



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

BIOPROSPECCIÓN, IMPORTANCIA BIOCULTURAL Y BIOTECNOLOGÍA DE HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES DE PIEDRA CANTEADA, NANACAMILPA, TLAXCALA

ORALIA FUENTES GARCÍA

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

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2023



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Bioprospección, importancia biocultural y biotecnología de hongos silvestres comestibles de Piedra Canteada, Nanacamilpa, Tlaxcala**, realizada por la estudiante: Oralia Fuentes García 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

CONSEJERA

DRA. IRMA DÍAZ AGUILAR

ASESOR

DR. JESÚS PÉREZ MORENO

ASESORA

DRA. MAGDALENA MARTÍNEZ REYES

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México marzo de 2023

Esta tesis formó parte del **Proyecto CONACyT-PRONACES FOP07-2021-03 316198**, al cual se agradece su apoyo.



**BIOPROSPECCIÓN, IMPORTANCIA BIOCULTURAL Y BIOTECNOLOGÍA DE
HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES DE PIEDRA CANTEADA,
NANACAMILPA, TLAXCALA**

**Oralia Fuentes García, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2023**

RESUMEN

Los bosques albergan una gran diversidad biológica, incluyendo a los hongos, los cuales contribuyen a la mitigación del cambio climático, captura y almacenamiento del agua, alimento y medicina; entre otros. Por otro lado, la ectomicorriza es una simbiosis mutualista obligada para los árboles forestales, esta asociación es fundamental en los bosques, pues mejora el crecimiento y la calidad fisiológica de los árboles asociados. El presente estudio se compone de dos capítulos, en el Capítulo I se propone una nueva especie de hongo perteneciente al género *Xerocomellus* basada en análisis filogenéticos de secuencias de ADN denominada *Xerocomellus piedracanteadensis*; además se reporta por primera vez el registro de *X. bolinii* en nuestro país, así como su comestibilidad. Ambas especies son comestibles en Piedra Canteada, Nanacamilpa, Tlaxcala del Centro de México. El Capítulo II describe el efecto de la inoculación del hongo silvestre comestible ectomicorrízico *Laccaria squarrosa* en *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae* y su efecto en el crecimiento, peso seco, contenido nutrimental y colonización de estas especies forestales; como resultado de la inoculación ectomicorrízica, existió un efecto benéfico en todas las variables evaluadas, con un porcentaje de colonización micorrízica mayor al 90%. Este conocimiento generado es de gran interés, con enorme importancia ecológica y gran potencial biotecnológico del recurso micológico asociado.

Palabras clave: Boletaceae, reforestación, comestible, morfotipos, caracterización.

**BIOPROSPECTING, BIOCULTURAL IMPORTANCE AND BIOTECHNOLOGY
OF EDIBLE WILD MUSHROOMS FROM PIEDRA CANTEADA,
NANACAMILPA, TLAXCALA**

**Oralia Fuentes García, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2023**

ABSTRACT

Forests harbour a great biological diversity, including fungi, which contribute to the mitigation of climate change, capture and storage of water, food and medicine; among others. On the other hand, ectomycorrhiza is an obligate mutualistic symbiosis for forest trees. This association is of paramount importance in the structure and functioning of forest ecosystems, since it improves the growth and physiological quality of associated trees. The present study consists of two chapters, in Chapter I, a new species of fungus belonging to the genus *Xerocomellus* is proposed based on phylogenetic analysis of DNA sequences called *Xerocomellus piedracanteadensis*; In addition, the record of *X. bolinii* in our country is reported for the first time, as well as its edibility. Both species are edible in Piedra Canteada, Nanacamilpa, Tlaxcala, Central Mexico. Chapter II describes the effect of inoculating with the wild edible ectomycorrhizal fungus *Laccaria squarrosa* on *Pinus pseudostrobus* and *Pinus montezumae* and its effect on growth, dry weight, nutrient content and colonization of these forest species. As a result of the ectomycorrhizal inoculation, there was a beneficial effect in all the evaluated variables, with a percentage of mycorrhizal colonization greater than 90%. The generated knowledge is of great interest, because it shows the enormous ecological importance and biotechnological potential of the mycological resource in forest maintenance.

Key words: Boletaceae, reforestation, edible, morphotypes, characterization.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por toda la fortaleza que me ha dado a lo largo de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante los estudios de maestría.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, en especial al posgrado de Edafología, Área de Microbiología de Suelos, al laboratorio de micorrizas dirigido por el Doctor Jesús Pérez Moreno y al laboratorio de la Doctora Irma Díaz Aguilar, a cada uno de los académicos que lo conforman, gracias por las enseñanzas recibidas que contribuyen a la formación profesional.

A ustedes mis más queridos maestros: Doctora Irma Díaz Aguilar, Doctor Jesús Pérez Moreno, Doctora Magdalena Martínez Reyes, Doctora Cristina Arteaga León y Doctora Olivia Ayala Vásquez, mis más sinceros agradecimientos por compartir su amplio conocimiento, por la confianza depositada en mí, por sus sabias palabras en todo momento, su apoyo es fundamental para la consolidación de metas.

Al Doctor Jesús Pérez Moreno, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, le agradezco de todo corazón porque siempre me recibió con gran entusiasmo y cariño, por creer en mis capacidades académicas, por darme la oportunidad de conocer un mundo diferente conformado por los hermosos y deliciosos hongos.

