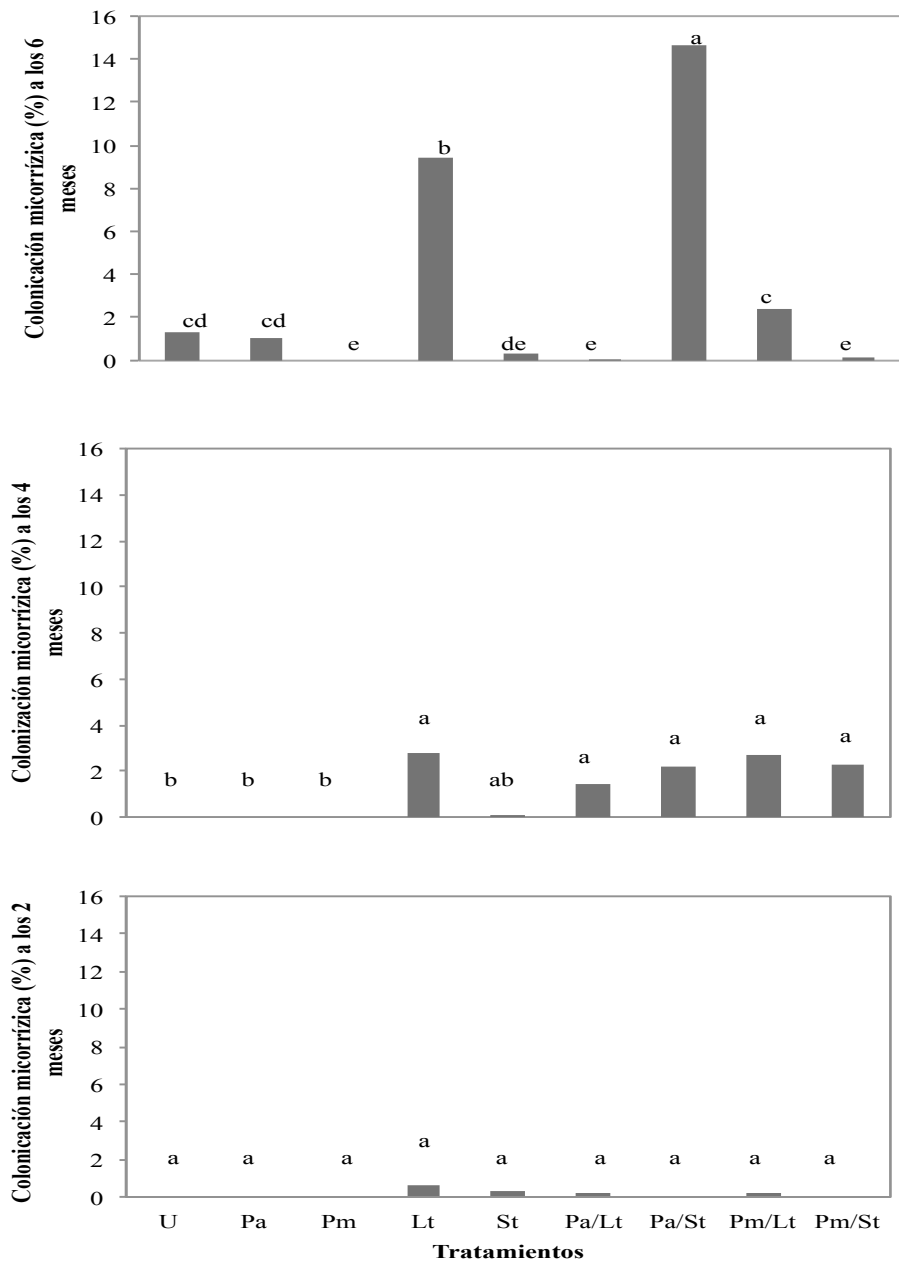
Los porcentajes de micorrización en las plántulas a los dos meses después de la inoculación presentaron una variación entre tratamientos que va de 0% en las plántulas inoculadas con esporas de *S. tomentosus* que pasaron por tracto digestivo de ambas especies de ratones a 0.7% en plántulas inoculadas con esporas de *L. trichodermophora*. Los porcentajes de micorrización en las plántulas de los diferentes tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) entre ellos (Figura 5).

Los porcentajes de micorrización en las plántulas a los cuatro meses muestra una variación entre tratamientos que va de 0% en las plántulas adicionadas con excretas de los dos diferentes ratones y el control universal, a 2.8% en plántulas inoculadas con esporas de *L. trichodermophora*. Los porcentajes de micorrización de las plántulas inoculadas con esporas de hongos que pasaron o no por el tracto digestivo de ambas especies de ratón variaron entre 0.1 y 2.8% y presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.005$ ) con relación a las plántulas adicionadas con excretas de los dos diferentes ratones y el control universal, pero no hubo diferencias entre ellos (Figura 5).

