



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO
EDAFOLOGÍA

**INOCULACIÓN DE PINOS DE IMPORTANCIA FORESTAL
ÚTILES EN RESTAURACIÓN DE ÁREAS DEGRADADAS CON
HONGOS COMESTIBLES ECTOMICORRÍZICOS**

MÓNICA MÉNDEZ NERI

T E S I S

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO
2007

La presente tesis titulada: “Inoculación de pinos de importancia forestal útiles en restauración de áreas degradadas con hongos comestibles ectomicorrízicos.”, **realizada por la alumna:** Mónica Méndez Neri **bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:**

MAESTRA EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. ROBERTO QUINTERO LIZAOLA
Colegio de Postgraduados

DIRECTOR
DE TESIS

DR. JESÚS PÉREZ MORENO
Colegio de Postgraduados

ASESOR

DR. ALFREDO LARA HERRERA
Universidad Autonoma de Zacatecas

ASESORA

DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ ACOSTA
Universidad Autonoma Chapingo

INOCULACIÓN DE PINOS DE IMPORTANCIA FORESTAL ÚTILES EN RESTAURACIÓN DE ÁREAS DEGRADADAS CON HONGOS COMESTIBLES ECTOMICORRÍZICOS

Mónica Mendez Neri M.C.

Colegio de Postgraduados, 2007

Un criterio de selección de los hongos ectomicorrízicos (ECM) a utilizarse para inocular plantas en invernadero es su carácter de comestibilidad humana. El presente estudio evaluó el efecto de la inoculación con tres especies de hongos ECM (de los géneros *Hebeloma*, *Laccaria* y *Suillus*) los cuales son ampliamente utilizadas como alimento y comercializadas en mercados tradicionales mexicanos, solos o combinados, en el desarrollo de dos especies de pinos mexicanos nativos (*Pinus greggii* y *Pinus pseudostrobus*). En condiciones de invernadero 240 días después de la siembra se determinó el diámetro del tallo, peso seco aéreo, radical y total de las plantas, el porcentaje de colonización ECM, y se efectuó una caracterización morfológica de los morfotipos encontrados y contenido nutrimental (N,P,K) de las plantas. Las plantas inoculadas con hongos ECM, al final del experimento, fueron superiores a las plantas no inoculadas, en términos de producción de biomasa, porcentaje de colonización y contenido nutrimental. Este fenómeno se observó para ambas especies de pino independientemente del tipo de suelo y de la condición de esterilización. En términos generales, los máximos valores, tanto en altura como en peso seco total se observaron en aquellas plantas inoculadas con *Hebeloma*. En el caso de *Hebeloma* se observaron fructificaciones después de un año de la inoculación. Hasta donde conocemos, esta es la primera ocasión que se estudia el efecto de la inoculación con esporas ECM en *P. greggii* y *P. pseudostrobus*. Asimismo, este es uno de los pocos registros que se conoce a nivel mundial de consumo masivo de especies del género *Hebeloma*.

Palabras clave Hongos ectomicorrízicos comestibles, Inoculación con píleos, Pinaceae, Colonización micorrízica, México.

INOCULATION OF PINES WITH FORESTAL IMPORTANCE IN RESTAURATION OF ERODED AREAS WITH EDIBLE ECTOMYCORRHIZAL MUSHROOMS

Mónica Mendez Neri, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2007

A criterion for selection of ectomycorrhizal mushrooms (ECM) used for inoculation of plants under greenhouse conditions, is their edibility. This study assessed the effect of inoculating with three species of edible mushrooms (of the genera *Hebeloma*, *Laccaria* and *Suillus*), which are widely used as food and sold in traditional Mexican markets, alone or combined, on the development of two native Mexican pines (*Pinus greggii* and *Pinus pseudostrabus*). In a greenhouse 240 days after sowing, stem diameter, shoot, root and total plant dry weight, percentage of ECM colonization, and plant nutrient (N,P,K) content were determined, and a morphological characterization of the morphotypes found was conducted. At the end of the experiment, the plants inoculated with ECM were superior to non-inoculated plants in terms of biomass production, percentage of colonization and nutrient content. This phenomenon was observed in both pine species regardless of the type of soil or sterilization condition. In general, the highest values for both height and total dry weight were observed in those plants inoculated with *Hebeloma*. In the case of *Hebeloma*, fructification was observed a year after inoculation. As far as we know, this is the first study of the effect of inoculation with ECM spores on *P. greggii* and *P. pseudostrabus*. Also, this is one of the few records worldwide that documents the massive consumption of species of the genus *Hebeloma*.

Index words edible ectomycorrhizal mushrooms, inoculation with pilea, Pinaceae, mycorrhizal colonization, Mexico.

Este trabajo está dedicado:

Al compañero de mi vida... por compartir mis sueños y metas, y por ayudarme a realizar cada uno de ellos, por caminar a mi lado alentándome y apoyándome a cada paso que doy para seguir adelante... por llenar cada día de mi vida de razones para respirar. Para Iván, con todo mi amor.

A mis hermanos... porque juntos empezamos a soñar con grandezas y aprendimos a entregar lo mejor de nosotros, brindándonos la mano para levantarnos en cada tropiezo...por toda una vida de alegrías y apoyo incondicional...con mucho cariño para Ale e Iván.

A mis papas... por el inmenso amor, apoyo y confianza que han depositado en mí, porque gracias a su ejemplo y a su guía he logrado realizar una más de mis metas...para Maru y Alejandro con admiración, respeto y cariño.

Al lobo mexicano...fuente de inspiración de este trabajo, esperando sea un grano de arena más que contribuya a la recuperación de los bosques, su hogar...y de nuestra casa...GAAA.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca para realizar mis estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados por aceptarme y brindarme sus instalaciones para la realización de mi proyecto de investigación.

Al doctor Jesús Pérez Moreno por concederme la oportunidad y el honor de ser parte de su equipo, por encaminarme y guiarme durante mi investigación, por su sincera amistad y apoyo incondicional, por las lecciones académicas y de vida brindadas, porque con usted aprendí que: “Nadie sabe tanto como todos juntos”...Gracias por sus enseñanzas MAESTRO!!!

A mis amigos: Victor, por compartir tus conocimientos conmigo y por tu asesoramiento y apoyo técnico durante mi trabajo de investigación. A Sergio y Liliana por alegrar mi estancia en el Colegio y por la infinita ayuda que me brindaron. A Erica, por tus sabios consejos y apoyo académico.

Esta tesis intitulada “Inoculación de pinos de importancia forestal útiles en restauración de áreas degradadas con hongos comestibles ectomicorrízicos” formó parte del proyecto SEMARNAT-CONACyT- 2004-01-52: “*Los hongos silvestres comestibles del Parque Nacional Izta-Popo Zoquiapan y Anexos*” bajo la dirección del Dr. Jesús Pérez Moreno, a quien se agradece por su apoyo financiero.

Contenido

	Página
Índice de cuadros.....	vii
Índice de figuras.....	Viii
Capítulo 1. Introducción general.....	1
1.2. Literatura citada.....	8
Capítulo 2. Objetivos e Hipótesis.....	
2.1. Objetivo general.....	11
2.2. Objetivos particulares.....	11
2.3. Hipótesis.....	12
	13
Capítulo 3. Efecto de la inoculación con hongos comestibles ECM en el crecimiento y contenido nutrimental de dos pinos mexicanos subtropicales en invernadero	
3.1. Resumen.....	13
3.2. Abstract.....	15
3.3. Introducción.....	16
3.4. Materiales y Métodos.....	17
3.4.1. Material biológico y preparación de inóculo.....	17
3.4.2. Características físicas y químicas de los sustratos.....	18
3.4.3. Montaje del experimento.....	18
3.4.4. Diseño experimental y análisis estadístico.....	20
3.4.5. Variables evaluadas.....	21
3.5. Resultados.....	21
3.5.1. Altura y diámetro de las plantas.....	21
3.5.2. Peso seco de la parte aérea y radical.....	23
3.5.3. Contenido nutrimental.....	27
3.5.4. Colonización ectomicorrízica.....	28
3.5.5. Fructificaciones de <i>Hebeloma</i> en tubetes.....	31
3.6. Discusión.....	32
3.7. Conclusiones.....	39
3.8. Literatura citada.....	40
Capítulo 4. Conclusiones generales y consideraciones finales.....	45
Anexos.....	46
Anexo 1. Diseño experimental.....	46
Anexo 2. Cambios secuenciales en el diámetro.....	47
Anexo 3. Cambios secuenciales en el diámetro.....	47
.....	

Índice de Cuadros

	Página
Cuadro 3.1. Características físicas y químicas de los sustratos usados en el Experimento.....	20
Cuadro 3.2. Peso seco, diámetro del tallo y altura de plantas de <i>Pinus greggii</i> inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos 240 días después de la siembra.....	24
Cuadro 3.3. Peso seco, diámetro del tallo y altura de plantas de <i>Pinus pseudostrobus</i> inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos 240 días después de la siembra.....	26
Cuadro 3.4. Porcentajes de colonización ectomicorrízica total y por morfotipo de especies inoculadas en raíces de plantas de <i>Pinus greggii</i> y <i>Pinus pseudostrobus</i> 240 días después de la siembra.....	29
Cuadro 3.5. Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio de parte aérea, radical y total de plantas de <i>Pinus greggii</i> inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos 240 días después de la siembra.....	30
Cuadro 3.6. Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio de parte aérea, radical y total de plantas de <i>Pinus pseudostrobus</i> inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos 240 días después de la siembra.....	31

Índice de Figuras

	Página
Figura 3.1. Especies de hongos ECM utilizadas en el experimento y respuesta en plantas inoculadas. a Comercialización de hongos silvestres comestibles en mercados mexicanos. b Venta de <i>Hebeloma mesophaeum</i> , especie considerada generalmente no comestible a nivel mundial. c Deshidratación de pileos de <i>Laccaria bicolor</i> . d Respuesta en crecimiento de <i>Pinus greggii</i> como efecto de la inoculación con <i>Hebeloma mesophaeum</i> . e morfotipo tuberculado observado en las raíces de plantas inoculadas con <i>Suillus pseudobrevipes</i>	19
Figura 3.2. Cambios secuenciales en la altura de las plantas de <i>Pinus greggi</i> inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos, en el periodo de 90, 180 y 240 días después de la siembra crecidas en diferentes suelos.....	22
Figura 3.3. Cambios secuenciales en la altura de las plantas de <i>Pinus pseudostrobus</i> inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos, en el periodo de 90, 180 y 240 días después de la siembra crecidas en diferentes suelos.....	25

Capítulo 1

Introducción general

El impacto que han tenido las actividades humanas sobre los ecosistemas forestales ha traído como consecuencia la degradación y pérdida de grandes áreas, afectando la estructura y función de los ecosistemas lo cual, finalmente, se ve reflejado en una progresiva disminución de la capacidad de carga del planeta. Por tal motivo, la restauración de zonas degradadas debe ser considerada un componente esencial para contrarrestar dichos impactos.

La superficie forestal estimada en México para el 2004 fue de 84 millones 379 mil hectáreas. De acuerdo con datos obtenidos por el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) y la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) el índice anual de deforestación en nuestro país resulta de 314 mil hectáreas. Estos procesos de deforestación y la degradación forestal son factores importantes para el cambio climático global, puesto que producen emisiones netas de dióxido de carbono, constituyendo la segunda fuente de emisiones de gases de efecto invernadero en nuestro país. Además generan grandes problemas locales y regionales, como el incremento de la erosión y el abatimiento de los mantos acuíferos, entre otros. Es evidente que la pérdida de suelo implica la pérdida de comunidades de microorganismos que participan en la dinámica de este ecosistema. De igual manera, la pérdida de árboles en el bosque rompe con todas estas relaciones y favorece la erosión del suelo, lo que establece una cadena de destrucción y deterioro, que de no ser atendida a corto plazo se corre el riesgo de favorecer los procesos de desertificación.

En México, dicha explotación forestal se ha caracterizado por ser una actividad de extracción, sin manejo alguno, en la que no solo se pierden los recursos naturales, sino que los beneficios económicos no son equitativos. Paradójicamente, las comunidades y ejidos agrarios que actualmente son poseedores de la mayor parte de los recursos forestales del país, viven en condiciones de marginidad y pobreza (Merino, 1997). Aunque se han hecho inventarios sobre la delimitación de los terrenos forestales y su grado de perturbación, poco se ha avanzado en el de las plantaciones exitosas. Las zonas de restauración ocupan una superficie de 30 363 797 Ha, cuyos terrenos con aptitud forestal son dedicados a otros usos o están en proceso de degradación por incendios forestales, plagas, erosión, entre otros. Las zonas protegidas del país ocupan una superficie de 9 017 969 Ha y en comparación con la superficie total del país estas áreas naturales resultan insuficientes para la conservación de la biodiversidad y el decreto por si solo en algunas áreas protegidas no garantiza su control. La conservación de la diversidad biológica requiere de la instrumentación de acciones que contemplen las diferentes causas actuales del desarrollo y aprovechen las alternativas prácticas para el desarrollo sustentable.