A la Doctora Magdalena Martínez Reyes, por confiar en mí (enseñándome que no hay obstáculo suficiente que pueda impedir un sueño) y encaminarme a la investigación científica, gracias por compartir su conocimiento y apoyo incondicional.

A la Doctora Irma Diaz Aguilar, por la paciencia y apoyo brindado en cada momento, por sus sabias palabras y por enseñarme un mundo diferente y fantástico con la mesofauna, es una excelente persona.

Al Doctor Marco Polo Carballo Sánchez le agradezco el enorme apoyo en el riego de mi experimento en la huelga de Colegio.

A la Doctora Olivia Ayala Vásquez, mis más sinceros agradecimientos por todo el apoyo brindado durante mi investigación y redacción del artículo, gracias al apoyo financiero de CONACyT, Id proyecto:3129307.

Agradezco la confianza y apoyo otorgado en todo momento al Ingeniero Aurelio Hernández López, Técnico forestal de Piedra Canteada donde realice mi investigación.

Un agradecimiento especial al Doctor Faustino Hernández Santiago por las enseñanzas que me compartió en el mundo mágico de la ciencia.

Agradezco profundamente a los comuneros del santuario de luciérnagas de Piedra Canteada por permitirnos realizar la investigación en su propiedad, y por facilitar el muestreo de hongos y a la maestra Anaitzi Carrera-Martínez por la captura de algunas de las fotografías utilizadas en esta investigación, muchas gracias maestra.

A la familia Martínez Reyes, mi más sincero agradecimiento por todas esas sabias palabras y consejos que han depositado en mí, llegar y ser acogida con ustedes me ha permitido tener la confianza de saber qué hay personas con las que puedo confiar en momentos en los que no está la familia, ustedes que dan amor a alumnos que poco a poco nos ganamos el cariño de personas tan divinas, su impulso me ha llevado a seguir adelante, esa mano que nunca me ha soltado les agradezco infinitamente.

Qué sería la vida sin esos amigos tan queridos que también se han convertido en familia a lo largo de estos años mi querida Ani, Ivette, Prude, Karla,

Sonia, Patsy, Marye, Sory, Ana Caro y a mis estimados amigos: Armando, Esteban, Alfonso, Juan Carlos, Uzzi, José Luis, don Joaquín, todos ustedes están en mi corazón y soy bendecida por compartir sueños y ver metas realizadas, regocija mi corazón.

También agradezco el conocer a personas tan sabías; me ha permitido tomar sentido a la vida, don Ascensión, don Cheyo, don David, don Sixto, el ahora tesorero de la Piedra Canteada, Juan José, y todas las personas que me acompañaron y me compartieron el conocimiento y amor por los hongos, les agradezco por caminar a mi lado y unirse al sueño de una persona que los aprecia. Les agradezco a todos ustedes con toda mi alma el haber llegado a mi vida y el compartir momentos agradables y momentos tristes, pero esos momentos son los que nos hacen crecer y valorar a las personas que nos rodean. Los quiero mucho y nunca los olvidaré.

Lo único que es más perfecto que lo perfecto, es aquello que se recupera después del quiebre.

DEDICATORIA

Una persona importante que adoro con todo el corazón y respeto por todo el amor que nos comparte y la forma de vivir es mi querida abuelita Natalia Santiago Pedro, soy afortunada de tener a mi padre Jesús Fuentes Cruz y a mi madre Delfina García Santiago, dos pilares fundamentales que han sabido forjar valores en mi persona, me han acompañado a lo largo de mis sueños, agradezco a mi padre por siempre impulsarme a conseguir mis objetivos, sabiendo que todo tiene cierta dificultad pero que con perseverancia, disciplina, trabajo diario, confianza y amor, todo es posible.

Para mis hermanos Abel, Cristina y Rosario agradezco el apoyo y las palabras sabias que han compartido conmigo, a cada uno de ustedes y a sus familias las aprecio y tengo en el corazón.

Para mi tía Esther, mi tío Onésimo y mi primo Carlos personas que me acompañaron y apoyaron en etapas difíciles, nunca me han dejado sola.

Agradezco la compañía de mi querida prima María Luisa, me has dado la fuerza y el impulso para lograr mis objetivos, todas tus palabras tan sabias y tu forma de enfrentar las tribulaciones, me dan fuerza para caminar cada día al lado de tu hermosa y cariñosa hija Melisa que ha llenado de amor y felicidad mi corazón y es el impulso en los días de cansancio. Mis Ángeles queridos que desde el cielo nos cuidan, los amo y siempre estarán en mi corazón Edel y Matías, agradezco las palabras sabias y momentos llenos de felicidad.

Doctora Magdalena mi corazón la tendrá siempre en un lugar muy especial se ha convertido en mi maestra y madre académica, es una persona increíble, gracias por todo el apoyo recibido, cada palabra, abrazo e impulso me han llevado a no caerme y a valorar lo que tengo, para una persona que ha sido fuerte y ha superado pruebas de la vida.

Para la maestra Patricia, por las vivencias y experiencias que nos hicieron coincidir, la aprecio mucho.

A la maestra Maricela, es una mujer extraordinaria, la respeto y la admiro, gracias por abrirme las puertas de su casa y las puertas de su corazón, le agradezco toda la ayuda brindada.

A doña Cata, todos los consejos que me ha dado y el amor recibido es reflejo del maravilloso ser humano que es, gracias por todos los momentos compartidos, siempre la tendré en el corazón.

Con enorme cariño para la enfermera Herminia, que siempre estuvo apoyándome y cuidando mi salud.

