



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Universidad Autónoma de Tlaxcala
Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Inoculación micelial de *Pinus hartwegii* con hongos
ectomicorrizógenos provenientes de la Cuenca del
Río Magdalena D. F. en invernadero

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Emmanuel Núñez Rodríguez

Comité Tutorial

Co-Director de Tesis

M. en C. Gema L. Galindo Flores
Dra. María Guadalupe Santiago Martínez

Tutores

Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez
Dr. Arturo Estrada Torres
Dr. Jesús Pérez Moreno

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2013



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que Emmanuel Núñez Rodríguez realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es "Inoculación micelial de *Pinus hartwegii* con hongos ectomicorrizógenos provenientes de la Cuenca del Rio Magdalena D.F. en invernadero"

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., OCTUBRE 15 DE 2012

DR. FRANCISCO J. ÁLVAREZ SÁNCHEZ

DR. JESÚS PÉREZ MORENO

DR. ARTURO ESTRADA TORRES

DRA. MARÍA GUADALUPE SANTIAGO MARTÍNEZ

M. en C. GEMA LILIA GALINDO FLORES

DR. CARLOS ALBERTO LARA RODRÍGUEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



El presente proyecto se realizó bajo la codirección de la M. en C. Gema L. Galindo-Flores y la Dra. Ma. Guadalupe Santiago-Martínez en el Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Se conto con apoyo a estudios de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), becario número 328746. La Maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional. Padrón Nacional de Posgrado (PNP).

Formó parte del Macroproyecto “Manejo de Ecosistemas y Desarrollo Humano, UNAM” (SEDEI-PTID-02) del cual se obtuvo financiamiento para la realización de parte experimental.

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT) por brindarme la oportunidad de alcanzar una meta más en mi formación académica.

Al CONACyT por la beca otorgada para realizar los estudios de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biológicas.

Al Macroproyecto “Manejo de Ecosistemas y Desarrollo Humano, UNAM” (SEDEI-PTID-02) por el financiamiento otorgado para realizar la presente investigación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) en particular al Departamento de Ecología y Recursos Naturales y a la Unidad de Análisis Ambiental de la Facultad de Ciencias, al Laboratorio Planta-Microbio-Ambiente y el Laboratorio de Agroecología del Centro de Investigaciones en Ecosistemas (Campus Morelia) y por brindarme el apoyo para la realización y a cumplir con los objetivos de esta investigación.

A mi comité tutorial, M. en C. Gema L. Galindo-Flores, Dra. Ma. Guadalupe Santiago-Martínez, Dr. Arturo Estrada-Torres, Dr. F. Javier Álvarez-Sánchez y al Dr. Jesús Pérez-Moreno por el gran apoyo y sus valiosos comentarios durante la revisión de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la M. en C. Gema L. Galindo por brindarme su amistad, apoyo y paciencia, en la realización de la tesis.

A la Dra. Ma. Guadalupe Santiago-Martínez por su amistad, comentarios y revisión a la tesis, así como las bromas en el laboratorio...gracias!

Al Dr. F. Javier Álvarez-Sánchez por todo su apoyo que me brindo en mi estancia en la Facultad de Ciencias, por el conocimiento compartido y la gran disposición a esta investigación.

Al Dr. Arturo Estrada-Torres por participar en este proyecto con su asesoría, sus conocimientos compartidos y su tiempo.

Al Dr. Jesús Pérez-Moreno por compartir y saber transmitir su gran conocimiento conmigo, por su atención y su valioso apoyo.

A la Dra. Irene Sánchez-Gallen del Laboratorio de Ecología del Suelo, por su apoyo logístico en aprender y compartir conocimientos adquiridos en esta travesía llamada.....ácidos grasos.

A la Dra Mayra E. Gavito Pardo y el Dr. John Larsen del Laboratorio Planta-Microbio-Ambiente del CIECO por compartir sus conocimientos y metodología en la cuantificación de ácidos grasos, ya que sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

A la Bióloga Yolanda M. García Rodríguez por su asistencia en los análisis por cromatografía de gases-masa en el laboratorio del CIECO, Morelia.

Al M. en C. Manuel Hernández Quiroz y a la Dra. Claudia Ponce de León Hill de la Unidad de Análisis Ambiental de la Facultad de Ciencias, por su paciencia, conocimiento y esfuerzo en el análisis y procesamiento de mis muestras para ácidos grasos.

A todos los profesores de la Maestría por transmitirme sus conocimientos en mi formación como maestro, especialmente al Dr. Carlos A. Lara Rodríguez y a la Teacher María Inés Campos Badillo por brindarme su incondicional apoyo.

A mis amigos de años: Blanca, Yvonn, Adriana, Jorge y Alberto por el apoyo moral, experiencias y lo vivido durante tanto tiempo.

A mis amigos del laboratorio: Francisco, Gabriel, Geovani, Luis Alberto, Karla y Dulce, por compartir conocimientos, experiencias y diversiones.

A mis amigos de la licenciatura y maestría: Nerit, Ivette, Leyda, Hellen, Miriam, Laura Hernández y Raymundo por las anécdotas, sus conocimientos y diversiones.

A todos aquellos compañeros y amigos que conocí en esta experiencia y de manera directa e indirecta me ayudaron en el trabajo: María Eugenia (Patagonia, Argentina); Carolina, Kate, Vanessa, Rosabel, Karen, Esther, Ana, Eduardo, Erasmo, Yeny de la UATx; Dulce, Irene, Liz Guzmán, Dulce Moreno, Carla, Andrea, Esthela, Juan Carlos, Nacho, Ernesto, Néstor, Oswaldo y Raúl de la Fac. de Ciencias-UNAM; Fabiola y Claudia de CIECO-UNAM.

A mis compañeros donde laboré por compartir este momento en mi carrera profesional.

DEDICATORIA

A DIOS por ser la fuerza que me ha impulsado a seguir siempre adelante y no dejarme caer en los tiempos más difíciles, pero principalmente por la vida.

A mis padres: Gerardo Núñez Corrales y María Guadalupe Rodríguez Ocampo por enseñarme los mejores principios, por su amor e infinito apoyo en todos los momentos de mi vida y por entregarme la mejor herencia que un padre puede dar a sus hijos...mi carrera profesional.

A mi hermana Jaqueline Núñez Rodríguez por ser mi cómplice, por su cariño, apoyo incondicional y motivación a seguir adelante.

A mis sobrinos Elías Sebastián (Tian), Octavio Baruc (Tavo) y Mathilda Carolina (Tata) por sus sonrisas, muestras de cariño y amor me ayudaron a relajarme cuando más estresado me sentía.

A mi familia:

- Mis abuelos Leonarda e Isaías, Flora y Fructuoso y Ángela Belmont, por enseñarme a no rendirse y ser partícipes de mis triunfos y anhelos.
- Mis tíos Juanita, Cruz, Mar, Geno, Tere, Pedro, Moy, Aarón, por la unión que nos caracteriza, la motivación en cada momento de mi vida, a ellos, respeto y admiración.
- A mis primos y sobrinos: Martha Elizabeth, Alina, Maricruz, Emilio, Tania, Annel, Carlos, Lance, Axel, Jonathan Jesús, Luis, May, Xel-Há, Briss, Gael, Moy, Valeria, Grettel, por el ánimo, muestras de apoyo y los momentos de convivencia. A todos ustedes les digo: vivan y aspiren a lo más alto, nunca se den por vencidos.
- Y todos aquellos primos y tíos que me han brindado palabras de aliento en diversas ocasiones, Ezequiel, Cela, Carmina, Lidia, Zenaida, Enrique, Ana, Javier, Quique, Leslie, Yesi, Dalia, Flor, Karen...a toda la familia sin excepción.

RESUMEN

El conocimiento de la interacción micorrízica en las coníferas y la adecuada selección de las especies de hongos pueden ser aspectos claves para lograr con éxito el establecimiento de las especies vegetales en campo. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la inoculación micelial de hongos micorrizógenos (HEM), en plántulas de *Pinus hartwegii*, utilizando como sustrato suelo forestal y dispuestos en tres tratamientos: 1) *Pinus hartwegii* con *Suillus brevipes*, 2) *P. hartwegii* con *Inocybe splendens* y 3) *P. hartwegii* sin inocular (Testigo).

Durante 12 meses se tomaron mediciones bimestrales de las siguientes variables de crecimiento en las plántulas: a) supervivencia, b) altura, c) diámetro de tallo. También se tomaron mediciones cada cuatro meses de: a) biomasa aérea y radical y b) Cociente raíz/vástago. Respecto a la asociación micorrízica se evaluó: a) porcentaje de colonización (a los 4, 8 y 12 meses), b) biomasa micelial (a los 4 y 8 meses, a través del ácido graso 18: 2 ω 6,9) y c) caracterización macro y microscópica de las ectomicorrizas obtenidas (12 meses).

En los resultados se observó que la supervivencia y el diámetro del tallo en las plántulas inoculadas y no inoculadas no se presentaron diferencias significativas en los diferentes tiempos de evaluación. Las plántulas inoculadas con *Inocybe splendens* mostraron mayor altura y mayor biomasa radical presentando diferencias significativas entre tratamientos.

A los ocho meses de evaluación en las plántulas inoculadas con *Inocybe splendens* en biomasa aérea, se observaron diferencias significativas entre las plantas inoculadas y no inoculadas. En el caso de cociente raíz/vástago no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos durante los diferentes tiempos de evaluación. Al evaluar el porcentaje de colonización, las plántulas inoculadas con *Suillus brevipes* presentaron el valor más alto (6.6 %) significativamente diferente con los otros tratamientos.

Para la cuantificación de biomasa micelial a través del ácido graso 18: 2 ω 6,9 se realizaron varios ensayos con la técnica de ácidos grasos, dos con muestras del sustrato a base de vermiculita y turba en donde no se detectó la presencia del ácido. Se realizó un ensayo más con micelio de los hongos crecidos en medio líquido, pero sólo en el micelio de *Suillus brevipes*, se logró cuantificar la biomasa micelial por medio de la evaluación con dicho ácido.

Las caracterizaciones macro y microscópicas que se describieron para las micorrizas encontradas en las raíces de *P. hartwegii* correspondieron a las especies ectomicorizógenas inoculadas (*Suillus brevipes* e *Inocybe splendens*), presentando algunas diferencias con respecto las caracterizaciones reportadas en la literatura.

Se considera que el efecto de los HEM sobre el crecimiento de *Pinus hartwegii*, en algunas variables fue más evidente que en otras, sin embargo, la especie forestal utilizada requiere de periodos más largos para su evaluación ya que presenta un lento crecimiento. Asimismo, se recomienda hacer una serie de modificaciones en la técnica de cuantificación de biomasa micelial, ya que su evaluación ayudará a entender que sucede con el hongo en la rizósfera. La información que se genere permitirá de forma directa relacionar este parámetro con las variables de crecimiento del hospedero.

ABSTRACT

Knowledge of mycorrhizal interaction in the conifers and the appropriate selection of species of fungi can be key aspects for successful establishment of plants in the field. In this study, we evaluated the effect of mycelial inoculation of mycorrhizal fungi (HEM), in *Pinus hartwegii*, using forest soil substrate and disposed in three treatments: 1) *Suillus brevipes* with *Pinus hartwegii*, 2) *P. hartwegii* with *Inocybe splendens* and 3) *P. hartwegii* uninoculated (control).

During 12 months measurements were taken every two months of the following variables on the plantlets growth: a) survival, b) height c) stem diameter. Also every four months were measured: a) shoot and root biomass and b) Quotient root / shoot. With respect to the mycorrhizal association was evaluated: a) percentage of colonization (at 4, 8 and 12 months), b) mycelial biomass (4 and 8 months, through the fatty acid 18: 2 ω 6.9) c) characterization macro and microscopic the ectomycorrhizae obtained (12 months).

The results showed that the survival and stem diameter in inoculated and non-inoculated seedlings were not significantly different in the different evaluation times. Seedlings inoculated with *Inocybe splendens* showed higher and higher root biomass producing significant differences between treatments.

In terms of biomass, at eight months of evaluation, seedlings inoculated with *Inocybe splendens*, significant differences were observed between inoculated and uninoculated plants. For quotient root / shoot no significant differences in any of the treatments at different evaluation times. In evaluating the percentage of colonization, seedlings inoculated with *Suillus brevipes* showed the highest value (6.6%) significantly different to the other treatments.

For quantification of mycelial biomass through the fatty acid 18: 6.9 2 ω several trials were conducted with the fatty acid technique, two samples of the substrate with vermiculite and peat basis where not detected the presence of acid. Further trial was conducted with the fungus mycelium grown in liquid medium, but only in the mycelium of *Suillus brevipes*, it was possible to quantify the mycelial biomass through this acid.

The macro and microscopic characterizations described for mycorrhizal roots found in *P. hartwegii* corresponded to species inoculated with *Suillus brevipes* and *Inocybe splendens*, presenting some differences from those reported in the literature.

It is considered that the effect of HEM on growth of *Pinus hartwegii* in some variables is more evident than others, however, the tree species used in this work requires longer periods of time for evaluation because it has a slow growth. It is also recommended making a series of modifications in the technical of quantification of mycelial biomass because its evaluation will help to understand what goes with the fungus in the rhizosphere. The information generated will allow directly relate this parameter with the growth of the host variables.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Concepto de micorriza	4
2.2 Ectomicorriza	4
2.3 Estudios de inoculación con hongos ectomicorrizógenos en México	7
2.4 Estudios de hongos ectomicorrizógenos en la Cuenca del Río Magdalena (CRM).....	10
2.5 Estudios realizados para cuantificación de biomasa micelial a través de la técnica de ácidos grasos.....	12
2.6 Descripción de los sistemas biológicos de estudio.....	14
2.6.1 Especie vegetal.....	14
2.6.2 Especies de hongos ectomicorrizógenos	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. PROBLEMA.....	17
5. PREGUNTAS	18
6. OBJETIVOS.....	18
6.1 Generales.....	18
6.2 Específicos	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
7.1 Selección de cepas.....	19
7.2 Producción de inóculo	19
7.3 Obtención de plántulas de <i>P. hartwegii</i>	20
7.3.1 Desinfección y escarificación de semillas de <i>P. hartwegii</i>	20
7.4 Sustrato.....	21
7.5 Confrontación planta-hongo.....	21
7.5.1 Inoculación.....	21
7.6 Diseño experimental.....	22

7.7	Cuantificación de biomasa micelial	23
7.8	Evaluación de variables.....	24
7.9	Análisis estadísticos	26
8.	DIAGRAMA DE FLUJO DEL MÉTODO	27
9.	RESULTADOS.....	28
9.1	Producción de inóculo.....	28
9.1.1	Crecimiento activo de las cepas	28
9.1.2	Crecimiento masivo de las cepas	28
9.1.3	Preparación del inóculo micelial	28
9.2	Crecimiento en invernadero	28
9.2.1	Supervivencia.....	29
9.2.2	Porcentaje de colonización.....	30
9.2.3	Altura.....	31
9.2.4	Diámetro del tallo.....	33
9.2.5	Biomasa aérea y radical.....	34
9.2.6	Cociente raíz/vástago	36
9.2.7	Cuantificación micelial a través del ácido graso 18: 2 ω 6,9	37
9.2.8	Caracterización macro y microscópica de las ectomicorrizas	41
9.2.8.1	<i>Suillus brevipes</i> con <i>Pinus hartwegii</i>	41
9.2.8.2	<i>Inocybe splendens</i> con <i>Pinus hartwegii</i>	41
10.	DISCUSIÓN.....	43
10.1	Supervivencia.....	43
10.2	Porcentaje de colonización.....	44
10.3	Variables de crecimiento en las plántulas de <i>Pinus hartwegii</i>	46
10.3.1	Altura.....	46
10.3.2	Diámetro del tallo.....	48
10.3.3	Biomasa aérea y radical.....	49
10.3.4	Cociente raíz/vástago	52
10.3.5	Cuantificación de biomasa micelial a través del ácido graso 18: 2 ω 6,9	53
10.3.6	Caracterización macro y microscópica de las ectomicorrizas	54
11.	CONCLUSIONES.....	59
12.	PERSPECTIVAS	60
13.	LITERATURA CITADA	61
14.	ANEXOS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** a) Beneficios hongo-planta y b) Estructuras de la ectomicorriza. 5
- Figura 2.** Esquema del diseño experimental en invernadero: a) Distribución de los tratamientos en los bloques y b) Tratamientos de inoculación. 22
- Figura 3.** Evaluación de la colonización ectomicorrízica en raíces de pináceas, mediante el establecimiento subjetivo de una escala (0-100 %) que representa la presencia, en porcentaje, de las diferentes estructuras ectomicorrízicas en el sistema radical de las plantas hospederas. 25
- Figura 4.** Lectura de una muestra procesada para *Suillus brevipes* (cromatograma): a) Abundancia de los ácidos grasos presentes en la muestra (picogramos), b) Tiempo de retención de los picos, c) Picos (indicadores de ácidos grasos) y d) Datos desglosados sólo de los picos de interés (tiempo en el que aparecen, área bajo la curva, porcentaje de área etc.). 39
- Figura 5.** Lectura de una muestra procesada para *Inocybe splendens* (cromatograma): a) Abundancia de los ácidos grasos presentes en la muestra (picogramos), b) Tiempo de retención de los picos, c) Picos (indicadores de ácidos grasos) y d) Datos desglosados sólo de los picos de interés (tiempo en el que aparecen, área bajo la curva, porcentaje de área etc). 40
- Figura 6.** a) Cuenca del Río Magdalena D.F., b) Plántula de *Pinus hartwegii*, c) Esporoma de *Suillus brevipes*, d) Esporoma de *Inocybe splendens*, e) Crecimiento activo de la cepa de *Suillus brevipes*, f) Crecimiento activo de la cepa de *Inocybe splendens*, g) Raíz micorrizada de *Pinus hartwegii* con *Suillus brevipes* (2.6 x 10X), h) Raíz micorrizada de *Pinus hartwegii* con *Inocybe splendens* (2.6 x 10X), i) Corte transversal de la ectomicorriza de *Pinus hartwegii* con *Suillus brevipes* (40X) y j) Corte transversal de la ectomicorriza de *Pinus hartwegii* con *Inocybe splendens* (40X). 42

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Géneros típicos de micobiontes y fitobiontes de zonas templadas y boreales involucradas en simbiosis ectomicorrízicas. 6
- Tabla 2.** Porcentaje y peso (mg) del ácido 18:2 ω 6,9 en micelio de *S. brevipes* crecido *in vitro*. 37
- Tabla 3.** Características de las micorrizas reportadas en Deemy y otros trabajos comparados con en el presente estudio para especies del género *Suillus*. 55
- Tabla 4.** Características de las micorrizas reportadas en Deemy y otros trabajos comparados con en el presente trabajo para especies del género *Inocybe*. 56

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Supervivencia de plántulas de <i>Pinus hartwegii</i> en invernadero durante 12 meses.....	29
Gráfica 2. Porcentaje de colonización micorrízica obtenida a los cuatro, ocho y 12 meses en plántulas <i>Pinus hartwegii</i>	30
Gráfica 3. Altura de plántulas de <i>Pinus hartwegii</i> en invernadero durante 12 meses.....	32
Gráfica 4. Diámetro de tallo de plántulas de <i>Pinus hartwegii</i> en invernadero durante 12 meses.	33
Gráfica 5. Biomasa aérea de plántulas de <i>Pinus hartwegii</i> en invernadero a los cuatro, ocho y 12 meses.	35
Gráfica 6. Biomasa radical de plántulas de <i>Pinus hartwegii</i> en invernadero a los cuatro, ocho y 12 meses.	35
Gráfica 7. Cociente raíz/vástago de plántulas de <i>Pinus hartwegii</i> en invernadero a los cuatro, ocho y 12 meses.	36

1. INTRODUCCIÓN

El término micorriza fue propuesto por Frank en 1885, literalmente significa “hongo-raíz”, para definir asociaciones simbióticas (vivir conjuntamente dos o más organismos), mutualistas, entre raíces de plantas y micelios de hongos, en las que ambos resultan beneficiados (Honrubia, 2009). Dentro de estas asociaciones se reconocen distintos tipos de micorrizas, en función de las especies fúngicas y vegetales que establecen la asociación, así como de su estrategia nutricional, puede posibilitar una penetración intracelular, por parte del hongo dentro de las células corticales de la raíz del hospedero. En todos los tipos de micorrizas, se establece una interfase de contacto íntimo entre hifas y células vegetales, donde se produce el intercambio de nutrientes de manera bidireccional (los nutrientes minerales son transportados disueltos en agua desde el hongo a la planta, mientras ésta cede al hongo los azúcares procedentes de su actividad fotosintética) (Honrubia *et al.*, 2002; Barea y Honrubia, 2004; Smith y Read, 2008).

Uno de los tipos de micorriza presentes en los ecosistemas de Bosques templados es la ectomicorriza la cual tienen una distribución limitada por las especies vegetales con las que se asocia. Sólo entre el 3 y 5 % de los vegetales establecen este tipo de micorriza (Barea, 1991; Honrubia *et al.*, 1992); sin embargo, su importancia forestal es abundante, no sólo por la amplia distribución de las familias de plantas de uso maderable con las que forman simbiosis, sino también por los diversos grupos fúngicos que desarrollan ésta asociación y que incluye muchas especies comestibles (Honrubia *et al.*, 1992; Smith y Read, 1997).

El conocimiento acerca de esta interacción micorrízica y la adecuada selección de las especies de hongos micorrizógenos y su posterior manipulación, tanto en laboratorio como en vivero, pueden ser aspectos claves para lograr con éxito el establecimiento de muchas especies vegetales en campo (Honrubia *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 2007), en donde no sólo facilitan la revegetación en condiciones particulares como suelos degradados, sino que también mejoran la formación de suelos y la repoblación de áreas forestales (Castellano, 1996) contribuyendo al reciclaje de la materia orgánica, la creación y modificación de hábitats para la fauna y, en general, son un componente importante en el mantenimiento del equilibrio ecológico de los bosques y de los ecosistemas (Zamora-Martínez, 2008).

Entre los ecosistemas ampliamente distribuidos de México están los bosques templados, los cuales se distribuyen en zonas de alta montaña con clima templado y frío, desde el nivel del mar hasta las porciones más elevadas del país (Rzedowski, 1978). Uno de los bosques más representativos en estas zonas es el de *Pinus hartwegii*; esta especie se encuentra distribuida en el Eje Neovolcánico Mexicano y en América Central, creciendo entre 3000 y 4000 m snm, comúnmente está asociada a los bosques de *Abies* y por sus características casi nunca se encuentran rodales puros ya que se distribuyen en forma dispersa (Perry, 1991; Lauer, 1978). Además es una conífera de gran importancia tanto ecológica como económica.

Una de las áreas importantes donde se encuentra dicha especie es la Cuenca del Río Magdalena (CRM), la cual se ubica al límite sur-occidental del Distrito Federal (Ávila-Akeberg, 2002), abarcando parte de las delegaciones políticas Magdalena Contreras, Álvaro Obregón y Cuajimalpa. Se encuentra entre los paralelos 19° 13' 53'' y 19° 18' 12'' de latitud norte y los meridianos 99° 14' 50'' y 99° 20' 30'' de longitud oeste (Ávila-Akerberg, 2002).