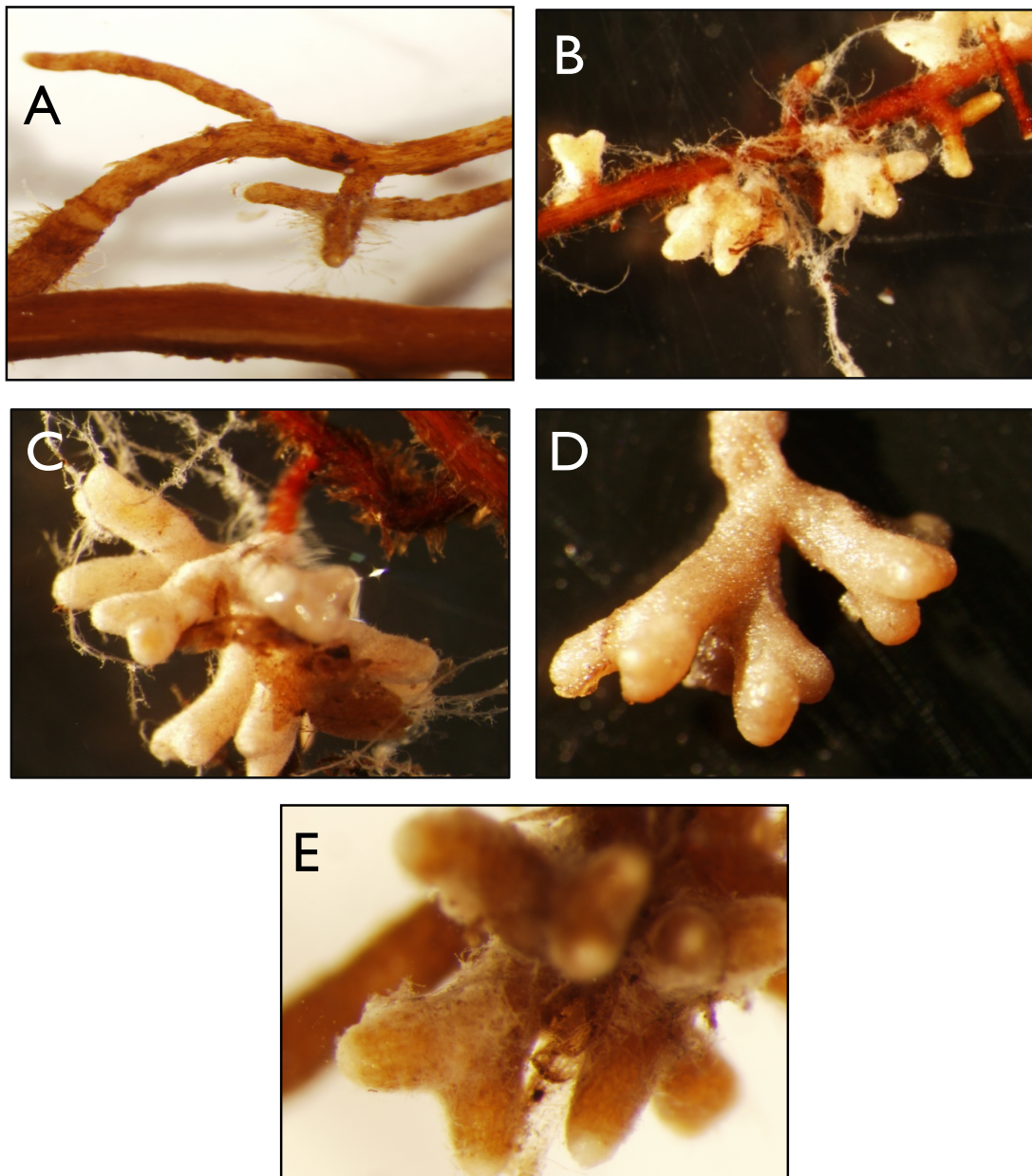
A los seis meses se muestra contaminación en los tratamientos de control universal (U) y en aquel donde las plántulas se inocularon únicamente con excretas de *P. alstoni* (Pa), detectándose hasta 1.28% de colonización micorrízica. Alternativamente es posible que en el curso del experimento haya habido contaminación por movimiento del sustrato por riego, vía insectos entre los tratamientos. Sin embargo al mismo tiempo este resultado indica que cualquiera que sea la causa el efecto en porcentaje de colonización es pequeño. En contraste cuando se agregaron excretas de *P. maniculatus* no se detectó colonización micorrízica. Respecto a los porcentajes de micorrización en las plántulas inoculadas con los demás tratamiento, los valores oscilaron de 0% en las plántulas inoculadas con excretas de *P. maniculatus* a 14.7% en plántulas inoculadas con esporas de *S. tomentosus* que pasaron por el tracto digestivo de *P. alstoni*. El porcentaje de micorrización en las plántulas inoculadas con esporas de *S. tomentosus* que pasaron por tracto digestivo de *P. alstoni* presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) con el resto de los tratamientos. A su vez, las plántulas inoculadas con esporas de *L. trichodermophora* que no pasaron por tracto digestivo también tuvieron un porcentaje de micorrización estadísticamente diferentes de los otros tratamientos. Los

tratamientos inoculados con esporas de *S. tomentosus*, ya sea que hayan pasado por tracto digestivo o no de *P. maniculatus*, y las plántulas inoculadas con excretas de *P. alstoni* alimentado con *L. trichodermophora*, no presentaron diferencias estadísticas con las plántulas adicionadas con excretas de *P. maniculatus*, con porcentajes de micorrización que oscilaron entre 0 y 0.4% (Figura 5).





**Figura 5.** Porcentaje de micorrización en plántulas de *Pinus montezumae* a los 2, 4 y 6 meses posterior a la inoculación. U= Universal (plántulas no inoculadas), Pa= Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus alstoni*. Pm=Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus maniculatus*, Lt= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Laccaria trichodermophora*, St= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Suillus tomentosus*. Pa/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pa/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pm/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*. Pm/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas. Cada punto corresponde a la media de 8 réplicas.



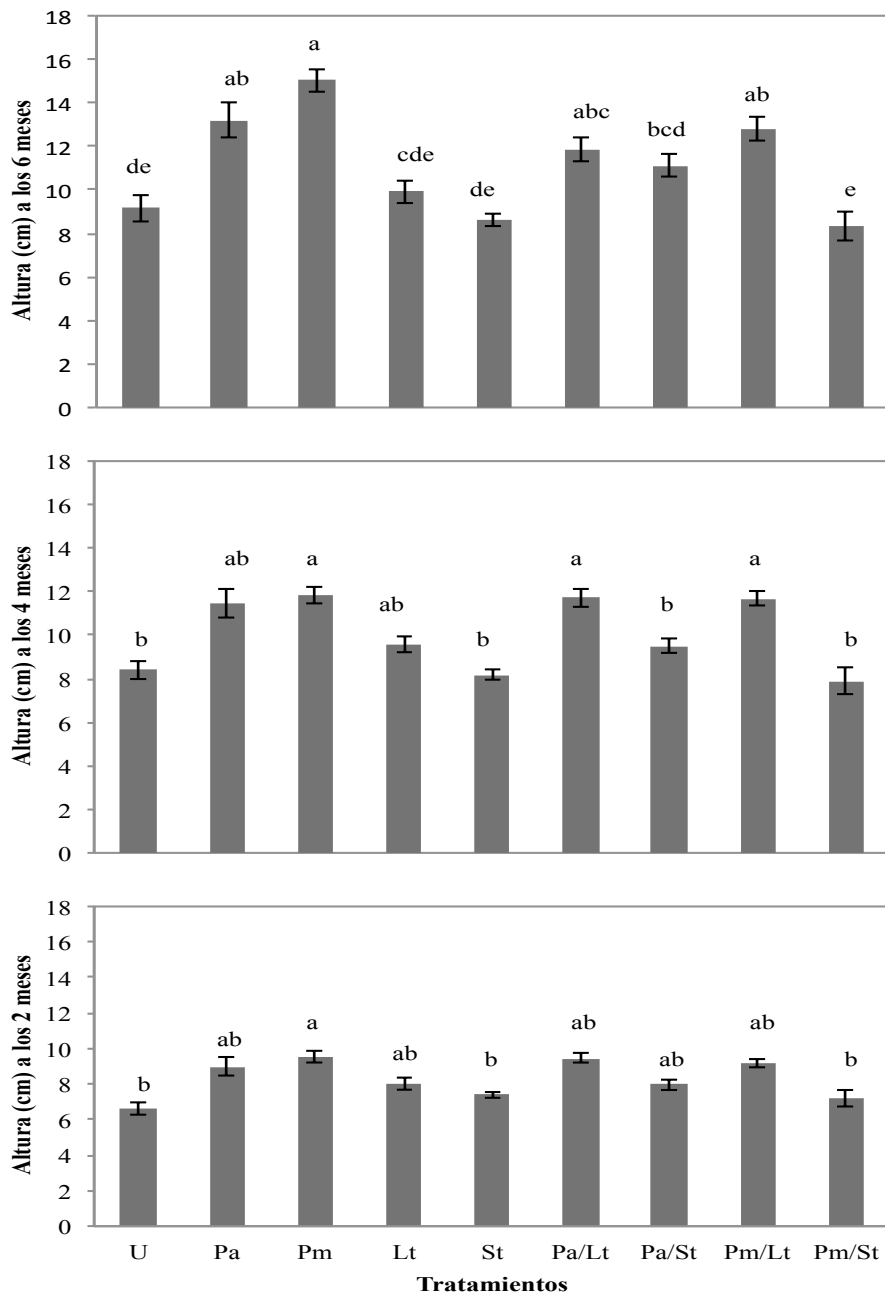
**Figura 6.** Micorrización en los diferentes tratamientos de inoculación. **A.** Raíz sin micorriza del tratamiento control universal (U= Plántulas no inoculadas); **B.** Raíz micorrizada con esporas de *Laccaria trichodermophora* consumidas por *Peromyscus alstoni* (Pa/Lt); **C.** Raíz micorrizada con esporas de *Laccaria trichodermophora* consumidas por *Peromyscus maniculatus* (Pm/Lt); **D.** Raíz micorrizada con esporas de *Suillus tomentosus* consumidas por *Peromyscus maniculatus* (Pm/St); **E.** Raíz micorrizada con esporas de *Suillus tomentosus* consumidas por *Peromyscus alstoni* (Pa/St).