Agradezco el amor, la paciencia, la fortaleza y las ganas de salir adelante, eres una mujer única, a ti Oralia Fuentes García, te agradezco el no rendirte y concluir tus metas.

Todos ustedes siéntanse orgullosos pues este trabajo lleva un pedacito de su corazón, mi más sincero agradecimiento.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	ix
LISTAS DE CUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	6
Objetivo general	6
Objetivos específicos.....	6
Hipótesis	7
CHAPTER I. <i>Xerocomellus piedracanteadensis</i>: A NEW EDIBLE SPECIES AND FIRST RECORD OF <i>X. bolinii</i> (BOLETACEAE, BOLETALES) FROM MEXICO	8
1.1 RESUMEN	8
1.2 ABSTRACT	9
1.3 INTRODUCTION	10
1.4 MATERIALS AND METHODS	12
1.4.1 Field work.....	12
1.4.2 DNA extraction, amplification, and sequencing	12
1.4.3 Phylogenetic analyses	13
1.5 RESULTS	18
1.5.1 Taxonomy.....	18
1.5.2 <i>Xerocomellus bolinii</i>	21
1.6 DISCUSSION	22
1.7 CONCLUSION.....	23
CAPÍTULO II. CRECIMIENTO Y CONTENIDO NUTRIMENTAL EN <i>Pinus pseudostrobus</i> Y <i>Pinus montezumae</i> CON EL HONGO COMESTIBLE ECTOMICORRÍZICO <i>Laccaria squarrosa</i>	27

2.1 RESUMEN	27
2.2 ABSTRACT	28
2.3 INTRODUCCIÓN.....	29
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.4.1 Material vegetal e inóculo.....	35
2.4.2. Establecimiento del experimento.....	36
2.4.3 Siembra e inoculación.....	38
2.4.4 Diseño experimental	39
2.4.5 Variables evaluadas	40
2.4.6 Análisis estadístico de variables	43
2.5 RESULTADOS	44
2.5.1 Biomasa seca y crecimiento vegetal.....	44
2.5.2 Contenido nutrimental.....	47
2.5.3 Colonización micorrízica y caracterización macro y micro morfológica de los morfotipos.....	52
2.6 DISCUSIÓN.....	56
2.6.1 Crecimiento vegetal.....	56
2.6.2 Análisis nutrimental	56
2.6.3 Colonización ectomicorrízica	58
2.7 CONCLUSIONES	61
CONCLUSIONES GENERALES	62
LITERATURA CITADA	63

LISTAS DE CUADROS

Table 1.1. List of species, geographic location and GenBank accession numbers of ITS, LSU, RPB1 and TEF1 sequences used in the molecular analysis	15
Cuadro 2.1. Altura, diámetro y peso seco de la parte aérea, radical y total de plantas de <i>Pinus pseudostrobus</i> y <i>Pinus montezumae</i> inoculadas o no con <i>Laccaria squarrosa</i> , 22 meses después de la siembra.....	44
Cuadro 2.2. Contenido de macronutrientes de la parte aérea, radical y total de plantas de <i>Pinus pseudostrobus</i> y <i>Pinus montezumae</i> inoculadas o no con <i>Laccaria squarrosa</i> , 22 meses después de la siembra.....	48
Cuadro 2.3. Contenido de micronutrientes de la parte aérea, radical y total de plantas de <i>Pinus pseudostrobus</i> y <i>Pinus montezumae</i> inoculadas o no inoculadas, con <i>Laccaria squarrosa</i> , 22 meses después de la siembra.....	50
Cuadro 2.4. Porcentaje de colonización micorrízica y promedio de raíces cortas vivas y muertas micorrizadas y no micorrizadas en plantas de <i>Pinus pseudostrobus</i> y <i>Pinus montezumae</i> inoculadas o no, con <i>Laccaria squarrosa</i> , 22 meses después de la siembra.....	53

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1.2.** *Xerocomellus piedracanteadensis* (Holotype); A) Habitat of the type specimen showing a pine-oak mixed forest; B) pileus surface; C) crossed-section of type specimen; D) basidiomata; E) pseudosclerotia (yellow arrows) nearby the stipe base; F) basidiospores; G) pleurocystidia; H) cheilocystidia; I) Caulocystidia and caulobasidia; J-K) pileipellis. Scale bars: B-E: 10mm. F-K:10 μ m. 25
- Figure 1.3.** *Xerocomellus bolinii* (MEXU 30430); A) Vegetation type where some specimens were sampled, showing a mixed forest; B) basidioma in its natural habitat; C) cross-section of basidioma; D) basidiospores; E) basidia and pleurocystidia; F-G)-cheilocystidia; H) Caulobasidia; I-J) pileipellis. scale bars B-C:10mm, D-J: 10 μ m. 26
- Figura 2.1.** Material vegetal y micológico: a) Árbol de *Pinus pseudostrobus* en bosque natural; b) Planta de *Pinus montezumae* en estadio juvenil; c) Esporoma de *Laccaria squarrosa* en estadio maduro; d) Cuerpos fructíferos en diferentes estadios de *L. squarrosa*. 36
- Figura 2.2.** Preparación de inóculo ectomicorrízico de *Laccaria squarrosa*. a) Esporomas de *L. squarrosa* en bosque de pino-encino; b) Fotografía taxonómica del cuerpo fructífero de *L. squarrosa* en campo; c) Píleos de *L. squarrosa* con las esporas en los himenios; d) Preparación de inóculo en proporción 1:1 de agua destilada estéril y píleos de la especie de hongo. 37
- Figura 2.3.** Inoculación de *Laccaria squarrosa* en *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae*. a) Siembra e inoculación del hongo comestible ectomicorrízico *L. squarrosa*; b) Medida del inóculo a utilizar por tubete o contenedor; c) Segunda inoculación en plantas de *P. pseudostrobus* y; d) En plantas de *P. montezumae*. 39