Sin embargo debido a la destrucción acelerada de los bosques de coníferas, entre ellos los de la CRM, especies como *Pinus hartwegii* se han visto muy afectadas (Álvarez, 2000; Nava, 2003). Por esta razón es necesario realizar estudios de los organismos que formen interacciones con estos árboles, en particular de aquellos que les proporcionan beneficios. Tal es el caso de hongos micorrizógenos que se asocian con las raíces y que favorecen la absorción de nutrimentos y agua (Kaul, 2002); además, de que brindan protección contra patógenos y les confieren capacidad de supervivencia (Honrubia *et al.*, 1992; Nava y Hernández, 2003), esto se ve reflejado en un mayor crecimiento vegetal.

En estudios de micorrizas, generalmente la colonización micorrízica ha sido evaluada a través de procedimientos convencionales, esta evaluación varía desde la simple observación de muestras frescas de raíces e identificación de la formación de la micorriza, hasta la cuantificación basada en contar las raíces cortas o secundarias micorrizadas y no micorrizadas a través del microscopio y presentar los datos con el porcentaje de estas por longitud de la raíz de la unidad (Brundrett *et al.*, 1996; Salmanowicz y Nylund, 1988).

No obstante, existen trabajos que evalúan el efecto de los hongos ectomicorrizógenos en el desarrollo de la planta, lo cual se enfoca de manera más directa a esta y al hongo se le deja de manera aislada, es decir que sólo se evalúa el hongo a través de la micorrización, pero no se

sabe que sucede con él en la rizósfera (Carrera-Nieva y López, 2004; Perea-Estrada *et al.*, 2009). Una manera de evaluar particularmente al hongo es a través de la biomasa micelial (Klamer y Bääth, 2004; Högberg, 2006; Karlinski *et al.*, 2007).

Recientemente, se han implementado métodos químicos como una alternativa para cuantificar la biomasa micelial producida en la rizósfera por el hongo micorrizógeno asociado a la planta hospedera (Rousseau *et al.*, 1992).

Algunos de estos métodos se basan en el uso de técnicas que cuantifican la biomasa a partir de los ácidos grasos contenidos en las paredes de las membranas celulares de los hongos, tales como: 1) Determinación de Ergosterol, 2) Ácidos Grasos Lípidos Neutros/ Ácidos Grasos Fosfolipídicos (NLFA/PLFA) y 3) Ácidos Grasos de Células Enteras (WCFA) (Bligh y Dyer 1959; White *et al.*, 1979; Frostgård *et al.*, 1991).

Los resultados obtenidos con los métodos convencionales, así como nuevas técnicas permitirán relacionar el efecto de la planta hacia el hongo y del hongo hacia la planta de manera más precisa la asociación micorrízica y con ello tener éxito en la producción de plantas inoculadas con fines de reforestación.

Este trabajo pretende evaluar el efecto de la inoculación en plántulas de *Pinus hartwegii* con *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* tomando en cuenta variables de crecimiento de la planta, así como el porcentaje de colonización y la cuantificación de biomasa micelial a través de ácidos grasos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Concepto de micorriza

El término micorriza se utiliza para designar la asociación mutualista entre algunas especies de hongos del suelo y las raíces de las plantas (Honrubia *et al.* 1992; Lakhanpal, 2002). Esta asociación se presenta en la mayoría de los ecosistemas terrestres, ya que entre el 80 y/o 90 % de las especies vegetales presentan algún tipo de esta asociación (Sallzer y Boller, 2000; Pérez-Moreno y Read, 2004) en donde tanto la planta y el hongo se ven favorecidos. El hongo obtiene los carbohidratos necesarios para su desarrollo, debido a que de manera independiente el hongo no es capaz de sintetizar y obtener de manera directa las fuentes de carbono que necesita; convirtiéndolo en un simbiote obligado (Francis y Read, 1994) (Figura 1). Asimismo, en la planta se ve favorecida la absorción, principalmente de fósforo y nitrógeno aunque existe un intercambio de elementos secundarios como potasio, calcio, azufre, zinc, cobre, entre otros (Francis y Read, 1994; Hernández *et al.*, 2003) (Figura 1).

Dependiendo del grado de penetración del hongo y las estructuras que se forman en la raíz del hospedero, las micorrizas se pueden dividir en tres grupos: endomicorrizas, ectendomicorrizas y ectomicorrizas (Smith y Read, 1992). Actualmente se reconocen siete tipos de simbiosis micorrízicas: arbuscular, ectomicorriza, ectendomicorriza, arbutoide, monotropoide, ericoide y de orquídeas (Smith y Read, 2008).

2.2 Ectomicorriza

Particularmente, la asociación ectomicorrízica se desarrolla principalmente en climas templados-fríos, característicos de bosques de coníferas y del bosque mesófilo de montaña (Kong-Luz, 2003), asimismo se ha registrado esta asociación en regiones tropicales (Pérez-Moreno y Ferrera-Cerrato, 1997; Moyersoen *et al.*, 2001). Las raíces micorrizadas poseen una cubierta compacta de micelio que rodea la raíz de las plantas llamado manto, algunas de cuyas hifas penetran entre las células corticales o epidérmicas de la raíz, formando la Red de Hartig (Lankhanpal, 2002; Kaul, 2002; Nava y Hernández, 2003).

Las estructuras que se presentan en las ectomicorrizas son el manto que es la capa de hifas extrarradicales, puede presentarse una o varias capas que cubren la superficie de la raíz, excepto en el ápice. Su función es proteger a la planta contra organismos patógenos y además

almacena sustancias de reserva y minerales; la Red de Hartig es el conjunto de hifas intrarradicales que rodean las células corticales formando una especie de laberinto. Su función es el intercambio de nutrientes del hongo a su hospedero y viceversa y el micelio externo es la masa de hifas que dan origen al cuerpo o talo del hongo (Smith y Read, 1997; Peterson y Bonfante, 1994).

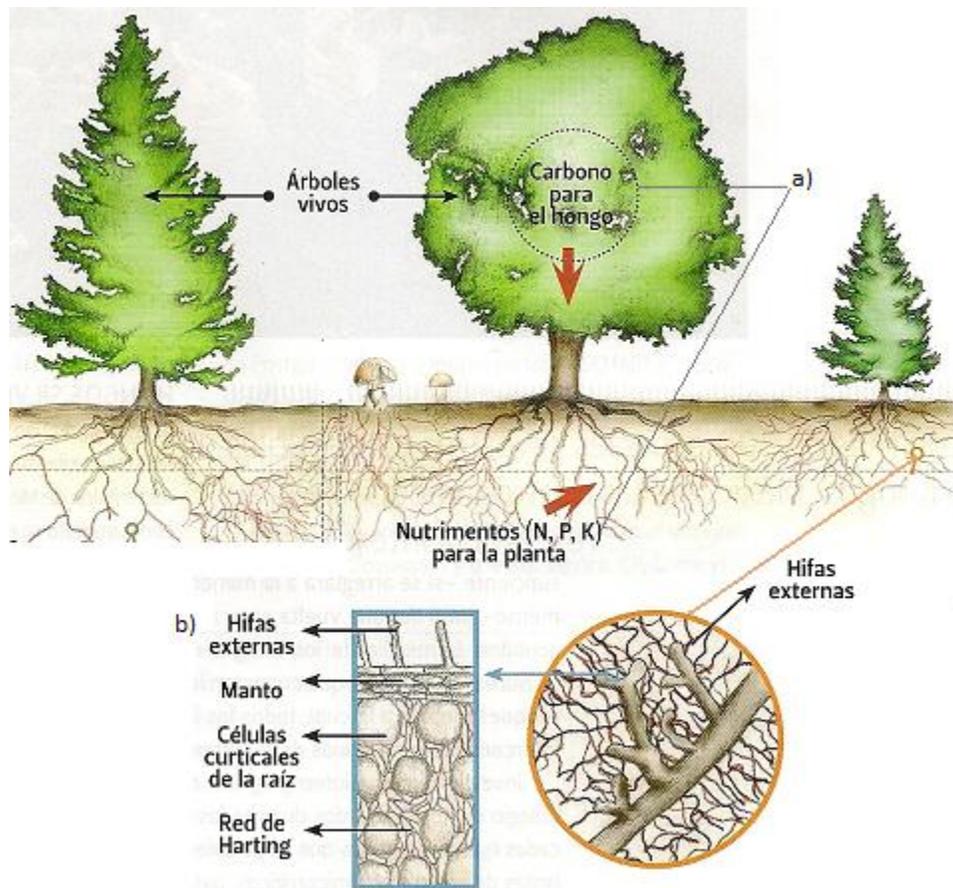


Figura 1. a) Beneficios hongo-planta y b) Estructuras de la ectomicorriza (Tomando y modificado de Pérez-Moreno *et al.*, 2011).

La asociación ectomicorrízica se establece entre alrededor de 5000 especies de hongos que fructifican por arriba del suelo (epigéas) como por debajo de éste (hipogéas) (Pera y Parladé, 2005). La mayoría pertenecen a las clases de los Basidiomycetes, algunos a la de los Ascomycetes y pocos a la de los Zigomycetes, principalmente en regiones templadas y boreales (Tabla 1) (Pérez-Moreno y Read, 2004). Con respecto a la planta hospedera, se conoce que cerca de 450 especies vegetales forman esta asociación incluidas en las familias de plantas de

enorme importancia forestal como Pinaceae, Fagaceae, Myrtaceae, Betulaceae y Salicaceae (Hawksworth *et al.*, 1995; Pera y Parladé, 2005).

Micobionte	Fitobionte
Basidiomycotina	
<i>Alpova, Amanita, Astraeus, Boletus, Cantharellus, Cortinarius, Entoloma, Gastroboletus, Gauteria, Gomphidius, Hebeloma, Hygrophorus, Hymenogaster, Hysterangium, Inocybe, Lacaria, Lactarius, Leccinum, Martellia, Paxillus, Pisolitus, Rhizopogon, Rozites, Russula, Scleroderma, Suillus, Tylopilus, Tricholoma, Xerocomus</i>	<i>Abies, Alnus, Betula, Corylus, Eucalyptus, Fagus, Larix, Picea, Pinus, Populus, Pseudotsuga, Quercus, Salix, Tsuga</i>
Ascomycotina	
<i>Balsamia, Elaphomyces, Genea, Geopora, Helvella, Hydnotria, Sphaerosporella, Tuber, Cenococcum</i>	<i>Abies, Betula, Corylus, Eucalyptus, Fagus, Larix, Pinus, Populus, Pseudotsuga, Quercus, Salix, Tsuga</i>
Zygomycotina	
<i>Endogone</i>	<i>Eucalyptus, Pinus, Pseudotsuga</i>

Tabla 1. Géneros típicos de micobiontes y fitobiontes de zonas templadas y boreales involucradas en simbiosis ectomicorrízicas (Pérez-Moreno y Read, 2004).

Se ha señalado que al presentarse de manera natural la asociación ectomicorrizógena, los ecosistemas mantienen su funcionalidad ecológica, inclusive aún después de un disturbio, contribuyendo a la estabilidad o en su caso a su recuperación. Por lo que desde el punto de vista funcional y ecológico será mejor una planta micorrizada a diferencia de aquella que no lo está, esto debido a los beneficios que presenta la asociación (Trappe, 1977).

También existe la posibilidad de que varias especies de hongos micorrizógenos puedan asociarse con una sola planta e interactuar entre ellos, esta forma de asociarse entre los micelios de los hongos de varias especies con las raíces de diversas plantas incrementa el área de absorción e intercambio de nutrimentos, lo cual le confiere ventajas adicionales. A esta capacidad que tienen los hongos ectomicorrizógenos de formar la asociación con una sola especie de planta hospedera o con una amplia gama de ellas, se denomina especificidad (Marx y Cordell *et al.*, 1994).

De acuerdo con la gama de especies de plantas que forman micorriza con las especies fúngicas se pueden apreciar tres categorías de especificidad: 1) estrecha, en donde los hongos ectomicorrízicos se asocian con un género de planta. Un ejemplo de ello lo constituye *Alnus rubra*, el cual se asocia únicamente con hongos fuertemente específicos como *Alpova diplophloeus* (Molina, 1979; 1981), 2) intermedia, estos hongos tienen la particularidad de establecer la asociación con una familia de hospederos, por ejemplo, *Suillus* y *Rhizopogon* con las Pináceas, tales como *Pseudotsuga menziesii* y *Pinus spp.* (Molina *et al.*, 1992a; Molina y Trappe, 1982). De acuerdo con la clasificación de Molina *et al.*, 1992, las especies de *Suillus brevipes* y algunas especies del género *Inocybe* se localizan en esta categoría y 3) amplia, donde los hongos tienen la capacidad de formar micorrizas con un gran número de diversas plantas hospederas, tal es el caso de *Cenococcum geophilum*, que es quizá el hongo con la gama más amplia, con cerca de 150 hospederos (Molina *et al.*, 1992a; 1992b).

Debido a los beneficios que le confiere la interacción de los hongos ectomicorrizógenos a la planta de interés forestal, es importante conocer aspectos sobre la inoculación y el efecto que tiene sobre el crecimiento del hospedero.

2.3 Estudios de inoculación con hongos ectomicorrizógenos en México

Particularmente en nuestro país, existen escasas investigaciones que se han dado a la tarea de abordar la importancia de los HEM en el crecimiento de las plantas y rehabilitación de bosques templados perturbados, así como las relaciones que se establecen entre éstos con otros grupos de organismos (Estrada-Torres, 2003).

Los primeros estudios en cuanto a la inducción de la ectomicorriza, consistieron en ensayos de inoculación en vivero con varias especies de *Pinus*, tal como *P. montezumae* con algunas cepas exóticas de HEM producidas vegetativamente como *Pisolithus arhizus*, en los cuales se encontraron efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas inoculadas (Cuevas-Rangel, 1979; Estrada-Torres y Valdés, 1986). No obstante, solamente se ha realizado una evaluación de plantas inoculadas con HEM en campo, utilizando especies exóticas (Valdés, 1986).

Recientemente, en algunos viveros se ha implementado el uso de hongos ectomicorrizógenos con el objetivo de incrementar la supervivencia, establecimiento y crecimiento de los árboles de especies forestales tanto en condiciones de vivero como de campo (Carrera-Nieva y López, 2004).

En este sentido Santiago-Martínez (2002), realizó ensayos de inoculación esporal con dos diferentes sustratos (suelo forestal y suelo de cerro con suelo forestal) en *Pinus montezumae* y varios HEM (*Amanita caesarea*, *Boletus edulis*, *Inocybe dulcamara*, *Inocybe griseovelata* y *Suillus glandulosipes*) encontrando variabilidad en cuanto a los porcentajes de micorrización debido a la infectividad de los hongos y el efecto del sustrato, además mencionó que de todos los géneros de hongos ectomicorrizógenos utilizados el de *Suillus* toleró más el manejo de laboratorio, recomendando su uso en plantaciones de pinos.

Por su parte Muñoz (2003), realizó un estudio de inoculación controlada en *Pinus pseudostrobus* con esporas de *Laccaria bicolor* y *P. montezumae* con esporas de cuatro diferentes HEM (*Hebeloma mesophaeum*, *Inocybe dulcamara*, *Suillus glandulosipes* y *Suillus tomentosus*), en donde se presentó una mayor supervivencia en las plantas micorrizadas con respecto a las no micorrizadas, además de un mejor crecimiento, asimismo los efectos de las especies fúngicas fueron diferentes en cada uno de los hospederos. En el primer caso se encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas de *Pinus pseudostrobus* con *Laccaria bicolor* con respecto a las plantas testigos y *P. montezumae* con las cuatro especies de HEM, de manera general se observó que *Hebeloma mesophaeum* proporcionó mayor altura y producción de biomasa, asimismo con *Suillus tomentosus* se obtuvo mayor diámetro y producción de biomasa, mientras que *Inocybe dulcamara* y *Suillus glandulosipes* mostraron ser las especies más infectivas.

Hernández (2003), realizó dos ensayos donde evaluó la efectividad e infectividad de inóculo esporal con diferentes HEM en *Pinus montezumae* y *Pinus pseudostrobus* en diferentes sustratos, en donde observó que los sustratos influyeron sobre el desarrollo de las plantas y el porcentaje de micorrización. En el primer ensayo la altura y el diámetro de las plantas de *Pinus montezumae* inoculadas con *Suillus grandulosipes* no presentaron diferencias significativas con las plantas testigos, así como la micorrización fue muy baja; para el segundo ensayo la inoculación con plantas de *Pinus pseudostrobus* e *Inocybe griseovelata* y *Laccaria bicolor*,

presentaron mayor altura, mayor diámetro de la corona y mayor biomasa, sin embargo con *Laccaria bicolor*, *Suillus tomentosus* y *Russula olivacea* los porcentajes de micorrización fueron más altos (entre 11 y 12 %).

Carrera-Nieva y López (2004), evaluaron la inoculación con varios hongos ectomicorrízicos (*Laccaria laccata*, *Suillus pseudobrevipes*, *Amanita fulva*, *Amanita caesarea*, *Suillus granulatus*, *Boletus clavipes* y *Pisolithus tinctorius*) con *Pinus patula* y *Pinus greggii*, en condiciones de invernadero tomando en cuenta variables de crecimiento como altura, diámetro de tallo, parte aérea y radical, así como el porcentaje de colonización. Los porcentajes de colonización micorrízica variaron entre especies de 9 a 66 %. Las plantas inoculadas con *Laccaria laccata* y *Suillus pseudobrevipes* presentaron un mayor porcentaje de colonización y desarrollaron un micelio externo abundante. Los valores medios más altos en altura, peso seco y diámetro de tallo se observaron en plantas inoculadas con *Laccaria laccata*, *Suillus pseudobrevipes* y *Boletus clavipes* en comparación con el testigo. En el caso de *A. fulva* en peso seco total se obtuvo el valor menor, mientras que *A. caesarea* el diámetro de tallo y el peso seco total se obtuvieron los valores menores.

También se han realizado estudios de inoculación en vivero de *Eucalyptus urophylla* y *P. greggii* con esporas de *Pisolithus tinctorius*, encontrando que con la inoculación esporal se obtuvieron mayores beneficios en las dos especies de plantas hospederas (García-Rodríguez *et al.*, 2006).

Por su parte Perea-Estrada *et al.* (2009), evaluaron en invernadero la influencia de dos regímenes de humedad del sustrato [80 a 100 y 40 a 60 % de la capacidad máxima de retención de agua del sustrato (CMRAS)], así como la adición de tres dosis de Nitrógeno (N) mineral (140, 70 y 0 Kg de N ha⁻¹) y la inoculación con tres HEM comestibles (*Hebeloma* spp., *Laccaria* spp., y *Clavulina* aff. *cinerea*), en el desarrollo de dos especies de pinos (*Pinus patula* Schl. et Cham y *Pinus hartwegii* Lindl). Al final observaron que el crecimiento para las dos especies forestales fue afectado diferencialmente en los dos regímenes de humedad evaluadas, en función de los HEM inoculados. Las plantas de *P. patula* inoculadas con *Hebeloma* spp., presentaron valores más altos en peso seco total, del follaje y la raíz, así como mayor altura y diámetro de tallo, en comparación con las plantas inoculadas con *Laccaria* spp., *Clavulina* aff. *cinerea* o sin inocular, cuando crecieron en el régimen de 80 a 100 % de la humedad edáfica,

comparado con el régimen de 40 a 60 %. Las colonizaciones micorrízicas encontradas al final del experimento fueron bajas en todos los tratamientos y no resultaron afectadas por la fertilización nitrogenada.

Por otro lado, se han obtenido aislamientos de micelios de hongos ectomicorrizógenos a partir de esporomas, los cuales se han empleado en diferentes estudios, en los que destacan la caracterización microscópica de los micelios (Cruz-Ulloa, 1990 y 1991; Pérez-Moreno y Ferrera-Cerrato, 1991); la optimización del crecimiento de las colonias en diferentes medios nutritivos, pH (Vázquez-García *et al.*, 2002 y Alvarado-Sánchez, 2008) y concentraciones de glucosa (Aquiahuatl *et al.*, 1998 y Alvarado-Sánchez, 2008).

Aunque en México se han incrementado los estudios sobre la asociación micorrízica y los HEM en los últimos años, se desconoce el efecto y/o beneficios que más de una especie nativa de estos hongos tienen sobre un mismo hospedero y de esta manera poder seleccionar el más apto que favorezca el crecimiento de la planta.

En este contexto, el proyecto “Manejo de Ecosistemas y Desarrollo Humano” ha tenido como objetivo construir una red nacional de investigación enfocada al manejo sustentable de los ecosistemas con el fin de generar modelos de ordenamiento, conservación, uso y restauración de los valores, los recursos y los servicios ambientales. Dicho proyecto se realiza en cuatro cuencas en el país, una de ellas es la Cuenca del Río Magdalena ubicada en el Distrito Federal (Fig. 6a). Como parte de este proyecto, se han considerado a los HEM como una alternativa de uso en la restauración de esta zona (<http://campus.iztacala.unam.mx/mmrg/mega>), utilizándolos como una herramienta de inoculación y para evaluar parámetros de crecimiento de la actividad funcional del hongo en su hospedero.

2.4 Estudios de hongos ectomicorrizógenos en la Cuenca del Río Magdalena (CRM)

En la CRM ya se han realizado algunos estudios de listados con hongos ectomicorrizógenos destacando los de mayor relevancia, como el de Delgado (2004) quien citó 41 especies de HEM. Por otro lado, Villarruel y Cifuentes (2006) reportaron 74 especies de macromicetos de las cuales 15 son ectomicorrizógenas, mientras que Meza (2010) registró 40 especies de HEM, 27 especies para el bosque de *Pinus* y 34 para el bosque de *Abies*.

Por su parte, Alvarado-Sánchez (2008) aisló siete cepas de HEM de la CRM y encontró que *Suillus brevipes*, *Boletus pinophilus* e *Inocybe splendens* presentaron los mejores crecimientos al ser sometidas a pruebas de crecimiento en diferentes medios nutritivos, pH's y fuente de carbono.

Sandoval (2010), realizó la inducción de la micorriza en dos fases experimentales con plántulas de *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii* inoculadas con *Suillus brevipes* en vivero tomando parámetros de crecimiento como diámetro a la base, altura total y altura al meristemo y posteriormente se trasplantaron en campo (bosque) y al año de establecimiento se reinocularon con *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens*, respectivamente, asimismo se evaluaron otros parámetros de crecimiento en la planta, como supervivencia, cociente raíz/vástago, peso seco total, tasa relativa de crecimiento, así como la caracterización de la micorriza y un análisis de macronutrientes contenidos en el suelo. En este trabajo se concluyó que *Abies religiosa* es una especie de difícil manejo y recomienda una inoculación mixta con HEM nativos para aumentar su supervivencia y en el caso de *Pinus hartwegii* se comprobó que la inoculación con HEM favorece la absorción de nutrimentos, principalmente fósforo.