#### 7.4 Altura

La altura de las plántulas a los dos meses muestra una fluctuación entre tratamientos de 6.61 cm en las plántulas no inoculadas (U) a 9.55 cm en plántulas adicionadas con las excretas de *P. maniculatus*. Éstas últimas presentaron alturas con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a las inoculadas con las esporas de *S. tomentosus* que pasaron o no por tracto digestivo de *P. maniculatus* y la del control universal (U), no así con los demás tratamientos, con valores que oscilan entre 7.96 y 9.55 cm (Figura 7).

A los cuatro meses los valores variaron de 7.89 cm en plántulas inoculadas con esporas de *S. tomentosus* que pasaron por tracto digestivo de *P. maniculatus* a 11.83 cm en plántulas adicionadas con excretas de *P. maniculatus*. La altura de las plántulas inoculadas con excretas de *P. maniculatus* presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) con relación a las inoculadas con esporas de *S. tomentosus* que pasaron o no por el tracto digestivo de los diferente ratones y el control universal, no así con los tratamientos restantes con valores que oscilan entre 9.58 y 11.83 cm (Figura 7).

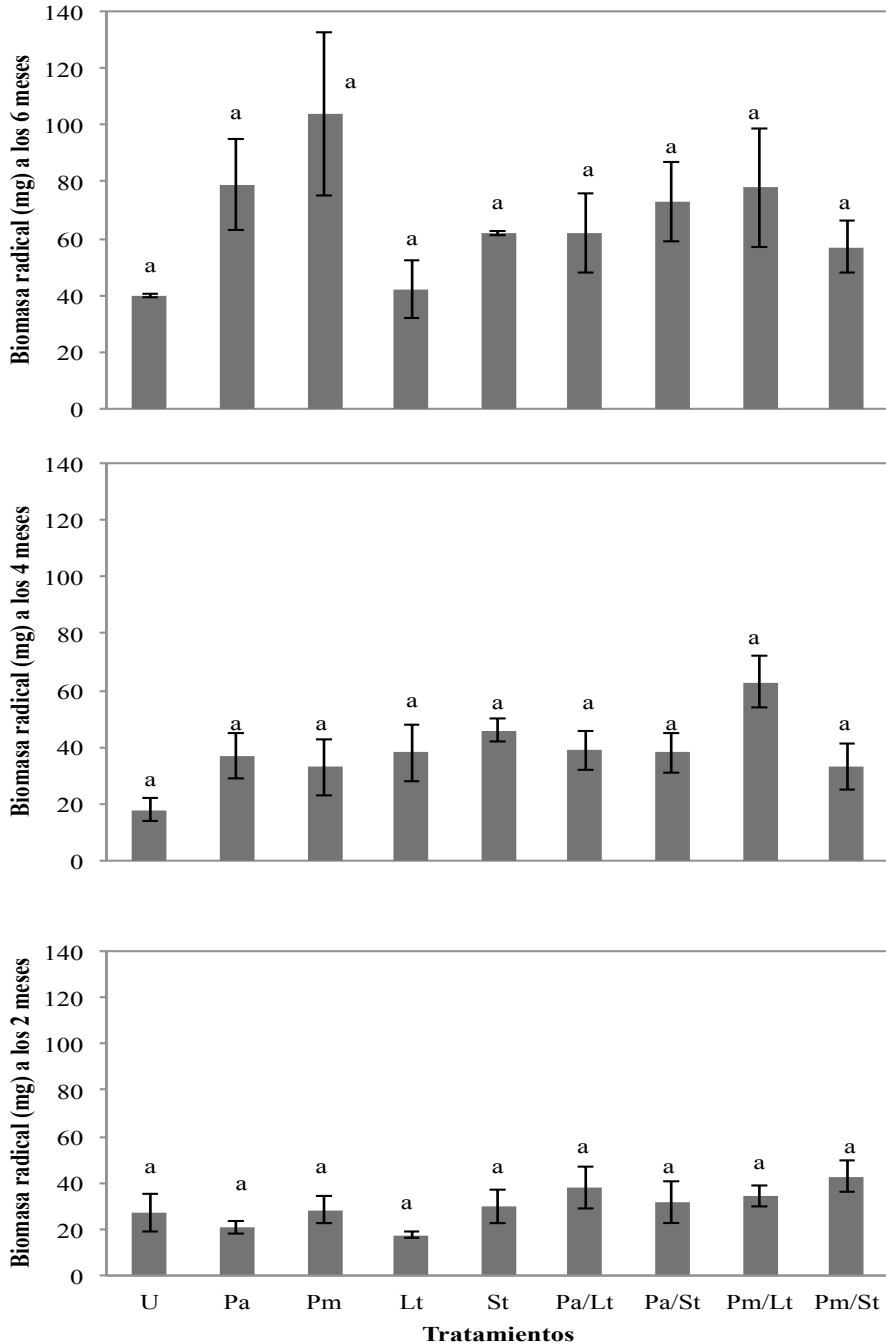
La altura de las plántulas inoculadas con excretas de *P. maniculatus* (15.03 cm) a los seis meses no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a las plántulas inoculadas con esporas de *L. trichodermophora* que pasaron por el tracto digestivo de los diferentes ratones y las plántulas inoculadas con excretas de *P. alstoni*, pero si con el resto de los tratamientos ( $P < 0.05$ ) con valores que oscilan entre 8.32 y 11.11 cm (Figura 7).



**Figura 7.** Altura de plántulas de *Pinus montezumae* a los 2, 4 y 6 meses posterior a la inoculación. U= Universal (plántulas no inoculadas), Pa= Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus alstoni*. Pm=Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus maniculatus*, Lt= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Laccaria trichodermophora*, St= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Suillus tomentosus*. Pa/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pa/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pm/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*. Pm/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas. Cada punto corresponde a la media de 12 réplicas  $\pm$  error estándar.