Figura 2.4. Análisis nutrimental de las plantas ectomicorrizadas: a) Biomasa aérea y radical de <i>Pinus pseudostrobus</i> ; b) Muestra enviada a laboratorio (Fertilab) para análisis nutrimental.	41
Figura 2.5. Conteo de raíces cortas de las plantas de pino inoculadas con el hongo ectomicorrízico <i>Laccaria squarrosa</i> en el microscopio estereoscópico Leica.	42
Figura 2.6. a) Altura de plantas de <i>Pinus pseudostrobus</i> no inoculadas (Ppsni), plantas de <i>P. pseudostrobus</i> inoculadas con <i>Laccaria squarrosa</i> (Pps+Lsq), plantas de <i>Pinus montezumae</i> no inoculadas (Pmni), plantas de <i>P. montezumae</i> inoculadas con <i>L. squarrosa</i> (Pm+Lsq); b) Diámetro de plantas de <i>Pinus pseudostrobus</i> no inoculadas (Ppsni), plantas de <i>P. pseudostrobus</i> inoculadas con <i>Laccaria squarrosa</i> (Pps+Lsq), plantas de <i>Pinus montezumae</i> no inoculadas (Pmni), plantas de <i>P. montezumae</i> inoculadas con <i>L. squarrosa</i> (Pm+Lsq).	45
Figura 2.7. a) Crecimiento de la parte aérea de <i>Pinus pseudostrobus</i> inoculadas con <i>Laccaria squarrosa</i> (Pps+Lsq) y plantas de <i>Pinus pseudostrobus</i> no inoculadas (Ppsni); b) Crecimiento de la parte aérea de <i>Pinus montezumae</i> inoculadas con <i>Laccaria squarrosa</i> (Pm+Lsq) y plantas de <i>Pinus montezumae</i> no inoculadas (Pmni).	46
Figura 2.8 a) Diferencia de biomasa aérea y radical de <i>Pinus pseudostrobus</i> inoculadas con <i>Laccaria squarrosa</i> (Pps+Lsq) y plantas no inoculadas (Pni); b) Diferencia de biomasa aérea y radical de <i>P. montezumae</i> en su estadio cespitoso con abundante biomasa aérea (Pm+Ls) en comparación con las plantas sin inocular (Pni). ...	51
Figura 2.9. Porcentaje de colonización de <i>Pinus montezumae</i> (Pm+Lsq) y <i>Pinus pseudostrobus</i> (Pps+Lsq) inoculadas con <i>Laccaria squarrosa</i> comparado con (Pmni) Plantas <i>P. montezumae</i> no inoculadas y (Ppsni) Plantas <i>P. pseudostrobus</i> no inoculadas 22 meses después de la siembra. Valores promedio \pm desviación estándar n=3.	52

Figura 2.10. Raíces cortas ectomicorrizadas de *Pinus pseudostrobus*. a y b) Raíces cortas micorrizadas de *Laccaria squarrosa* vista a 0.63X; c) Morfotipo maduro de coloración ocre a café oscuro visto a 3.2X; d) Corte histológico transversal de raíz colonizada presentando estructuras diagnóstico como red de Hartig (rH) y manto (M) vista a 40X; e) Morfotipo en estadio juvenil de *L. squarrosa* con coloración ocre y en el ápice color blanquecino vista a 1.60X; f) Raíces cortas de una planta sin inocular con presencia de pelos radicales, vista a 0.63X. 54

Figura 2.11. Ectomicorrizas de *Pinus montezumae* (Pm) inoculadas con *Laccaria squarrosa* (Lsq). a y b) Micorrizas de Lsq con Pm, aun con presencia de pelos radicales, vista a 1.25X y 1.6X, respectivamente; c) Morfotipo en estadio juvenil de Lsq, vista a 1.25X; d y f) Morfotipos maduros, visto a 1.6X y 2.25X, respectivamente) Corte transversal de la ectomicorriza con las estructuras diagnóstico: red de Harti (rH) y micelio externo (Me) vista a 40X. 55

INTRODUCCIÓN GENERAL

Boletaceae es la familia más abundante de los Boletales. Actualmente existen seis subfamilias: Austroboletoidae, Chalciporoideae, Leccinoideae, Xerocomoideae, Zangioideae y Boletoidae, donde se incluye *Xerocomellus*, teniendo como género hermano *Hortiboletus Simonini* (Wu *et al.*, 2016).

Los hongos pertenecientes a la familia Boletaceae Chevallier (Basidiomycota, Agaricomycetes, Boletales) representan un grupo importante de hongos ectomicorrízicos distribuidos en regiones templadas, tropicales y subtropicales, asociados a plantas leñosas (Saldivar *et al.*, 2021). Un estudio realizado menciona que al sintetizar nanopartículas de plata utilizando extractos de *Xerocomellus chrysenteron* obtuvieron propiedades antimicrobianas, tratar infecciones, actividad anticancerígena en cáncer de colon (Ozgur *et al.*, 2021).