Respecto a la evaluación de variables ecofisiológicas, Flores (2010) determinó el efecto de los hongos ectomicorrizógenos (*Suillus brevipes* e *Inocybe splendens*) en plántulas de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*. Dicha autora encontró que *Pinus hartwegii* presentó un mayor potencial osmótico (-1.68 Mpa), una resistencia estomática (1.52 s cm^{-1}), la capacidad fotosintética (mayor absorción de CO_2 , 4.45 ppm cm^{-2}), el crecimiento y la supervivencia en campo, concluyendo que la ectomicorriza tiene un efecto positivo, particularmente en *P. hartwegii* ya que presentó una supervivencia muy alta (80 %) además de gran altura, por lo que recomendó la inoculación de *P. hartwegii* con fines de restauración de la Cuenca del Río Magdalena. En cambio, para *A. religiosa* no es necesaria la inoculación previa debido al alto potencial de inóculo presente en el campo.

Generalmente en estudios realizados con HEM, la forma de evaluar el efecto de la asociación micorrízica y del hongo sobre su hospedero se realiza a través de la medición de variables de crecimiento en la planta. No obstante, es importante considerar métodos para evaluar de manera directa el efecto que se presenta en el hongo, una vez que se ha llevado a cabo la asociación. Un ejemplo de ello es la producción de biomasa micelial desarrollada en la

rizósfera de planta inoculada ya que se ha evaluado el efecto del hongo de forma indirecta en el hospedero a través de su crecimiento, pero se tiene poca información acerca de la producción del micelio del hongo en el suelo en donde interactúan ambos simbioses, de esta manera se puede relacionar este parámetro con las variables de crecimiento, así como la capacidad de colonización.

2.5 Estudios realizados para cuantificación de biomasa micelial a través de la técnica de ácidos grasos

En este contexto, Olsson (1999) señaló que los hongos micorrizógenos forman extenso micelio en el suelo y que juegan un papel significativo en la mayoría de los ecosistemas, por lo que la valoración de la biomasa fúngica utilizando la técnica de NLFA/PLFA (Ácidos Grasos Lípidos Neutros y Ácidos Grasos Fosfolipídicos) es de gran relevancia, puesto que contribuye al conocimiento de las estrategias de desarrollo del micelio de ciertas comunidades de hongos micorrizógenos, así como los procesos que se dan en el suelo, tal como la traslocación de nutrientes y la composición de microorganismos presentes en el suelo (Bäath, 2003). Para la micorriza arbuscular (MA) y la ectomicorriza (EM), la cuantificación de los ácidos grasos proporciona una nueva y prometedora herramienta para la valoración de biomasa fúngica en el suelo y en las raíces. Para el caso de los hongos ectomicorrizógenos Olsson (1999) y Bäath (2003) encontraron que los ácidos grasos fosfolipídicos (PLFAs), específicamente el 18:2 ω 6, 9 (9,12 ácido octadecadienoico, metil éster) que domina entre todos, se puede utilizar como buen biomarcador para la cuantificación de biomasa micelial en sistemas experimentales, ya que se encuentra de manera natural en la pared de la membrana celular de los hongos ectomicorrizógenos. Además, con el uso de PLFAs específicos es posible estudiar interacciones entre el micelio micorrízico y bacterias en el suelo, micelio de hongos micorrizógenos y el micelio de hongos saprofitos y hongos parásitos en suelo y de raíces en condiciones naturales.

Olsson (1999), mencionó que los métodos de estimación para determinar la composición de ácidos grasos pueden ser utilizados en estudios de interacciones en condiciones *in vitro* ya que se obtienen factores de conversión confiables, es decir, la cantidad de ácidos grasos es un buen indicador de la cantidad de biomasa que se presenta en una muestra. Un ejemplo de ello lo constituye el trabajo realizado por Zeppa *et al.* (2000), quienes hicieron un análisis del contenido de ergosterol a lo largo del desarrollo de la ectomicorriza entre *Tilia platyphyllos* y *Tuber borchii* en condiciones *in vitro*. Sus resultados revelaron un cambio en la biomasa

fúngica durante las diferentes fases de desarrollo de la ectomicorriza. No obstante, señalan que en muestras ambientales o experimentos en campo, la cuantificación de la biomasa fúngica a través de ergosterol puede variar ya que también cuantificaría la biomasa de otros microorganismos de la rizósfera como las bacterias. Por su parte, Mille-Lindblom *et al.* (2004), cuantificaron la biomasa fúngica en muestras ambientales mediante el ergosterol, encontrando que este ácido graso es fotosensible a la luz solar por lo que sugieren que el uso del ergosterol como biomarcador de los hongos vivos debe ser usado con cautela, evitando que las muestras sean expuestas a diversos grados de intensidad luminosa puesto que la exposición puede alterar las cantidades de dicho ácido graso drásticamente.

Este mismo hecho fue encontrado por Klamer y Bääth (2004), al analizar el contenido de ácidos grasos como el ergosterol y el fosfolípido 18:2 ω 6, 9 en 11 especies de hongos saprobios crecidos *in vitro* en medios nutritivos. Dichos autores encontraron que tanto en el ergosterol como en el fosfolípido 18:2 ω 6,9 (PLFA) las estimaciones de la biomasa fúngica fueron similares, esto debido a que ambos marcadores cuantifican ácidos grasos que son componentes de la pared de la membrana celular fúngica. Klamer y Bääth (2004) y Högberg (2006), señalan que aunque ambos marcadores son adecuados, el 18:2 ω 6, 9 es mejor, ya que es más específico para los hongos ectomicorizógenos, además considera que es un buen indicador de biomasa fúngica en zonas perturbadas y el ergosterol es un buen biomarcador pero en zonas menos perturbadas.

Finalmente, Karlinski *et al.* (2007) analizaron la composición de WCFA (Ácidos Grasos de Células Enteras) de tres diferentes estructuras ectomicorízicas: esporomas, micelio en cultivo *in vitro* y raíces micorrizadas para evaluar el uso potencial de ácidos grasos como biomarcadores en los HEM y las bacterias asociadas con las ectomicorrizas en plántulas de *Picea noruega*. Dichos autores compararon los métodos para la identificación de los ácidos encontrando una mayor cantidad de 18:2 ω 6, 9, 18:1 ω 9 y 16:0 para los esporomas fúngicos y para los cultivos puros de micelio, mientras que en las raíces micorrizadas se encontraron ácidos grasos que también se localizan en las bacterias como el ergosterol. Dichos autores concluyeron que los métodos basados en la cuantificación de ácidos grasos en microorganismos, pueden ser útiles en los estudios de asociación ectomicorizógena y pueden ayudar a diferenciar biomasa fúngica de otros microorganismos asociados a las raíces de la planta hospedera en el campo.

Como se puede observar, en años recientes ya se han realizado numerosos estudios en donde utilizan a los ácidos grasos como un biomarcador que permite la cuantificación de biomasa micelial, utilizándose algunos más generales como el ergosterol u otros más específicos como el 18:2 ω 6,9 y 18:1 ω 9. Sin embargo, en nuestro país aún no existen trabajos que incluyan estos biomarcadores, por lo que el uso de estas técnicas como alternativa para llevar a cabo la cuantificación micelial de hongos micorrizógenos ayudaría a evaluar la cantidad de biomasa micelial producida por el HEM y su relación con la capacidad de formar la asociación ectomicorrízica y el efecto en el hospedero en condiciones de laboratorio, invernadero o campo.

2.6 Descripción de los sistemas biológicos de estudio

2.6.1 Especie vegetal

Pinus hartwegii

Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

Phylum: Coniferophyta

Clase: Pinopsida

Orden: Pinales

Familia: Pinaceae

Género: *Pinus*

Nombre Científico: *Pinus hartwegii* Lindl.

Autor del nombre: Karl Theodor Hartweg Lindl.

(<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU>)

La especie *P. hartwegii* Lindl., es conocida con diferentes nombres: pino hartweg, ocote, pino de las alturas (Musálem y Solís, 2000), o pino escobetón, pino negro, pino de montaña mexicano (Farjon *et al.*, 1997). Es un árbol que se desarrolla a una altitud entre 2700 a 4000 msnm, llega a medir de 5 a 25 o en ocasiones de 30 m de altura; tronco con un diámetro hasta de 75 cm, corteza gruesa y áspera, de color café oscuro tornándose grisácea, dividida en placas irregulares o cuadrangulares, ramas extendidas con hojas de 4 ó 5 en cada fascículo, a veces 3 ó

6, rígidas, de 6 a 18 cm de largo, de color verde claro, casi glaucas, vaina persistente; amentos masculinos de 1 a 2.5 cm de largo, de color amarillento o violáceo, tornándose a café; conillos femeninos oblongos, de color azul-violáceo y dispuestos en grupos de 2 a 4, a veces 6, cortamente pedunculados; conos ovoideo-oblongos, levemente encorvados, de 7 a 14 cm de largo, por 5 a 8 cm de diámetro, casi sésiles, de color café oscuro o casi negro, a veces con tinte rojizo, persistentes, dispuestos por pares o en grupos de 3 ó 4; semillas de 5 a 8 mm de largo, de color café, con el ala de 12 a 20 mm de largo por 5 a 12 mm de ancho, de color café con líneas oscuras. En el Valle de México se encuentra entre 2600 y 4200 m de altitud, con frecuencia integrando los bosques que forman el último nivel arbóreo de la vegetación (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

2.6.2 Especies de hongos ectomicorrizógenos

I) *Suillus brevipes*

Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Clase: Holobasidiomycete

Orden: Boletales

Familia: Suillaceae

Género: *Suillus*

Especie: *Suillus brevipes* (Peck) Kuntze

Las especies de este género se asocian sólo con coníferas en las primeras etapas de vida (Singer, 1986; Molina *et al.*, 1992a, 1992b) en especial con los géneros de *Pinus*, *Larix* y *Pseudotsuga* (Dahlberg y Finlay, 1999). Forma esporomas epígeos con himenóforos tubulares (Bowen, 1994; Santiago-Martínez, 1992 y 2002). Generalmente es de fácil aislamiento y manipulación, por lo que ha sido utilizado en estudios *in vitro* (Alvarado Sánchez, 2008; Santiago-Martínez 2002). El píleo es plano convexo de 68 mm de diámetro, viscoso, liso de color café muy pálido (10YR7/3), con mancha de color café oscuro (10YR4/3). Contexto carnoso higrófono por debajo de la cutícula, de 13 mm de ancho de color amarillo (2.5Y8/8), aroma muy ligero. Poros circulares de 1-2 por mm, de tamaño mediano, de color amarillo

(2.5Y7/8) y tubos amarillos (2.5Y7/6), de 9 mm de ancho y un cm de profundidad, adnados al estípite.

Estípite carnoso, higrófono, concóloro al contexto de su interior, salvo la base que es café amarillento oscuro (10YR5/4). Al exterior es de color café amarillento oscuro (10YR3/4) salvo en el ápice que es amarillo (2.5Y8/8) y pruinoso, con las pruinas de color café oscuro rojizo (5YR3/3) de 10 mm de diámetro, 50 mm de largo, cilíndrico pero atenuado en la base. Esporas lisas de 7.16-8.61 x 2.05-3.44 μ (Fig. 6c) (www.indexfungorum.org/names/names.asp).

II) *Inocybe splendens*

Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

División: Basidiomycota

Clase: Holobasidiomycete

Orden: Cortinariales

Familia: Cortinariaceae

Género: *Inocybe*

Especie: *Inocybe splendens* R. Heim

Es un género que se asocia en los primeros años de los árboles de coníferas y bosques de encino (Mason *et al.*, 1990). Se asocia a las primeras etapas de vida de las plántulas (Bowen, 1994). Presenta láminas adheridas al estípite; en los esporomas maduros el velo interno se transforma en una cortina, los cuales se observan como fibrillas en el borde del píleo (Herrera y Ulloa, 1990). El píleo entre 20-50 mm, cónico al principio, más adelante umbonado convexo, eventualmente plano-convexo, a menudo en forma de un escudo obtuso, superficie radialmente fibrilosa, viscoso cuando es húmedo, gris-marrón y margen agudo. La carne es blanca, olor levemente espermático. Laminillas gris pálido cuando son jóvenes, aceituna-marrón pálido cuando son viejas. Estípite entre 20-50 x 5-6 mm, cilíndrico, con el bulbo precipitado, superficie blanquecina al principio y marrón amarillento. Esporas 11-12 x 5-6 μ , amigdaliforme, lisas, de color marrón amarillento y de pared gruesa (Fig. 6d) (www.indexfungorum.org/names/names.asp).

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia que tienen las especies forestales, entre ellas *Pinus hartwegii* y especies ectomicorrizógenas como *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens*, se han intensificado los trabajos sobre la selección de cepas de HEM e inoculación, determinando la efectividad e infectividad a través de la evaluación de variables de crecimiento en la planta.

No obstante, es necesario también estudiar la relación que existe en la producción de biomasa micelial que produce el hongo en la rizósfera durante el proceso de formación de la asociación con el hospedero, y con ello poder determinar si la cantidad de micelio producida por el hongo está relacionada con su capacidad de colonización y con el crecimiento de la planta.

El conjunto de la evaluación de las variables tanto de la planta como del hongo permitirá obtener datos más precisos acerca del efecto en el crecimiento y supervivencia de las plántulas de *P. hartwegii*.

4. PROBLEMA

1. Se desconoce el efecto que tienen *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* sobre el crecimiento de *Pinus hartwegii*.
2. Se ha considerado el porcentaje de colonización como una variable de respuesta a la inoculación con cepas de HEM, sin embargo se desconoce si la biomasa micelial se puede relacionar con las demás variables de crecimiento del hospedero.

5. PREGUNTAS

1. ¿La inoculación con los HEM *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* tendrá un efecto diferente sobre la supervivencia y el crecimiento en plántulas de *Pinus hartwegii*?
2. ¿Existirán diferencias en la capacidad de colonización y la cantidad de biomasa micelial producida por *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* sobre *Pinus hartwegii*?

6. OBJETIVOS

6.1 Generales

1. Evaluar el efecto de *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* provenientes de la Cuenca del Río Magdalena sobre el crecimiento y supervivencia en plántulas de *Pinus hartwegii* en condiciones de invernadero.
2. Evaluar la cantidad de biomasa micelial producida por *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* producida en la rizósfera de las plántulas inoculadas.

6.2 Específicos

1. Determinar el efecto el inóculo de dos cepas de HEM (*Suillus brevipes* e *Inocybe splendens*) sobre la supervivencia y el crecimiento en plántulas de *Pinus hartwegii* en condiciones de invernadero.
2. Determinar la infectividad de las dos cepas evaluadas mediante el porcentaje de colonización en plántulas de *P. hartwegii*.
3. Determinar si hay una relación entre la cantidad de biomasa micelial rizosférica y la capacidad de colonización a lo largo de la asociación ectomicorrízica formada entre *S. brevipes* e *I. splendens* con *P. hartwegii*.
4. Caracterizar la morfología macro y microscópica de la ectomicorriza formada por cada una de las cepas con la planta hospedera.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Selección de cepas

Las dos cepas de HEM utilizadas fueron *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens*, las cuales se seleccionaron de acuerdo con los resultados obtenidos por Alvarado-Sánchez (2008), al realizar pruebas de crecimiento, en las que consideró cuatro concentraciones de glucosa (10, 20, 30 y 40 g/L); tres pH's (3, 5 y 7) en tres medios: Biotina Aneurina Ácido Fólico (BAF), Agar Extracto de Malta (EMA) y Agar Dextrosa Papa (PDA). Dicha autora encontró que la cepa de *Suillus brevipes* creció mejor en concentraciones intermedias de glucosa, medios enriquecidos y pH ácidos, y para la cepa de *Inocybe splendens*, el crecimiento micelial se vio favorecido en medios enriquecidos, pH neutros y fue indiferente a la concentración de la glucosa. Las cepas se encuentran depositadas en el cepario de HEM del Laboratorio de Micorrizas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

7.2 Producción de inóculo

El crecimiento de las cepas de *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* consistió en cuatro fases: a) crecimiento activo en medio Biotina Aneurina Ácido Fólico (BAF) sólido, b) crecimiento masivo en medio BAF líquido, c) producción de inóculo en medio BAF líquido mezclado con turba/ vermiculita (proporción 1:2) y d) extracción del micelio y lavado del inóculo. Con este procedimiento se obtuvo un inóculo puro, el cual se adicionó a los tratamientos con plántulas de *Pinus hartwegii*.

- a) Crecimiento activo de las cepas: para la producción del inóculo micelial, se prepararon cajas Petri adicionadas con el medio de cultivo BAF sólido para ambas cepas, a las cuales se agregaron tres fragmentos pequeños de aproximadamente 5x5 mm distribuidas de forma homogénea sobre el medio, esto bajo condiciones de asepsia. Una vez realizada esta fase se mantuvieron en incubación a 25°C, durante un periodo de tres semanas (Marx y Bryan, 1975; Miller y Allen, 1992; Santiago-Martínez y Estrada-Torres, 1999) (Figuras 6e y 6f).

b) Crecimiento masivo: se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de medio BAF líquido, a los que se les agregó 10 fragmentos de 5x5 mm de micelio crecido en medio sólido, y se mantuvieron en una incubadora de agitación a 150 rpm a una temperatura de 25°C, durante un periodo de cuatro semanas aproximadamente (Marx y Bryan, 1975; Miller y Allen, 1992; Santiago-Martínez y Estrada-Torres, 1999).

c) Producción de Inóculo: para la preparación del inóculo micelial se utilizaron frascos de vidrio con capacidad de un litro, a los cuales se les agregó 600 ml de vermiculita, 60 ml de turba como sustrato y con 300 ml de medio de cultivo líquido BAF, y se esterilizaron durante 15 minutos a 120 libras de presión. Bajo condiciones asépticas se virtió el micelio que creció en los matraces Erlenmeyer. Posteriormente, los frascos se incubaron a 25°C en condiciones de oscuridad hasta que el micelio cubrió por completo el sustrato (Marx y Bryan, 1975; Miller y Allen, 1992; Santiago-Martínez y Estrada-Torres, 1999).

d) Obtención del inóculo: cuando el micelio cubrió el sustrato contenido en las botellas, este fue sacado con cuidado y se colocó en un pedazo de manta de cielo, la cual se expuso al chorro de agua durante 3 min con la finalidad de eliminar residuos del medio de cultivo. Posteriormente se colocó sobre papel de estraza para que se secase a temperatura ambiente durante un día. Una vez que el micelio estaba seco, se guardó en bolsas de plástico y se refrigeró a 4°C, hasta que se utilizó (Santiago-Martínez y Estrada-Torres, 1999).

7.3 Obtención de plántulas de *P. hartwegii*

7.3.1 Desinfección y escarificación de semillas de *P. hartwegii*

Las semillas fueron donadas por el vivero de San Luis Tlaxialmanalco, D.F. y provienen de San Luis Quipil, Ajusco, D.F. las cuales fueron colectadas en el 2009. La desinfección y escarificación de éstas se realizó con Peróxido de Hidrógeno al 30% durante una hora en agitación, con la finalidad de eliminar residuos como la resina y ablandar la testa, al término del tiempo se lavaron tres veces con agua destilada. Posteriormente se aplicó un fungicida (Captan 1g/L o Benomil 0.5 g/L) y se mantuvieron en refrigeración a 4°C durante 24 horas, pasado este tiempo se lavaron nuevamente con agua destilada y se aplicó un bactericida (Cloranfenicol 33 mg/L) durante una hora en agitación. Con este proceso de desinfección se eliminan agentes patógenos como el hongo que causa enfermedades como el caso de damping-off (Galindo Flores *et al.*, 2004).

Para la germinación de las semillas, se utilizaron charolas de aluminio de 46 x 36 cm que contenían como sustrato una mezcla de turba/vermiculita en una proporción 1:2. En ellas se sembraron las semillas y se realizaron riegos continuos con agua destilada para mantener la humedad (Peñuelas y Ocaña, 1984).

7.4 Sustrato

El sustrato que se utilizó para trasplantar las plántulas consistió de una mezcla de turba (T)/vermiculita (V) y suelo forestal (SF) en una proporción 1:2:1. Este último se colectó en la zona de pino de la Cuenca del Río Magdalena. El suelo se esterilizó por una hora con vapor y se dejó enfriar y airear temperatura ambiente durante 24 h. Esto se realizó tres veces (en tres días) a presión en la autoclave.

Por otra parte la turba y la vermiculita se esterilizaron por 20 minutos a presión en la autoclave. Una vez que los sustratos estaban estériles se realizó la mezcla (T:V:SF).

7.5 Confrontación planta-hongo

7.5.1 Inoculación

Cuando las plántulas tuvieron de 45-60 días o las primeras raíces secundarias, se procedió a la inoculación con los HEM, para lo cual las plantas fueron trasplantadas a contenedores cilíndricos con capacidad de 250 ml, a los que se les adicionó el sustrato en tres partes: 1) en la parte inferior del contenedor se colocó el sustrato (turba/vermiculita y suelo forestal estéril), 2) en la parte media 25 ml del inóculo producido en los frascos de vidrio o hasta donde tuvieran contacto las raíces y 3) en la parte superior para llenarlo nuevamente con la mezcla de los tres sustratos. Las plántulas fueron inoculadas con el inóculo micelial en invernadero.

Las plantas se distribuyeron en el invernadero de acuerdo al diseño experimental en bloques al azar que se menciona a continuación y se regaron periódicamente a capacidad de campo (Figura 2).

7.6 Diseño experimental

Se realizó un diseño en bloques al azar con un factor.

Factor. Cepas de hongos: *Inocybe splendens*, *Suillus brevipes* y Testigo.

Se contemplaron dos tratamientos y un grupo control (en total tres tratamientos) los cuales se describen a continuación y se observan en la Figura 2:

CEPAS	SUSTRATO
	Suelo Forestal (SF)
<i>Suillus brevipes</i> (Sb)	SF+Sb
<i>Inocybe splendens</i> (Is)	SF+Is
Testigo (SH)	SH*+ SF

*SH: Sin Hongo

Los colores que se muestran en la tabla son los que se asignaron en las etiquetas de los tratamientos en el invernadero.

Los tratamientos se distribuyeron en tres bloques al azar en el invernadero.

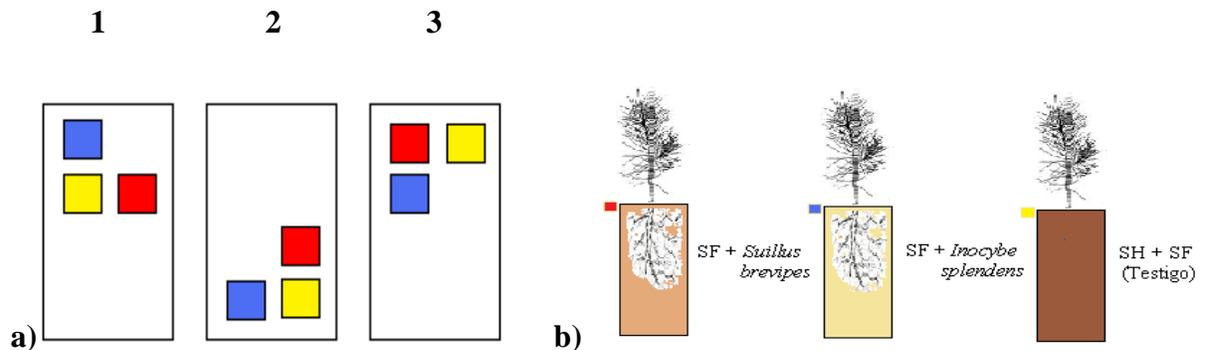


Figura 2. Esquema del diseño experimental en invernadero: a) Distribución de los tratamientos en los bloques y b) Tratamientos de inoculación.