Actualmente una de las estrategias que permiten la recuperación parcial o total de los bosques, dependiendo del nivel de degradación que presentan, es la restauración ecológica. Las técnicas de restauración ecológica buscan crear las condiciones adecuadas para el establecimiento y supervivencia de especies vegetales con la subsecuente creación de hábitat para especies animales, en este sentido, Lindig *et al.* (2005) propone el uso de plantaciones como una herramienta de restauración en zonas con altos niveles de degradación, considerando que su implementación además de

presentar una serie de ventajas ecológicas también puede representar un beneficio económico a largo plazo.

Sin embargo, los problemas a los que se enfrenta la restauración están relacionados, principalmente, con la degradación del suelo y la escasez de agua, la cual crea un ambiente inapropiado para el establecimiento de las plantas. De acuerdo con Cetina (2005) se ha observado que en nuestro país la supervivencia de las plantaciones de recuperación va del 15 al 40% en el primer año, llegando a ser en algunos sitios hasta del 0%. Entre otros factores, encontramos que los resultados negativos de las reforestaciones se deben a la producción de plantas de baja calidad en los viveros; el transporte de las plantas del vivero a la zona de plantación; durante el cual existe una gran mortandad de plantas y, por último, el sistema de plantación.

Se ha observado que los programas de reforestación con pinos u otras coníferas han prosperado rápidamente en las áreas donde existen hongos micorrizicos. Sin embargo, la desaparición de la cubierta vegetal provoca la desaparición de las poblaciones naturales de hongos micorrízicos. Por lo cual, la reintroducción o restablecimiento de los hongos ectomicorrízicos debe ser considerada al abordar la reforestación (Pera y Parladé, 2005), por lo que las plantas deben ser inoculadas con los hongos simbiosis adecuados. Esta simbiosis tiene gran relevancia para que la producción de plantas de vivero sean capaces de sobrevivir al estrés del transplante, especialmente en sitios con un alto grado de perturbación (Amora-Lazcano *et al.*, 2005).

Los hongos ectomicorrízicos son un componente importante de la biodiversidad, particularmente en ecosistemas de bosques templados y boreales (Nilsson *et al.*, 2005). Molina *et al.* (1992) reportan 148 géneros y 5400 especies descritas al rededor del mundo los cuales incluyen un amplio grupo de ascomicetos y basidiomicetos (Newton

y Haigh, 1998). Además representan un recurso para el establecimiento de prácticas sustentables de manejo forestal en las zonas templadas de nuestro país, puesto que numerosas especies, sobretodo del grupo de los basidiomicetos, son comestibles (Pérez-Moreno y Read, 2004).

La ectomicorriza es una simbiosis que involucra un mutualismo entre las raíces de las plantas y los hongos. Para muchas plantas y hongos la interacción parece ser esencialmente obligada, los pinos, por ejemplo, no pueden crecer sin la presencia de hongos ectomicorrízicos, y no hay evidencia de que los hongos sean capaces de vivir de forma independiente de la planta (Bruns *et al.*, 2002). La ectomicorriza juega un papel significativo en la obtención y distribución de nutrientes en los ecosistemas de bosques templados y son el principal camino a través del cual muchas plantas obtienen nutrientes minerales y, como tal, son críticas en el funcionamiento de los ecosistemas terrestres (Cullings *et al.*, 2003). En general, la infección micorrízica aumenta la obtención de nutrientes por lo cual hay un mayor crecimiento en las plantas, de acuerdo con Bucking *et al.* (2002) esta adquisición de nutrientes se puede dar por un incremento del área de absorción, por la movilización de nutrientes disponibles en el suelo o por un incremento en la secreción de compuestos “pinza” o exoenzimas. En esta simbiosis mutualista, las plantas cambian fotosintatos, no solo por nutrientes minerales, sino también por un incremento en la resistencia contra las enfermedades, sequía y temperaturas extremas (Kernaghan, 2004), se ha observado que los hongos micorrízicos son excelentes candidatos de biocontrol a través de la competencia por espacio; gracias a la ventaja ecológica que representa su asociación obligada con las raíces, y debido a que los hongos ectomicorrízicos están recubiertos por una vaina que

les proporciona protección se ha demostrado que éstos son capaces de habitar en sitios infectados por patógenos (Wipps, 2001).

La ectomicorriza es de gran importancia para el desarrollo de las plantas en condiciones de baja fertilidad debido a que el sistema micelial ectomicorrízico es un importante sumidero de carbono y es la parte de la asociación que es funcionalmente importante en la captura de agua y nutrientes (Genney *et al.*, 2006; Gehring y Whitham, 1994) ya que el micelio ECM incrementa el área de superficie para la absorción de nutrientes. Además puede también jugar un papel directo, mediante la producción de exoenzimas, en los procesos de descomposición, movilización y transporte de nutrientes de sustratos complejos, los cuales son predominantemente residuos orgánicos de los árboles, sus hongos simbiotes y otros componentes de la microflora del suelo que la planta, por sí misma, no sería capaz de asimilar (Tibbett y Sanders, 2002; Pérez-Moreno y Read, 2000, 2001).

Los hongos ECM pueden incrementar la obtención de nutrientes a través de una mejor exploración del suelo por las hifas comparado con las raíces (Calvaruso *et al.*, 2006 Hoffland *et al.*, 2004,), los hongos ECM pueden tomar N y P de fuentes orgánicas las cuales no están disponibles para raíces no micorrizadas (van Schöll *et al.*, 2006). Se ha observado que especies de pinos que compiten en suelos pobres en nitrógeno exhiben una gran habilidad para asimilar nitrógeno inorgánico o aminoácidos en bajas concentraciones por simbiosis ectomicorrízica (Daufresne y Hedin, 2005), más aún, se ha demostrado que la ectomicorriza tiene la capacidad de transferir agua y nutrientes entre árboles de la misma o diferente especie, a través de una conexión micelial (Pérez-Moreno y Read, 2004) con lo cual se puede llegar a incrementar la supervivencia y el crecimiento de las plántulas en campo (Newbery *et al.*, 2000).

Diversos estudios han demostrado que la colonización micorrízica no influye únicamente en la supervivencia y productividad de las plantas, sino también en otras características, incluyendo calidad foliar (Goverde *et al.*, 2000), morfología clonal (Stretwolf-Engel *et al.*, 1997) y salud (Xiaohong y Koide, 1994).

Ahora bien, la susceptibilidad de las plantas a ser micorrizadas depende de factores ambientales y químicos como disponibilidad de nutrientes, temperatura y pH, donde la tolerancia de los hongos a estos factores puede influir en la colonización y establecimiento de las micorrizas. Estas características podrían ser utilizadas como uno de los criterios de selección de hongos, para que puedan ser útiles en los programas de reforestación, sobre todo en lugares con condiciones adversas (Vazquez-García *et al.*, 2002). Sin embargo, la competencia entre los hongos inoculados en invernadero y los hongos indígenas (nativos) puede causar estrés y afectar adversamente el crecimiento de las plantas trasplantadas a campo. Los hongos de invernadero probablemente carecen de adaptaciones para las condiciones ambientales presentes en los sitios de reforestación (por ejemplo bajo pH y disponibilidad de nutrientes) y por consiguiente son reemplazados por hongos indígenas de estos suelos forestales. Tarvainen *et al.*, 2004. Estudios de campo han demostrado que la persistencia de la micorriza inoculada y su efecto sobre las plantas depende de la especie de hongo inoculada, Menkis *et al.*, 2007; Gagné *et al.*, 2006; Maestre *et al.*, 2002, reportan bajas tasas de colonización y persistencia en campo de especies inoculadas y una abundante presencia de hongos ECM nativos, los cuales al tener una alta capacidad de adaptación al sistema suelo-planta, podrían haber colonizado las plantas introducidas, suprimiendo el beneficio potencial de la inoculación en vivero. Por lo cual, es de gran relevancia contar con las

técnicas de inoculación adecuadas en los cultivos de invernadero para incrementar el rendimiento de las plantas en campo Parladé *et al.* (2004) así como los requerimientos de las especies de hongos empleadas para inoculación de plantas para asegurar el éxito del establecimiento de comunidades vegetales en la restauración de áreas degradadas. De tal forma que la pre-selección de hongos ectomicorrizicos es un paso crítico para el establecimiento de programas de inoculación en vivero. El criterio de selección debe estar basado en las diferencias ecológicas y fisiológicas entre los diferentes hongos y para cada cepa de hongo. Estos criterios incluyen la compatibilidad simbiótica del hongo y el hospedero, la adaptabilidad ecológica del hongo micorrizico al sitio de trasplante, la habilidad del hongo para competir con los hongos nativos y la facilidad para producción de inóculo.

Así, la aplicación exitosa de tratamientos micorrízicos en programas de restauración podría mejorar con la explotación potencial de hongos micorrízicos presentes en los sitios donde será llevada a cabo la reforestación. Después probar para inoculación en condiciones de invernadero la combinación de especies de hongos-planta hospedera más favorable y compatible.

Aunque en los últimos años se ha incrementado el conocimiento sobre la función de la ectomicorriza en el ecosistema, aún no se cuenta con programas nacionales para el desarrollo biotecnológico de propagación y aplicación a gran escala del micelio de hongos ECM que favorezca la supervivencia y crecimiento de un mayor número de plantas utilizadas para la reforestación de áreas degradadas en nuestro país. El éxito en los programas de inoculación tendrá que basarse en la selección de hongos simbioses que sean efectivos y benéficos en la asociación.

Bajo este contexto, el objetivo del presente estudio fue comparar la eficiencia en el crecimiento de plantas de pino, bajo condiciones de invernadero, de la inoculación con hongos ectomicorrízicos frecuentemente consumidas y comercializadas por grupos indígenas en la parte central de México.

Literatura citada

Amora-Lazcano, E., Y. Carreón-Abud y M. Martínez-Trujillo. 2005. Ectomicorrizas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Biológicas* 7: 63-71.

Bruns, T.D., M.I. Bidartondo y D.L. Taylor. 2002. Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us? *Integrative and Comparative Biology* 42: 352-359.

Bücking, H., A.J. Kuhn, W.H. Schröder y W. Heyser. 2002. The fungal sheath ectomycorrhizal pine roots: An apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium and potassium into the root cortex? *Journal of Experimental Botany* 53: 1659-1669.

Calvaruso, C., M-P. Turpault y P. Frey-Klett. 2006. Root-associated bacteria contribute to mineral weathering and to mineral nutrition in trees: a budgeting analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1258-1266.

Cetina, V. M. 2005. Deforestación y reforestación. *In: Temas ambientales del siglo XXI. Segunda edición. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.* pp 12-13.

CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2004. Protección, restauración y conservación de suelos forestales. Manual de obras y prácticas. SEMARNAT, México, D.F. 210 p.

Cullings, K.W., M.H. New, S. Makhija y V.T. Parker. 2003. Effects of litter addition on ectomycorrhizal associates of a lodgepole pine (*Pinus contorta*) stand in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3772-3776.

Daufresne, T. y L.O. Hedin. 2005. Plant coexistence depends on ecosystem nutrient cycles: Extension of the resource-ratio theory. *PNAS* 102: 9212-9217.

Gagné, A., J. L. Jany, J. Bousquet y D.P. Khasa. 2006. Ectomycorrhizal fungal communities of nursery-inoculated seedlings outplanted on clear-cut sites in northern Alberta. *Canadian Journal of Forest Reserach* 36 : 1684-1694.

Genney, D.R., I.C. Anderson y I.J. Alexander. 2006. Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. *New Phytologist* 170 : 381-390.

Gehring, C.A. y T.G. Whitham. 1994. Comparisons of ectomycorrhizae on pinyon pines (*Pinus edulis*: Pinaceae) across extremes of soil type and herbivory. *American Journal of Botany* 81: 1509-1516.

Goverde, M., M. van der Heijden, M.G.A. Wiemken, A. Sanders y I.R. Erhardt. 2000. Arbuscular mycorrhizal fungi influence life history traits of a lepidopteran herbivore. *Oecologia* 125: 362-369.