Los Boletaceae son una familia de los hongos carnosos más grandes de los Boletales de gran importancia tanto en ecología como en economía (Wu *et al.*, 2016). A pesar de esta extensa historia de trabajo en Boletaceae en América del Norte se describen continuamente nuevas especies y géneros. Los análisis filogenéticos moleculares multigénicos de cinco loci se cambiaron con estudios morfológicos exhaustivos para investigar la taxonomía de varios boletos del suroeste de Estados Unidos. Describiendo cuatro nuevas especies: *Aeroboletus pseudoauriporus*, *Cyanoboletus bessettei*, *Hemileccinum floridanum* y *Xerocomellus bolinii* (Farid *et al.*, 2021).

La comprensión de la diversidad en el género *Xerocomellus* en el oeste de América del Norte se ha visto oscurecida por la variabilidad morfológica, el uso generalizado de epítetos de especies tipificados por especímenes de Europa y el este de América del Norte, relaciones filogenéticas mal entendidas y complejos de especies (Frank *et al.*, 2020).

Šutara (2008) estableció *Xerocomellus* para acomodar a *X. chrysenteron* y sus parientes, a menudo denominados "boletes de tapa agrietada" debido a su

tendencia a desarrollar superficies de píleo areolado. Mientras que las especies de *Xerocomellus* de América del Norte sigue sin estar clara. Esto se debe en parte al uso de nombres europeos para las colecciones de América del Norte, la falta de conceptos sólidos de especies, un alto grado de variabilidad morfológica y conjuntos de rasgos superpuestos en los basidiomas de las especies de este género (Frank *et al.*, 2020).

La necesidad de aclarar los boletes de *Xerocomellus* del oeste de América del Norte se ha vuelto cada vez más aguda. En el momento de este estudio, las secuencias de ADN que representan una sola especie se han depositado en GenBank con hasta cuatro epítetos de especies diferentes, lo que hace que sea casi imposible para los investigadores identificar colecciones, muestras ambientales y micorrizas en función de los códigos de barras ITS. El epíteto específico “chrysenteron” ha sido el nombre mal aplicado con mayor frecuencia y, a menudo, ha servido como el nombre predeterminado para cualquier *Xerocomellus* con un píleo areolado; el epíteto específico “truncatus” se ha aplicado incorrectamente en el oeste de América del Norte a aquellos basidiomas con tinción rápida y profundamente coloreada en los poros o con esporas truncadas, mientras que el epíteto específico “zelleri” se ha aplicado a la mayoría de los *Xerocomellus* que exhiben un color púrpura rojizo oscuro a púrpura no areolado y superficie del píleo negro (Frank *et al.*, 2020).

La definición de los límites genéricos de *Xerocomus* y particularmente la delimitación de este género de *Boletus* es muy confusa y controvertida. Durante su estudio de las especies europeas de Boletaceae, el autor ha llegado a la conclusión de que *Xerocomus* en un concepto amplio es una mezcla heterogénea de varios grupos de especies (Šutara, 2008).

En México se han registrado dos especies con base únicamente en caracteres morfológicos: *Xerocomellus truncatus*, Klofac distribuidas principalmente en el Eje Neovolcánico Transversal y la Sierra Madre del Sur, asociadas principalmente a *Abies* (Ayala-Vásquez, 2021; Saldivar *et al.*, 2021) y

X. dryophilus (Thiers) N. Siegel, descritos de Baja California en el noroeste del país asociado con *Quercus agrifolia* (Ayala-Sánchez *et al.*, 2015). Una tercera especie también ha sido mencionada en listas micológicas, erróneamente denominada *X. chrysenteron*. Sin embargo, Frank *et al.* (2020) han demostrado en su análisis filogenético que *X. chrysenteron* no se distribuye en América del Norte.

Xerocomellus es un género de la familia Boletaceae, caracterizado por los idiomas pequeños a medianos, boletoides a gasteroides, generalmente con pileo areolado y basidiosporas lisas a ornamentadas. Hasta el momento solo se conocen tres especies en México (Garza-Ocaña *et al.*, 2022).

En exploraciones recientes en bosques mixtos de coníferas y bosques de *Pinus-Quercus* en el centro de México, *X. piedracanteadensis* fue colectada como una nueva especie con importancia bicultural debido a que es consumida por algunas personas locales de San Felipe Hidalgo, además, dos de los coautores corroboraron la comestibilidad. Además, *Xerocomellus bolinii* se reporta por primera vez para México y se amplía el rango de distribución, la especie solo se describe de Florida, USA a una altitud de 40 m (Farid *et al.*, 2021), en México se distribuye de 2785 a 3200 m. Se presentan estudios moleculares con cuatro genes que sustentan la nueva especie y el nuevo registro.

Por otro lado, algunos hongos forman ectomicorrizas, una simbiosis con las raíces de unas 5000 especies de plantas, incluidas principalmente gimnospermas y angiospermas, y más de 20,000 especies de hongos, principalmente ascomicetos y basidiomicetos. (Pérez-Moreno y Read, 2004; García *et al.*, 2006; Smith y Read, 2008). Su importancia en el área forestal es enorme, ya que en los suelos naturales todas las especies forestales forman esta asociación, la cual proporciona diversos beneficios a las plantas y a los árboles adultos al facilitarles la adquisición de agua y nutrientes, proporciona protección a la planta contra patógenos y mayor tolerancia a condiciones de estrés por efecto de trasplante, sequía, altas temperaturas y metales pesados, por tanto,

las plantas dependen de forma obligada de esta asociación para crecer y sobrevivir; lo que se evidencia por la baja supervivencia de plantas no micorrizadas cuando son trasplantadas a campo, sobre todo en aquellos ambientes con condiciones edáficas adversas como temperatura y acidez extrema, con carencias de nutrientes o erosionados, (Smith y Read, 2008; Rudawska *et al.*, 2018; Stuart y Plett, 2020).