Se contemplaron 30 plántulas por tratamiento para cada bloque, en total 90 plántulas por tratamiento. De las cuales 20 plántulas por bloque se asignaron para evaluar supervivencia, altura y diámetro de tallo y las 10 restantes se asignaron para evaluar porcentaje de micorrización, biomasa aérea, biomasa radical y biomasa micelial.

7.7 Cuantificación de biomasa micelial

A los cuatro y ocho meses de desarrollo se tomaron dos plantas al azar por tratamiento y de cada bloque (seis en total), de las cuales se obtuvieron cuatro gramos del sustrato para realizar la cuantificación de biomasa micelial formada por cada una de las cepas. La biomasa micelial fue evaluada, a través de la técnica de ácidos grasos siguiendo el protocolo de WCFA (Whole Cell Fatty Acid) tomando como referencia el 18:2 ω 6, 9 (Bligh & Dyer 1959; White *et al.*, 1979; Frostgärd *et al.*, 1991). El protocolo consistió en cinco pasos, que se describen en el anexo 1. Los resultados desglosados se presentan de forma gráfica en un cromatograma, y a los valores obtenidos bajo la curva se aplicó la siguiente fórmula:

Biomasa micelial = (% de área del pico del ácido graso/ % área del pico del estándar) x cantidad de estándar añadido/ 312 g mol/ gramos de la muestra original.

Dónde:

- 312 g mol es una constante
- El estándar añadido son 25 microgramos

7.8 Evaluación de variables

Para conocer el efecto de *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* en el crecimiento de las plántulas de *Pinus hartwegii* se analizaron las siguientes variables:

- a) Supervivencia, se evaluó bimestralmente en cada uno de los tratamientos a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 meses, lo cual consistió en contar a las plántulas vivas de todos los tratamientos en cada uno de los tiempos correspondientes, tomando como criterio aquellas que estaban turgentes y verdes, ya que si se observaba que la plántula estaba completamente seca y sin crecimiento esta se consideraba como muerta.
- b) Altura, se midió a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 meses, con la ayuda de una regla métrica y consistió en medir a las plántulas desde la base del tallo hasta el ápice de las mismas.
- c) Diámetro del tallo se midió a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 meses, con un vernier se midió el ancho que presentaba el tallo en la base de la parte aérea en los diferentes tiempos de evaluación.
- d) Biomasa vegetal de la parte aérea y radical (se lavaron las raíces, para eliminar las partículas adheridas del sustrato) expresada en peso seco a los 4, 8 y 12 meses, se separaron ambas partes aérea y radical de las plántulas en bolsas de papel de estraza las cuales se secaron en una estufa a 60 °C durante un día, pasado este tiempo se sacaron de la estufa y se pesaron en una balanza analítica.
- e) Cociente raíz/vástago, se obtuvo a partir de los datos de peso seco de la parte aérea y la parte radical a los 4, 8 y 12 meses de acuerdo a Hunt (1982):

Cociente raíz/vástago (R/V): $R/V = PSr/PSv$

Donde: PSr es el peso seco de la raíz

PSv es el peso seco del vástago

En los diferentes tiempos de evaluación se contemplaron todas las plántulas, sólo para biomasa aérea y radical, así como para el cociente raíz/vástago se utilizaron 6 (dos por cada bloque, por cada tratamiento).

Para el caso del micobionte se realizaron mediciones a los 4, 8 y 12 meses, considerando 6 plántulas al azar por cada variable para evaluar:

- a) Porcentaje de colonización micorrízica, se retiró la parte radical de las plántulas lavándolas con agua para retirar restos de sustrato adherido a las mismas, posteriormente se colocaron en charolas de plástico para ser observadas en el estereoscopio y con la ayuda de un contador manual, se contaron las raíces micorrizadas y las no micorrizadas, obteniendo así el porcentaje (Brundett *et al.*, 1996). Al final se comparó con la escala utilizada por el USDA Forest Service de Georgia (Figura 3), con diferentes grados de micorrización que va de: nula cuando no se obtienen raíces micorrizadas, pobre cuando se obtiene de 1 a 24%, moderada de 24 a 29%, buena de 50 a 74% y excelente de 75 a 100% (Marx *et al.*, 1991; Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

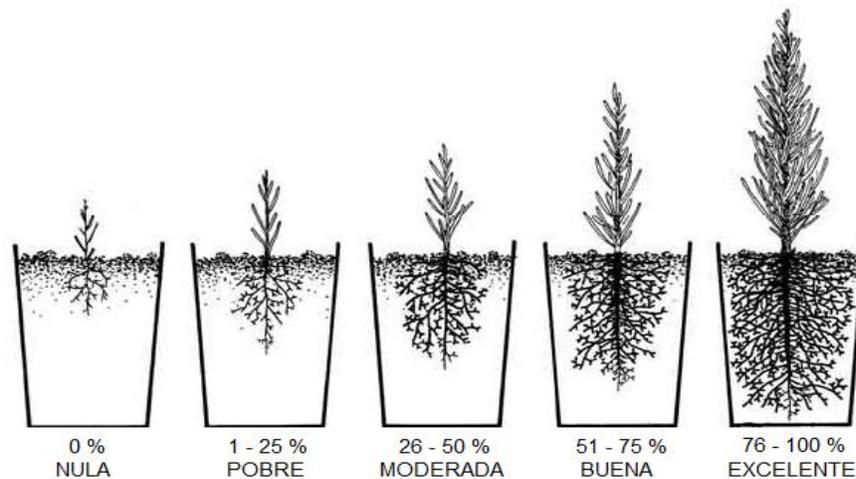


Figura 3. Evaluación de la colonización ectomicorrízica en raíces de pináceas, mediante el establecimiento subjetivo de una escala (0-100 %) que representa la presencia, en porcentaje, de las diferentes estructuras ectomicorrízicas en el sistema radical de las plantas hospederas (Tomado y modificado de Marx *et al.*, 1991; Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

- b) Cuantificación de biomasa micelial en el sustrato (ácido graso, 18:2 ω 6, 9) a los 4 y 8 meses (Bligh y Dyer 1959; White *et al.* 1979; Frostgård *et al.* 1991) (Anexo 1).

c) Caracterización macro y microscópica de la ectomicorriza, se separó la parte radical de las plántulas lavándolas con agua para retirar restos de sustrato adherido a las mismas, al terminar lo anterior se observaron al microscopio estereoscópico y óptico para describir las características más comunes como el color, tipos de ramificación (dimensión, formas), superficie del manto, presencia de rizomorfos y cordones miceliares, tipo de manto etc., tomándose fotografías de cada tipo de micorriza formada por ambos simbioses, asimismo se utilizaron tablas de colores (Munsell, 1975) y guías para determinar la caracterización (Agerer, 1986, 1987-1993; http://www.pfc.cfs.nrcan.gc.ca/biodiversity/bcern/manual/ecto_morph_anat_e.html).

7.9 Análisis estadísticos

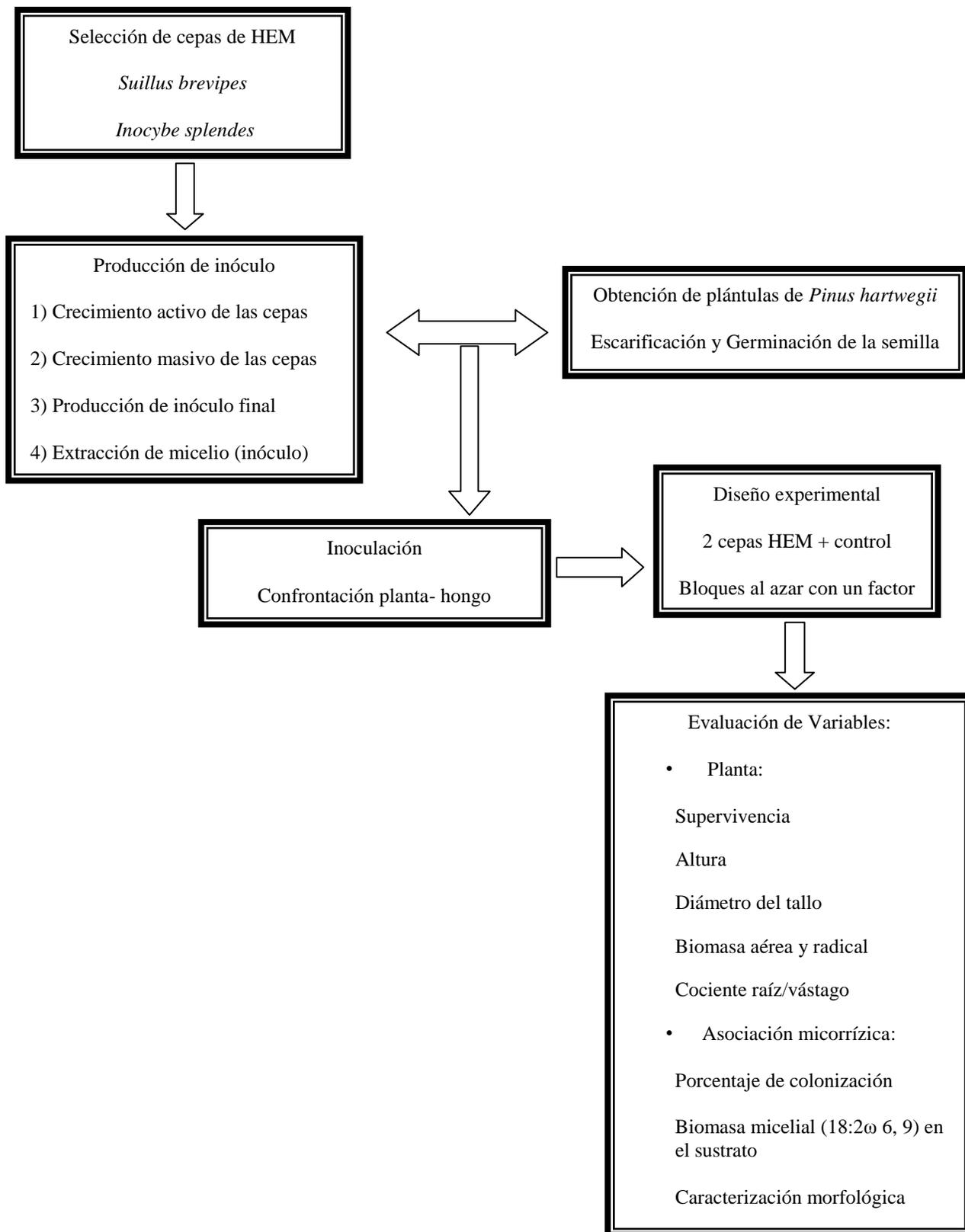
Para determinar si hubo diferencias estadísticas en cuanto a la altura, biomasa aérea y del sistema radical, así como el cociente raíz/vástago entre tratamientos, se realizó un análisis de varianza de una vía.

Para comparar las medias estadísticamente significativas se aplicó la prueba de intervalos múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$) (Zar, 1984).

La supervivencia se analizó mediante la prueba no paramétrica “logrank” de Peto y Peto (Pyke y Thompson, 1986) con un análisis de X^2 para comparar entre especies y entre tratamientos.

El porcentaje de micorrización se analizó con la prueba estadística de X^2 mediante tablas de contingencia 3x2 ($p \leq 0.05$) (Zar, 1984).

8. DIAGRAMA DE FLUJO DEL MÉTODO



9. RESULTADOS

9.1 Producción de inóculo

9.1.1 Crecimiento activo de las cepas

Se realizaron resiembras de *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* para obtener el crecimiento activo, en cajas Petri en medio BAF sólido, las cuales se lograron propagar las cepas cada dos meses, 10 cajas de cada una.

9.1.2 Crecimiento masivo de las cepas

Se realizó el cultivo de las cepas en medio líquido BAF para obtener el crecimiento masivo en matraces Enlarmeyer obteniendo 15 matraces por cada cepa.

9.1.3 Preparación del inóculo micelial

Se prepararon 20 frascos por cada cepa de los cuales se obtuvieron 12 frascos de inóculo de *Inocybe splendens*, mientras que para *Suillus brevipes* se obtuvieron 16 frascos.

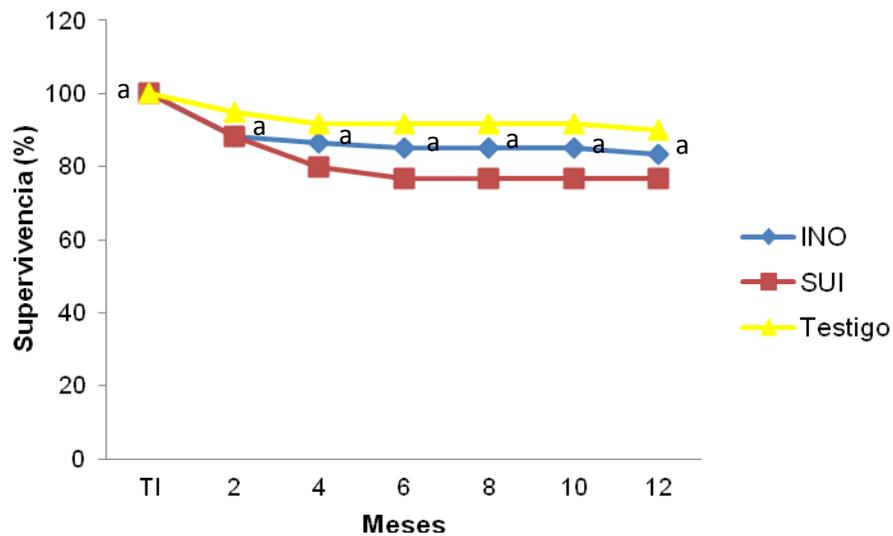
9.2 Crecimiento en invernadero

A partir del trasplante en los contenedores cilíndricos se realizaron mediciones a las plántulas al mes de establecimiento, a los dos, cuatro, seis, ocho, 10 y 12 meses en invernadero de las variables de crecimiento señalados en la metodología.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada una de las variables:

9.2.1 Supervivencia

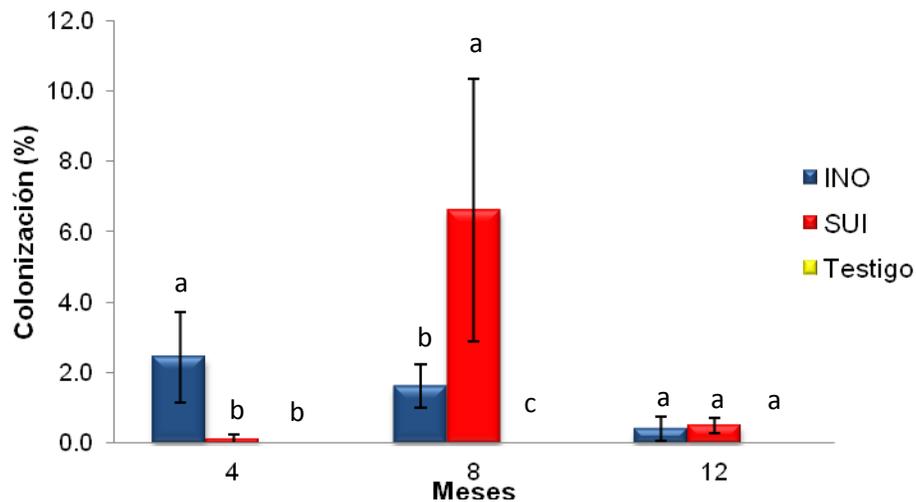
El porcentaje de supervivencia al tiempo inicial de establecimiento de las plántulas de *Pinus hartwegii* fue del 100% en todos los tratamientos. A los dos meses los valores de supervivencia en los tratamientos fueron de 88.33% a 95 % ($X^2=0.6372$, $P=0.7272$). A los cuatro meses de 80% a 91.66% ($X^2=1.4587$, $P=0.4822$). A los seis, ocho, 10 y 12 meses los valores se mantuvieron constantes, de 76.66% a 90% para cada tiempo de evaluación y para los tres tratamientos. Cabe mencionar que al realizar el análisis estadístico de X^2 , no hubo diferencias significativas entre tratamientos para cada uno de los tiempos de evaluación ($X^2 = 1.9145$, $P=0.3839$) (Gráfica 1).



Gráfica 1. Supervivencia de plántulas de *Pinus hartwegii* en invernadero durante 12 meses. Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas en cada tiempo de evaluación. $P < 0.05$ ($n=20$)

9.2.2 Porcentaje de colonización

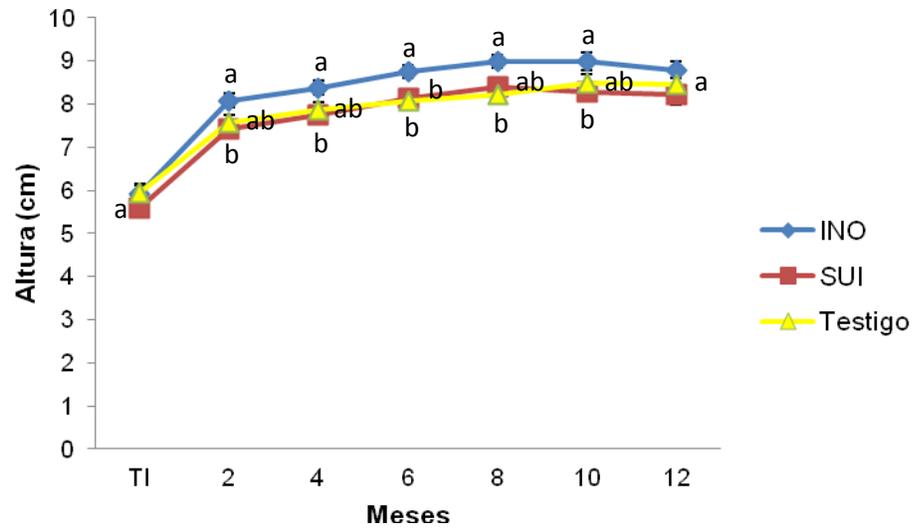
En la gráfica 2 se muestran los resultados en la colonización micorrízica, las plántulas inoculadas con *Inocybe splendens* presentaron el valor más alto de micorrización a los cuatro meses (2.4%), siguiéndole *Suillus brevipes* con el valor más bajo (0.1%), mientras el tratamiento Testigo con un valor de 0 %, siendo el tratamiento de inoculación con *Inocybe splendens* estadísticamente diferente a los dos tratamientos restantes ($X^2=6.80$, $P=0.0334$). A los ocho meses las plántulas inoculadas con *Suillus brevipes* presentaron el valor más alto significativamente (6.6%), mientras que en *Inocybe splendens* el valor fue de 1.6% y en el tratamiento Testigo se obtuvo un valor de 0% ($X^2=7.4621$, $P=0.0240$) (Gráfica 2). Finalmente, a los 12 meses el porcentaje de micorrización en *Suillus brevipes* fue de 0.5%, en *Inocybe splendens* el valor fue de 0.4% y para el Testigo fue de 0%. Estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los tratamientos a este tiempo ($X^2=5.6440$, $P=0.0595$) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentaje de colonización micorrízica obtenida a los cuatro, ocho y 12 meses en plántulas *Pinus hartwegii*. Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas en cada tiempo de evaluación. $P < 0.05$ ($n=6$)

9.2.3 Altura

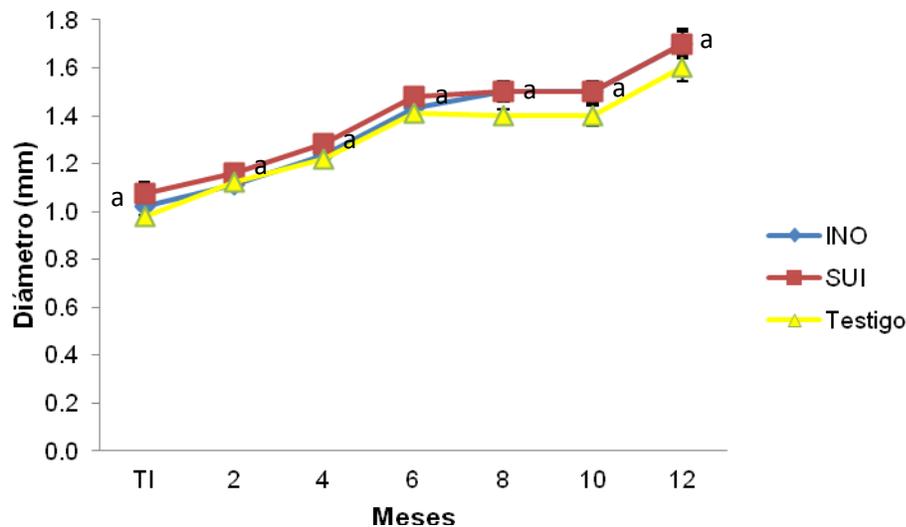
En cuanto a la altura de las plántulas de *Pinus hartwegii*, los valores obtenidos para los tres tratamientos en el tiempo inicial fluctuaron entre los 5.91 a 5.94 cm., no habiendo diferencias significativas ($F_{2,105}=1.044$, $P=0.356$). A los dos meses de evaluación las plántulas inoculadas con *Inocybe splendens* presentaron el valor mayor (8.08 cm), siguiéndole los tratamientos Testigo con 7.57 cm y *Suillus brevipes* con 7.42 cm. Al realizar el análisis estadístico presentaron diferencias entre *Inocybe splendens* y *Suillus brevipes* ($F_{2,105}=3.791$, $P=0.026$). A los cuatro meses en el tratamiento de inoculación con *Inocybe splendens* se presentó el valor más alto con 8.38 cm, en el Testigo fue de 7.87 cm y en *Suillus brevipes* de 7.76 cm. A este tiempo hubo diferencias significativas entre los tratamientos de *Inocybe splendens* y *Suillus brevipes* ($F_{2,105}=3.417$, $P=0.036$). El tratamiento de *Inocybe splendens* a los seis meses presentó un valor de 8.75 cm, siendo estadísticamente diferente a los otros tratamientos, en *Suillus brevipes* el valor fue de 8.13 cm y el Testigo fue de 8.09 cm ($F_{2,105}=4.120$, $P=0.019$). A los ocho meses en *Inocybe splendens* se presentó un valor mayor con 8.99 cm, para el tratamiento con *Suillus brevipes* fue de 8.40 cm, mientras que el tratamiento Testigo presentó un valor de 8.23 cm. El análisis estadístico mostró diferencias significativas de *Inocybe splendens* respecto al tratamiento Testigo ($F_{2,105}=4.726$, $P=0.011$). No obstante, a los 10 meses el tratamiento de *Inocybe splendens* presentó un valor de 9 cm, seguido por el tratamiento Testigo con 8.50 cm y para *Suillus brevipes* fue de 8.30 cm, presentando diferencias significativas entre *Inocybe splendens* y *Suillus brevipes* ($F_{2,105}=3.137$, $P=0.048$). En el último tiempo de evaluación el valor obtenido con el tratamiento de *Inocybe splendens* fue de 8.79 cm, para el Testigo el valor fue de 8.47 cm y finalmente *Suillus brevipes* con 8.21 cm, al realizar el análisis estadístico no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos a este tiempo ($F_{2,87}=1.044$, $P=0.356$) (Gráfica 3).