Hoffland, E., T.W. Kuyper, H. Wallander, C. Plassard, A.A. Gorbushina, K. Haselwandter, S. Holmström, R. Landeweert, U.S. Lundström, A. Rosling, R. Sen, M.M. Smits, P.A.W. van Hess y N. van Breemen. 2004. The role of fungi in weathering. *Front Ecol Environ* 2: 258-264.

INEGI

Kernaghan, G. 2004. Mycorrhizal diversity: Cause and effect? *Pedobiologia* 49: 511-520.

Lindig C. R., A. Blanco y C. Sáenz. 2005. Estrategias para la restauración ecológica de bosques. *Biológicas* 7: 13-20.

Maestre, F.T., S. Bautista, J. Cortina, G. Diaz, M. Honrubia y R. Vallejo. 2002. Microsite and mycorrhizal inoculum effects on the establishment of *Quercus coccifera* in a semi-arid degraded steppe. *Ecological Engineering* 19: 289-295

Menkis, A., R. Vasiliauskas, A.F.S. Taylor, J. Stenlid y R. Finlay. 2007. Afforestation of abandoned farmland with conifer seedlings inoculated with three ectomycorrhizal fungi-impact on plant performance and ectomycorrhizal community. *Mycorrhiza* ???

Merino, I. 1997. El manejo forestal comunitario en México y sus perspectivas de sustentabilidad. UNAM, SEMARNAP, CMSS y WRI. Centro Regional de Investigaciones Multidisciplinarias, UNAM. Cuernavaca, Morelos.

Molina, R., H. Masticote y J.M. Trappe. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbioses: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen, M.F. (Ed). *Mycorrhizal functioning an integrative plant-fungal process*. Champan and Hall. New York, USA. Pp. 357-423.

Newbery, D.M., I.J. Alexander y J.A. Rother. 2000. Does proximity to conspecific adults influence the establishment of ectomycorrhizal trees in rain forest? *New Phytologist* 147: 401-409.

Newton A.C. y J.M. Haigh. 1998. Diversity of ectomycorrhizal fungi in Britain: a test of the species-area relationship, and the role of host specificity. *New Phytologist* 138: 619-627.

Nilsson, L.O., R. Giesler, E. Baath y H. Wallander. 2005. Growth and biomass of mycorrhizal mycelia in coniferous forest along short natural nutrient gradients. *New Phytologist* 165: 613-622.

Parladé, J., J. Pera y J. Luque. 2004. Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza* 14: 171-176

Pera, J. y J. Parladé. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrizicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación agraria: Sistemas de recursos forestales* 14: 419-433

Pérez-Moreno, J. y D.J. Read. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247.

Perez-Moreno, J. and D.J. Read. 2000. Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist* 145: 301-309.

Stretwolf-Engel, R., M. van der Heijden, M.G.A. Wiemken y A. Sanders. 1997. The ecological significance of arbuscular mycorrhizal fungal effects on clonal reproductions in plants. *Ecology* 82: 2846-2859.

Tarvainen, O., A.M. Markkola, U. Ahonen-Jonnarth, A. Jumpponen y R. Strömmer. 2004. Changes in ectomycorrhizal colonization and root peroxidase activity in *Pinus sylvestris* nursery seedlings planted in forest humus. *Scandinavian Journal of Forest Research* 19: 400-408.

Tibbett, M. y F.E. Sanders. 2002. Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany* 89: 783-789.

van Schöll, L., M.M. Smits y E. Hoffland. 2006. Ectomycorrhizal weathering of the soil minerals muscovite and hornblende. *New Phytologist* 171: 805-814.

Vazquez-García, A., G. Santiago-Martínez y A. Estrada-Torres. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 73: 1-15.

Wipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.

Xiaohong, L. y R. Koide. 1994. The effects of mycorrhizal infection on components of plant growth and reproduction. *New Phytologist* 128: 211-218.

Capítulo 2

Objetivos e Hipótesis

2.1. Objetivo general

Evaluar y comparar el efecto de la inoculación individual o combinada con 3 especies de hongos ectomicorrízicos (ECM) comestibles en el desarrollo de plantas de pino bajo condiciones de invernadero.

2.2. Objetivos particulares

1. Evaluar el crecimiento y contenido nutrimental de plantas de pino inoculadas o no con hongos ECM comestibles en suelo esterilizado y no esterilizado en condiciones de invernadero.
2. Comparar la eficiencia, en el crecimiento de plantas de pino y contenido nutrimental de la inoculación combinada ECM comestibles con tres especies de hongos bajo condiciones de invernadero.
3. Evaluar en dos suelos con diferentes condiciones de fertilidad la eficiencia de la inoculación con hongos ECM comestibles.

2.3. Hipótesis

1. Los hongos ECM inoculados en plantas que se han desarrollado en suelos esterilizados presentan un efecto positivo en comparación con aquellos crecidos en suelo no esterilizado.
2. Existe un efecto sinérgico positivo en el crecimiento y contenido nutrimental de las plantas de pino como resultado de la inoculación simultánea con hongos ECM comestibles, comparado con aquellas plantas que fueron inoculadas solo con una especie.
3. La simbiosis ECM es más eficiente en el desarrollo de las plantas de pino que crecen en suelos fértiles comparadas con aquellas que se desarrollan en suelos de baja fertilidad.

Capítulo 3

Efecto de la inoculación con hongos comestibles ECM en el crecimiento y contenido nutrimental de dos pinos mexicanos subtropicales en invernadero

3.1 Resumen

La inoculación de árboles de importancia forestal con hongos micorrízicos representa una importante herramienta en la producción de plantas en invernadero. Un criterio de selección que ha cobrado importancia a últimas fechas de los hongos ectomicorrízicos (ECM) a utilizarse es su carácter de comestibilidad humana. El presente estudio evaluó el efecto de la inoculación con tres especies de hongos ECM (de los géneros *Hebeloma*, *Laccaria* y *Suillus*) los cuales son ampliamente utilizadas como alimento y comercializadas en mercados tradicionales mexicanos, solos o combinados, en el desarrollo de dos especies de pinos mexicanos nativos (*Pinus greggii* y *Pinus pseudostrobus*). En condiciones de invernadero 240 días después de la siembra se determinó el diámetro del tallo, peso seco aéreo, radical y total de las plantas, el porcentaje de colonización ECM, y se efectuó una caracterización morfológica de los morfotipos encontrados y contenido nutrimental (N,P,K) de las plantas. Las plantas inoculadas con hongos ECM, al final del experimento, fueron superiores a las plantas no inoculadas, en términos de producción de biomasa, porcentaje de colonización y contenido nutrimental. Este fenómeno se observó para ambas

especies de pino independientemente del tipo de suelo y de la condición de esterilización. En términos generales, los máximos valores, tanto en altura como en peso seco total se observaron en aquellas plantas inoculadas con *Hebeloma*. Los porcentajes de colonización por morfotipo de especie inoculada alcanzaron valores de hasta 78.9%. En el caso de *Hebeloma* se observaron fructificaciones después de un año de la inoculación. Hasta donde conocemos, esta es la primera ocasión que se estudia el efecto de la inoculación con esporas ECM en *P. greggii* y *P. pseudostrobus*. Asimismo, este es uno de los pocos registros que se conoce a nivel mundial de consumo masivo de especies del género *Hebeloma*.

Palabras clave Hongos ectomicorrízicos comestibles, Inoculación con píleos, Pinaceae, Colonización micorrízica, México.

3.2 Abstract

Inoculating important forest trees with mycorrhizal mushrooms can be an important tool in greenhouse plant production. A criterion for selection of ectomycorrhizal mushrooms (ECM) that has recently gained importance is their edibility. This study assessed the effect of inoculating with three species of edible mushrooms (of the genera *Hebeloma*, *Laccaria* and *Suillus*), which are widely used as food and sold in traditional Mexican markets, alone or combined, on the development of two native Mexican pines (*Pinus greggii* and *Pinus pseudostrabus*). In a greenhouse 240 days after sowing, stem diameter, shoot, root and total plant dry weight, percentage of ECM colonization, and plant nutrient (N,P,K) content were determined, and a morphological characterization of the morphotypes found was conducted. At the end of the experiment, the plants inoculated with ECM were superior to non-inoculated plants in terms of biomass production, percentage of colonization and nutrient content. This phenomenon was observed in both pine species regardless of the type of soil or sterilization condition. In general, the highest values for both height and total dry weight were observed in those plants inoculated with *Hebeloma*. Colonization percentages by morphotype of inoculated species were up to 78.9%. In the case of *Hebeloma*, fructification was observed a year after inoculation. As far as we know, this is the first study of the effect of inoculation with ECM spores on *P. greggii* and *P. pseudostrabus*. Also, this is one of the few records worldwide that documents the massive consumption of species of the genus *Hebeloma*.

Index words edible ectomycorrhizal mushrooms, inoculation with pilea, Pinaceae, mycorrhizal colonization, Mexico.

3.3 Introducción

La ectomicorriza es una simbiosis que se establece entre alrededor de 2000 especies de plantas y 5000 especies de hongos. Dicha simbiosis resulta fundamental en la estructura y funcionamiento de ecosistemas boreales, templados y algunos tropicales (Pérez-Moreno and Read 2004; Smith and Read 1997). Los hongos ectomicorrízicos (ECM), debido en parte a las conspicuas redes miceliales que establecen, incrementan la adquisición de agua y nutrientes de las plantas con las que se asocian y pueden llegar a constituir también un importante factor de control de patógenos vegetales. Debido a esto, la inoculación con hongos ECM constituye una importante herramienta en la propagación masiva de plantas, dado que con frecuencia la ECM es obligada para los árboles con los que se asocia (Bruns et al. 2002; Castellano and Molina 1989). Debido a i) la compatibilidad simbiótica de hongos y plantas, ii) la adaptabilidad ecológica de los simbiontes fúngicos en diferentes sustratos y su habilidad para competir con hongos nativos, iii) los efectos benéficos diferenciales en las plantas hospederas y iv) la facilidad de producción de inóculo, es importante la selección de los simbiontes fúngicos apropiados en programas de inoculación con hongos ECM en vivero (Parladé et al. 2004; Rincón et al. 2001). Adicionalmente, un criterio que ha cobrado importancia últimas fechas en la selección de hongos ECM a ser utilizados para inocular plantas es su comestibilidad. A nivel mundial, se han registrado más de 200 especies de hongos ECM comestibles con importancia económica. Algunos de ellos tienen un amplio mercado internacional cotizado en billones de dólares anualmente tales como trufas, matsutake, porcini, cantarelos y hongo Cesar (Wang and Hall 2004). Adicionalmente, existen centenares de especies que son consumidas localmente en diferentes países. Por ejemplo, en México se conocen más de 200 hongos silvestres

comestibles los cuales han sido consumidos por siglos (Villareal y Pérez-Moreno 1989) y actualmente son comercializados por diversos grupos étnicos en mercados locales en centenares de toneladas anualmente. El uso de productos forestales no maderables, ha recibido recientemente atención como un factor de enorme importancia para la conservación forestal, por su importancia socioeconómica. Por ejemplo en México más de 50% de las especies comestibles conocidas son ECM y podrían potencialmente utilizarse en la inoculación de plantas. Desafortunadamente, los estudios relacionados con la inoculación de muchas de las especies comestibles ECM y su eficiencia en el crecimiento vegetal son incipientes. En el presente trabajo se estudió el efecto de la inoculación individual o combinada con púleos molidos de 3 especies de hongos comestibles ECM ampliamente consumidas en México, y por lo tanto cuya producción de inóculo resulta relativamente sencilla, sobre plantas de *Pinus greggii* y *Pinus pseudostrobus* en sustratos con características físicas y químicas distintas, esterilizados o no.

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1. Material biológico y preparación de inóculo

La semillas utilizadas de *P. greggii* y *P. pseudostrobus* proceden de áreas de su distribución natural en el estado de México. Previo a su siembra, las semillas fueron esterilizadas con H₂O₂ 30% por 20 minutos y lavadas con agua destilada estéril. Para seleccionar las especies de los hongos ECM comestibles a utilizarse, se efectuaron estudios preliminares en el Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan ubicado en el centro de México. Se evaluaron las especies comercializadas en mercados locales con mayor potencial de producción de inóculo ECM. Como consecuencia, se seleccionaron tres especies

pertenecientes a los géneros: *Hebeloma*, *Laccaria* y *Suillus* (principalmente *H. mesophaeum*, *L. bicolor* y *S. pseudobrevipes*). Los hongos utilizados fueron adquiridos en mercados locales (**Fig. 3.1 a-b**). En el caso de *Laccaria* y *Hebeloma* se utilizaron exclusivamente los píleos (**Fig. 3.1 c**), y en el caso de *Suillus* los himenios. Estas estructuras fueron deshidratadas a 36 °C como máximo, para mantener viabilidad de propágulos, molidas y pasadas a través de un tamiz de 1mm para homogeneización de tamaño de partícula. El inóculo así obtenido fue almacenado a 5 °C hasta su utilización.