En la naturaleza generalmente las comunidades vegetales y fúngicas están inmersas en un proceso constante de competencia o sinergismo y por ello el acceso a los nutrientes es de gran importancia en este tipo de ambientes, una forma de obtención más eficiente es mediante la asociación ectomicorrízica entre la planta y el hongo en la cual uno de sus beneficios es la asimilación y absorción de nutrientes en la planta, además de transferir aquellos de baja movilidad como N, P, Mg, K, Ca, S, Fe, Cu, Bo y Mn del suelo a través de las hifas y micelio del hongo que exploran un gran volumen de suelo no accesible a las raíces y que permiten la translocación de nutrientes a grandes distancias hasta la región de intercambio en la micorriza (red de Hartig) ubicada en la interfaz entre las células corticales de la raíz y las hifas fúngicas, así como también movilizarlos de la raíz hacia la parte aérea (Ashford y Allaway, 2002; Makarov, 2019)

Los hongos ectomicorrízicos colonizan las raíces de sus huéspedes y mejoran su acceso a los nutrientes, generalmente nitrógeno (N) y, a cambio, los árboles entregan una porción significativa, en algunos casos hasta un 75% de su carbono fotosintético (C) a los hongos, (Stuart y Plett, 2020). A través de su acceso al N orgánico, los hongos ectomicorrízicos compiten con los microbios del suelo de vida libre: se cree que esta competencia realiza la descomposición de materia orgánica (Tatsumi *et al.*, 2020).

Esta simbiosis en la que los nutrientes (fósforo y otros) se intercambian con las plantas hospedantes por carbono (azúcar y lípidos) y todas sus complejidades fisiológicas, bioquímicas, moleculares y ultraestructurales, ha

llamado la atención de investigadores y explica el aumento de experimentos de las interacciones entre plantas y hongos (Powell y Rillig, 2019).

La adecuada selección de las especies de hongos micorrízicos como simbioses y su posterior manipulación, son aspectos claves para lograr con éxito el establecimiento de muchas especies vegetales en campo. La micorrización controlada en vivero y su efecto en los procesos de reforestación en distintos países y condiciones ecológicas han sido estudiados y revisados cada vez más y hoy en día no existe ninguna duda de que los hongos ectomicorrízicos son un componente esencial en los ecosistemas forestales para un óptimo desarrollo de las especies (Pilz y Molina, 2002; Perea *et al.*, 2009; Barroetaveña *et al.*, 2012).

Hasta el momento no se tienen reportes de la simbiosis ectomicorrízica en invernadero entre *Pinus pseudostrobus* y *P. montezume* asociados con el hongo silvestre comestible ectomicorrízico *Laccaria squarrosa*, por lo que la presente investigación se realizó con la finalidad de contribuir al conocimiento biotecnológico, la importancia biocultural y la bioprospección de tres especies de hongos silvestres comestibles del predio forestal de Piedra Canteada, municipio de Nanacamilpa, Tlaxcala.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Contribuir a la generación del conocimiento en la descripción y caracterización de una nueva especie para México y al desarrollo biotecnológico de la especie comestible ectomicorrízica silvestre *Laccaria squarrosa* asociada a *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae*.

Objetivos específicos

Caracterizar las estructuras macro y micromorfológicas de ejemplares de *Xerocomellus piedracanteadensis*, para su registro e identificación como nueva especie en México.

Caracterizar y describir los ejemplares de *X. piedracanteadensis* sp. nov. de manera integrativa, con datos morfológicos, moleculares y filogenéticos.

Caracterizar y describir los ejemplares de *Xerocomellus bolinii* de manera integrativa, con datos morfológicos, moleculares y filogenéticos.

Evaluar el efecto de la inoculación ectomicorrízica en términos de crecimiento (producción de biomasa, altura y diámetro del tallo), contenidos nutrimentales y colonización de la especie comestible *L. squarrosa* asociadas con las especies nativas de la región de Piedra Canteada, Tlaxcala, *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*.

Evaluar el contenido nutrimental (macro y micronutrientes) en plantas de *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* inoculadas con *L. squarrosa*.

Caracterizar las estructuras diagnósticas de las ectomicorrizas formadas entre *L. squarrosa* con *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*.

Hipótesis

X. piedracanteadensis constituye una nueva especie con base en sus características macro, micromorfológicas y moleculares comparada con otras especies cercanas pertenecientes al género *Xerocomellus*.

Las relaciones filogenéticas entre *X. piedracanteadensis*, con base en el análisis de secuencias de ADN de dos genes basados en ITS y LSU confirman que es una nueva especie, al ser comparada molecularmente con otras especies pertenecientes al género *Xerocomellus sensu stricto*.

La inoculación con especies ectomicorrízicas de *L. squarrosa* nativas del área de estudio origina efectos benéficos en términos de crecimiento, transferencia de nutrientes y calidad fisiológica de la planta en *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*.

Existe mayor contenido nutrimental en plantas de *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* inoculadas con *L. squarrosa*, en contraste con las plantas no inoculadas.