### **7.5 Biomasa radical**

La biomasa radical de las plántulas, aunque a los dos meses después de la inoculación mostró una variación entre tratamientos que va de 17.63 mg en las plantas inoculadas con esporas de *L. trichodermophora* a 42.75 mg en plántulas inoculadas con esporas de *S. tomentosus* que pasaron por tracto digestivo de *P. maniculatus*, a los cuatro meses varió de 18 mg en las plántulas que no se inocularon (U) a 63 mg en plántulas inoculadas con esporas de *L. trichodermophora* que pasaron por tracto digestivo de *P. maniculatus*, y a los seis meses la variación fue de 40 mg en las plántulas que no se inocularon (U) a 104 mg en plántulas inoculadas con excretas de *P. maniculatus*. No se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos durante las tres evaluaciones (Figura 8).



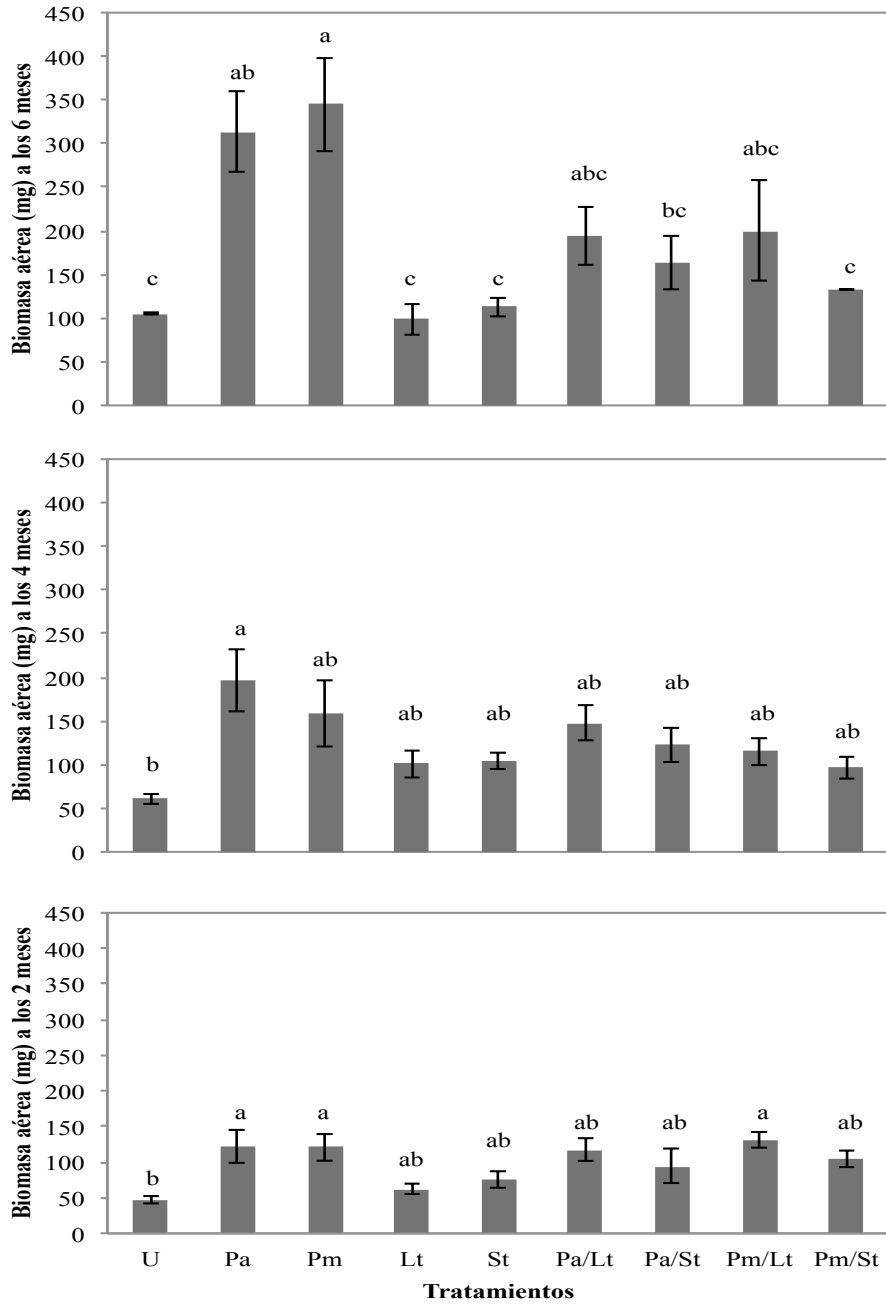
**Figura 8.** Biomasa radical de plántulas de *Pinus montezumae* a los 2, 4 y 6 meses posterior a la inoculación. U= Universal (plántulas no inoculadas), Pa= Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus alstoni*. Pm=Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus maniculatus*, Lt= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Laccaria trichodermophora*, St= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Suillus tomentosus*. Pa/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pa/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pm/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*. Pm/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas. Cada punto corresponde a la media de 8 réplicas  $\pm$  error estándar.

## 7.6 Biomasa aérea

La biomasa aérea de las plántulas inoculadas con las excretas de los diferentes ratones y de las plántulas inoculadas con las excretas de *P. maniculatus* alimentado con *L. trichodermophora* presenta diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) con las plántulas que no se inocularon (U). (Figura 9). Los valores fluctuaron de 46.75 mg en las plántulas que no se inocularon (U) a 122.88 mg en las plántulas inoculadas con excretas de *P. alstoni*.

La biomasa aérea de las plántulas a los cuatro meses mostró una variación entre los tratamientos que va de 61 mg en las plántulas que no se inocularon (U) a 196 mg en las plántulas inoculadas con excretas de *P. alstoni*. La biomasa aérea de las plántulas inoculadas con excretas de *P. alstoni* presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto las plántulas que no se inocularon (U), no así, con los demás tratamientos, con valores que oscilan entre 96 y 196 mg (Figura 9).

A los seis meses la biomasa aérea de las plántulas la variación entre tratamientos fue de 99 mg en las plántulas inoculadas con esporas de *L. trichodermophora* a 345 mg en las plántulas inoculadas con excretas de *P. maniculatus*. La biomasa aérea de las plántulas inoculadas con excretas de *P. maniculatus* no presentó diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) con respecto las plántulas inoculadas con esporas de *L. trichodermophora* que pasaron por tracto digestivo de ambas especies de ratón y con las plántulas inoculadas con excreta de *P. alstoni*, pero si con los tratamientos restantes, con valores que oscilan entre 99 y 164 mg (Figura 9).



**Figura 9.** Biomasa aérea de plántulas de *Pinus montezumae* a los 2, 4 y 6 meses posterior a la inoculación. U= Universal (plántulas no inoculadas), Pa= Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus alstoni*. Pm=Plántulas inoculadas con la excreta de ratón de *Peromyscus maniculatus*, Lt= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Laccaria trichodermophora*, St= Plántulas inoculadas con esporas del hongo *Suillus tomentosus*. Pa/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pa/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus alstoni*. Pm/Lt= Plántulas inoculadas con esporas de *Laccaria trichodermophora* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*. Pm/St= Plántulas inoculadas con esporas de *Suillus tomentosus* obtenidas de las excretas de *Peromyscus maniculatus*. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticas significativas. Cada punto corresponde a la media de 8 réplicas  $\pm$  error estándar.