3.4.2. Características físicas y químicas de los sustratos

Se recolectaron dos suelos con características físicas y químicas distintas: i) un suelo actualmente degradado donde existió bosque procedente de la localidad de San Sebastián, Texcoco y ii) un suelo forestal del Parque Nacional Zoquiapan. Dichos suelos fueron utilizados como sustratos en el experimento en invernadero. Las características físicas y químicas de los sustratos se muestran en el **Cuadro 3.1**.

3.4.3. Montaje del experimento

Los sustratos utilizados fueron esterilizados con vapor durante 4 hrs. La siembra se efectuó en tubetes de plástico negro de 140 cm³ que contenían una mezcla de aserrín-arena-suelo en proporción 2:2:1. Cada planta fue inoculada con al menos 10⁷ a 10⁸ esporas. Se efectuaron dos inoculaciones, con la finalidad de incrementar la probabilidad de colonización de las plantas. Una porción del inóculo ECM a utilizarse fue colocada en una cavidad que se hizo en la superficie de los sustratos contenidos en los tubetes, 30 días antes de la siembra. La otra porción del inóculo se incorporó 90 días después de la siembra. Para reducir las

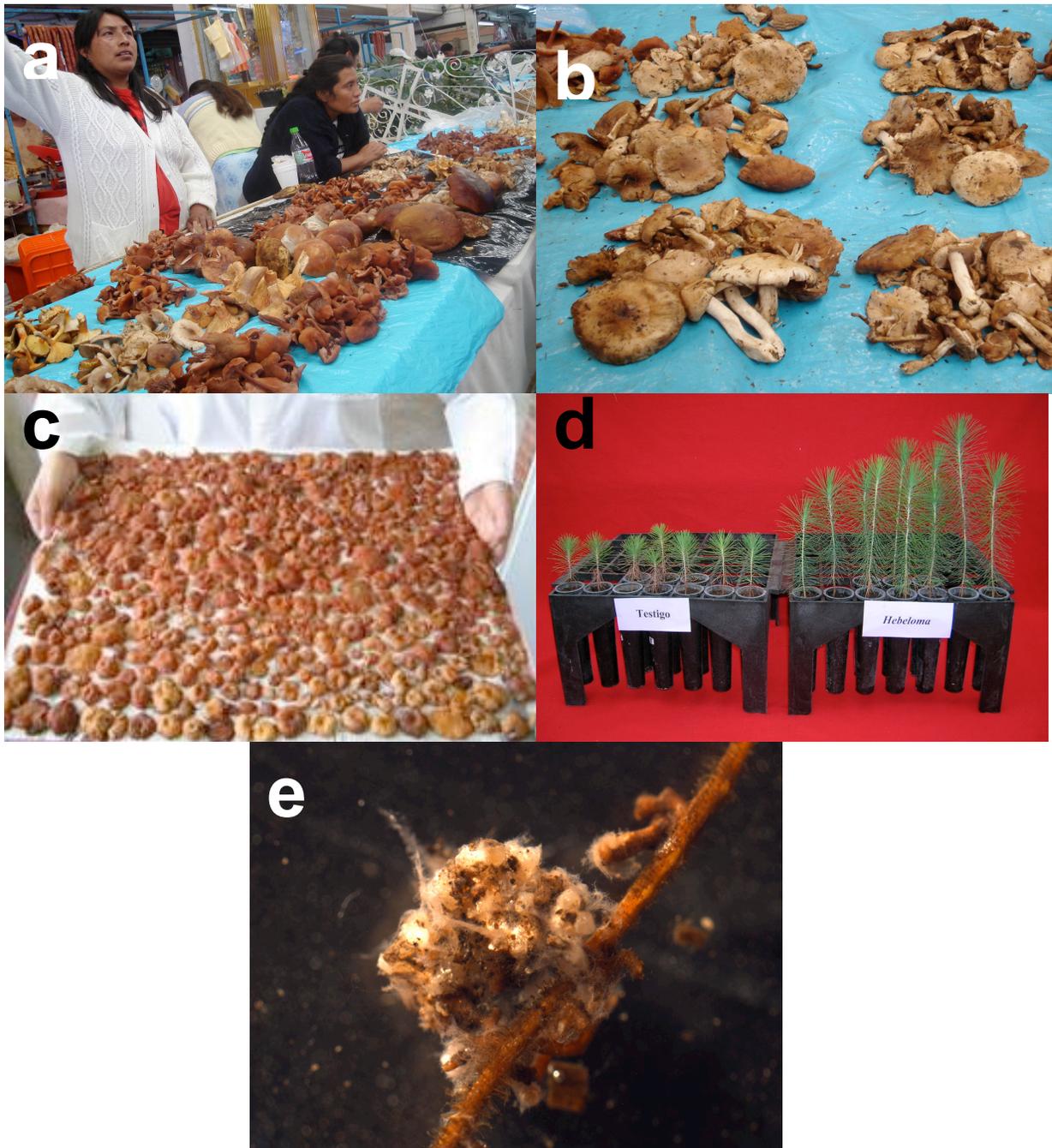


Figura 3.1. Especies de hongos ECM utilizadas en el experimento y respuesta en plantas inoculadas. **a** Comercialización de hongos silvestres comestibles en mercados mexicanos. **b** Venta de *Hebeloma mesophaeum*, especie considerada generalmente no comestible a nivel mundial. **c** Deshidratación de píleos de *Laccaria bicolor*. **d** Respuesta en crecimiento de *Pinus greggii* como efecto de la inoculación con *Hebeloma mesophaeum*. **e** morfotipo tuberculado observado en las raíces de plantas inoculadas con *Suillus pseudobrevipes*.

Cuadro 3.1. Características físicas y químicas de los sustratos usados en el experimento.

Característica	Unidad	Sustrato usado en invernadero	
		Mezcla más suelo de Zoquiapan ^a	Mezcla más suelo de San Sebastián ^a
Textura		Arena-francosa	Arena-francosa
Arena	%	83	85
Limo	%	8	8
Arcilla	%	9	7
pH		5.9	7.8
Materia orgánica	%	2.9	2.2
Conductividad Electrica 1:5 H ₂ O	dS m ⁻¹	0.06	0.14
Capacidad de Intercambio Cationico	meq/100g	9.1	6.2
Nitrógeno total	%	0.10	0.03
P Olsen	ppm	2	19
K intercambiable	Cmol Kg ⁻¹	0.1	1.3
Fe	ppm	19	10
Cu	ppm	0.4	0.7
Zn	ppm	1.2	2.2
Mn	ppm	35	13

probabilidades de contaminación se colocó tezontle estéril en la superficie de los tubetes. Las plantas fueron regadas con agua destilada durante 240 días. Al inicio del riego, se aplicó captan en dilución 2g/L de agua destilada.

3.4.4. Diseño experimental y análisis estadístico

Para cada especie de pino evaluada: *P. greggii* y *P. pseudostrobus* se utilizó una distribución completamente al azar y un diseño factorial 5 x 2 x 2. Se inóculo con los siguientes hongos: i) *Hebeloma* spp. (principalmente *H. mesophaeum*); ii) *Laccaria* spp. (principalmente *L. bicolor*); iii) *Suillus pseudobrevipes*, y iv) la combinación de los tres hongos. Adicionalmente se mantuvieron testigos sin inocular. Se utilizaron suelos

procedentes de dos localidades (San Sebastián y Zoquiapan) y cada uno de los dos tipos de suelo fue esterilizado o no de acuerdo a los tratamientos. Este diseño entonces tuvo 20 tratamientos para cada especie de pino y cada tratamiento tuvo 5 replicas. A los datos que se obtuvieron en las diferentes variables evaluadas se le realizaron análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) (SAS Institute 1999). En el caso de los valores de colonización micorrízica que se expresan como porcentajes, los datos se transformaron y se utilizaron sus arcosenos en los análisis de varianza.

3.4.5. Variables evaluadas

Se efectuaron mediciones periódicas de la altura y diámetro del tallo de cada planta a los 90, 180 y 240 días después de la siembra. 240 días después de siembra se evaluó el peso seco de la parte aérea y el radical. Las plantas fueron previamente secadas a 80 °C. Se evaluó el N total, P Olsen y K de la parte aérea y radical de cada planta, según Bremner (1965) y Olsen et al. (1954) respectivamente. Se evaluó el número de raíces cortas totales y el porcentaje de colonización ECM a todas las plantas. Se efectuó una caracterización morfológica de los morfotipos encontrados (Agerer 1991) para evaluar la presencia de los hongos inoculados. Se tomaron microfotografías de cada morfotipo observado.

3.5. Resultados

3.5.1. Altura y diámetro de las plantas

En el caso de *P. greggii*, noventa días después de la siembra no existió efecto de la inoculación, en términos de la altura de las plantas (**Fig. 3.2.**) y diámetro del tallo, independientemente del tipo de suelo y condición de esterilización. 180 días después de la

Fig. 3.2

la siembra se observaron diferencias en el diámetro del tallo y en la altura de plantas principalmente aquellas inoculadas con *Hebeloma* y con la mezcla HLS en relación a las plantas no inoculadas.

Al final del experimento, se observaron diferencias en la altura de las plantas como consecuencia de la inoculación y la condición de esterilización. Los efectos más evidentes fueron observados en el suelo de Zoquiapan sin esterilizar y en el suelo de San Sebastián estéril. En estos dos casos la inoculación con cualquiera de los hongos evaluados produjo mayores alturas de planta en comparación con la altura de plantas no inoculadas. Una tendencia similar se observó para el diámetro del tallo en donde los efectos más evidentes se presentaron en el suelo de Zoquiapan sin esterilizar (**Cuadro 3.2.**).

En el caso *P. pseudostrobus* (**Fig. 3.3.**) se observaron alturas similares a las inoculadas con *Hebeloma*. A diferencia de *P. greggii*, en *P. pseudostrobus*, al final del experimento, solo existieron diferencias en la altura de plantas inoculadas con *Hebeloma* en relación a las plantas testigo. En el caso de *P. pseudostrobus* no se observaron diferencias en los diámetros del tallo como efecto de la inoculación (**Cuadro 3.3.**).

3.5.2. Peso seco de la parte aérea y radical

La respuesta como resultado de la inoculación dependió del tipo de planta y de hongo ECM inoculado. En el caso de *P. greggii*, cuando se inóculo con *Hebeloma* se observó un mayor peso seco total ($p = 0.05$) independientemente del tipo de suelo y de condición o no de esterilidad. El mayor incremento en peso seco total se observó en el caso de suelo de Zoquiapan sin esterilizar. En este caso, las plantas de *P. greggii* inoculadas con *Hebeloma*

Cuadro 3.2. Peso seco, diámetro del tallo y altura de plantas de *Pinus greggii* inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos 240 días después de la siembra.