Gráfica 3. Altura de plántulas de *Pinus hartwegii* en invernadero durante 12 meses. Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas en cada tiempo de evaluación. $P < 0.05$ ($n=20$)

9.2.4 Diámetro del tallo

Con respecto al diámetro del tallo, los valores entre los tratamientos al tiempo inicial ($F_{2,105}=1.885$, $P=0.157$) y a los dos meses ($F_{2,105}=0.684$, $P=0.507$) del experimento, fluctuaron entre 1.1 mm en el caso de *Inocybe splendens* y el Testigo, para *Suillus brevipes* fue de 1.2 mm. A los cuatro meses el tratamiento con *Suillus brevipes* presentó un valor de 1.3 mm, seguidos por los tratamientos con *Inocybe splendens* y el Testigo los cuales presentaron valores similares de 1.2 mm ($F_{2,105}=1.291$, $P=0.279$). Para los seis meses en el tratamiento de *Suillus brevipes* se presentó un valor de 1.5 mm, mientras que los tratamientos con *Inocybe splendens* y el Testigo fueron de 1.4 mm ($F_{2,105}=1.388$, $P=0.254$). A los ocho ($F_{2,105}=1.781$, $P=0.173$) y 10 meses ($F_{2,105}=1.137$, $P=0.324$) los valores para *Inocybe splendens* y *Suillus brevipes* fueron de 1.5 mm en los dos tiempos de evaluación y en el Testigo fue de 1.4 mm. Los valores obtenidos a los 12 meses, tanto en el tratamiento con *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* fueron de 1.7 mm, mientras que para el Testigo el valor fue de 1.6 mm ($F_{2,87}=1.313$, $P=0.274$). Sin embargo el ANOVA no mostró diferencias significativas entre tratamientos para cada uno de los tiempos de evaluación (Gráfica 4).

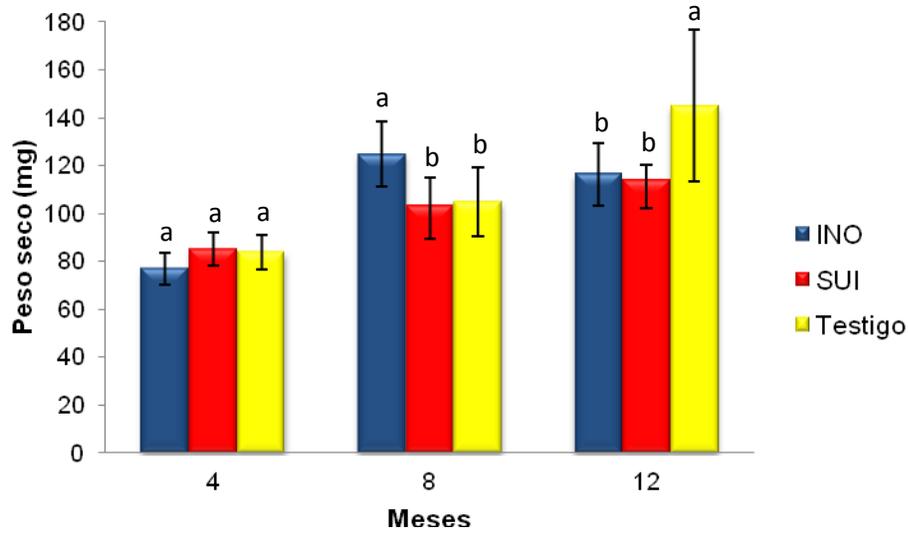


Gráfica 4. Diámetro de tallo de plántulas de *Pinus hartwegii* en invernadero durante 12 meses. Letras iguales no hay diferencias estadísticamente diferentes en cada tiempo de evaluación. $P < 0.05$ ($n=20$)

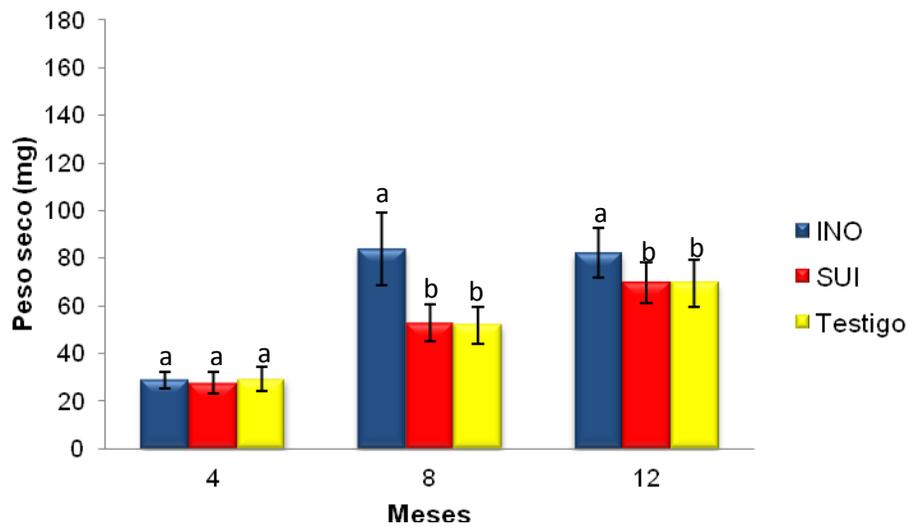
9.2.5 Biomasa aérea y radical

En cuanto a la biomasa aérea, los valores obtenidos para *Suillus brevipes* y el tratamiento Testigo fueron de 84.98 y 83.98 mg respectivamente, mientras que el tratamiento con *Inocybe splendens* el valor fue de 76.95 mg, no habiendo diferencias significativas para este tiempo de evaluación ($F_{2,15}=0.397$, $P=0.679$). A los ocho meses, el valor más alto lo presentaron las plántulas inoculadas con *Inocybe splendens* (124.78 mg) siendo estadísticamente diferente de los tratamientos Testigo (104.95) y *Suillus brevipes* (103.11 mg) ($F_{2,15}=1.949$, $P=0.185$). A los 12 meses de evaluación el valor más alto se presentó en el tratamiento Testigo (145.08 mg) seguido de los otros tratamientos, *Inocybe splendens* y *Suillus brevipes* con 116.45 y 114.05 mg respectivamente, con el ANOVA se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el Testigo respecto a los dos tratamientos de inoculación ($F_{2,15}=0.734$, $P=0.496$) (Gráfica 5).

Con respecto a la biomasa radical, a los cuatro meses, los valores promedio para los tratamientos Testigo e *Inocybe splendens* fueron de 29.30 mg y 29.02 mg respectivamente, mientras que el tratamiento con *Suillus brevipes* el valor obtenido fue de 27.73 mg, al realizar el análisis estadístico no hubo diferencias significativas entre tratamientos ($F_{2,15}=0.514$, $P=0.608$). A los ocho meses el valor más alto estadísticamente significativo lo presentaron las plántulas inoculadas con *Inocybe splendens* (83.75 mg) con respecto a los tratamientos de *Suillus brevipes* (52.85 mg) y el Testigo (51.88 mg) ($F_{2,15}=5.553$, $P=0.020$). A los 12 meses el valor más alto se registró nuevamente con *Inocybe splendens* (82.15 mg) siendo estadísticamente diferente con respecto a los valores obtenidos para *Suillus brevipes* y el Testigo (69.92 y 69.53 mg respectivamente) ($F_{2,15}=0.557$, $P=0.584$) (Gráfica 6).



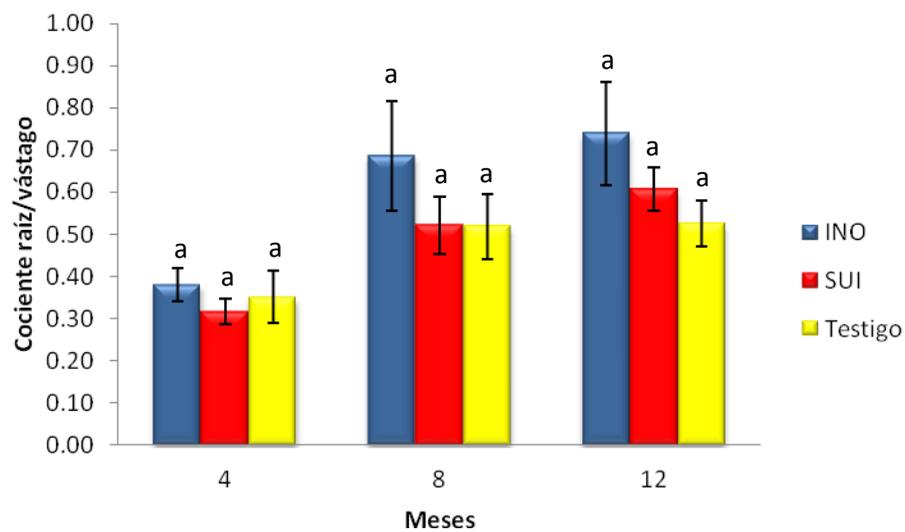
Gráfica 5. Biomasa aérea de plántulas de *Pinus hartwegii* en invernadero a los cuatro, ocho y 12 meses. Letras iguales no hay diferencias estadísticamente diferentes en cada tiempo de evaluación. $P < 0.05$ (n=6)



Gráfica 6. Biomasa radical de plántulas de *Pinus hartwegii* en invernadero a los cuatro, ocho y 12 meses. Letras iguales no hay diferencias estadísticamente diferentes en cada tiempo de evaluación. $P < 0.05$ (n=6)

9.2.6 Cociente raíz/vástago

Para obtener la relación cociente raíz/vástago los valores obtenidos entre tratamientos son similares en cada uno de los tiempos de evaluación, aunque a los cuatro meses ($F_{2,15}=4.79$, $P=.628$) la tendencia de asignación es menor, ya que para los ocho ($F_{2,15}=1.022$, $P=.384$) y 12 meses de evaluación ($F_{2,15}=1.690$, $P=.218$) en comparación con la primera evaluación los valores fueron mayores. Con el ANOVA no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Gráfica 7).



Gráfica 7. Cociente raíz/vástago de plántulas de *Pinus hartwegii* en invernadero a los cuatro, ocho y 12 meses. Letras iguales no hay diferencias estadísticamente diferentes en cada tiempo de evaluación. $P < 0.05$ (n=6)

9.2.7 Cuantificación micelial a través del ácido graso 18: 2 ω 6,9

Se realizaron tres pruebas para cuantificar biomasa micelial a través del ácido graso 18: 2 ω 6,9.

En la primera prueba se utilizaron tres muestras de micelio crecido en una mezcla de turba y vermiculita y suelo forestal inoculado al primer mes de establecimiento (tiempo inicial) con *Suillus brevipes* y tres muestras de *Inocybe splendens*. Una vez hecha la extracción de los ácidos grasos en las muestras e inyectar la muestra en el cromatógrafo de gases para la detección del ácido graso de interés (18: 2 ω 6,9), no se detectó dicho ácido en ninguna de las muestras de los dos tratamientos de inoculación (Figuras 4 y 5).

Al no poderse cuantificar los ácidos grasos en el sustrato, se realizó una segunda prueba, pero contemplando micelio crecido en medio líquido (BAF). El objetivo fue detectar la presencia del ácido graso en cultivo *in vitro* que contenía únicamente micelio. Se utilizaron seis muestras (tres con *Suillus brevipes* y tres con *Inocybe splendens*) y aplicando el mismo procedimiento que en la primera prueba, se observaron picos detectables en las tres muestras correspondientes a *Suillus brevipes*, es decir, se detectó el ácido graso (18: 2 ω 6,9). Cada uno de estos picos se reportaron las áreas bajo la curva en el cromatograma, a las que se les aplicó la fórmula señalada en la metodología para determinar la biomasa micelial (Tabla 2). En el caso del micelio de *Inocybe splendens*, no se detectaron picos del ácido graso (18: 2 ω 6,9) en ninguna de las tres muestras estudiadas.

MUESTRAS <i>Suillus brevipes</i>	Porcentaje (%) de área del estándar	Porcentaje (%) de área del ácido 18:2 ω 6,9	Resultados obtenidos
1	63.79	3.13	0.001965 mg
2	74.5	2.98	0.001602 mg
3	69.4	2.40	0.001385 mg

Tabla 2. Porcentaje y peso (mg) del ácido 18:2 ω 6,9 en micelio de *S. brevipes* crecido *in vitro*.

Finalmente, en la tercera prueba se utilizaron muestras del sustrato obtenido de los tratamientos de inoculación con *Suillus brevipes* y con *Inocybe splendens* que se encontraban en el invernadero a los cuatro y ocho meses.

Se procesaron dos muestras provenientes del sustrato de los cuatro meses, una de *S. brevipes* y una de *I. splendens*. Al realizar la cuantificación no se pudo identificar el ácido graso de interés en ninguna de las dos muestras. Posteriormente se realizaron dos extracciones más con las muestras de cuatro meses, pero ahora con algunas modificaciones al procedimiento de la técnica y al equipo, una vez realizadas estas modificaciones se procesaron las muestras, en donde tampoco se logró determinar el ácido de interés.

Cabe mencionar que en las dos muestras correspondientes a los ocho meses (una con *S. brevipes* y otra con *I. splendens*) tampoco se detectó el ácido graso de interés.

Después de probar con varias modificaciones tanto en la técnica como en el equipo no se logró detectar el ácido graso para ninguno de los tiempos de evaluación.

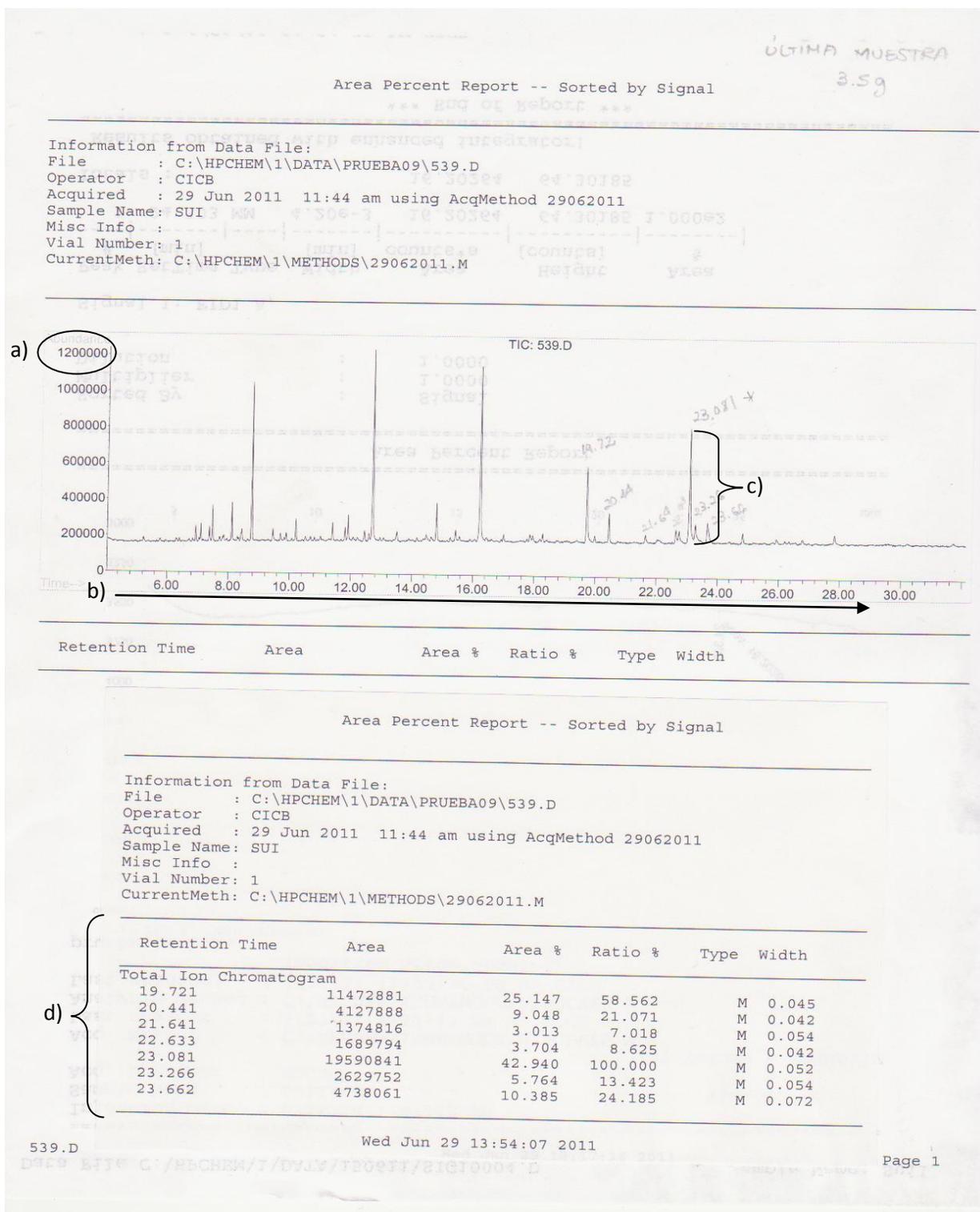


Figura 4. Lectura de una muestra procesada para *Suillus brevipes* (cromatograma): a) Abundancia de los ácidos grasos presentes en la muestra (picogramos), b) Tiempo de retención de los picos, c) Picos (indicadores de ácidos grasos) y d) Datos desglosados sólo de los picos de interés (tiempo en el que aparecen, área bajo la curva, porcentaje de área etc.).

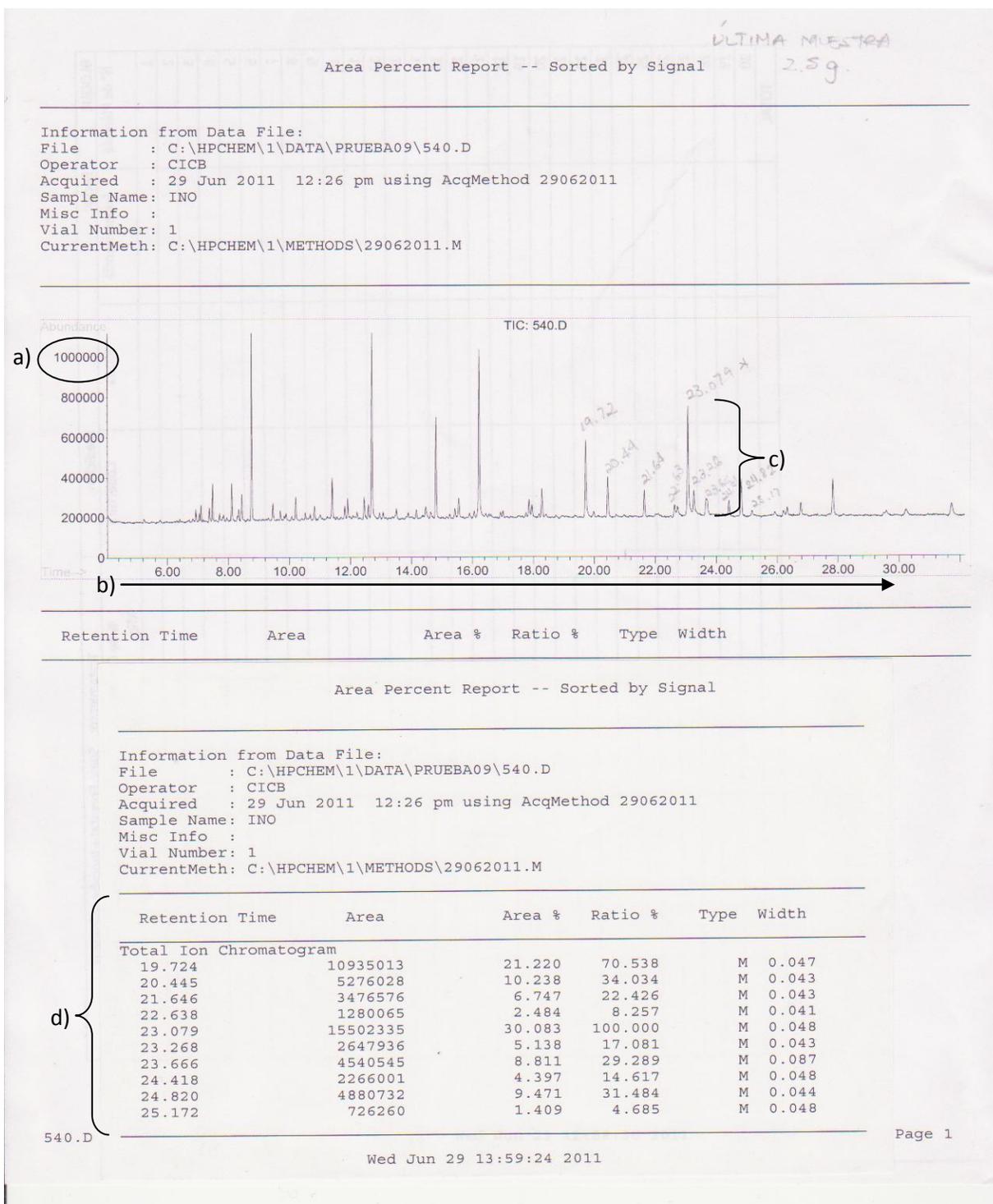


Figura 5. Lectura de una muestra procesada para *Inocybe splendens* (cromatograma): a) Abundancia de los ácidos grasos presentes en la muestra (picogramos), b) Tiempo de retención de los picos, c) Picos (indicadores de ácidos grasos) y d) Datos desglosados sólo de los picos de interés (tiempo en el que aparecen, área bajo la curva, porcentaje de área etc).

9.2.8 Caracterización macro y microscópica de las ectomicorrizas

9.2.8.1 *Suillus brevipes* con *Pinus hartwegii*

La ectomicorriza formada por *S. brevipes* con *P. hartwegii* en etapas jóvenes son simples (sin ramificaciones) de color café rojizo (5YR 4/4) con una longitud de 0.8 mm y dicotómicas de color rojo (10R 4/5) con terminaciones ligeramente torcidas y puntas color blanco (10YR 8/1) en etapas maduras de desarrollo con una longitud de 1.8 mm, con diámetros en promedio de 0.1 mm en etapas jóvenes a 0.3 mm en etapas maduras (Fig. 6g). Presentó un manto Plectenquimatoso de tipo F (hifas con parches de células redondeadas situadas en el manto) según la clasificación de Agerer (Agerer, 1991) de 24.75 μ m de diámetro en promedio, con presencia de hifas emanantes, laxo, sin rizomorfos. La ectomicorriza desarrolló una red de hartig con penetración de una y dos capas de células corticales. Las células corticales presentaron formas irregulares (poliédricas) con coloraciones entre anaranjadas y café oscuro con varios puntos dentro de las mismas debido a la producción de taninos (Fig. 6i).