## 8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó por primera vez en México, mediante pruebas experimentales, el efecto de la micofagia sobre la actividad esporal y la capacidad de formación de micorrizas en hongos epigeos. Los datos obtenidos demostraron que la actividad de las esporas de *S. tomentosus* se mantiene después de pasar por el tracto digestivo de ambas especies de ratón, con respecto a las esporas que no pasaron por el tracto (control). Para el caso de *L. trichodermophora*, la actividad aumentó cuando las esporas pasaron por el tracto digestivo de ambos ratones. Colgan y Claridge (2002) encontraron la misma tendencia de mantener o aumentar la actividad de las esporas después de pasar por el tracto digestivo de micófagos con respecto al control, con pruebas de alimentación similares aunque con otro sistema de estudio. Dichas pruebas consistieron en alimentar a tres especies de pequeños mamíferos micófagos (*Tamias townsendi*, *Glaucomys sabrinus* y *Clethrionomys californicus*) con el hongo hipogeo *Rhizopogon vinicolor*, encontrando que el porcentaje de esporas activas se mantuvo o aumentó después de pasar por el tracto digestivo de los micófagos en estudio con relación al control (esporas que no pasaron por tracto digestivo y que fueron procesados de la misma forma que en este estudio).

Cabría esperar que a mayor porcentaje de actividad metabólica de las esporas se obtuviera mayor porcentaje de colonización de las raíces de las plántulas hospederas. Por lo tanto, considerando los efectos observados sobre la actividad esporal después de ser ingeridas por *P. alstoni* y *P. maniculatus*, no se esperarían diferencias en la colonización micorrízica producida en los tratamientos con esporas de *S. tomentosus* ya que la actividad esporal no cambió en los distintos tratamientos. En contraste, dado que la actividad esporal de *L. trichodermophora* aumentó casi dos veces después de ser ingeridas por cualquiera de las especies de ratones investigadas, esperaríamos un aumento en la formación de la micorriza con esta especie de hongo al ser consumida por los micófagos. Sin embargo, los resultados obtenidos para ambas especies fúngicas no corresponden con esta predicción. No obstante que las esporas de *L. trichodermophora* que pasaron por tracto digestivo de *P. alstoni* y *P. maniculatus* presentaron mayores porcentajes de actividad metabólica que las que no pasaron por tracto digestivo de los animales, los porcentajes de colonización micorrízica de las plántulas inoculadas con las esporas consumidas por los ratones fueron marcadamente menores que las plántulas inoculadas con esporas de *L. trichodermophora* que no pasaron por tracto digestivo de los micófagos. También, pese a que no se detectaron

diferencias en la actividad de las esporas de *Suillus tomentosus* consumidas por cualquiera de las especies de ratón y las esporas no ingeridas, las esporas que pasaron por el tracto digestivo de *P. alstoni* promovieron mayores porcentajes de colonización que las de los otros tratamientos. Estos resultados son congruentes con lo reportado en otros estudios en los que se ha evaluado la actividad esporal y la capacidad micorrizógena de las esporas consumidas, con la salvedad de que estos estudios se han realizado con especies de hongos hipogeos. Por ejemplo, Colgan y Claridge (2002) encontraron que las esporas del hongo *Rhizopogon vinicolor* consumidas por el ratón *Clethrionomys californicus* después de determinar el porcentaje de actividad como mencionamos anteriormente, ellos también estimaron el porcentaje de micorrización en plántulas de *Pseudotsuga menziesii*. Encontraron que para el caso de *Clethrionomys californicus*, aunque obtuvo una alta proporción de actividad esporal del hongo *Rhizopogon vinicolor* (7.1%) con relación al control, el porcentaje de micorrización en *Pseudotsuga menziesii* fue bajo. Por otra parte, el consumo de las esporas de este hongo por los micófagos *Glaucomys sabrinus* y *Tamias townsendii* mantuvo o incluso incrementó la capacidad micorrizógena de las esporas. Miller (1985) por su parte, encontró que el porcentaje de micorrización de los hongos hipogeos *Tuber canaliculatum* y *T. shearii* aumentó después de pasar por el tracto digestivo del ratón de patas blancas (*Peromyscus leucopus*). Para el caso de Colgan y Claridge (2002) argumentan que las diferencias en sus resultados podrían radicar en el tiempo de residencia de las esporas en tracto digestivo, la temperatura del cuerpo del roedor, así como diferencias anatómicas del sistema digestivo (Kotter y Farentinos 1984, Colgan y Claridge 2002). Variaciones en la composición y abundancias de la microbiota en el intestino de los roedores podría afectar directamente la degradación de la pared celular de las esporas y en consecuencia su germinación (Miller 1985, Colgan y Claridge 2002). En nuestro caso estas hipótesis podrían aplicar a nuestro sistema de estudio. Los roedores de nuestro sistema de estudio difieren en tamaño y peso. *P. alstoni* en promedio tiene un peso de 21 a 41 g y *P. maniculatus* de 16 a 21 g por individuo (D'Alva y cols. 2007), aunque en sus hábitos alimenticios son parecidos (Linzey y Linzey 1973, Ceballos y Galindo 1984, Hunt y Maser 1985, Prieto 19889).

Para el caso de los hongos, el bajo porcentaje de micorrización que se presentó puede ser consecuencia del tiempo de almacenamiento en refrigeración de las esporas utilizadas. El tiempo de almacenamiento de las esporas de *L. trichodermophora*

extraídas de las excretas de los dos diferentes roedores fue de 6 meses antes de su inoculación. Para el caso de las esporas de *S. tomentosus* extraídas de las excretas de los dos diferentes roedores y de las esporas extraídas directamente de los esporomas para el tratamiento control fue de cinco meses. La evaluación de la actividad esporal se realizó a los cuatro y tres meses para *L. trichodermophora* y *S. tomentosus* respectivamente. Otros estudios han demostrado que la actividad y viabilidad de las esporas de hongos del género *Laccaria* y *Suillus* empieza a disminuir a los 30 días de ser almacenadas en refrigeración. Sin embargo, algunos hongos del género *Suillus* mantienen la actividad después de 180 días de almacenamiento (Torres–Martínez 1992). Las esporas extraídas de la excretas de los ratones pudieron haber sufrido degradación microbiana de la pared celular durante su mantenimiento en refrigeración afectando la viabilidad de estas, y reflejándose en bajos niveles de colonización.