Variables	Testigo	Especies de hongos			HLS
		<i>Hebeloma</i>	<i>Laccaria</i>	<i>Suillus</i>	
Peso seco de parte aérea					
mg					
Zoquiapan					
- esterilización	173.4 d	787.0 a	609.0 a	396.2 c	567.0 bc
+ esterilización	210.4 d	817.4 a	449.0 a	495.6 bc	704.4 ab
San Sebastián					
- esterilización	442.2 b	896.4 a	657.0 ab	680.8 ab	786.4 ab
+ esterilización	433.8 b	582.6 b	655.2 ab	878.6 a	883.6 a
Peso seco radical					
Zoquiapan					
- esterilización	81.4 d	225.0 bc	228.0 b	134.0 cd	380.6 a
+ esterilización	155.0 a	198.2 a	160.8 a	208.2 a	214.4 a
San Sebastián					
- esterilización	268.4 a	327.4 a	330.2 a	341.4 a	286.0 a
+ esterilización	257.2 a	354.4 a	320.2 a	310.4 a	305.4 a
Peso seco total					
Zoquiapan					
- esterilización	254.8 c	1012.0 a	837.0 a	532.2 b	947.6 a
+ esterilización	365.4 d	1015.6 a	609.8 cd	703.8 bc	918.8 ab
San Sebastián					
- esterilización	710.6 b	1243.8 a	987.2 ab	1022.2 ab	1052 ab
+ esterilización	691.0 b	937.0 ab	975.4 ab	1189.0 a	1189.0 a
Diámetro del tallo					
mm					
Zoquiapan					
- esterilización	1.3 b	1.7 a	1.6 a	1.3 b	1.6 a
+ esterilización	1.4 a	1.6 a	1.5 a	1.5 a	1.6 a
San Sebastián					
- esterilización	1.3 a	1.7 a	1.3 a	1.5 a	1.5 a
+ esterilización	1.5 b	1.6 ab	1.6 ab	1.8 a	1.7 ab
Altura					
cm					
Zoquiapan					
- esterilización	6.3 d	12.4 a	9.4 bc	7.4 cd	9.7 b
+ esterilización	6.8 c	12.1 a	8.5 bc	9.0 bc	10.8 ab
San Sebastián					
- esterilización	9.6 a	13.1 a	9.6 a	10.9 a	11.7 a
+ esterilización	9.3 b	12.9 a	12.8 a	15.0 a	13.9 a

- esterilización = Suelo sin esterilizar; + esterilización = Suelo esterilizado. Valores en la misma línea con la misma letra son iguales según Tukey ($p = 0.05$). $n = 5$.

Fig. 3.3

Cuadro 3.3. Peso seco, diámetro del tallo y altura de plantas de *Pinus pseudostrobus* inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos 240 días después de la siembra.

Variables	Testigo	Especies de hongos			HLS
		<i>Hebeloma</i>	<i>Laccaria</i>	<i>Suillus</i>	
Peso seco de parte aérea		mg			
Zoquiapan					
- esterilización	248.2 b	430.4 ab	362.2 ab	249.0 ab	522.0 a
+ esterilización	168.4 b	643.0 a	194.2 b	320.6 b	284.0 b
San Sebastián					
- esterilización	384.2 a	581.6 a	669.2 a	492.6 a	551.8 a
+ esterilización	365.2 a	507.2 a	429.4 a	496.0 a	604.6 a
Peso seco radical					
Zoquiapan					
- esterilización	90.2 a	121.0 a	101.2 a	200.6 a	199.6 a
+ esterilización	72.6 b	232.8 a	68.0 b	138.0 b	97.2 b
San Sebastián					
- esterilización	195.6 a	212.0 a	285.2 a	224.4 a	319.8 a
+ esterilización	190.8 a	308.2 a	189.4 a	251.4 a	319.6 a
Peso seco total					
Zoquiapan					
- esterilización	338.4 b	551.4 ab	463.4 ab	549.6 ab	721.6 a
+ esterilización	241.0 b	875.8 a	262.2 b	458.6 b	381.2 b
San Sebastián					
- esterilización	579.8 a	793.6 a	954.4 a	717.0 a	871.6 a
+ esterilización	556.0 a	815.4 a	618.8 a	747.4 a	924.2 a
Diámetro del tallo		mm			
Zoquiapan					
- esterilización	1.6 a	1.8 a	1.8 a	1.7 a	1.9 a
+ esterilización	1.5 a	2.1 a	1.5 a	1.7 a	1.4 a
San Sebastián					
- esterilización	1.5 a	1.8 a	1.8 a	1.7 a	1.9 a
+ esterilización	1.9 a	1.7 a	1.5 a	1.6 a	1.7 a
Altura		cm			
Zoquiapan					
- esterilización	5.7 a	7.1 a	7.0 a	6.5 a	7.4 a
+ esterilización	4.5 b	9.4 a	5.4 b	6.5 ab	4.6 b
San Sebastián					
- esterilización	7.1 a	11.0 a	9.9 a	7.6 a	7.5 a
+ esterilización	7.5 a	9.6 a	6.7 a	10.4 a	8.5 a

- esterilización = Suelo sin esterilizar; + esterilización = Suelo esterilizado. Valores en la misma línea con la misma letra son iguales según Tukey ($p = 0.05$). $n = 5$.

produjeron 3.9 más peso seco total comparadas con las plantas no inoculadas (**Fig. 3.1. d**). En el caso de *P. pseudostrobis* solo se observaron diferencias en suelo de Zoquiapan que había sido esterilizado. Cuando *P. greggii* se inoculó con *Suillus*, en términos generales, se observó también un mayor peso seco total en comparación con las plantas no inoculadas. La inoculación con *Laccaria* en *P. greggii* solamente produjo mayor peso seco total en el suelo de Zoquiapan sin esterilizar. En el caso de *P. pseudostrobis* independientemente de la procedencia del suelo y la condición de esterilidad, la inoculación con *Laccaria* o *Suillus* no produjo efecto positivo, en términos de peso seco total, en relación a plantas no inoculadas.

La inoculación simultánea de *Hebeloma*, *Laccaria* y *Suillus*, en plantas de *P. greggii*, no originó un efecto sinérgico. Tampoco se observó un efecto de competencia entre las especies inoculadas. El peso seco total de *P. greggii* inoculada simultáneamente con *Hebeloma*, *Laccaria* y *Suillus* fue similar al de plantas inoculadas solo con *Hebeloma*, y siempre superior al de las plantas sin inoculación. En el caso de *P. pseudostrobis* la inoculación simultánea con *Hebeloma*, *Laccaria* y *Suillus* solamente produjo mayor biomasa en el suelo de Zoquiapan sin esterilizar.

3.5.3. Contenido nutrimental

El contenido total de N, P y K varió de 1.50 a 16.7, 0.12 a 1.58 y de 0.60 a 13.18 mg por planta, respectivamente de acuerdo a los hongos inoculados y los tipos de suelo. De manera similar que para el peso seco total y la altura, el contenido total de los tres nutrimentos fueron siempre superiores en la parte aérea y total de las plantas de *P. greggii* inoculadas

con hongos ECM que en las no inoculadas. Este fenómeno se observó independientemente de la especie de hongo inoculada y del tipo de suelo empleado (**Cuadro 3.4.**). En términos generales los mayores contrastes se observaron para los tres elementos entre las plantas inoculadas con *Hebeloma* y aquellas no inoculadas. En el caso de *P. pseudostrobis* solo se observaron diferencias entre el contenido total de N, P y K principalmente entre las plantas inoculadas simultáneamente con los tres hongos ECM, o con *Laccaria*, y las plantas no inoculadas (**Cuadro 3.5.**).

3.5.4. Colonización ectomicorrízica

Al final del experimento, en términos generales, la colonización micorrízica fue superior en las plantas inoculadas con hongos ectomicorrízicos comestibles comparados con plantas no inoculadas, tanto en *P. greggii* como en *P. pseudostrobis* (**Cuadro 3.6.**) independientemente del tipo de suelo y de la condición de esterilización. Los máximos porcentajes de colonización, 100%, se observaron en *P. pseudostrobis* inoculados con *Hebeloma* o *Suillus*. En el suelo de San Sebastián se observaron, en términos generales, mayor cantidad de raíces cortas totales comparadas con el suelo de Zoquiapan (11,372 vs 8,345) y (9,868 vs 3,793) n=50 para *P. greggii* y *P. pseudostrobis*, respectivamente (datos no mostrados). Los menores valores de raíces cortas totales fueron observados en el suelo de Zoquiapan. Los porcentajes de colonización por morfotipo de especie inoculada alcanzaron hasta 78% (**Cuadro 3.6.**), lo cual es un indicador de que las especies inoculadas se establecieron extensivamente en las raíces de los pinos evaluados (**Fig. 3.1.e**). En términos generales, la colonización ectomicorrízica por morfotipo de especie inoculada fue menor en *P. pseudostrobis* comparada con *P. greggii* (**Cuadro 3.6.**).

Cuadro 3.4. Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio de parte aérea, radical y total de plantas de *Pinus greggii* inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos 240 días después de la siembra.

Variables	Testigo	Especies de hongos			
		<i>Hebeloma</i>	<i>Laccaria</i>	<i>Suillus</i>	HLS
		N			
Zoquiapan					
Parte aérea	1.75 c	12.83 a	13.46 a	6.41 b	12.0 a
Parte radical	0.70 c	2.59 b	3.16 b	1.44 c	4.68 a
Total	2.45 c	15.41 a	16.62 a	7.85 b	16.7 a
San Sebastián					
Parte aérea	3.05 b	6.27 a	5.45 a	5.17 a	5.66 a
Parte radical	2.76 a	2.81 a	2.44 a	2.52 a	2.11 a
Total	5.81 b	9.08 a	7.89 a	7.70 a	7.78 a
		P			
Zoquiapan					
Parte aérea	0.086 d	0.62 a	0.48 b	0.24 c	0.34 c
Parte radical	0.07 c	0.22 b	0.22 b	0.12 c	0.30 a
Total	0.15 d	0.85 a	0.71 ab	0.36 c	0.64 b
San Sebastián					
Parte aérea	0.53 c	1.25 a	0.92 b	1.02 ab	1.10 ab
Parte radical	0.48 b	0.73 a	0.59 ab	0.27 c	0.48 b
Total	1.01 c	1.98 a	1.51 b	1.29 bc	1.58 b
		K			
Zoquiapan					
Parte aérea	0.93 c	8.02 a	7.79 a	3.33 b	7.50 a
Parte radical	0.39 c	2.11 ab	1.71 b	0.70 c	2.59 a
Total	1.33 c	10.14 a	9.50 a	4.03 b	10.12 a
San Sebastián					
Parte aérea	3.22 c	7.98 a	7.55 ab	5.85 b	6.99 ab
Parte radical	2.17 b	5.21 a	2.60 b	2.56 b	2.11 b
Total	5.40 c	13.18 a	10.16 b	8.41 b	9.11 b

Valores en la misma línea con la misma letra son iguales según Tukey ($p = 0.05$). $n = 5$.

Cuadro 3.5. Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio de parte aérea, radical y total de plantas de *Pinus pseudostrobus* inoculadas o no con hongos ectomicorrízicos 240 días después de la siembra.

Variables	Testigo	Especies de hongos			
		<i>Hebeloma</i>	<i>Laccaria</i>	<i>Suillus</i>	HLS
Zoquiapan		N			
Parte aérea	3.37 b	3.91 b	6.59 a	6.42 a	7.62 a
Parte radical	0.63 b	1.65 ab	1.44 ab	2.06ab	2.55 a
Total	4.0 c	5.57 bc	8.04 ab	8.48 ab	10.17 a
San Sebastián					
Parte aérea	2.65 b	5.35 ab	6.22 a	3.54 ab	4.08 ab
Parte radical	1.21 a	1.90 a	2.73 a	1.52 a	2.43 a
Total	3.86 b	7.26 ab	8.96 a	5.07 ab	6.51 ab
		P			
Zoquiapan					
Parte aérea	0.12 b	0.34 a	0.21 ab	0.21 ab	0.31 a
Parte radical	0.05 b	0.12 ab	0.10 ab	0.14 ab	0.20 a
Total	0.18 b	0.46 a	0.32 ab	0.35 ab	0.51 a
San Sebastián					
Parte aérea	0.38 b	0.93 ab	1.07 a	0.69 ab	0.88 ab
Parte radical	0.21 a	0.49 a	0.51 a	0.33 a	0.57 a
Total	0.59 b	1.42 ab	1.58 a	1.02 ab	1.46 ab
		K			
Zoquiapan					
Parte aérea	2.03 c	3.39 bc	3.87 ab	3.14 bc	5.22 a
Parte radical	0.68 a	1.06 a	0.60 a	0.96 a	1.11 a
Total	2.72 b	4.46 ab	4.48 ab	4.10 b	6.33 a
San Sebastián					
Parte aérea	2.11 b	5.11 ab	6.15 a	5.76 ab	8.16 a
Parte radical	1.66 a	1.99 a	2.25 a	1.41 a	2.27 a
Total	3.77 b	7.11 ab	8.41 ab	7.17 ab	10.43 a

Valores en la misma línea con la misma letra son iguales según Tukey ($p = 0.05$). $n = 5$.

Cuadro 3.6. Porcentajes de colonización ectomicorrízica total y por morfotipo de especies inoculadas en raíces de plantas de *Pinus greggii* y *Pinus pseudostrabus* 240 días después de la siembra.