9.2.8.2 *Inocybe splendens* con *Pinus hartwegii*

La ectomicorriza formada por *I. splendens* con *P. hartwegii* en etapas jóvenes son simples (sin ramificaciones) de color café rojizo oscuro (2.5YR 3/4) con una longitud de 0.9 mm y dicotómicas de color rojo oscuro (10R 3/4) con terminaciones ligeramente torcidas con puntas color blanco (2.5Y 7/2) en etapas maduras de desarrollo con una longitud de 2.0 mm con diámetros en promedio de 0.1 mm en etapas jóvenes a 0.3 mm en etapas maduras (Fig. 6h). Presentó un manto Plectenquimatoso de tipo F (hifas con parches de células redondeadas situadas en el manto) según la clasificación de Agerer (Agerer, 1991) de 15.87 μ m de diámetro en promedio, con presencia de hifas emanantes, laxo, sin presencia de rizomorfos. La ectomicorriza desarrollo una red de hartig con penetración de una y dos capas de células corticales. Las células corticales presentaron formas irregulares (poliédricas) con coloraciones entre anaranjadas y café claro (Fig. 6j).



Figura 6. a) Cuenca del Río Magdalena D.F., b) Plántula de *Pinus hartwegii*, c) Esporoma de *Suillus brevipes*, d) Esporoma de *Inocybe splendens*, e) Crecimiento activo de la cepa de *Suillus brevipes*, f) Crecimiento activo de la cepa de *Inocybe splendens*, g) Raíz micorrizada de *Pinus hartwegii* con *Suillus brevipes* (2.6 x 10X), h) Raíz micorrizada de *Pinus hartwegii* con *Inocybe splendens* (2.6 x 10X), i) Corte transversal de la ectomicorriza de *Pinus hartwegii* con *Suillus brevipes* (40X) y j) Corte transversal de la ectomicorriza de *Pinus hartwegii* con *Inocybe splendens* (40X).

CC: Células corticales, RH: Red de Hartig, M: Manto

10. DISCUSIÓN

10.1 Supervivencia

En la evaluación de la supervivencia de las plántulas de *Pinus hartwegii* no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación con los HEM y las plantas no inoculadas, detectándose que a partir de los cuatro meses de evaluación en todos los tratamientos se mantuvieron los valores entre 85 y 90%. Los porcentajes de supervivencia obtenidos en este trabajo son más altos al compáralos con el estudio realizado por Muñoz (2003) quien obtuvo valores de supervivencia en plántulas de *Pinus montezumae* inoculadas con esporas de *Suillus glandulosipes* de 67.9%, *S. tomentosus* de 65.3% e *Inocybe dulcamara* de 63.1%. Cabe mencionar que para ambos trabajos no se encontraron diferencias significativas entre las plantas inoculadas y no inoculadas. Asimismo, el presente trabajo coincide con otros estudios, en donde no se presentaron diferencias significativas en la supervivencia entre plántulas no inoculadas de *Pinus hartwegii* y las inoculadas con *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* en condiciones de campo las cuales presentaron valores promedio de supervivencia de 80% (Sandoval, 2010 y Flores, 2010), dichas autoras recomendaron la inoculación con ambas especies fúngicas en *Pinus hartwegii* ya que observaron que esta conífera es de fácil manejo. En la mayoría de los estudios se considera evaluar la supervivencia como efecto de la inoculación, sin embargo aún cuando se consideren condiciones de crecimiento similares al sitio donde se extrajo la semilla de las plántulas, en algunas especies forestales no es suficiente evaluar el efecto de la asociación con sólo esta variable ya que por sí sola no mostraría el efecto de la inoculación. Debido a lo anterior es necesario considerar otras variables de crecimiento para evidenciar los beneficios tales como altura, biomasa aérea y radical, diámetro de tallo y colonización que los HEM le brindan a las plantas (Rodríguez, 2006 y García *et al.*, 2007).

10.2 Porcentaje de colonización

Al evaluar los porcentajes de micorrización encontramos que a los ocho meses de evaluación las plántulas inoculadas con *Suillus brevipes* presentaron valores más altos (6.6%) con respecto a las inoculadas con *Inocybe splendens* y con las plantas Testigo. En el último tiempo de evaluación en todos los tratamientos no hubo diferencias estadísticas significativas. En trabajos como el de Muñoz (2003) realizado en condiciones de vivero se encontraron porcentajes altos de micorrización en *Pinus montezumae* inoculados con esporas de *Suillus glandulosipes* (71.7%), con *Suillus tomentosus* (63.4%), y con *Inocybe dulcamara* (72.2%). Estos valores son altos al compararlos con los encontrados en el presente trabajo. Otros trabajos como el de Hernández (2003) encontró porcentajes de colonización similares a nuestro trabajo en *Pinus pseudostrobus* inoculados con *Suillus pseudobrevipes* (9.75%) o *Inocybe dulcamara* (7.02%) en un ensayo probando sustratos ricos en materia orgánica como composta de champiñón y aserrín.

En campo, Sandoval (2010) inoculó plántulas de *Pinus hartwegii* con *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens*, dicha autora encontró que a los cinco meses de evaluación el porcentaje de colonización con *S. brevipes* fue de 14 % y de 9% para *I. splendens*. Asimismo, Flores (2010) quien continuó el estudio, encontró que a los 12 meses el mayor porcentaje de colonización se obtuvo en el tratamiento de plántulas asociadas con *Suillus brevipes* con un 80 %, mientras que para las plántulas con *I. splendens* se obtuvo un porcentaje de 70%.

Es muy importante que en trabajos de inoculación se tomen en cuenta las dosis de inóculo propuestas por diferentes autores, éstas van desde los ml, litros, hasta kg (dependiendo del tipo de inóculo) ya que permitirán establecer la efectividad del hongo y su capacidad de colonización en condiciones de vivero o invernadero (Marx *et al.*, 1991). En el presente trabajo se utilizó la dosis de inóculo micelial recomendada por la literatura que señalan intervalos entre 25 y 30 ml de inóculo. Existen otros estudios que dependiendo de las especies de HEM utilizadas y de la producción del micelio por parte de las mismas, las cantidades pueden ser más bajas (entre 5 y 7 ml) o más altas (Marx *et al.*, 1982; Tommerup *et al.*, 1987). Para este trabajo la producción de micelio por los HEM tal vez no fue suficiente, aunado a que la escasa cantidad de micelio pudo perderse al momento de ser lavado.

Asimismo, es importante tomar en cuenta el tiempo de almacenamiento del inóculo antes de ser aplicado a los tratamientos, ya que de éste depende la capacidad de colonización del hongo y en el desarrollo del hospedero (Torre-Martínez, 1992). En este contexto existen otros métodos que mantienen la viabilidad del inóculo aún después de ser almacenado, Kuek *et al.* (1992) utilizó un método con el cual atrapó el micelio en capsulas de hidrogel para inocular 80000 plántulas en condiciones de vivero, de las cuales resultaron estar micorrizadas al 100%. Otros estudios realizados por Mauperin *et al.* (1987) y Kuek (1994), observaron que el micelio de especies como *Hebeloma westraliensis*, *Laccaria laccata* y *Hebeloma crustiliniforme* al ser atrapados en capsulas de hidrogel y almacenado en frío, mantuvieron su viabilidad inicial después de cinco meses (90%). Sin embargo el utilizar este método presenta el inconveniente por su alto costo.

Para el caso particular de nuestro trabajo dicho inóculo se mantuvo almacenado en refrigeración por tres meses, posiblemente esto pudo influir en una pobre micorrización (6.6%) (Marx *et al.*, 1991; Ferrera-Cerrato *et al.*, 1993).

No obstante, aunque la micorrización en nuestro estudio fue pobre, la inoculación con *I. splendens* le confirió beneficios a las plántulas, los cuales se expresaron en la altura y biomasa radical, caso contrario sucedió con la inoculación de *S. brevipes* la cual se vio reflejada en mayor efecto de colonización, pero menor en crecimiento. Por lo tanto, no se alcanzó a observar la relación de que a mayor colonización se obtenga un mayor crecimiento o viceversa. Más bien, la capacidad de colonización, así como el efecto que producen los hongos sobre las plantas inoculadas, varía dependiendo de las características fisiológicas intrínsecas de cada especie para poder desarrollar la micorriza, aún cuando se trata de diferentes especies de un mismo género fúngico así como en los hospederos (Marx, 1981; Le Tacon y Bouchard, 1986; Malajczuk *et al.*, 1990).

Existe otra razón en la que se ha visto que el efecto de la simbiosis hongo-planta durante la fase de vivero/invernadero y después del trasplante a campo puede ser muy diferente, es decir que los hongos que no estimulan el crecimiento de la planta en vivero/invernadero pueden obtenerse los mejores resultados en campo (Stenström y Unestam, 1985), aunque muchas veces sucede lo contrario.

10.3 Variables de crecimiento en las plántulas de *Pinus hartwegii*

10.3.1 Altura

En cuanto a la altura de la plántula, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos a partir de los dos y hasta los 10 meses de evaluación siendo las plántulas inoculadas con el tratamiento de *Inocybe splendens*, las que presentaron los valores mayores, mientras que a los 12 meses no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Lo anterior pudo haber influido con la disponibilidad de nutrimentos para el desarrollo de las plántulas, lo cual se vio reflejado con el poco crecimiento de las mismas y al utilizar como sustrato suelo forestal donde se desarrolla *P. hartwegii*, asimismo esto pudo estar relacionado con la poca colonización debido a las cantidades de nutrimentos minerales.

De acuerdo a los resultados obtenidos, existen reportes que por un lado explican que los hongos al encontrarse asociados con sus hospederos ayudan de tal forma que ponen a su disposición moléculas orgánicas más simples que son absorbidas a través de las raíces, como aminoácidos, vitaminas, antibióticos, fitohormonas y contribuyen a su nutrición mineral por los procesos de mineralización y solubilización, de ciertos elementos que se requieren para su crecimiento (Bazin *et al.*, 1990; Frioni, 1990), ya que estos nutrientes son degradados a través del metabolismo fúngico pero no pueden ser absorbidos directamente por la planta (Morcillo y Sánchez, 2000).

Por otro lado autores como Nambiar y Sands (1993), mencionan que al no encontrarse el nitrógeno (N) de manera asimilable puede ser una razón, por la cual las plantas tienden a crecer lentamente, asimismo, cuando los pinos tienen muy poco fósforo (P) disponible y cuando hay exceso de potasio (K), las plantas tienden a disminuir su crecimiento (Brown, 1999; Baird y Alexander, 1963). Existe un análisis de suelo de diferentes comunidades vegetales (abies, pino y encino) de la CRM, realizado por Delgadillo (2011) el cual señala que el suelo en donde se desarrolla la vegetación de pino, los minerales más importantes como el N presenta valores entre 0.30 y 0.37% (entre 5.2 y 9.0 Mg ha⁻¹) superiores a los registrados para otros bosques templados en México y el P se encontró en pequeñas cantidades (4 ppm), por otro lado el C total se encontró entre 7.60 y 7.95% dentro de los valores mínimos e intermedios (entre 90.19 y 138.79 Mg ha⁻¹) y para el caso del K no se obtuvieron datos, aunado a esto, el INEGI (2003) e

INEGI (2006) clasificó a los suelos de la parte alta de la CRM, zona en donde se desarrolla la comunidad vegetal de pino, como muy ligeros, con textura de migajón arenoso, drenaje rápido, principalmente ácidos (de 6.0 a 6.5) (Álvarez, 2000) y considerado dentro de los más ricos en materia orgánica. Con los datos reportados por Delgadillo (2011) se compararon con la Norma Oficial Mexicana (NOM-021-SEMARNAT-2000) para determinar las categorías en las que se encuentra el suelo de pino de la CRM y observamos que el N y el C se encontraron dentro de los porcentajes medios, pH moderadamente ácido, y al ser rico en materia orgánica se considera dentro de la clase muy alta.

Algunos estudios con inoculación esporal en diferentes pinos se encontraron diferencias dependiendo de la especie de planta con la que se trabajó, ya que las plantas inoculadas y no inoculadas en condiciones de vivero e invernadero, sus valores fueron desde 5.9 hasta 23.67 cm de altura con hongos de los géneros de *Suillus* e *Inocybe* (Santiago-Martínez, 2002; Muñoz, 2003; Hernández, 2003). Asimismo, Chávez, *et al.* (2009), realizó la inoculación en vivero de *Pinus radiata* pero con diferentes tipos de inóculos utilizando especies como *Suillus bellinii*, *Suillus luteus* y *Rhizopogon luteolus* donde obtuvieron un efecto positivo en altura de las plantas inoculadas, obteniendo diferencias significativas al compararlas con el tratamiento control. Dichos autores concluyeron que el efecto del tipo de inóculo sobre la planta micorrizada varía según la especie fúngica estudiada y asimismo recomiendan la inoculación micelial de acuerdo a los resultados encontrados.

Trabajos en condiciones de campo como el de Sandoval (2010), quien observó la misma respuesta que en nuestro estudio: las plántulas de *P. hartwegii* inoculadas con *Inocybe splendens* presentaron mayor altura con respecto a los otros tratamientos, debido a que este hongo pudo facilitarle el aporte de nutrimentos hacia la planta, así como mayor elongación celular, finalmente concluyó que la especie forestal, es de lento crecimiento y se requiere realizar un monitoreo de su crecimiento y supervivencia a largo plazo, para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos de inoculación.

Este mismo hecho lo observó Parladé (1999) al evaluar el crecimiento de uno a dos años después de su trasplante a campo con diferentes especies de coníferas de los géneros *Pinus* (*P. halepensis*, *P. pinaster* y *P. pinea*) así como *Pseudotsuga menziesii*, concluyendo que es insuficiente el tiempo de evaluación para establecer conclusiones. Estos últimos dos autores

proponen dar seguimiento del crecimiento y supervivencia de las plantas inoculadas, respecto a las no inoculadas, por lo menos durante cinco años.

Asimismo, en este contexto existen especies forestales que por su biología o por presentar un rápido crecimiento llegan a desarrollar mayor cantidad de raíces cuando se encuentran en condiciones de invernadero o vivero, sin embargo, los contenedores deben cumplir con requerimientos especiales, como es el caso del diseño con la finalidad de evitar un crecimiento radical en espiral (Landis, 1990), debido a esto, existen investigaciones donde consideran que si el sistema radical de las plántulas se ha generado con rapidez, así como la disponibilidad del espacio es limitado, estas deben ser trasplantadas al sitio donde se pretenda reforestar (Landis, 1990; Ritchie, 1984), para continuar con su desarrollo. Sin embargo, en especies forestales como la que se utilizó en el presente trabajo bajo condiciones de invernadero, al ser una especie de lento crecimiento el desarrollo radical fue menor. Aunque se ha recomendado que plántulas de especies forestales no pueden permanecer por un periodo mayor de dos años bajo condiciones de invernadero.

Para el caso de *P. hartwegii* al ser de lento crecimiento se recomienda su evaluación a largo plazo, es decir, que las plántulas de esta especie tendrían que llevarse a campo y monitorear su crecimiento al menos cinco años debido a su desarrollo, tal como lo proponen Parladé, (1999); Espinosa, (2005) y Sandoval (2010).

10.3.2 Diámetro del tallo

Para este trabajo los valores obtenidos del diámetro del tallo, no presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos durante todo el ensayo. A diferencia de nuestros resultados existen trabajos realizados en vivero como el de Santiago-Martínez (2002) en donde observaron que la inoculación de las plántulas de *Pinus montezumae* con *Suillus grandulosipes* obtuvieron los valores mayores de diámetro con respecto a los otros tratamientos de inoculación (*Inocybe dulcamara*, *I. griseovelata* y plantas Testigo). Asimismo, Muñoz (2003) utilizó plántulas de *Pinus montezumae* inoculadas con varias especies de HEM reportando los valores mayores en plántulas inoculadas con *Suillus tomentosus* respecto al Testigo y con *S. grandulosipes*. Por su parte Carrera-Nieva y López (2004) al evaluar el efecto de varios hongos ectomicorrizógenos sobre *Pinus patula* y *Pinus greggii*, en condiciones de invernadero encontraron que las

plántulas inoculadas con *Boletus clavipes*, *Suillus pseudobrevipes* y *Pisolithus tinctorius* presentaron mayores valores del diámetro de tallo respecto a las plantas Testigo, con ello concluyeron que el efecto sobre la planta micorrizada varía según la especie fúngica estudiada.

En dichos trabajos de inoculación con diferentes hongos ectomicorrizógenos se pudo evidenciar el efecto positivo que estos hongos proporcionaron a las plántulas con respecto al diámetro del tallo. En nuestro trabajo no se evidenció dicho efecto, esto se puede atribuir a las particularidades de la biología y fisiología de *Pinus hartwegii*, especie que se ha reportado como de lento crecimiento entre las plantas del género *Pinus* (Espinosa, 2005).

Caso similar al de nuestro trabajo lo reportaron Sandoval (2010) y Flores (2010), al evaluar el diámetro en plántulas de *Pinus hartwegii* inoculadas con *Suillus brevipes* y con *Inocybe splendens*, donde no se presentaron diferencias significativas entre sus tratamientos a los diferentes tiempos de evaluación. Parladé (1999), mencionó que las especies forestales al ser de lento crecimiento necesitan continuar con su evaluación en un plazo mayor, lo cual permitirá determinar si pudieran existir diferencias entre los tratamientos de inoculación. En nuestro caso podríamos atribuir esto a la especie forestal utilizada, por su lento crecimiento no permito observar dicho efecto y se necesita mayor tiempo para seguir evaluando a especies como *P. hartwegii*.

10.3.3 Biomasa aérea y radical

Las plántulas inoculadas con *Inocybe splendens* a los ocho meses de evaluación fueron las que presentaron valores más altos en biomasa aérea con respecto a los otros tratamientos de inoculación, mientras que a los 12 meses el valor más alto se registró en el tratamiento Testigo. Los resultados nos indicaron que *Inocybe splendens* fue la especie más efectiva, ya que al conjuntarse las variables de crecimiento como altura y biomasa radical se observó el efecto de la inoculación.

En diversos trabajos se han documentado resultados diferentes con la inoculación respecto a la biomasa aérea y radical. Por ejemplo, Muñoz (2003) quien en condiciones de vivero realizó la inoculación en plantas de *Pinus montezumae* con *Hebeloma mesophaeum* y *Suillus tomentosus* reportó valores de biomasa total de 3.64 y 3.59 mg respectivamente, siendo más altos con respecto a los tratamientos de inoculación con *Inocybe dulcamara*, *Suillus grandulosipes* y Testigo. Mientras que en nuestro trabajo, la inoculación con el tratamiento de *I. splendens*

presentó los valores más altos en biomasa radical a los ocho y 12 meses (83.75 y 82.15 mg respectivamente).

Carrera Nieva y López (2004) al evaluar en condiciones de invernadero la inoculación con varios HEM en plantas de *Pinus patula* y *P. greggii*, no encontraron diferencias estadísticas en biomasa aérea entre los tratamientos de inoculación y el tratamiento Testigo. No obstante, en el caso de biomasa radical, en la inoculación con *Laccaria laccata* se obtuvo mayor peso respecto a las plantas no inoculadas.

A diferencia de lo reportado por estos autores, en el presente trabajo, tanto en la evaluación de la biomasa aérea y de la biomasa radical se presentaron diferencias significativas en algunos tiempos de evaluación. Cabe mencionar que en las plántulas con el tratamiento de *I. splendens* se presentó mayor producción de biomasa radical con respecto al tratamiento con *S. brevipes* y el tratamiento Testigo. Por lo tanto, podemos decir que los efectos conferidos por los hongos, son diferentes en función de las especies forestales utilizadas así como las distintas especies fúngicas ectomicorrizógenas involucradas, misma conclusión a la que llegaron Carrera Nieva y López (2004).

Por su parte, Perea-Estrada, *et al.* (2009), evaluaron la influencia de humedad en invernadero con tres HEM comestibles (*Hebeloma* spp., *Laccaria* spp., y *Clavulina* aff. *cinerea*), en el desarrollo de dos especies de pinos (*Pinus patula* y *P. hartwegii*). Cabe mencionar que al final del ensayo observaron que el crecimiento para las dos especies forestales fue afectado diferencialmente en los dos regímenes de humedad evaluadas, en función de los HEM inoculados y particularmente en *P. hartwegii*. Dichos autores encontraron que no se presentaron diferencias estadísticas para biomasa aérea y radical. No obstante, en nuestro estudio la inoculación con *Inocybe splendens* en plántulas de *P. hartwegii* si presentaron diferencias estadísticas significativas en biomasa radical con respecto a los otros tratamientos de inoculación.

Sandoval (2010) al realizar una evaluación de la inoculación con la misma especie de planta y de hongos ectomicorrizógenos que se consideraron en el presente trabajo, pero en condiciones de campo, no encontró diferencias en los tratamientos de inoculación, aunque si hubo una tendencia a asignar mayor biomasa en las plantas inoculadas con *S. brevipes* por lo que sugiere que esta especie de hongo puede ser la más efectiva para dicho pino. Además de que la

combinación de géneros *Pinus-Suillus* ha sido utilizada como una estrategia para la reforestación en sitios contaminados (Adriaesens *et al.*, 2006). Por su parte Flores (2010), quien continuó monitoreando el estudio anterior durante un año, tampoco encontró diferencias estadísticas en la biomasa con los diferentes tratamientos de inoculación con los HEM.

Recientemente en el estudio realizado por Méndez *et al.* (2011), en donde evaluaron el efecto de la inoculación en condiciones de invernadero con tres especies de HEM (*Hebeloma mesophaeum*, *Laccaria laccata* y *Suillus* aff. *pseudobrevipes*) solos y combinados en el desarrollo de *Pinus greggi*, reportaron los valores mayores en biomasa aérea y radical a partir del sexto mes en los tratamientos de inoculación combinados respecto a las plantas inoculadas con los hongos individualmente y las plantas sin inocular. Dichos autores atribuyen esto último al alto costo inicial que necesita el establecimiento de la simbiosis hongo-planta respecto al carbón (C) fijado. Asimismo, mencionaron que la respuesta de crecimiento vegetal dependió del tipo de HEM inoculado. Misma tendencia de incremento de biomasa aérea y radical se presentó en nuestro trabajo, en donde el efecto se pudo evidenciar a partir de los ocho meses de la evaluación con los diferentes tratamientos de inoculación.

Con los resultados obtenidos en los diversos trabajos mencionados anteriormente se puede observar que el efecto que tienen la inoculación sobre la biomasa varía en función de la especie de la planta hospedera y de la especie de hongo ectomicorrizógeno. Aunado a esto, las plantas inoculadas tienden a tener mayor biomasa que las no inoculadas y desde el punto de vista ecológico se dice que una planta con mayor proporción de biomasa en raíz tendría un crecimiento más lento, sin embargo, esto le confiere otras ventajas como por ejemplo una mayor superficie de absorción (Villar *et al.*, 2004). Esta tendencia fue encontrada en nuestro trabajo puesto que se encontró una mayor biomasa radical con el tratamiento de inoculación con *Inocybe splendens*. No obstante, en otros estudios de inoculación (Santiago-Martínez, 2002; Hernández, 2003; Muñoz, 2003; Carrera Nieva y López, 2004; Chávez *et al.*, 2009; Sandoval, 2010; Flores, 2010; Méndez *et al.*, 2011; Galindo-Flores (en preparación), se presentan diferentes tendencias, ya sea mayor biomasa aérea o mayor biomasa radical o total por lo que este método sigue representando una alternativa eficiente para producir planta de buena calidad.