Sin embargo, para el caso de las esporas de *S. tomentosus* la pérdida de viabilidad por la posible degradación en el tracto digestivo y en almacenamiento no parece ser la explicación ya que las esporas que pasaron por tracto digestivo de *P. alstoni* presentaron los mayores niveles de colonización. Esto es congruente con lo reportado por Ashkannejhad y Horton (2005) con *S. tomentosus*, quienes encuentran que la capacidad micorrizógena de este hongo con plántulas de *P. contorta* se mantiene después de pasar por el tracto digestivo del venado cola negra *Odocoileus hemionus*, siendo esta la primera evidencia de que las esporas de algunos hongos epigeos pueden mantener su viabilidad después de ser consumidas por micófagos. Estos resultados sugieren que para *S. tomentosus* el consumo de sus esporomas y esporas por *P. alstoni* podría jugar un papel importante en la promoción de la interacción micorrízica. A este respecto es necesario conducir otros estudios que evalúen el papel de esta especie de roedor como dispersor de las esporas de *S. tomentosus* y si esta dispersión afecta positivamente la probabilidad de que se forme la interacción micorrízica con sus árboles hospederos. Con nuestro estudio aumentamos la evidencia, encontrando que esta especie mantiene la capacidad de formar ectomicorriza después de que las esporas pasaron por el tracto digestivo de *P. maniculatus* y potencializa la formación en las esporas que pasaron por tracto digestivo de *P. alstoni*. Es posible que con la evidencia citada anteriormente y con lo que nosotros encontramos para *S. tomentosus* y *L. trichodermophora*, al parecer el tracto digestivo de algunos mamíferos micófagos actúan primeramente como almacén para esporas (Colgan y Claridge 2002, Maser y cols. 2008). El mayor beneficio para

los hongos está en que sus esporas sea dispersadas a lo largo del rango hogareño de los roedores y que sean depositadas en el suelo por medio de sus excretas o en su madriguera donde posiblemente almacenen semillas. También podría darse el caso que el roedor almacene los esporomas en su madriguera como en algunos roedores ya se ha demostrado (Polaco y cols. 1982) y facilite la rápida colonización entre las esporas germinadas del hongo y las raíces de la planta hospedera. Podríamos suponer que este es un sistema de dispersión esporal más eficiente, como lo es en el caso de los hongos hipogeos, a diferencia de la dispersión por el viento como se tiene registrado para los hongos epigeos. (Claridge y cols. 1992, Colgan y Claridge 2002).

La micofagia podría contribuir al re-establecimiento de micorrizas en zonas perturbadas del Parque Nacional La Malinche, ayudando a la rápida regeneración vegetal. Dependiendo del rango hogareño del animal micófago la colonización podría llegar más allá de los límites de las zonas boscosas. Por ejemplo, Ashkannejhad y Horton (2005) encontraron que esporas de especies de hongos de *Suillus* y *Rhizopogon* son dispersadas por el venado cola negra *Odocoileus hemionus* ayudando al establecimiento de plántulas de *P. contorta* en dunas de arena, y Frank y cols. (2009) demostraron que el roedor *Peromyscus maniculatus* dispersa esporas de hongos hipogeos promoviendo el establecimiento de plántulas que se encuentran alejadas de las redes miceliarias en bosques de *Quercus garryana*. Estos resultados pueden cambiar para otras especies de hongos que son consumidos por estos ratones debido a que podrían variar en su capacidad de resistencia al ser consumidas por las dos especies de roedores, repercutiendo también en su potencial de dispersión y en consecuencia en la viabilidad de éstas para formar la ectomicorriza con su hospedero. Sin embargo, se requieren más estudios al respecto. Para el caso de los ratones en este estudio, ya se ha demostrado que los hongos son un recurso que utilizan en su dieta (Durán 2006). Aún así, se desconoce qué tan importantes son con respecto a otros alimentos que consumen. D'Alva y cols. (2007) encontraron evidencia que sugiere que del hongo *Russula occidentalis* los ratones *Peromyscus alstoni* y *P. maniculatus* obtienen básicamente agua y pocos nutrimentos, debido a que los ratones perdieron masa corporal por la poca digestibilidad del hongo. La cantidad de energía contenida en el hongo es similar a la de las hojas pero menor a las semillas y frutos secos (Cork y Kenagy 1989, Bertolino y cols. 2004). El consumo de este hongo en condiciones naturales como recurso alimenticio podría ser valioso cuando alimentos de alta calidad son poco abundantes (Cork y Kenagy 1989, Johnson 1994, Bozinovic y

Muñoz-Pedrerros 1995, Bertolino y cols. 2004). En tales condiciones este tipo de alimento es importante como recurso de agua, vitaminas y minerales, y sus efectos en aminorar el incremento en las concentraciones de colesterol (Fukushima y cols. 2001). Además de que probablemente minimiza el esfuerzo de forrajeo en relación a la energía consumida (Bertolino y cols. 2004).

Por lo que se refiere a las plántulas, los bajos valores en las variables de crecimiento en plántulas inoculadas con esporas de los hongos *L. trichodermophora* y *S. tomentosus* ya sea que pasaron o no por tracto digestivo de *P. alstoni* y *P. maniculatus*, comparado con las plántulas inoculadas con las excretas de ratón nos hace suponer que en primera instancia posiblemente el hongo este demandado demasiado productos de carbono a la plántula durante el establecimiento de la colonización viéndose reflejada en el lento crecimiento de esta. No obstante, una vez establecida la colonización, el hongo retribuirá a la plántula proporcionándole los nutrimentos necesarios para su desarrollo. Lo antes mencionado es indicativo que posiblemente el tiempo de evaluación fue muy corto. En trabajos anteriormente realizados sobre inoculación esporal en plántulas de *P. montezumae* con hongos del género *Laccaria* y *Suillus* incluyendo la especie *S. tomentosus*, observaron porcentajes de micorrización del 45 a 60 % a los 9 y 12 meses (Xochitiotzin 2000, Hernández 2003). Esto nos hace suponer que se necesitaría más tiempo para poder observar un efecto más claro y positivo de la inoculación sobre las plántulas. También hay una respuesta diferente a la especie forestal hospedera. Por ejemplo Santiago-Martínez (2002) comparó las micorrizas formadas por *Suillus tomentosus* con *Pinus cembroides* y *P. montezumae*, encontrando que los sistemas micorrizicos formados con las primeras plantas son más grandes, además de presentar las puntas no ramificadas de torcidas a tortuosas, mientras que *P. montezumae* las presentó de rectas a redondeadas. Los tratamientos donde las plántulas fueron inoculadas con las excretas de los ratones (*P. alstoni* y *P. maniculatus*) que sólo fueron alimentados con pellets tuvieron un efecto positivo inmediato, esto puede deberse a que estas excretas contienen altas concentraciones del alimento balanceado en forma de “pellets” son ricos en hierro, fósforo, magnesio y otros minerales, así como, vitaminas (D’Alva 2007), que pudieran estar aprovechando las plántulas para su crecimiento, pero no obstante, con el tiempo se agotaran afectando el desarrollo en las plántulas. Por ello se sugiere que se continúen las mediciones de micorrización y crecimiento en las plántulas al menos hasta los 12 meses.

## 9. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación hemos demostrado mediante pruebas experimentales que los efectos del paso por el tracto digestivo de esporas de hongos epigeos son diferentes de las especies interactuantes. Para el caso de *L. trichodermophora* el paso por el tracto digestivo aumentó la actividad esporal pero no su capacidad micorrizógena de esta especie. Por otra parte, para *S. tomentosus* el paso por el tracto digestivo no tuvo efecto en la actividad esporal pero el consumo por *P. alstoni* incrementó el porcentaje de micorrización en las plántulas de *P. montezumae*, aunque no se observó un efecto en el crecimiento del hospedero, esto quizá debido al corto tiempo en el que se realizó la evaluación.