**CHAPTER I. *Xerocomellus piedracanteadensis*: A NEW EDIBLE SPECIES
AND FIRST RECORD OF *X. bolinii* (BOLETACEAE, BOLETALES) FROM
MEXICO**

1.1 RESUMEN

Una nueva especie de *Xerocomellus* basada en análisis fenéticos y filogenéticos de secuencias de ADN de múltiples locus. *Xerocomellus piedracanteadensis* forma un linaje independiente de otras especies del género y se caracteriza por basidiomas de tamaño mediano, superficie pilosa seca, tomentosa a rivulosa o areolada con pulpa blanquecina teñida de amarillo pálido a rojo pálido, con basidiosporas que van desde (8 –) 10 –14 (– 15) × (3)–5 μm , pileipellis formado por un tricodermo 300 micras de espesor, con células terminales 13–55 × (8–)10–23 μm, cilíndrica, ovoide, subglobosa a mamilada con ápice redondeado o agudo, con incrustaciones gruesas en los elementos inferiores, pared de aspecto anillado, marrón oscuro. Además, un segundo registro de *Xerocomellus bolinii*, anteriormente solo conocido de Florida, USA, se presenta y se reporta por primera vez su comestibilidad. Ambas especies descritas en este trabajo son comestibles en Piedra Canteada, Nanacamilpa, Tlaxcala en el Centro de México. Se presentan fotografías y una descripción detallada de la nueva especie y el nuevo registro junto con sus relaciones filogenéticas .

Palabras clave: ectomicorrízico, hongos silvestres comestibles, bosque de pino-encino, bosques mixtos de coníferas.

1.2 ABSTRACT

A new species of *Xerocomellus* is proposed based on phenetic and phylogenetic analyses of DNA sequences from multi-locus. *Xerocomellus piedracanteadensis* forms an independent lineage from other species of the genus and is characterized by medium-sized basidiomata, dry, tomentose to rivulose or areolate pileus surface with whitish flesh staining pale yellow to pale red, with basidiospores ranging from (8–)10–14 (–15) × (3)–5 µm, pileipellis formed by a trichoderm 300 µm thick, with terminal cells 13–55 × (8–)10–23 µm, cylindrical, ovoid, subglobose to mamillate with rounded or acute apex, coarsely encrusting in lower elements ringed look wall, dark brown. Additionally, a second record of *Xerocomellus bolinii*, previously known only from Florida, USA is presented and its edibility is reported for the first time. Both species described in this work are edible in Piedra Canteada, Nanacamilpa, Tlaxcala in Central Mexico. Photographs and a detailed description of the new species and the new record along with their phylogenetic relationships are presented.

Keywords: ectomycorrhizal, edible wild mushrooms, pine-oak forest, coniferous mixed forests.

1.3 INTRODUCTION

Boletaceae is the most abundant family of the Boletales. Currently there are six subfamilies: Austroboletaceae G. Wu & Zhu L. Yang, Chalciporoideae G. Wu & Zhu L. Yang, Leccinoideae G. Wu & Zhu L. Yang, Xerocomoideae Singer, Zangioideae G. Wu, the Pulveroboletus group, and Boletaceae, where *Xerocomellus* is included having as a sister genus *Hortiboletus* Simonini, Vizzini & Gelardi (Wu *et al.*, 2016). *Xerocomellus* was proposed by Šutara (2008) with *X. chrysenteron* (Bull.) Šutara as type species. Šutara (2008) separated *Xerocomus* Quél., from *Xerocomellus* by small to medium pileus, dry surface, never viscid, at first smooth, tomentose, areolate to rivulose at maturity. The pileipellis is arranged as a palisadoderm of incrustated hyphae; basidiospores smooth or longitudinally striated, never bacilliform, subfusoid or fusoid, sometimes truncate. Currently 28 species are recognized mainly from the USA, Europe and Asia (Šutara, 2008; Ariyawansa *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016; Frank *et al.*, 2020, Farid *et al.*, 2021, Garza-Ocaña *et al.*, 2022, Martínez-Reyes *et al.*, 2023). In Mexico, two species have been recorded on morphological characters and two with morphological characters and molecular data: *Xerocomellus truncatus* (Singer, Snell & E.A. Dick) Klofac distributed mainly in the Transversal Neovolcanic Axis and the Sierra Madre del Sur, associated mainly with *Abies* (Ayala-Vásquez, 2021; Saldivar *et al.*, 2021), this species has importance by its edibility (Li *et al.*, 2021) and *Xerocomellus dryophilus* (Thiers) N. Siegel, C.F. Schwarz & J.L. Frank described from Baja California in the northwest of the country associated with *Quercus agrifolia* Neé (Ayala-Sánchez *et al.*, 2015). A third species *Xerocomellus carmeniae* Garza-Ocañas, J. García & de la Fuente, was described by Garza-Ocañas *et al.* (2022) in northeastern Mexico, this species characterized by basidiomata epigeous to gastroid, pileus surface areolate vivid red, reddish to brown, basidiospores, 10.5-13.6× 5.7-7.8 µm, truncate, elongate to ellipsoid. *Xerocomellus perezmorenoi* Martínez-Reyes & Ayala-Vásquez, was described by Martínez-Reyes *et al.* (2023) it is characterized by basidiomata small, pileus brown, brown deep, hymenophoral with pores lilac, peach to

salmon when young, yellow citrine at mature, basidiospores (12–)15–16 (–17) × 4–5 (–6) μm and it is edible.