10.3.4 Cociente raíz/vástago

Al determinar el cociente raíz/vástago de las plántulas de *P. hartwegii*, no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, valores menores a uno (intervalos entre 0.40-0.70). Si bien este parámetro se ha utilizado para entender el desarrollo de la planta, así como el crecimiento por cualquiera de los dos (raíz o vástago), muchas veces el valor de esta relación se ve influenciado por los factores ambientales (Mitchell, 1970).

En estudios en donde evalúan la inoculación, dentro de todas las variables no se contempla a ésta como una más y sólo existen pocos trabajos en donde ya la han evaluado. Tal es el trabajo de Reyes (2011) quien evaluó la inoculación con dos especies forestales (*P. montezumae* y *P. greggii*) y con diferentes HEM (*Boletus edulis*, *Laccaria laccata* y *Hebeloma mesophaeum*) en condiciones de invernadero, obteniendo valores menores a los de este estudio, intervalos entre 0.23-0.52 para ambas especies. Otros trabajos como el de Sandoval (2010) y Flores (2010) quienes utilizaron la misma especie forestal al del presente estudio, inoculándola en condiciones de campo. Dichas autoras tampoco encontraron diferencias significativas, sin embargo, hubo una tendencia a mayor biomasa radical en el tratamiento de inoculación con *Inocybe splendens*.

Dalmaso *et al.* (1994), mencionaron que esta relación raíz/vástago sirve para observar el crecimiento de las plantas, pero puede ser aún más útil para evaluar el establecimiento de las plántulas cuando son trasplantadas en campo, caso contrario a nuestro estudio el cual se llevó a cabo en condiciones de invernadero y al no encontrarse diferencias significativas entre los tratamientos podemos decir que esta variable puede utilizarse pero da mejor información cuando se realizan evaluaciones de las plántulas en campo.

10.3.5 Cuantificación de biomasa micelial a través del ácido graso 18: 2 ω 6,9

Con respecto a la producción de biomasa micelial con los hongos *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* en el sustrato (turba y vermiculita y suelo forestal inoculado) donde se desarrollaron la plántulas, no se logró detectar el ácido graso de interés (18: 2 ω 6,9), posiblemente porque dicho sustrato pudo intervenir en los resultados. No obstante, en los tiempos de retención bajo la curva (cromatograma) para ambos hongos, se observó la presencia de otro ácido el cual podría ser el 18:1 ω 9. Este mismo ácido ha sido utilizado por Frostegard *et al.* (1993) como un biomarcador más de los hongos ectomicorrizógenos, por lo que el ácido 18:1 ω 9 podría ser otra alternativa para la cuantificación de biomasa micelial en los hongos utilizados en este trabajo.

Cuando se realizó la técnica con micelio puro *in vitro*, sólo con *Suillus brevipes* se pudo cuantificar el ácido de interés (18: 2 ω 6,9). Mismo resultado fue encontrado por Karlinski *et al.* (2007), dichos autores aplicaron la misma técnica con micelio en cultivo puro de *Suillus grevillei*, *Suillus luteus* y *Suillus bovinus*, encontrando valores entre 4.46 y 6.80 g/mol del ácido 18:2 ω 6,9, para nuestro trabajo se reportaron valores entre 2.40 y 3.13 g/mol con *Suillus brevipes*.

Para el caso de *Inocybe splendens* no se pudo cuantificar el ácido graso (18: 2 ω 6,9) ni en micelio puro *in vitro* y tampoco en el sustrato. De acuerdo con los resultados inferimos que esto pudo deberse a diversos factores: 1) el tipo de sustrato utilizado para el crecimiento del inóculo interfiere en la cuantificación del ácido, 2) la cantidad del ácido graso producido por este, es muy bajo, por lo que no es detectado mediante esta técnica, o dicha cantidad pudiera estarse perdiendo durante el proceso de extracción y 3) El hongo no produce este ácido. Además, aún no existen reportes en donde consideren al género o a las especies de *Inocybe* para comprobar si produce este u otros ácidos grasos. Debido a lo anterior es necesario continuar con este tipo de trabajos, realizando modificaciones a la técnica o a las condiciones con las que se trabaja en el equipo (temperatura, flujo de helio, etc.) o probar otros ácidos grasos presentes en los hongos ectomicorrizógenos, como el que se mencionó en los párrafos anteriores.

10.3.6 Caracterización macro y microscópica de las ectomicorrizas

Para identificar las micorrizas de *Pinus hartwegii* con *Suillus brevipes* y con *Inocybe splendens* se revisó el sistema radical haciendo las descripciones correspondientes las cuales se compararon con las hechas por Agerer (1991), Sandoval (2010) y Flores (2010), así como criterios de clasificación y algunas características de los morfotipos reportadas en la página de internet (<http://www.deemy.de>). Al comparar la estructura de *Pinus hartwegii* -*Suillus brevipes* y con *Inocybe splendens* con la reportada por otros autores con diferentes especies de *Pinus* y diferentes especies de hongos pudimos observar que el tipo de ramificación con *Suillus brevipes* se presentó de simple a torcida y ligeramente dicotómicas, de color café rojizo, manto plectenquimatoso, red de Hartig con penetración de 1 a 2 capas de células corticales, con poca variación en cuanto la estructura y color reportada por otros autores (Tabla 3), lo cual inferimos que la formación de la ectomicorriza pudo estar en la primera etapa de desarrollo lo cual podría confundirse con ciertas características a simple vista. Caso similar sucedió para *Inocybe splendens* respecto a otras micorrizas reportadas por diferentes autores (Tabla 4), en donde se reportan variaciones de la estructura y coloración. En este estudio el tipo de ramificación fue de simple a dicotómica, de color café rojizo a rojo oscuro con algunas tonalidades naranjas, el manto fue plectenquimatoso y una red de Hartig con penetración de una a dos capas de células corticales.

Cabe mencionar que algunas de estas características como el ancho del manto y el largo del eje principal de la micorriza entre otras, varían debido al grado de desarrollo de la ectomicorriza.

Características	Xicohtécatl <i>et al.</i> (1997)		Xicohtécatl <i>et al.</i> (1998)		Santiago Martínez (2002)	
	<i>Suillus pseudobrevipes</i> con <i>P. montezumae</i>	<i>Suillus glandulosipes</i> con <i>P. montezumae</i>	<i>Suillus tomentosus</i> con <i>P. cembroides</i>	<i>Suillus glandulosipes</i> con <i>P. cembroides</i>	<i>Suillus tomentosus</i> con <i>P. montezumae</i>	
Tipo de ramificación	Simple, dicotómica a coralióide	Simple, dicotómica a coralióide	Simple, dicotómica a coralióide	Simple, dicotómica a coralióide	Simple, dicotómica a coralióide	
Terminaciones de las puntas	Rectas y redondeadas	Rectas y redondeadas	Torcidas a tortuosas o redondeadas	Rectas a torcidas	Rectas y redondeadas	
Color	Naranja oscuro a café grisáceo	Naranja café y café oscuro	Naranja café y café oscuro	Café oscuro	Naranja café a café oscuro	
Textura del manto	Algodonosa densa	Algodonosa densa	Algodonosa densa	Algodonosa laxa	Algodonosa	
Rizomorfos	Abundantes	Abundantes	Abundantes	Abundantes	Presentes	
Anatomía del manto	Plectenquimatoso	*ND	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso	No diferenciado	
Ancho del manto	31.2 µm	*ND	122.5 µm	125.4 µm	55 µm	
Red de Hartig con células corticales	2	2	2 o 3	2	2	
Largo del eje principal de la micorriza	1.4 mm	1.9 mm	2.0 mm	3.7 mm	1.0 mm	
Diámetro del eje principal de la micorriza	1.1 mm	1.0 mm	0.7 mm	0.9 mm	0.5 mm	
Largo de los ejes secundarios de la micorriza	0.3 mm	0.7 mm	0.4 mm	1.1 mm	0.9 mm	
Diámetro de los ejes secundarios de la micorriza	0.4 mm	*ND	0.4 mm	0.7 mm	0.3 mm	

Tabla 3. Características de las micorrizas reportadas en Deemy y otros trabajos comparados con en el presente estudio para especies del género *Suillus*.

*ND: No disponible

Características	Hernández (2003)	Deemy (2009)	Sandoval (2010) ⁺	Flores (2010) ⁺	
	<i>Inocybe dulcamara</i> con <i>P. pseudostrobus</i>	<i>Inocybe griseovelata</i> con <i>P. pseudostrobus</i>	<i>Inocybe terrigena</i> con <i>Pinus</i>	<i>Inocybe splendens</i> con <i>P. hartwegii</i>	<i>Inocybe splendens</i> con <i>P. hartwegii</i>
Tipo de ramificación	Dicotómica a coraloide	Dicotómica a coraloide	Dicotómica a coraloide	Dicotómica	Simple a dicotómica
Terminaciones de las puntas	No ramificadas	No ramificadas	*ND	*ND	Torcidas a tortuosas
Color	Amarillo grisáceo	Café amarillento	Amarillo o naranja	Café a amarillo	Café naranja a café rojizo
Textura del manto	*ND	*ND	Ligeramente a densamente algodonosa	Ligeramente algodonosa	Ligeramente fibrosas
Rizomorfos	Pocos	Pocos	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Anatomía del manto	*ND	*ND	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso
Ancho del manto	*ND	*ND	*ND	*ND	15.87 μ m
Red de Hartig con células corticales					2
Largo del eje principal de la micorriza	1.9 mm	4.2 mm	5 mm	4 mm	4 mm
Diámetro del eje principal de la micorriza	1.7 mm	6.2 mm	0.5 mm	0.5 mm	0.28 mm
Largo de los ejes secundarios de la micorriza	0.6 mm	0.6 mm	*ND	*ND	2.07 mm
Diámetro de los ejes secundarios de la micorriza	0.3 mm	0.3 mm	*ND	*ND	0.49 mm

Tabla 4. Características de las micorrizas reportadas en Deemy y otros trabajos comparados con en el presente trabajo para especies del género *Inocybe*.

*ND: no disponible

+ Estudio en condiciones de campo

Continuación.....

Características	Deemy (2009)		Sandoval (2010) ⁺	Flores (2010) ⁺
	<i>Suillus bovinus</i> con <i>Pinus</i>	<i>Suillus collinitus</i> con <i>Pinus</i>	<i>Suillus brevipes</i> con <i>P. hartwegii</i>	<i>Suillus brevipes</i> con <i>P. hartwegii</i>
Tipo de ramificación	Coraloide	Dicotómica o coraloide	Dicotómica	Dicotómica, irregular pinada a coraloide
Terminaciones de las puntas	*ND	*ND	*ND	Torcidas a tortuosas
Color	Ocre, café amarillento o amarillento	Café oscuro a café rojizo	Café a amarillo	Café amarillento a café oscuro
Textura del manto	*ND	Ligeramente lanudo	Ligeramente algodonosa	Liso con poco brillo
Rizomorfos	Presentes	Presentes	Ausentes	Ausentes
Anatomía del manto	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso
Ancho del manto	*ND	*ND	*ND	24.75 µm
Red de Hartig con células corticales	*ND	*ND	*ND	2
Largo del eje principal de la micorriza	15 mm	5 mm	4 mm	11.15 mm
Diámetro del eje principal de la micorriza	*ND	*ND	0.5 mm	1.24 mm
Largo de los ejes secundarios de la micorriza	*ND	*ND	*ND	5.4 mm
Diámetro de los ejes secundarios de la micorriza	*ND	*ND	*ND	1.08 mm

Tabla 4. Características de las micorrizas reportadas en Deemy y otros trabajos comparados con en el presente trabajo para especies del género *Inocybe*.

*ND: no disponible

+ Estudio en condiciones de campo

Considerando las variables de supervivencia y crecimiento como el porcentaje de colonización, altura, diámetro del tallo, biomasa aérea y radical, al igual que otros autores (Santiago-Martínez, 2002; Hernández, 2003; Muñoz, 2003; Carrera Nieva y López, 2004; Chávez *et al.*, 2009; Méndez *et al.*, 2011), los resultados obtenidos confirman que la respuesta a la inoculación micelial tiende a ser diferente según las especies hospederas y las especies de hongos que estén involucradas en la asociación.

Autores como Dahlberg y Finlay (1999) recomiendan el género de *Suillus* para realizar inoculaciones debido a que la mayoría de las especies se asocian a bosques jóvenes e incluso algunas especies tienen potencial como biorremediadores al degradar compuestos tóxicos o metales pesados (Adriasens *et al.*, 2006). En cuanto a *Inocybe splendens*, y en general de las especies de *Inocybe*, se tiene poco conocimiento de éstas como formadoras de micorrizas, no obstante, se ha reportado como un hongo pionero que se encuentra en los primeros años de edad de un bosque (Last *et al.*, 1992) por lo que también representa una buena alternativa como inoculante de plantas destinadas a la reforestación.

Con este estudio al considerar una amplia gama de variables de crecimiento de las plantas nos permitió ver en algunas de ellas el efecto positivo con estos hongos sobre la planta hospedera, aunque se deben considerar aspectos biológicos y fisiológicos de las especies forestales a estudiar, ya que en nuestro caso el crecimiento lento de la misma no permitió observar en su totalidad su desarrollo. Por lo que algunas de éstas como altura, biomasa aérea y radical y el porcentaje de micorrización permitieron evidenciar el efecto del hongo, pero si hablamos de características específicas del hospedero como el lento crecimiento que llegan a presentar, existen variables que no se podrían considerar por esta razón, algunas de ellas son: el diámetro de tallo, longitud de acículas y cobertura foliar, estas últimas aún cuando no se consideraron en el presente trabajo existen reportes en donde si se toman en cuenta para evaluar a las plántulas. Asimismo, observamos que independientemente en donde se realicen los experimentos, los métodos de inoculación empleados, las especies forestales y fúngicas involucradas, una planta micorrizada tendrá mejores ventajas que una no micorrizada.

11. CONCLUSIONES

La supervivencia de las plántulas en todos los tratamientos fue similar a partir de los dos y hasta los 12 meses.

El porcentaje de micorrización con *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* resultó ser pobre.

Variables de crecimiento como altura, biomasa aérea y radical permitieron evidenciar de una forma más clara el efecto positivo de la inoculación con HEM en plántulas de *Pinus hartwegii*.

Con el tratamiento de inoculación con *Inocybe splendens* se observó mayor altura y biomasa radical en las plantas de *P. hartwegii*.

Al evaluar el diámetro de tallo no se encontraron diferencias con las dos especies ectomicorrizógenas debido al tipo de crecimiento de la planta hospedera.

Se logró la cuantificación de biomasa micelial a través del ácido graso 18:2 ω 6,9 únicamente en micelio puro de *Suillus brevipes*.

En el hongo de *Inocybe splendens* no se logró cuantificar la biomasa micelial a través del ácido graso 18:2 ω 6,9 ni en micelio puro ni en el sustrato.

Al realizar la caracterización de las micorrizas encontradas al final del estudio, comprobamos diferencias en el tipo de ramificación con ambas especies inoculadas, pero semejanzas con las otras características citadas en la literatura.

12. PERSPECTIVAS

- Llevar a cabo la inoculación de *Pinus hartwegii* con esporas de *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens* para observar si se obtienen los mismos resultados que con inoculación micelial.
- Utilizar otros sustratos alternos para la producción de inóculo y otros sustratos en donde se inocule a las plantas para observar si no interfieren en la cuantificación de ácidos grasos.
- Cuantificar la biomasa micelial de los HEM mediante el uso de otros ácidos grasos tal como 18.1 ω ,9
- Cuantificar la biomasa micelial en las raíces del hospedero inoculado, para comparar las variaciones que pudieran existir respecto al micelio puro y el micelio desarrollado en el sustrato.
- Probar otras especies de hongos para comprobar si producen el ácido graso 18.2 ω 6,9 u otro que sea característico de los hongos ectomicorrizógenos.

13. LITERATURA CITADA

- Adriensen, K, Vangronsveld, J. y Colpaert, J., V. 2006. Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 16:553-558.
- Agerer, R. 1986. Studies on ectomycorrhizae II. Introducing remarks on characterization and identification. *Mycotaxon*. 26:473-492.
- Agerer, R. 1991. Characterization of ectomycorrhiza En: Norris, J. R, Reid, D., J. y Varma, K. (Eds.) *Methods in microbiology. Techniques for the study of mycorrhiza*. Academic Press, London, New York, 26-64.
- Agerer, R. 1987-1993. *Colour atlas of ectomycorrhizae*. 4a. ed. Einhorn-Verlag. SchwäbischGmünd.
- Alvarado-Sánchez, I.Y. 2008. Crecimiento y caracterización micelial *in vitro* de tres cepas de hongos potencialmente ectomicorrizógenos de la Cuenca del Río Magdalena, México. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F. pp. 93.
- Álvarez, K., E. 2000. Geografía de la Educación Ambiental: Algunas propuestas de trabajo en el Bosque de los Dinamos, área de conservación ecológica de la Delegación Magdalena Contreras. Tesis de Licenciatura en Geografía. UNAM. México, D.F. pp. 127
- Aquihuatl, M., A., Rodríguez, W. y Roussus, S. 1998. Efecto de la glucosa en el crecimiento de hongos ectomicorrízicos del género *Suillus*. *Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica*. Colima, Col.79.
- Ávila-Akerberg, V. 2002. La vegetación en la cuenca alta del Río Magdalena: un enfoque florístico, fitosociológico y estructural. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. pp. 86.
- Bääh, E. 2003. The use of neutral lipid acids to indicate the physiological conditions of soil fungi. *Microb Ecol*. 45:373-383.
- Baird, D., D. y Alexander, J., S. 1963. (Abstract) The influence of different levels of nitrogen and potassium on *Ilex crenata* in three soil series. En: *SNA Seventh Annual Report of Ornamental Research*. pp. 32.
- Barea, J., M. 1991. Vesicular-Arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *Soil Science*. 15: 1-40.
- Barea, J., M. y Honrubia, M. 2004. La micorrización dirigida de la planta forestal. En: Vallejo, R. & al. (ed.), *Avances en el estudio de la gestión del monte mediterráneo*. pp. 215-260.
- Bazin, M., J., Markham, P. y Scott, E., M. 1990. Population dynamics and rhizosphere interactions. En: Lynch, J., M. *The rhizosphere* (ed.). Wiley Interscience, New York: 99-127.
- Bligh, E., G. y Dyer, W., J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol*. 37: 911-917.

- Bowen, G. 1994. The ecology of the ectomycorrhiza formation and functioning. *Plant and Soil*. 159:61-67.
- Brown, R., K. 1999. Mineral Nutrition and Fertilization of Deciduous Broadleaved Tree Species in British Columbia. *Res. Br., B.C.Min. For., Victoria, B.C.Work.* pp. 42
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. y Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agriculture Research. Wembley, WA. p.17.
- Carrera-Nieva. A. y López, R., G.F. 2004. Manejo y evaluación de Ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo México.*10: 93-98.
- Castellano M., A. 1996. Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings. En: Mukerji, K. G. (ed.) *Concepts in Mycorrhizal Research.* Kluwer Academic Publ. The Netherlands. pp. 223-302.
- Chávez M., D., Pereira C., G. y Machuca H., A. 2009. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. *Universidad Austral de Chile. Bosque.* 30: 1: 4-9.
- Cruz-Ulloa, B. S. 1990. Cultivo *in vitro* y caracterización de micelios de basidiomicetos ectomicorrizógenos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Cruz-Ulloa, B. S. 1991. Características miceliarias de *Pisolithus tinctorius* y tres especies de *Rhizopogon*. *Memorias IV Congreso Nacional de Micología.* Tlaxcala. Tlax.137.
- Cuevas-Rangel, R. A. 1979. Pruebas de inoculación con el hongo micorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch, en plántulas de *Pinus moctezumae* Lamb. en suelos de vivero. *Ciencia Forestal* 4:19:46-62.
- Dahlberg, A. y Finlay, R., D. 1999. *Suillus*. En: *Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile.* Ed. By J.G.W. Cairney y Chambers. Springer, Heidelberg. pp. 33-64.
- Dalmasso, A., Masuelli, R. y Salgado, O. 1994. Relación vástago-raíz durante el crecimiento en vivero de tres especies nativas del monte *Prosopis chilensis*, *Prosopis flexuosa* y *Bulnesia retuana*. *Multequina.* 3:35-43.
- Delgadillo, D., E. 2011. Productividad primaria neta de los bosques templados de la Cuenca del Río Magdalena. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias, UNAM. México, D.F.
- Delgado, M., R. 2004. Los hongos ectomicorrízicos como herramienta para la recuperación de la cubierta forestal de ecosistemas perturbados. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental, Restauración Ecológica). Instituto de Biología, UNAM. México, D.F.

- Espinosa, P., M. I. 2005. Estimación del contenido y captura de carbono en el bosque de *Pinus hartwegii* de la cuenca alta del río Magdalena, D. F. Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F.
- Estrada-Torres, A. 2003. Ecología de los hongos ectomicorrizógenos. En: Estrada-Torres, A. y Santiago-Martínez, G. 2003. Avances en el estudio de la ectomicorriza en el Estado de Tlaxcala, México. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. Tlaxcala, México. pp. 26-34.
- Estrada-Torres, A. y Valdés, M. 1986. El crecimiento y la micorrización de plántulas de Pino inoculadas con *Pisolithus tinctorius* en el semillero o en el envase de trasplante. *Biótica* 11: 137-142.
- Farjon, A., J., Pérez de la R., A. y Styles, B., T. 1997. A Field Guide to the Pines of Mexico and Central America. The Royal Botanical Gardens. Kew, U.K. pp.147.
- Ferrera-Cerrato, R., González, C., M., C.A y Rodríguez, M., M.N. 1993. Simbiosis micorrízica. Manual de Agromicrobiología. Editorial Trillas México, D.F. pp. 33-71.
- Flores, R., D.Y. 2010. El efecto de los hongos ectomicorrizógenos en las condiciones ecofisiológicas de plántulas de *Pinus hartwegii* Lind. y *Abies religiosa* (Kunth. Schldl. Et Cham.): un enfoque para el análisis de la restauración de ambientes deteriorados en la Cuenca del Río Magdalena, D.F. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F.
- Francis, R. y Read, D., J. 1994. The contributions of mycorrhizal fungi to the determination of plant community structure. En: Robson, D.A., Abbott, A. y Malajczuk. (Eds). *Myc. Agric. Horti. Fores.* Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp. 11-25.
- Frioni, L. 1990. Ecología microbiana del suelo. Departamento de publicaciones de la Universidad de la Republica, Montevideo. p. 517.
- Frostgård, A., Tunlid, A., Bääth, E. 1991. Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *J. Microbiol Methods* 14:151-163
- Frostgård, A., Tunlid, A., Bääth, E. 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl Environ Microbiol* 59:3605-3617
- Galindo-Flores, G., García, C., F., Monjaraz, G., G. y Chavéz, A., V. M. 2004. Regeneración *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis* flos, a partir de embriones maduros. Investigación para el desarrollo regional. Ed. SEP-CONACYT, México D.F. ISBN 968-823-274-2 pp. 165-169.
- García, A., R., Regina, M., C., del Caño, F., J., Climent, N., A, Iglesias, S. y Alía, R. 2007. Red española de ensayos de mejoramiento, conservación y utilización de materiales forestales de reproducción. Escuela Superior Agraria de Coimbra, Portugal. pp.7
- García-Rodríguez, J.L., Pérez-Moreno, J., Aldrete, A., Cetina-Alcalá, V. M. y Vaquera-Huerta, H. 2006. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (pers.) cokeret couch en cultivo y en simbiosis con Eucalipto y Pino. *Agrociencia* 40: 665-676.
- Hawksworth, D., L., Kirk, P., M., Sutton, B., C. y Pegler, D., N. 1995. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi. CAB International, Wallingford. p. 616.