## 10. PERSPECTIVAS

Este trabajo provee un marco de referencia para estudios posteriores sobre la función de los pequeños mamíferos como dispersores de esporas de hongos epigeos. Sugerimos que futuros trabajos desarrollen investigación en esta línea, enfocándose a temas como:

1. Examinar factores que pueden influir en la activación de las esporas durante el paso por el tracto digestivo de los micófagos poniendo énfasis en: determinar el tiempo de residencia en el tracto digestivo, el efecto de las enzimas digestivas y las propiedades fisiológicas de la microflora intestinal.
2. Evaluar si existen diferentes niveles en la actividad de las esporas que pasan por tracto digestivo y las que se obtienen directamente del hongo.
3. Examinar la composición de la pared celular de las esporas de *Laccaria trichodermophora* y *S. tomentosus* para evaluar la capacidad de resistencia a la degradación en su paso por el tracto digestivo.
4. Valorar que pasa con otras especies de hongos epigeos utilizando el mismo modelo de experimentación.
5. Estimar el rango hogareño de los roedores para determinar su potencial dispersión de las esporas de hongos epigeos.
6. Realizar estudios que evalúen la importancia de los hongos con respecto a otros alimentos incluidos en la dieta de los roedores.
7. Examinar las madrigueras de estos roedores para verificar si almacenan esporomas de hongos ectomicorrizógenos.
8. Evaluar la densidad poblacional de los tres interactuantes (animales micófagos, hongos ectomicorrizógenos epigeos y plántulas hospederas) y correlacionarlas.
9. Investigar el fenómeno de la micofagia en otros roedores, tales como ardillas y conejos presentes en el Parque Nacional La Malinche.

Realizar investigaciones de esta interacción tripartita (animal micófago-hongo micorrizógeno-plántula hospedera) bajo condiciones naturales.

## 11. REFERENCIAS

- Acosta A y Kong A. 1991. Guía de las excursiones botánicas y micológicas al Cerro del Peñon y Cañada Grande del Estado de Tlaxcala. IV Congreso Nacional de Micología. Folleto No. 8, Jardín Botánico Tizatlán, Gobierno del Estado de Tlaxcala.
- Álvarez T y Mayo-Aceves E. 1993. Contribución al conocimiento de los hábitos alimenticios del ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni*. Xalapa, México. Acta Zoológica Mexicana. 59: 51-52.
- Ashkannejhad S y Horton TR. 2005. Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes: interactions involving *Pinus contorta*, suilloid fungi and deer. New Phytologist 169: 345-354.
- Bertolino S, Vizzini A, Wauters LA, Tosi G. 2004. Consumption of hypogeous and epigeous fungi by the red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in subalpine conifer forests. Forest Ecol and Manag 202: 227-233.
- Bozinovic F y Muños-Pedrerros A. 1995. Nutricional ecology and digestive responses of an omnivorous-insectivorous rodent (*Abrothrix longipilis*) feeding on fungus. Physiol Zool 68: 474-489.
- Castellano MA y Trappe JM. 1985. Ectomycorrhizal formation and plantation performance of Douglas-fir nursery stock inoculated with *Rhizopogon* spores. Can J For Res 15: 613-617.
- Cázares E y Trappe JM. 1993. Spore dispersal of ectomycorrhizal fungi on a glacial forest front by mammal mycophagy. Mycologia 86: 507-510.
- Ceballos G y Galindo CL. 1984. Mamíferos silvestres de la cuenca de México. Editorial Limusa. México DF.
- Claridge AW, Tanton MT, Seebeck JH, Cork SJ y Cunningham RB. 1992. Establishment of ectomycorrhizae on the roots of two species of *Eucalyptus* from fungal spores contained in the faeces of the long-nosed potoroo (*Potorous tridactylus*). Australian Journal of Ecology 17: 207-217.
- Claridge AW, Tanton MT y Cunningham. 1993. Hypogean Fungi in the Diet of the Long-Nosed Potoroo (*Potorous tridactylus*) in Mixed-Species and Regrowth Eucalypt Forest Stands in South-Eastern Australia. Wildlife Research. 20: 321-337.



- Claridge AW y Cork SJ. 1994. Nutricional value of hypogeal fungal sporocarps for the long-nosed potoroo (*Potorous tridactylus*) a forests-dwelling mycophagus marsupial. *Aust J Zool* 42: 701-710.
- Claridge AW, Trappe JM, Cork SJ y Claridge DL. 1999. Mycophagy by small mammals in the coniferous forests of North America: nutritional value of sporocarps of *Rhizopogon vinicolor*, a common hypogeous fungus. *J Comp Physiol* 169: 172-178.
- Colgan W y Claridge AW. 2002. Mycorrhizal effectiveness of *Rhizopogon* spores recovered from faecal pellets of small forest-dwelling mammals. *Mycol Res* 106: 314-320.
- Cork SJ y Kenagy GJ. 1989. Nutritional value of hypogeous fungus for forest-dwelling ground squirrel. *Ecology* 70: 577-586.
- Cortés G, Velázquez A, Torres A. y Bocco G. 2004. Contribución al plan de manejo forestal. Veintiuno.
- D'Alva T, Lara C, Estrada-Torres A y Castillo-Guevara C. 2007. Digestive responses of two omnivorous rodents (*Peromyscus maniculatus* and *P. alstoni*) feeding on epigeos fungus (*Russula occidentalis*). *J Comp Physiol B* 177:707-712.
- Díaz-Ojeda EV. 1992. Informe del Parque Nacional La Malinche. Jefatura del Programa Forestal de Tlaxcala. Coordinación General de Ecología, Tlaxcala.
- Durán Z. 2006. Micofagia por roedores en tres ambientes de bosque templado del Parque Nacional la Malinche, Tlaxcala. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Estrada-Croken C, Naranjo EJ y Millar B. 1996. The Mexican agouti in Chiapas, México. *Int Zool News* 270: 385-388.
- Estrada-Torres A y Santiago-Martínez. 2003. Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Fundación Produce Tlaxcala. México.
- Francis R. y Read DJ. 1994. The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of the plant community structure. En: Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Robson AD, Abbott LK y Malajczuk N (eds.), Editorial. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 11-25.
- Frank JL, Anglin S, Carrington EM, Taylor DS, Viratos B y Southworth. 2009. Rodent dispersal of fungal spores promotes seedling establishment away from