Variables	Testigo	Especies de hongos			
		<i>Hebeloma</i>	<i>Laccaria</i>	<i>Suillus</i>	HLS
<i>Pinus greggii</i>					
Porcentaje total de colonización ectomicorrízica					
Zoquiapan					
- esterilización	16.8 b	70.9 a	55.8a	71.1a	87.5a
+ esterilización	23.9 a	6.9 a	21.2a	57.9a	29.2 a
San Sebastián					
- esterilización	11.2 b	77.0ab	65.0a	88.9a	56.5ab
+ esterilización	25.7 b	76.5 a	85.0a	86.7a	63.0 a
Porcentaje de colonización por morfotipo de especie inoculada					
Zoquiapan					
- esterilización	sei	47.4 a	44.6 a	63.4 a	66.4 a
+ esterilización	sei	4.6 a	15.2 a	39.4 a	17.8 a
San Sebastián					
- esterilización	sei	63.2 a	59.8 a	64.3 a	50.6 a
+ esterilización	sei	68.7 a	77.2 a	57.5 a	52.4 a
<i>Pinus pseudostrabus</i>					
Porcentaje total de colonización ectomicorrízica					
Zoquiapan					
- esterilización	11.8 a	70.9a	71.3a	80.0a	61.8 a
+ esterilización	16.3 a	82.1a	56.4a	80.9a	41.2 a
San Sebastián					
- esterilización	39.6 b	82.1a	94.6ab	94.5a	81.2ab
+ esterilización	19.7 b	100 a	84.1a	100a	68.1 a
Porcentaje de colonización por morfotipo de especie inoculada					
Zoquiapan					
- esterilización	sei	54.8 a	67.7 a	71.3 a	41.5 a
+ esterilización	sei	75.5 a	45.1 a	55.2 a	23.1 a
San Sebastián					
- esterilización	sei	45.1 a	72.1 a	56.6 a	48.3 a
+ esterilización	sei	70.5 a	78.9 a	73.4 a	47.2 a

- esterilización = Suelo sin esterilizar; + esterilización = Suelo esterilizado; sei = si especie inoculada; ^a cuando se inóculo con tres especies se muestran solo los datos del morfotipo de la especie dominante. Valores en la misma línea con la misma letra son iguales según Tukey (p = 0.05). n = 5.

3.5.6. Fructificaciones de *Hebeloma* en tubetes

Para una de las especies inoculadas, *Hebeloma mesophaeum* se observaron fructificaciones en tubetes después de la inoculación con píleos molidos. Los primordios de dicha especie aparecieron 12 meses después de la inoculación. En las fructificaciones en tubetes se han observado las estructuras distintivas del género *Hebeloma*: cuerpos fructíferos agaricoides, láminas y esporada café claro, y presencia de un velo interno que inicialmente cubrían las laminas. Adicionalmente, la caracterización micromorfológica de esporas y basidios ha confirmado la identificación de la especie. El peso seco de las fructificaciones fue de alrededor del 2% del peso seco de las plantas asociadas.

3.6 Discusión

Previamente, se han documentado incrementos en la biomasa vegetal como resultado de la inoculación con algunos de los géneros de hongos ECM estudiados en el presente trabajo. Por ejemplo, Sudhakara-Reddy and Natarajan (1997) reportaron incrementos de 218% y 182% en el peso seco de la parte aérea y radical, respectivamente como resultado de la inoculación con *Laccaria laccata* en relación a plantas no inoculadas de *Pinus patula*, doce meses después de la inoculación en suelo esterilizado. Diversas investigaciones han reportado que la inoculación simultánea de distintos de hongos ECM puede producir mayor incremento en biomasa en las plantas inoculadas que la inoculación individual (Parladé and Álvarez 1993; Sudhakara-Reddy and Natarajan 1997). Sudhakara-Reddy and Natarajan (1997) inocularon simultáneamente *Laccaria laccata* y *Telephora terrestris* en *Pinus patula*. Dichos autores encontraron un efecto sinérgico en el peso seco de la parte área

como resultado de la inoculación simultánea con dichas especies. Sin embargo, en nuestro caso la inoculación simultánea con las tres especies ECM estudiadas no produjo un efecto sinérgico, a pesar de que se mantuvo, en términos generales un efecto benéfico. Un fenómeno similar ha sido encontrado por otros autores como Chu-Chou and Grace (1985). Estos autores inocularon *Laccaria laccata*, *Rhizopogon luteolus* y *R. rubescens* individualmente o de manera combinada en *Pinus radiata*. A pesar de que existió un efecto en crecimiento en las plantas inoculadas con cualquiera de las especies ECM cuando fueron aplicadas de manera individual en relación a las plantas no inoculadas, no existió un efecto sinérgico al efectuar una inoculación con las tres especies ECM simultáneamente. La inoculación con cualquiera de los hongos ECM estudiados produjo una mayor biomasa total de las plantas de pino. Estos incrementos en crecimiento variaron de 109% a 397% dependiendo de las especies vegetales y fúngicas involucradas.

En nuestro caso se observó que, en términos generales, en los primeros dos meses la inoculación con los hongos ECM redujo el crecimiento de las plantas inoculadas en comparación a las plantas no inoculadas (datos no mostrados) y posteriormente se observaron paulatinamente los efectos benéficos reportados al final del experimento, los cuales fueron más evidentes a partir del sexto mes. Previamente, Sudhakara-Reddy and Natarajan (1997) al inocular *Pinus patula* con *Laccaria laccata* encontraron que los efectos benéficos, en términos de peso seco de parte aérea y radical, solo fueron evidentes a partir del octavo mes después de la inoculación. Este fenómeno probablemente puede ser explicado en términos del alto costo inicial que requiere el establecimiento de la simbiosis ECM para la planta, en términos del C fijado. Se ha reportado que el costo de la simbiosis ECM puede constituir de 7 a 30% del C fijado por las plantas (Finlay and Söderström 1992;

Ek 1997; Bidartondo et al. 2001). En un inicio este puede ser considerado un alto costo para las plantas, sin embargo, debido a que una vez establecidas las redes miceliales existe la posibilidad de traslocación substancial de N y P (Pérez-Moreno and Read 2000, 2001 a y b), la simbiosis ECM en términos generales es considerada mutualista (Read and Pérez-Moreno, 2003).

Al momento de la cosecha, no existieron conspicuas diferencias entre las plantas crecidas en el sustrato esterilizado comparadas con aquellas crecidas en sustrato sin esterilizar. Sin embargo, diez meses después de la inoculación (datos no mostrados) un juego de plantas paralelas dejadas en invernadero mostraron diferencias entre ambos tipos de sustratos, observándose un mayor crecimiento en las plantas crecidas en sustrato esterilizado. Sudhakara-Reddy and Natarajan (1997) comparando resultados de suelo esterilizado y no esterilizado, encontraron que el número total de ectomicorrizas y peso de las plantas de *Pinus patula* inoculadas con *Laccaria laccata* y *Thelephora terrestris* fue superior en suelo esterilizado que en suelo no esterilizado, lo cual puede ser explicado por la falta de competencia con microorganismos nativos del suelo. Guerin-Laguette et al. (2003) reportaron que la altura y peso seco de *Pinus sylvestris* inoculadas con el hongo ECM *L. deliciosus*, produjeron mayor peso seco y altura cuando crecieron en sustrato esterilizado comparadas con aquellas plantas crecidas en sustrato no estéril.

Diversos autores han reportado que la inoculación con hongos ECM origina incremento en la concentración o contenido total de nutrimentos de árboles y arbustos templados y tropicales, principalmente N y P (Turjaman et al. 2006; Nara 2005; Tibbett and Sanders 2002; Baxter and Dighton 2001). Bâ et al. (1999) y Diédhiou et al. (2005) reportaron que la inoculación de plantas de *Azelia africana*, *Anthonotha macrophylla*,

Paramacrolobium coeruleum y *Uapaca somon* con *Scleroderma*, *Pisolithus* y un aislamiento “theleporoid” produjo incrementos en la concentración foliar de K en relación a plantas no inoculadas. De manera similar, Bandou et al. (2006) encontraron concentraciones de K más elevadas en plantas de *Coccoloba uvifera* L. inoculadas con *Scleroderma bermudense* en comparación con las plantas testigo. En nuestro caso, se observó que los altos niveles de colonización ECM de las especies inoculadas estuvieron relacionadas, en términos generales, con incrementos en las concentraciones de N, P y K en *P. greggii* pero no en *P. pseudostrobus*. Bâ et al. (1999) encontraron que los altos niveles de colonización ECM no están correlacionados positivamente con un incremento en las concentraciones de N, P y K en plantas de *Azelia africana*.

Debido a nuestro método de preparación de inoculante ECM, existe la posibilidad de que las respuestas diferenciales que observamos en el desarrollo de las plantas inoculadas de *P. greggii* y *P. pseudostrobus* podrían estar originadas no exclusivamente como respuesta a la inoculación con hongos ECM sino también como consecuencia a las asociaciones que las especies fúngicas pudieran establecer con otros microorganismos como, por ejemplo, bacterias fijadoras de nitrógeno. Se han reportado bacterias fijadoras de N asociadas con las ECM tuberculadas de *Rhizopogon vinicolor* y *Suillus tomentosus* (Li et al. 1992; Paul et al. 2007). Adicionalmente, Paul et al. (2007) encontraron que las ECM tuberculadas de *Suillus tomentosus* en las raíces de *Pinus contorta* son un importante sitio de actividad de la nitrogenasa y que dicha actividad esta afectada por la época y la edad del rodal. El estudio de las interacciones entre hongos ECM y bacterias fijadoras de N y su influencia en el crecimiento vegetal sería a futuro una interesante área de estudio.

En nuestro caso, utilizamos especies que pertenecen a estadios iniciales tempranos: *Laccaria*, *Hebeloma* y *Suillus* (Mason et al. 1983). Usually early or intermediate stage ECM species (as opposed to late-stage species) require only small amounts of carbon from their hosts and low concentrations of nitrogen and phosphorous (Gibson and Deacon 1990; Bergemann and Miller 2002). Estas especies usualmente producen incrementos en biomasa vegetal en invernadero o vivero probablemente por su preferencia de utilización de fuentes minerales de N y P (Jonson et al. 2001; Rincón et al. 2001; Sudhakara-Reddy and Natarajan 1997; Chu-Chou and Grace 1985).

Hebeloma mesophaeum es capaz de colonizar plantas de abedul creciendo sobre paredes de ladrillos (Trocha et al. 2007). En general, *H. mesophaeum* ha sido considerada como una especie ECM asociada con estadíos tempranos de vegetación. Debido a la alta tolerancia a condiciones extremas, como esta, dicha especie podría ser ampliamente utilizada para la inoculación de plantas en vivero. En general, las especies del genero *Hebeloma* son clasificadas como especies pioneras, con baja especificidad con planta hospedera, corta fase vegetativa y altas tasas de dispersión, presentes en plantaciones forestales jóvenes con bajo contenido de humus y hábitats degradados (Iwanski et al. 2006).

En términos generales la inoculación con los hongos ECM estudiados originó colonizaciones relativamente altas en las especies de pino evaluadas. Por ejemplo, *Hebeloma* colonizó, dependiendo del tipo de suelo, hasta 68 % y 75% de las raíces cortas de *P. greggii* y *P. pseudostrobus*, respectivamente. Las colonizaciones por *Laccaria bicolor* fueron ligeramente superiores ya que dicha especie colonizó, en nuestro caso, hasta 77% y 78% de las raíces cortas de *P. greggii* y *P. pseudostrobus*. Colonizaciones más altas han sido reportadas por otros autores, por ejemplo, Jonson et al. (2001) registraron

colonizaciones de 55 a 78% y de 95 a 99% en *Pinus sylvestris* inoculados con *Hebeloma crustiliniforme* y *Laccaria bicolor*, respectivamente. Rincón et al. (2001) reportaron colonizaciones superiores a 80% al inocular plantas de *Pinus pinea* con *H. crustiliniforme*. Otros autores han reportado colonizaciones menores a las observadas en nuestro caso, por ejemplo, Sudhakara- Reddy and Natarajan (1997) encontraron colonizaciones de alrededor de 60% al inocular *Pinus patula* con *Laccaria lacata* y Rincón et al. (2001) observaron colonizaciones de 11 al 40% al inocular *Pinus pinea* con *Laccaria lacata*. Trocha et al. (2007) reportan que *H. mesophaeum* coloniza del 18 al 22% de las raíces de *Betula pendula* creciendo en paredes de ladrillo.