- Hernández, F., M.F. 2003. Evaluación de la efectividad e infectividad del inóculo esporal de diferentes hongos ectomicorrízicos en *Pinus montezumae* y *P. pseudostrobus*. Tesis de Licenciatura en Biología Agropecuaria. Tlaxcala, Tlax.
- Hernández, L., Castillo, S., Guadarrama, P., Martínez, Y., Romero, M.A. y Sánchez, I. 2003. Hongos micorrizógenos arbusculares del Pedregal de San Ángel. Prensa de la Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos. Fondo de Cultura Económica. México.
- Högberg, M., N. 2006. Discrepancies between ergosterol and the phospholipid fatty acid 18:2 Ω 6,9 as biomarkers for fungi in boreal forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 38:3431-3435.
- Honrubia, M, Torres, P., Díaz, G. y Cano, A. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA. p. 47.
- Honrubia, M., Morte, A. y Díaz, G. 2002. Dinamismo del componente fúngico micorrízico y su incidencia en la regeneración del bosque mediterráneo. In: Charco, J. (coord.), La regeneración natural del bosque mediterráneo en la península Ibérica: evaluación de problemas y propuesta de soluciones. ARBA-MMA (eds.) pp: 87-113.
- Honrubia, M. 2009. Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. Ministerio de Educación y Ciencia España. 66:1: 133-144.
- Hunt, R. 1982. Plant growth analysis. Natural Environment Research Council. Inglaterra.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática, 2003. Síntesis de información geográfica del Estado de México. INEGI, México.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática, 2006. Cuaderno estadístico Delegacional. INEGI, México.
- Karlinski, L., Ravnskov, S., Kieliszewska-Rokicka, B. y Larsen, J. 2007. Fatty acid composition of various ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas of Norway spruce. *Soil Biology & Biochemistry* 39:854-866.
- Kaul, T., N. 2002. Biology and conservation of mushrooms. Science Publishers, Inc. India.
- Klamer, M. y Bääth, E. 2004. Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2 ω 6, 9. *Soil. Biology & Biochemistry* 36:57-65.
- Kong-Luz, A. 2003. Clasificación de los hongos ectomicorrizógenos. En: Estrada-Torres, A. y Santiago-Martínez, G. 2003. Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. Tlaxcala, México.

- Kuek, C., Tommerup, I., C., Malajczuk, N. 1992. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantation. *Mycol. Res.*, 96: 273-277.
- Kuek, C. 1994. Issues concerning the production and use of inocula of ectomycorrhizal fungi in increasing the economic productivity of plantations. En: Robson, A., D., Abbott, L., K. y Malajczuk, N. *Management of mycorrhizas in agriculture y forestry*. Kluwer academic publishers. pp. 221-230.
- Landis, T., D. 1990. Contenedores: tipos y funciones. En: Landis, T., D., Tinus, R., W., McDonald, S., E., Barnett, J., P. *Manual de viveros para la producción de especies forestales en contenedor*. Washington, DC. 2:1-40.
- Lankhanpal, T., N. 2002. *Ectomicorrhiza-an overview*. Kluwer Academic.
- Last, F., T., Natarajan, K., Mohan, V. y Mason, P., A. 1992. Sequences os sheathing (Ecto-) mycorrhizal fungi associated with man-made forest, temperate and tropical. En: Read, D., J., Lewis, D., H., Fitter, A., H., Alexander, I., J. (Ed). *Mycorrhizas in ecosistems*. C. A. B. International. Cambridge. 214-219.
- Lauer, W. 1978. Timberline studies in central Mexico. *Artic and Alpine Res.* 10: 383-396.
- Le Tacon, F. y Bouchard, D. 1986. Effect of different ectomycorrhizal fungi on growth of Larch, Douglas-fir, Scots pine and Norway spruce seedlings in fumigated nursery soil. *Acta Oecologia/Oecologia Applicata* 7: 389-402.
- Malajczuk, N., Lapeyrie, F. y Garbaye, J. 1990. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* *in vitro*. I. Mycorrhizal formation in model systems. *New Phytol.* 114: 627-631.
- Marx, D., H. y Bryan, W., C. 1975. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *Forest Sci.* 21:245-254.
- Marx, D., H. 1981. Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age, and reisolation. *Can. J. For. Res.* 11: 168-174.
- Marx, D., H., Ruchle, J., L. y Cordell, C., E. 1991. Methods for studying nurse and field response of trees to specific ectomycorrhiza. En: Norris, J.R. (Ed.) *Techniques for the study of mycorrhiza*. 23: 383-411.
- Marx, D., H. y Cordell, C., E. 1994. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. En: Waijpps, J.M. y Lumsden R.D. (eds.) *Biotechnology of fungi for improving plant grow*. University Press, Cambridge, 1-25.
- Mason, P., A., Last, F., T. y Wilson, J. 1990. Fruiting and Successions of Ectomycorrhizal Fungi. En: Pegg, G., F., Peter, G., A. (eds) *Fungal Infection of Plants*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 253-262.
- Mauperin, C., Montier, F., Garbaye, J., Le Tacon, F. y Carr, G. 1987. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid médium and entrapped in calcium alginate gel. *Can. J. Bot.* 65:2326-2329.

- Mendez-Neri, M., Pérez-Moreno, J., Quintero-Lizaola, R., Hernández-Acosta, E. y Lara-Herrera, A. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana*, México. 29:1: 73-81.
- Meza, R., D.R. 2010. Estudio de los hongos ectomicorrizógenos (Basidiomycetes) que se asocian a dos tipos de vegetación (Bosque de *Abies religiosa* y Bosque de *Pinus hartwegii*) de la Cuenca del Río Magdalena D.F. Tesis de Licenciatura en Biología Agropecuaria. Tlaxcala, Tlax.
- Mille-Lindblom, C., Von, W., E. y Tranvik, L., J. 2004. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods* 59:253-262.
- Miller, S., L. y Allen, E., B. 1992. Mycorrhizae nutrient translocation and interaction between plants. En: Allen, M.F. (Ed.) *Mycorrhizal functioning*. Chapman y Hall. New York.
- Mitchell, L. 1970. *Crop growth and culture*. Iowa State. University Press. p 349.
- Molina, R. 1979. Pure cultura synthesis and host specificity of read alder mycorrhizae. *Can. J. Bot.* 57: 1223-1228.
- Molina, R. 1981. Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*. *Canadian Journal of Botany* 59:325-334. En: Pegg, G.F. y Ayres, P.G. 1987. *Fungal infection of plants*, Cambridge University Press. Cambridge. pp. 25-43.
- Molina, R. y Trappe, J., M. 1982. Patterns of ectomycorrhizal specificity and potencial among Pacific Northwest conifers and fungi. *Forest Science* 28:423-458. En: Pegg, G.F. y Ayres, P.G. 1987. *Fungal infection of plants*, Cambridge University Press. Cambridge. pp. 25-43.
- Molina, R., Massicotte, H., B. y Trappe, J., M. 1992a. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: Community-Ecological consequences and practical implications. In: Allen, M.F. (Ed) *Mycorrhizal Funtioning*. Chapman & Hall, New York. pp. 375-423.
- Molina, R., Massicotte, H., B. y Trappe, J., M. 1992b. Ecological role of specificity phenomena in ectomycorrhizal plant communities: Potentials for interplant linkages and guild development. En: Read, D.J., Lewis, D. H., Fitter, A.H. y Alexander, I.J. *Mycorrhizas in ecosystems*. CAB International, Cambridge. pp. 106-112.
- Morcillo, S., M. y Sánchez, M. 2000. Ectomicorrizas: Aplicaciones en restauración del paisaje y en cultivo de hongos comestibles. *Micología forestal y aplicada*. Barcelona, España. pp. 22-30.
- Moyersoen, B, Becker, P. y Alexander, I., J. 2001. Are ectomycorrhizas more abundant than arbuscular mycorrhizas in tropical heath forests? *New Phytol.* 150: 591-599.
- Munsell Soil Color Charts. 1975. Soil Test Inc. Maryland.
- Muñoz, G., J.C. 2003. Inoculación esporal en *Pinus pseudostrobus* y *P. montezumae* con diferentes hongos ectomicorrizógenos, bajo condiciones de vivero. Tesis de Licenciatura en Biología Agropecuaria. Tlaxcala, Tlax.

- Musálem S., M.A. y Solís P., J.A. 2000. Monografía de *Pinus hartwegii*. SAGAR. INIFAP. CIRCE Campo Experimental Valle de México. Libro Técnico No 3. Chapingo, Estado de México. p.96.
- Nambiar, E., K.S., y Sands, R. 1993. Competing for water and nutrients in forest. *Can. J. For. Res.* 23:1955-1968.
- Nava, M. 2003. Los bosques de la cuenca alta del río Magdalena, D.F., México. Un estudio de vegetación y fitodiversidad. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Nava, G. y Hernández, C. 2003. Aspectos generales de la asociación micorrízica. En: Estrada-Torres, A. y Santiago-Martínez, G. 2003. Avances en el estudio de la ectomicorriza en el Estado de Tlaxcala, México. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. Tlaxcala, Méx. pp. 1-10.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.
- Olsson, P., A. 1999. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiolog y Ecology* 29:303-310.
- Parladé, X. 1999. Comportamiento en campo de planta de reforestación inoculada con hongos ectomicorrízicos. En: Vázquez, E., Rincón, S., Ramos, S. y Doncel, E. (Eds.). 1999. Micorrización en áreas mediterráneas de la península Ibérica. pp. 61-74.
- Peñuelas, R., J.L. y Ocaña, B., L. 1984. Cultivo de plantas forestales en contenedor. 2da. Edición. Ed. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Madrid, España. p. 190.
- Pera, J. y Parladé, J. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Invest. Agrar. Sist. Recur. For.* 14 (3): 419-433.
- Perea-Estrada, V.M., Pérez-Moreno, J., Villareal, R., L., Trinidad, S., A., de Bauer, M., L., Cetina, A., V.M. y Tijerina, C., L. 2009. Humedad edáfica, Nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Revista Fitotecnia Mexicana.* 32 (2): 93-102.
- Pereira, G., Herrera, J., Machuca, A. y Sánchez, M. 2007. Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrízicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque* 28:3: 215-219.
- Pérez-Moreno, J. y Ferrera-Cerrato, R. 1991. Aislamiento y caracterización de quince cepas de hongos ectomicorrízicos. *Memorias del IV Congreso Nacional de Micología.* Tlaxcala, Tlax.135.
- Pérez-Moreno, J. y Ferrera-Cerrato, R. 1997. Mycorrhizal interactions with plants and soil organisms in sustainable agroecosystems. En: Brussaard L, Ferrera Cerrato R (Eds.) *Soil ecology in sustainable agricultural systems.* CRC Lewis. Boca Raton, Florida, EEUU. pp. 91-112.
- Pérez-Moreno, J. y Read, D. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 19 (5): 239-247.

- Pérez-Moreno, J., Martínez, R., M., y García, R., L. 2011. Hongos silvestres: Amigos de los bosques y manjares divinos. *Ciencia y Desarrollo microorganismos y vida*. 237 (252): 35-39.
- Perry, J., P. 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press. Portland, Oregon, USA. p. 231.
- Peterson, R., L. y Bofante, P. 1994. Comparative structure of vesicular-arbuscular mycorrhizas and ectomycorrhizas. En: Robson, A., D., Abbott, L., K. y Malajczuk, N. (eds.). *management of mycorrhizas in agricultura, horticulture and forestry*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1-10
- Pyke, D., A. y Thompson, J., N. 1986. Statistical analysis of survival and renewal rate experiments. *Ecology*, 67: 240-245.
- Ritchie, G., A. 1984. Root growth potential: principles procedures, and predictive ability. En: Duryea, M., L. *Proceedings, evaluating seedling quality: principles, procedures, and predictive abilities of major tests*. Oregon State University, Forest Research Laboratory: 93-105.
- Rodríguez T., D. A. 2006. Notas sobre el diseño de plantaciones de restauración. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 12 (2):111-123.
- Rousseau, J., V.D., Reid, C., P.P. y English, R., J. 1992. Relationship between biomass of the mycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* y phosphorus uptake in loblolly pine seedlings. *Soil Biol. Biochem*. 24 (2):183-184.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. LIMUSA. D.F. México, DF.
- Rzedowski, G. y Rzedowski, J. 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2 ed. Instituto de Ecología-CONABIO. México. p. 584.
- Sallzer, P. y Boller, T. 2000. Elicitor-induced reactiond in mycorrhiza and their suppression. En: Podila, G. K. y Douds, D.D.Jr. (eds). *Current advances in mycorrhizae research*. APS Press, Minenesota. pp. 1-10.
- Salmanowicz, B. y Nylund, J., E. 1988. High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhiza infection in Scots pine. *Eur. J. For. Path*. 18: 292-298.
- Sandoval, G. I. 2010. Efecto de los hongos ectomicorrizógenos en el crecimiento y supervivencia de plántulas de *Pinus hartwegii* Lindl. y *Abies religiosa* (Kunth Schltld. Et Cham.): Un enfoque para la restauración de ambientes deteriorados en la Cuenca del Río Magdalena D.F. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F.
- Santiago-Martínez, G. 1992. Pruebas de crecimiento, síntesis *In vitro* y caracterización de 10 cepas de hongos ectomicorrizógenos. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F.

- Santiago-Martínez, G. y Estrada-Torres, A. 1999. Técnicas de producción de inóculo esporal de hongos ectomicorrizógenos. En: Hongos ectomicorrizógenos y producción de inoculantes para plantas de interés forestal. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. Tlaxcala, Méx. pp.16-20.
- Santiago-Martínez, G. 2002. Pruebas de crecimiento, descripción e identificación de cultivos de hongos ectomicorrizógenos e inoculación controlada con esporas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM, México, D.F.
- Singer, R. 1986. Agaricales in Modern Taxonomy, 4th edn. Koeltz, Köningstein.
- Smith, S., E. y Read, D., J. 1992. Mycorrhizal symbiosis. Chapman and Hall. USA.
- Smith, S., E. y Read, D., J. 1997. Mycorrhizal symbiosis. Cambridge, UK. Academic Press. New York. p. 605.
- Smith, S., E. y Read, D., J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3er Ed. Academic Press. p. 800.
- Stenström, E., K.M. y Unestam, T. 1985. Prolonged effects of initially introduced mycorrhizae of pine plants after outplanting. En: Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Proc. 1st Eur. Symp. On Mycorrhizae. Dijon, INRA. (Paris). pp. 503-506.
- Tommerup, I., C., Kuek, C. y Malajczuk, N. 1987. Ectomycorrhizal inoculum production and utilization in Australia. En: Sylvia, D., M., Hung, L., L. y Graham, J., H. Mycorrhizae in the next decade: Practical applications and research priorities, Proc. 7th NACOM. Institute of food and agricultural science, University of Florida, Gainesville, Florida. pp. 293-295.
- Torres-Martínez, P. 1992. Estudio de las micorrizas de pino Carrasco (*Pinus halapensis*). Tesis de doctorado. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. Murcia, España.
- Trappe, J., M. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. An. Rev. Phytopath. 15:203-222.
- Valdés, M. 1986. Survival and growth of Pines with specific ectomycorrhizae after three years on a highly eroded site. Can. J. Bot. 64:855-888.
- Vázquez-García A., Santiago-Martínez, G. y Estrada-Torres A. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de 15 cepas de hongos ectomicorrizógenos. Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica.
- Villar, R., Ruiz-Robledo, J., Quero, J., Poorter, H., Valladares, F. y Marañón, T. 2004. Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. En Valladares, F. (Ed.) 2004. Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Ministerio del medio ambiente, EGRAF, S.A., Madrid. pp. 191-227.
- Villarruel-Ordaz, J.L. y Cifuentes, J. 2006. Macromicetos de la Cuenca del Río Magdalena y zonas adyacentes, delegación la Magdalena Contreras, México D.F.: Listado preliminar y análisis de distribución. Reporte técnico de la sección de Micología del herbario FCME de la Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.

- White, D., C., Davis, W., M., Nickels, J., S., King, J., D. y Bobbie, R., J. 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate. *Ecologic* 40:51-62.
- Xicohténcatl, A., Santiago-Martínez, G. y Estrada-Torres, A. 1997. Ectomicorriza de *Pinus montezumae* con dos especies de *Suillus*. Memorias VI Congreso Nacional de Micología. Tapachula, Chiapas, 192.
- Xicohténcatl, A., Santiago-Martínez, G. y Estrada-Torres, A. 1998. La Ectomicorriza de *Pinus cembroides* y *Suillus tomentosus*. En: Zuleta, R., R., Escalona, M., A., y Trejo, D. (eds.). Avances de la investigación micorrízica en México. Universidad Veracruzana, Veracruz. pp 259-266.
- Zamora-Martínez, M. C. 2008. Los hongos silvestres comestibles. En: Guerra de la C. V y Mallén, C.R. (Comp.) Tlaxcala sus recursos forestales: conservación, aprovechamiento y bases para su manejo. INIFAP/ CENID-COMEF. CONACYT. MÉXICO, D. F. México. Libro técnico núm. 4. pp. 151-168.
- Zar. 1984. Biostatistic alanalysis. 2da Ed. Prentice Hall Inc. New Jersey
- Zeppa, S., Vallorani, L., Potenza, L., Bernardini, F., Pieretti, B., Guescini, M., Giomaro, G. y Stocchi, V. 2000. Estimation of fungal biomass and transcript levels in *Tilia platyphyllos* – *Tuber borchii* ectomycorrhizae. *FEMS Microbiology Letters* 188:199-124.

Páginas web

http://www.pfc.cfs.nrcan.gc.ca/biodiversity/bcern/manual/ecto_morph_anat_e.html

<http://campus.iztacala.unam.mx/mmr/mega>

<http://www.deemy.de>

www.indexfungorum.org/names/names.asp

<http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU>

14. ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de biomasa micelial

Técnica de Ácidos grasos (Bligh & Dyer 1959; White *et al.*, 1979; Frostgård *et al.*, 1991)

- a) Saponificación: La primera parte en donde una base metanólica fuerte combinada con calor provocan una lisis celular. Los ácidos grasos son lípidos celulares y son convertidos por las sales de sodio.
- b) Se pesaron 0.5 grs. de la muestra en un tubo de ensaye y se le agregó 1.0 +/- 0.1 ml del reactivo número uno el cual constó de NaOH, Metanol y H₂O esterilizada todo lo anterior se sometió a agitación en un vortex en un tiempo de exposición de 5-10 segundos.
- c) Pasado el tiempo de agitación, los tubos con la muestra fueron llevados a un baño maría el cual se calentó previamente a 96 +/- 2 °C, y una vez que se tenía esta temperatura se dejaron durante 5 minutos para posteriormente pasar a un recipiente con hielo para mantener el agua fría; al final se repitió la agitación. (Todo lo anterior se realizó con la finalidad de provocar una ruptura celular en donde se localizan los ácidos grasos por medio de un choque térmico).
- d) Metilación: El segundo paso de la técnica es la metilación, la cual convierte a los ácidos grasos (como sales de sodio) y el compuesto metil-ester incrementa la volatilización de los ácidos grasos para el análisis de cromatografía de gases.
- e) Después de ser sometidas las muestras a la saponificación, a los tubos se les adicionó 2.0 +/- 0.1 ml del reactivo número dos el cual constó de HCL y Metanol nuevamente los tubos fueron sometidos a agitación en el vortex con un tiempo de exposición de 5 a 10 segundos. Posteriormente se sometieron al choque térmico y por último en agitación.
- f) Extracción: En el tercer paso los ácidos grasos metil-ester son separados, la fase sobrenadante de la fase orgánica, donde la primera fase fue transferida utilizando una pipeta Pasteur a un tubo nuevo con el procedimiento de extracción líquida.

- g) A los tubos se les adicionó 1.25 +/- 0.1 ml del reactivo número tres el cual constó de Hexano y Metil-ter butil éter y 100 µl de la solución estándar 19:0 fueron agitados manualmente durante 10 min., se removió la fase superior del solvente a un nuevo tubo y se centrifugó durante de 3 minutos a 2000 rpm.
- h) El lavado: En este paso, la parte visible de la solución fue adicionada en un tubo para preparar la muestra de ácidos grasos y los reactivos residuales del extracto orgánico. Los reactivos residuales pueden dañar el sistema de cromatografía, resultando una pérdida del ácido hidroxi-metil ester.
- i) Se adicionó 3.0 +/- 0.1 ml del reactivo número cuatro el cual constó de NaOH y H₂O esterilizada fueron agitados manualmente durante 5 minutos y posteriormente agitados en el vortex durante 3 minutos a 2000 rpm.
- j) Transferencia del extracto de la muestra: En este paso, la fase superior del solvente fue removida y puesta en un vial para la cromatografía de gases. La interfase está entre las dos capas que a veces son difíciles de observar, utilizando una perilla manual con una pipeta Pasteur y se transfirió con cuidado de no extraer la fase acuosa (baja).
- k) Se prosiguió a remover la fase orgánica (superior) de estos y se transfirió a un vial limpio para la evaporación bajo nitrógeno.
- l) Posteriormente a la evaporación de las muestras, estuvieron listas para someterse a la Cromatografía de gases.

Anexo 2. Análisis de suelo (Delgadillo, 2011)*

No. Lab.	Identificación muestra	pH 1:2 H ₂ O	M.O. (%) Walkley - Black	N* (%)	P Olsen ppm	CIC meq/100g	N-NH ₄ KCl 2 N ppm	N-NO ₃	C %	Densidad aparente gmc
1726-1	Abies	4.9	35.5	1.04	10	42.3	40	207	18.06	0.69
1726-2	Abies	4.9	37.7	0.95	9	53.6	41	348	17.80	0.69
1726-3	Abies	4.9	37.7	0.79	8	43.1	36	233	17.93	0.69
1726-4	Abies	4.9	35.5	0.86	8	40.3	42	320	18.56	0.71
1726-5	Abies	4.9	35.5	0.85	9	37.8	47	358	18.28	0.71
1727-1	Pino	5.2	10.6	0.37	4	25.8	30	144	7.81	0.96
1727-2	Pino	5.1	11.5	0.30	4	27.0	23	114	7.95	0.96
1727-3	Pino	5.1	12.3	0.36	4	25.6	20	107	7.60	0.96
1727-4	Pino	5.2	12.7	0.33	4	27.8	25	104	7.76	0.96
1727-5	Pino	5.1	12.1	0.30	4	26.4	26	103	7.93	0.96

*Datos no publicados