- mycorrhizal networks on *Quercus garryana*. NRC Research Press. 87: 821-829.
- Fogel R y Trappe JM. 1978. Fungus consumption (mycophagy) by small animals. *Northw Sci* 52: 1-31.
- Fukushima M, Ohashi T, Fujiwara Y, Sonoyama K, Nakano M. 2001. Cholesterol-lowering effects of maitake (*Grifola frondosa*) fiber, shiitake (*Lentinus edodes*) fiber, and enokitake (*Flammulina velutipes*) fiber in rats. *Exp Biol Med* 226: 758-765.
- Green K, Tory MK, Mitchell, Tennant P y May TW. 1999. The diet of the Long-footed Potoroo (*Potorous longipes*), *Australian Journal of Ecology* 24: 151-156.
- Grönwall O, Pehrson A. 1984. Nutrient content in fungi as a primary food of the red squirrel *Sciurus vulgaris* L. *Oecologia*. 64: 230–231.
- Hall, E.R. 1981. The mammals of North America. John Wiley & Sons. New York. 2 vols.
- Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC y Pegler DN. 1995. Dictionary of the fungi CAB Internatinol, Wallingford.
- Hernández FM. 2003. Evaluación de la efectividad e infectividad del inóculo esporal de diferentes hongos ectomicorrizógenos en *Pinus montezumae* y *P. pseudostrobus*. Tesis de Licenciatura en Biología Agropecuaria. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Hunt A y Maser Z. 1985. Consumption of hypogeous fungi by the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*). En: Proceedings of the Sixth North American Conference on Mycorrhizae. Molina R. (eds.) For Res. Lab. Oregon State University. Corvallis, Oregon.
- Johnson CN. 1994. Nutritional ecology of a mycophagous marsupial in relation to production of hypogeous fungi. *Ecology*. 75: 2015-2021.
- Kotter MM y Farentinos RC. 1984. Formation of ponderosa pine ectomycorrhizae alter inoculation with feces of tassel-eared squirrels. *Mycologia* 76: 758-760.
- Kropp BR y Mueller GM. 1999. Laccarias. En: Ectomycorrhizal fungi: Key genera in profile. Cairney JWG y Chambers SM (eds.). Editorial. Springer-Verlag. Aleania. pp. 201-230.
- Lamont BB, Ralph CS, Christensen PES. 1985 Mycophagous marsupials as dispersal agents for ectomycorrhizal fungi on *Eucalyptus calophylla* and *Gastrolobium*

- bilobum*. New Phytologist 101: 651-656.
- Lawrence JF. 1989. Mycophagy in the Coleoptera: feeding strategies and morphological adaptations. En: Insect-fungus interactions. Wilding N, Collins NM, Hammond PM y Webber JF. (eds.) Editorial. Academic Press. New York. pp. 1-23.
- Linzey DW y Linzey AV. 1973. Notes on food of small mammals from Great Smoky Mountains National Park. Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society. Tennessee-North Carolina. 89: 6-14.
- Linzey DW. 1998. The mammals of virginia. The McDonald y Woodward Publishing Company. Inc. Blacksburg, Virginia.
- Maser Z, Maser C y Trappe JM. 1985. Food Habits of the Northern Flying Squirrel (*Glaucomys sabrinus*) in Oregon. Canadian Journal of Zoology. 63:1084-1088.
- Maser C, Claridge AW y Trappe JM. 2008. Of Animals and Fungi. En: Trees, Truffles, and Beasts How Forests Function. Maser C, Claridge AW y Trappe JM. (eds.) Editorial. Rutgers University Press. E.U. pp. 75-91.
- Miller SL. 1985. Rodent pellets as ectomycorrhizal inoculum for two *Tuber spp.* VI North American Conference on Mycorrhizae (Molina R. ed.): 273. Forestry Research Laboratory, Corvallis OR.
- Miller SL, Torres-Martínez P y McLean TM. 1992. Basidiospore viability, dormancy, activation and germination in ectomycorrhizal and saprophytic basidiomycetes. Mycological Research.
- Molina R, Massicotte H y Trappe JM. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. En: Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process. Allen MF. (ed.) Editorial. Chapman y Hall. New York. pp. 357-423.
- Moreno G, García MJL y Zugaza A. 1986. La guía de la INCAFO de los hongos de la Península Ibérica. Tomo II. INCAFO S.A: Madrid España. pp. 1276
- Nava-Gutiérrez Y y Hernández-Cuevas L. 2003. Aspectos generales de la asociación micorrízica. En: Avances en el estudio de la Ectomicorriza en el estado de Tlaxcala. Estrada-Torres A y Santiago-Martinez MG (eds.), Editorial. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. México. pp. 1-8.
- Nowak RM y Paradiso JL. 1983. Walker's Mammals of the World. The Johns Hopkins. Editorial University Press. USA.

- Pantidou ME y Groves JW. 1966. Cultural studies of Boletaceae, some species of *Suillus* and *Fuscoboletinus*. *Can J Bot* 44: 1371-1392.
- Perry JP Jr. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland, Oregon. pp 110.
- Peterson RL, Massicotte HB y Melvilla LH. 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and cell biology*. NRC Research Press. Ottawa, Canada.
- Polaco OJ, Guzmán G, Guzmán-Dávalos y Álvarez LT. 1982. Micofagia en la rata montera *Neotoma mexicana* (Mammalia, Rodentia). *Bol Soc Mex Micol* 17: 114-119.
- Prieto BM. 1988. Hábitos alimenticios de tres especies de roedores cricétidos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Santiago-Martínez MG y Estrada-Torres A. 1999. Hongos ectomicorrizógenos y producción de inoculantes para plantas de interés forestal. Fundación Produce Tlaxcala. México. Folleto No. 19. pp. 20
- Santiago-Martínez MG. 2002. Pruebas de crecimiento, descripción e identificación de cultivos de hongos ectomicorrizógenos e inoculación controlada con esporas. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sierra SJ. 2007. Viabilidad de esporas de hongos ectomicorrizógenos después de su paso a través del tracto digestivo de dos especies de ratones silvestres. Tesis de Licenciatura. Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla.
- Singer R. 1986. *The Agaricales in modern taxonomy*. IV edn. Koeltz Scientific Books, Koenigstein. pp. 981.
- Singer Snell/Dick. 1960. *Suillus tomentosus* (Kauffman). *Mycologia* 51: 570. In: Smith AH y Thiers HD. 1971. *The Boletes of Michigan*. The University of Michigan Press. pp. 45.
- Sot FJN, Gutierrez C, Lemus PA, Ortiz JMA, Desecador ENL y Varela FL. 1996. *Manual de Laboratorio de Ecología Microbiana*. IPN. México, DF.
- Stephen LW, Ramírez-Pulido J y Baker RJ. 1985. *Peromyscus alstoni*. *The American Society of Mammalogists*. 242: 1-4.
- Sussman AS. 1966a. Types of dormancy as represented by conidia and ascospores of *Neurospora*. En: *The fungus spore*. Mandelin M.F. (ed.) Editorial Academic Press. London. pp. 235-237.

- Sussman AS. 1966 b. Dormancy and spore germination. En: The fungi. Ainsworth GC y Sussman AS. (eds.) Editorial Academic Press. New York. pp. 733-764.
- Torres-Martínez P. 1992. Estudio de las Ectomicorrizas de Pino Carrasco (*Pinus halepensis*). Tesis de Doctorado. Facultad de Biología. Universidad de Murcia.
- Trappe JM y Guzmán G. 1971. Notes on some hypogeous fungi from México. *Mycologia* 63: 317-332.
- Ure DC y Maser C. 1982. Mycophagy of red-backed voles in Oregon and Washington. *Can J Zool* 60: 3307-3315.
- Verzani J. 2005. Using R for Introductory Statistics. Editorial. Chapman & Hall/Crc. EU.
- Wagner A. 1845. *Archiv für Naturgeschichte*. 11. 1:148.
- Xochitiotzin HM. 2000. Inoculación esporal de *Pinus montezumae* con *Suillus tomentosus* e *Inocybe griseovelata*, en tres sustratos bajo condiciones de vivero. Tesis de Licenciatura en Biología Agropecuaria. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Zar. 1984. *Biostatistical analysis 2ª*. Editorial. Prentice Hall Inc. New Jersey.