La fructificación de los hongos ECM en condiciones “*in vitro*” o de vivero es un fenómeno que se ha observado sólo para algunas especies fúngicas. En lo que respecta a la fructificación del género *Hebeloma*, Debaud and Gay (1987) reportaron la fructificación de *Hebeloma cylindrosporum* en asociación con plantas jóvenes de *Pinus pinaster* en condiciones “*in vitro*” y Ohta (1998) y Kanaeko and Sagara (2004) reportaron la producción de fructificaciones de *H. radicosum* y *Hebeloma* sp. en cultivo puro. También se han observado fructificaciones en condiciones “*in vitro*” o en invernadero de otros hongos ECM: *Laccaria bicolor* (Godbout and Fortín 1992); *Lyophyllum shimeji* (Ohta 1994); *Tuber melanosporum* (Hall et al. 2003); *Cantharellus cibarius* (Danell 1999); *Rhizopogon rubescens*, *Tricholoma flavovirens*, *Lactarius akahatsu* (Yamada et al. 2001) y *Boletus* sp. (Ohta and Fujiwara 2003). Sudhakara-Reddy and Natarajan (1997) reportaron la aparición de cuerpos fructíferos de *Thelephora terrestris* y *Laccaria lacata* 7 y 10 meses después de la inoculación de plantas de *Pinus patula* crecidas en vivero en suelos esterilizados o no. Guerin-Laguette et al. (2003) obtuvieron primordios de *Lactarius*

deliciosus un año después de la inoculación de plantas de *Pinus sylvestris* crecidas en bolsas y trasplantadas a contenedores.

Las especies del género *Hebeloma* son consideradas usualmente tóxicas o no comestibles a nivel mundial (Lincoff 1984). Tradicionalmente se ha considerado que originan síntomas gastrointestinales tales como náuseas y vómito, por ejemplo, *H. crustuliniforme* es conocida como “Poison pie”. Se han aislado incluso las micotoxinas de diversas especies del género como *Hebeloma vinosophyllum* y *H. spoliatum* (Fujimoto et al. 1986; 1992). Sin embargo, en este estudio se utilizó una especie ECM, *H. mesopheum* que es ampliamente utilizada como alimento humano en la parte central de México. Hasta donde conocemos, este es uno de los pocos registros que se tienen de consumo masivo de especies del género *Hebeloma* a nivel mundial. Adicionalmente es importante recalcar que la mejor respuesta de crecimiento en las dos especies de pinos estudiados fue observada con la inoculación con esta especie, por lo que *H. mesopheum* podría tener un gran potencial de aplicación práctica en vivero en México por su eficiencia para incrementar crecimiento vegetal, carácter de comestibilidad y facilidad de producir inóculo al poder ser adquirida en grandes cantidades en mercados locales. En nuestro experimento se obtuvieron también respuestas de crecimiento, principalmente en *P. greggii* como consecuencia de la inoculación con *Laccaria bicolor* y *Suillus pseudobrevipes*. Estas dos especies, principalmente *Laccaria bicolor* son comercializadas en grandes cantidades en mercados locales mexicanos y podría tener, como *Hebeloma*, un gran potencial para inocular pinos mexicanos. En caso de utilizarse grandes cantidades de hongos comestibles en la producción de inóculos ECM en México, se originaría un ingreso económico adicional para

los recolectores pertenecientes a grupos étnicos nativos, los cuales usualmente tienen muy escasos ingresos económicos. A pesar de que la respuesta de crecimiento vegetal a la inoculación con hongos ECM es de cierta importancia debido a que se pueden reducir costos de producción de planta al disminuir los tiempos de estancia en vivero, sería también altamente deseable evaluar la supervivencia de las plantas inoculadas así como la permanencia en campo de los hongos ECM evaluados. México constituye un centro de diversidad de especies de árboles ECM, por ejemplo el país posee el mayor número de especies y endemismo de *Pinus* y *Quercus* en el mundo, con 72 y 161 taxa y especies respectivamente (Perry 1991; Valencia 2004). Sin embargo, una gran cantidad de estos taxa no han sido estudiados desde el punto de vista de sus asociaciones simbióticas ECM. En el presente estudio se observó que la respuesta vegetal varió dependiendo de la especie de pino evaluada, por lo que debido a la gran diversidad de pinos existentes en México, sería también altamente deseable el desarrollo estudios con otras de pinos mexicanos de importancia forestal. Hasta donde conocemos, ésta es la primera ocasión en la que se evalúa el efecto de la inoculación de hongos ECM en las dos especies de pinos estudiadas *P. greggii* y *P. pseudostrobus*.

3.7. Conclusiones

Las plantas de pino inoculadas con cualquiera de las tres especies de hongos ECM evaluadas, solas o en combinación, tuvieron mayor biomasa comparadas con plantas no inoculadas. El contenido de N, P y K total fue siempre superior en las plantas inoculadas con hongos ECM que en las no inoculadas. Los altos porcentajes de colonización por morfotipo de especie de hongo inoculado obtenidos son un indicador de que las especies

inoculadas se establecieron extensivamente en las raíces de los pinos evaluados. La utilización de púlsos molidos de los hongos ECM estudiados constituye una fuente de inóculo eficiente para incrementar el crecimiento de pinos. Dado que las 3 especies de hongos estudiados son objeto de comercialización masiva en mercados mexicanos constituyen una importante fuente potencial de inóculo ECM para ser utilizado en viveros mexicanos.

3.8. Literatura citada

- Agerer R (1991) Characterization of ectomycorrhiza. *Methods Microbiol* 23: 25-73
- Bâ AM, Sanon KB, Duponnois R, Dexheimer J (1999) Growth response of *Afzelia africana* Sm. seedlings to ectomycorrhizal inoculation in a nutrient-deficient soil. *Mycorrhiza* 9: 91-95
- Bandou E, Lebailly F, Muller F, Dulormne M, Toribio A, Chabrol J, Courtecuisse R, Plenchette C, Prin Y, Duponnois R, Thiao M, Sylla S, Dreyfus B, Bâ AM (2006) The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt stress in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. *Mycorrhiza* 16: 559-565
- Baxter JW, Dighton J (2001) Ectomycorrhizal diversity alters growth and nutrient acquisition of grey birch (*Betula populifolia*) seedlings in host-symbiont culture conditions. *New Phyt* 152: 139-149
- Bergemann SE, Miller SL (2002) Size, distribution, and persistence of genets in local populations of the late-stage ectomycorrhizal basidiomycete, *Russula brevipes*. *New Phyt* 156: 313-320
- Bidartondo MI, Ek H, Wallander H, Söderström B (2001) Do nutrient additions alter carbon sink strength of ectomycorrhizal fungi? *New Phyt* 151: 543-550
- Bremner JM (1965) Total nitrogen. In: Black CA (ed) *Methods of soil analysis Part 2, Agronomy* 9. American society of agronomy, Madison WI, pp 1149-1178
- Bruns TD, Bidartondo MI, Taylor DL (2002) Host specificity in ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us? *Int Comp Biol* 42: 352-359

Castellano MA, Molina R (1989) Mycorrhizae. In: Landis TD, Tinus RW, McDonald SE, Barnett JP (eds) The container tree nursery manual, vol 5. Agric Handbook 674. USDA Forest Service, Washington DC, pp 101-167

Chu-Chou M, Grace LJ (1985) Comparative efficiency of the mycorrhizal fungi *Laccaria laccata*, *Hebeloma crustuliniforme* and *Rhizopogon* species on growth of radiate pine seedlings. New Zealand J Bot 23: 417-424

Danell E (1999) *Cantharellus*. In: Cairney JW, Chamber SM (eds) Ectomycorrhizal fungi.- Key genera and profile. Springer, New York, pp 253-268

Debaud CD, Gay G (1987) *In vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. New Phyt 105: 429-435

Diédhiou AG, Guèye O, Diabaté M, Prin Y, Duponnois R, Dreyfus B, Bâ AM (2005) Contrasting responses to ectomycorrhizal inoculation in seedlings of six tropical african tree species. Mycorrhiza 16: 11-17

Ek H (1997) The influence of nitrogen fertilization on the carbon economy of *Paxillus involutus* in ectomycorrhizal association with *Betula pendula*. New Phyt 135: 133-142

Finlay RD, Söderström B (1992) Mycorrhiza and carbon flow to the soil. In: Alen MF (ed) Mycorrhizal functioning. Chapman and Hall, London, pp 134-160

Fujimoto H, Suzuki K, Hagiwara H, Yamazaki M (1986) New toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma vinosophylum*. I. Structures of hevevinosides I,II,III, IV and V. Chem Pharm Bull 34: 88-99

Fujimoto H, Takano Y, Yamazaki M (1992) Isolation, identification and pharmacological studies on three toxic metabolites from a mushroom, *Hebeloma spoliatum*. Chem Pharm Bull 40: 869-872

Gibson F, Deacon JW (1990) Establishment of ectomycorrhizas in aseptic culture: Effects of glucose, nitrogen and phosphorus in relation to successions. Mycol Res 94: 166-172

Godbout C, Fortín JA (1992) Effects of nitrogen fertilization and photoperiod on basidiome formation of *Laccaria bicolor* associated with container-grown jack pine seedlings. Can J Bot 70: 181-185

Guerin-Laguette A, Confeti S, Ruiz G, Plassard C, Mousain D (2003) The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of a rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. Mycorrhiza 13: 17-25

Hall IR, Stephenson SL, Buchanan PK, Wang Y, Cole AL (2003) Edible and poisonous mushrooms of the world. Crop and Food Research, Christchurch New Zealand

Iwanski M, Rudawska M, Leski T (2006) Mycorrhizal associations of nursery grown Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings in Poland. Ann For Sc 63: 715-723

Jonsson LM, Nilsson DA, Zachrisson O (2001) Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. Oikos 93: 353-364

Kanaeko A, Sagara N (2004) Responses of *Hebeloma radicosum* fruit-bodies to light gravity: negatively gravitropic and nonphototropic growth. Mycoscience 43: 7-13

Li CY, Massicotte HB, Moore LVH (1992) Nitrogen fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. Plant Soil 140: 35-40

Lincoff GH (1984) The Audubon Society Field guide to North American mushrooms. Alfred Knopf Inc, New York

Mason PA, Wilson J, Last FT (1983) The concept of succession in relation to spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils. Plant Soil 71: 247-256

Nara K (2006) Ectomycorrhizal networks and seedlings establishment during early primary succession. New Phyt 169: 169-178

Ohta A (1998) Fruit-body production of two ectomycorrhizal fungi in the genus *Hebeloma* in pure culture. Mycoscience 39:15-19

Ohta A (1994) Production of fruit-bodies of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*, in pure culture. Mycoscience 39: 15-19

Ohta A, Fujiwara N (2003) Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture. Mycoscience 44: 295-300

Olsen SR, Cole CV, Cantable FS, Dean LA (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate, circular 939. US Department of Agriculture, Washington, DC

Parladé J, Álvarez IF (1993) Coinoculation of aseptically grown Douglas fir with pairs of ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 3: 93-96

Parladé J, Pera J, Luque J (2004) Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. Mycorrhiza 14: 171-176

Paul LR, Chapman BK, Chanway CP (2007) Nitrogen fixation associated with *Suillus tomentosus* tuberculate ectomycorrhizae on *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Ann Bot* 1-9

Pérez-Moreno J, Read DJ (2004) Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247

Pérez-Moreno J, Read DJ (2000) Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plant. *New Phyt* 145: 301-309

Pérez-Moreno J, Read DJ (2001a) Exploitation of pollen by mycorrhizal mycelial systems with special reference to nutrient recycling in boreal forests. *Proc Roy Soc London* 268: 1329-1335

Pérez-Moreno J, Read DJ (2001b) Nutrient transfer from soil nematodes to plants: A direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. *Plant Cell Environ* 24: 1219-1226

Perry JP (1991) *The pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland Oregon

Read DJ, Pérez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phyt* 157: 475-492

Rincón A, Álvarez IF, Pera J (2001) Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11: 265 – 271

SAS Institute (1999) *SAS User's Guide*, ver. 8.0. SAS Institute Inc., Cary, NC

Smith SE, Read DJ (1997) *Mycorrhizal symbiosis*. Second edition. Academic Press, London

Sudhakara-Reddy M, Natarajan K (1997) Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza* 7: 133-138

Tibbett M, Sanders FE (2002) Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Ann Bot* 89: 783-789

Trocha LK, Oleksyn J, Turzanska E, Rudawska M, Reich PB (2007) Living on the edge: Ecology of an incipient *Betula*-fungal community growing on brick walls. *Trees* 21: 239-247

Turjaman M, Tamai Y, Segah H, Limin SH, Osaka M, Tawaraya K (2006) Increase in early growth and nutrient uptake of *Zorrea seminis* seedlings inoculated with two ectomycorrhizal fungi. *J Trop For Sc* 18: 243-249

Valencia S (2004) Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. Bol Soc Bot Méx 75: 33-53

Villareal L, Pérez-Moreno J (1989) Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. Micol Neotrop Apl 2: 77-114

Wang Y, Hall IR (2004) Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. Can J Bot 82: 1063-1073

Yamada A, Ogura T, Ohmasa M (2001) Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. Mycorrhiza 11: 59-66.

Capítulo 4

Conclusiones generales y consideraciones finales

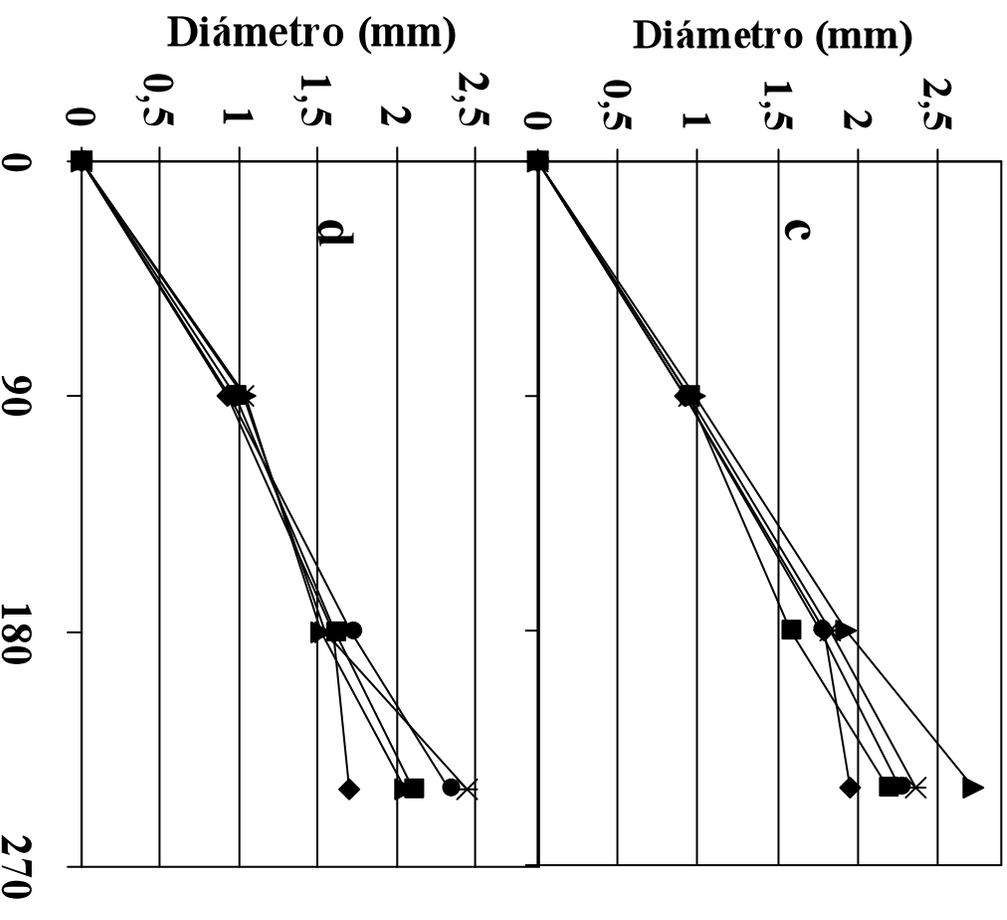
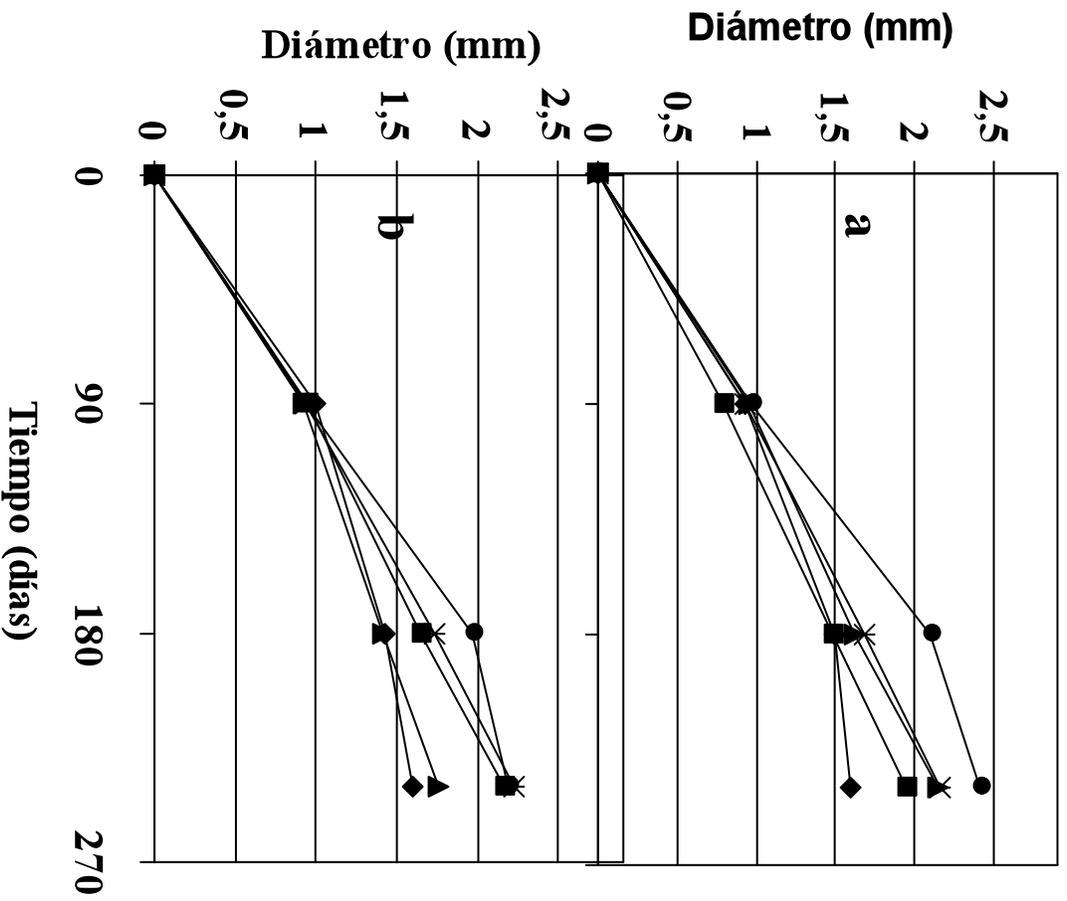
- Un importante criterio de selección considerado en este estudio, para la producción de inoculantes a partir de especies ECM fue la capacidad de las especies fúngicas para adaptarse y sobrevivir a las condiciones ambientales adversas presentes en áreas degradadas, y que adicionalmente posean el carácter de comestibilidad. Para lo cual es necesario conocer la diversidad de hongos, así como las especies asociadas a las raíces de los pinos, que prosperan en las áreas donde será llevada a cabo la reforestación. De esta forma se tendrá un mayor éxito en el establecimiento y sobrevivencia de las plantaciones de recuperación.
- El reestablecimiento de las comunidades fúngicas puede tener también un impacto positivo en la economía local, puesto que la venta de hongos, representa un importante ingreso para muchas de las familias que viven en el área de influencia de los bosques.
- En cuanto a las especies evaluadas bajo condiciones de invernadero, en este estudio, sería altamente deseable realizar estudios que prueben su efectividad y respuesta en campo.

Anexo 1. Descripción de los tratamientos del experimento de invernadero reportado en el capítulo 3.

Tratamiento	Especie forestal	Suelo	Hongo ectomicorrízico
1	<i>P. greggii</i>	Z E(+)	<i>Laccaria</i>
2	<i>P. greggii</i>	Z E(+)	<i>Hebeloma</i>
3	<i>P. greggii</i>	Z E(+)	<i>Suillus</i>
4	<i>P. greggii</i>	Z E(+)	<i>Laccaria, Hebeloma, Suillus</i>
5	<i>P. greggii</i>	Z E(+)	Ninguno
6	<i>P. greggii</i>	Z E(-)	<i>Laccaria</i>
7	<i>P. greggii</i>	Z E(-)	<i>Hebeloma</i>
8	<i>P. greggii</i>	Z E(-)	<i>Suillus</i>
9	<i>P. greggii</i>	Z E(-)	<i>Laccaria, Hebeloma, Suillus</i>
10	<i>P. greggii</i>	Z E(-)	Ninguno
11	<i>P. greggii</i>	SS E(+)	<i>Laccaria</i>
12	<i>P. greggii</i>	SS E(+)	<i>Hebeloma</i>
13	<i>P. greggii</i>	SS E(+)	<i>Suillus</i>
14	<i>P. greggii</i>	SS E(+)	<i>Laccaria, Hebeloma, Suillus</i>
15	<i>P. greggii</i>	SS E(+)	Ninguno
16	<i>P. greggii</i>	SS E(-)	<i>Laccaria</i>
17	<i>P. greggii</i>	SS E(-)	<i>Hebeloma</i>
18	<i>P. greggii</i>	SS E(-)	<i>Suillus</i>
19	<i>P. greggii</i>	SS E(-)	<i>Laccaria, Hebeloma, Suillus</i>
20	<i>P. greggii</i>	SS E(-)	Ninguno
21	<i>P.pseudostrobus</i>	Z E(+)	<i>Laccaria</i>
22	<i>P.pseudostrobus</i>	Z E(+)	<i>Hebeloma</i>
23	<i>P.pseudostrobus</i>	Z E(+)	<i>Suillus</i>
24	<i>P.pseudostrobus</i>	Z E(+)	<i>Laccaria, Hebeloma, Suillus</i>
25	<i>P.pseudostrobus</i>	Z E(+)	Ninguno
26	<i>P.pseudostrobus</i>	Z E(-)	<i>Laccaria</i>
27	<i>P.pseudostrobus</i>	Z E(-)	<i>Hebeloma</i>
28	<i>P.pseudostrobus</i>	Z E(-)	<i>Suillus</i>
29	<i>P.pseudostrobus</i>	Z E(-)	<i>Laccaria, Hebeloma, Suillus</i>
30	<i>P.pseudostrobus</i>	Z E(-)	Ninguno
31	<i>P.pseudostrobus</i>	SS E(+)	<i>Laccaria</i>
32	<i>P.pseudostrobus</i>	SS E(+)	<i>Hebeloma</i>
33	<i>P.pseudostrobus</i>	SS E(+)	<i>Suillus</i>
34	<i>P.pseudostrobus</i>	SS E(+)	<i>Laccaria, Hebeloma, Suillus</i>
35	<i>P.pseudostrobus</i>	SS E(+)	Ninguno
36	<i>P.pseudostrobus</i>	SS E(-)	<i>Laccaria</i>
37	<i>P.pseudostrobus</i>	SS E(-)	<i>Hebeloma</i>
38	<i>P.pseudostrobus</i>	SS E(-)	<i>Suillus</i>
39	<i>P.pseudostrobus</i>	SS E(-)	<i>Laccaria, Hebeloma, Suillus</i>
40	<i>P.pseudostrobus</i>	SS E(-)	Ninguno

Procedencia de los suelos: Z= Zoquiapan SS= San Sebastián; E(+)= esterilizado E(-)= no esterilizado

Anexo 2. Cambios secuenciales en el diámetro de los tallos de *Pinus greggii* inoculadas o no con hongos ectomicorrizicos, en el periodo de 90, 180 y 240 días después de la siembra crecidas en diferentes suelos. T: testigo, H: *Hebeloma* spp., L: *Laccaria* spp., S: *Suillus pseudobrevipes*, a: suelo San Sebastian sin esterilizar, b: suelo Zoquiapan sin esterilizar, c: suelo San Sebastian esteril, d: suelo Zoquiapan esteril



◆ T ● H ■ L ▲ S * HLS

◆ T ● H ■ L ▲ S * HLS

Anexo 3 . Cambios secuenciales en el diámetro de los tallos de *Pinus pseudostrabus* inoculadas o no con hongos ectomicorízicos, en el periodo de 90, 180 y 240 días después de la siembra crecidas en diferentes suelos. T: testigo, H: *Hebeloma* spp., L: *Laccaria* spp., S: *Suillus pseudobrevipes*, a: suelo San Sebastian sin esterilizar, b: suelo Zoquiapan sin esterilizar, c: suelo