In recent explorations in mixed coniferous forests and *Pinus-Quercus* forests in central Mexico, *X. piedracanteadensis* was collected as a new species with bicultural importance because it is consumed by some local people of San Felipe Hidalgo, in addition, two of the coauthors corroborated the edibility. Also, *Xerocomellus bolinii* is first reported for Mexico and the range of distribution is extended, the species only to be described from Florida USA at an altitude of 40 m (Farid *et al.*, 2021), in Mexico it is distributed at 2785 to 3200 m. Molecular studies are presented with four genes supporting the new species and the new record.

1.4 MATERIALS AND METHODS

1.4.1 Field work

Basidiomata were collected in the Piedra Canteada region, in Tlaxcala state of central Mexico. We collected some parasitized specimens as well. The vegetation types of the study area are mixed coniferous and *Pinus-Quercus* forests. They are dominated by *Abies religiosa* Kunth Schldl. et Cham., *Pinus teocote* Schiede ex Schldl., *Pinus moctezumae* Lamb, *Pinus pseudostrobus* Lindl., *Quercus laurina* Humb et Bonpl., and *Quercus* aff. *crassipes*. Protocols for sampling macrofungi were according to Lodge *et al.* (2004). The colour descriptions were based on Kornerup and Wanscher (1978). Sections were cut from dried specimens and temporary preparations were made using 5% KOH, congo red and Melzer's reagent. The size of the basidia, cystidia and basidiospores were determined by measuring at least 50 elements each. The abbreviation Q refers to the length/wide ratio. The material studied is deposited in the mycological herbaria MEXU at the National Autonomous University of Mexico in Mexico City.

1.4.2 DNA extraction, amplification, and sequencing

The authors the CTAB protocol was used to extract genomic DNA. The DNA was quantified with a Nanodrop 2000c (Thermo, USA). We prepared dilutions from each sample at 20 ng/ μ L to amplify the next for regions. The Internal Transcribed Spacer (ITS), the nuclear large subunit ribosomal DNA (LSU), the largest subunit of RNA polymerase II gene (*rpb1*) and translation elongation factor 1- α gene (*tef1*). The PCR reaction contained the following: enzyme buffer 1 x, Taq DNA polymerase, 0.8 mM deoxynucleoside triphosphates (0.2 mM each), 100 ng DNA, 20 pmol of each primer, and 2 units of GoTaq DNA (Promega, USA), with a final volume of 15 μ L. The PCR products were verified by agarose gel electrophoresis run for 1 h at 95 V cm⁻³ in 1.5% agarose and 1 x TAE buffer (Tris Acetate-EDTA). The products were then dyed with GelRed (Biotium, USA) and viewed in a transilluminator (Infinity 3000 Vilber, Loumat, Germany).

Finally, the products were purified using the ExoSap Kit (Affymetrix, USA) according to the manufacturer's instructions and were prepared for the sequencing reaction using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1 (Applied BioSystems). Sanger sequencing was carried out by Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The sequences were analyzed, edited, and assembled using BioEdit v. 1.0.5 (Hall, 1999) to create consensus sequences. The consensus sequences were compared with those in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLASTN 2.2.19 tool (Zhang *et al.*, 2000). The same procedure was followed for the parasitized specimens in order to identify the parasite with molecular analysis.

1.4.3 Phylogenetic analyses

In order to study phylogenetic relationships, our newly produced sequences of six individuals of *Xerocomellus* were added to reference sequences of ITS, LSU, rpb1 and tef1 (Table 1.1) deposited in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Each gene region was independently aligned using the online version of MAFFT v7 (Kato *et al.*, 2002; 2017; Kato and Standley, 2013). Alignments were reviewed in PhyDE V. 10.0 (Müller *et al.* 2005), followed by minor manual adjustments to ensure character homology between taxa. The matrices were formed for ITS of 47 exemplars (605 characters), LSU of 40 exemplars (610 characters), rpb1 of 14 exemplars (684 characters) and tef1 of 14 exemplars (600 characters). *Hortiboletus* spp. was used as the outgroup. The aligned matrices were concatenated into a single matrix (51 taxa, 2499 characters) with Mesquite v. 3.70 (Maddison and Maddison, 2021). Eight partitioning schemes were established: one for the ITS, one for the LSU, three to represent the codon positions of the gene region rpb1 and three for tef1 gene region, which were established using the option to minimize the stop codon with Mesquite v. 3.70 (Maddison and Maddison, 2021). Phylogenetic inferences were estimated with maximum likelihood in Rax-ML v. 8.2.10 (Stamatakis, 2014) with a GTR + G model of nucleotide substitution. To assess branch support, 1000 rapid bootstrap replicates were run with the GTRCAT model. For Bayesian

posterior probability, the best evolutionary model for alignment was sought using PartitionFinder v.2 (Lanfear *et al.*, 2014; 2017; Frandsen *et al.*, 2015). Phylogenetic analyses were performed using MrBayes v. 3.2.6 x64 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). The information block for the matrix included two simultaneous runs, four Montecarlo chains, temperature set to 0.2 and sampling 10 million generations (standard deviation ≤ 0.1) with trees sampled every 1000 generations. The first 25% of samples were discarded as burn-in, and stationarity was checked in Tracer v. 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014). Trees were visualized and optimized in FigTree v. 1.4.4 (Rambaut, 2014).

Table 1.1. List of species, geographic location and GenBank accession numbers of ITS, LSU, RPB1 and TEF1 sequences used in the molecular analysis

Taxon	Voucher	Country	ITS	LSU	RPB1	TEF1	References
<i>Xerocomellus amylosporus</i>	JLF3012	USA	KM213635	KU144742			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. amylosporus</i>	iNAT:18617460	USA	OL602056	OL602056			GenBank
<i>X. amylosporus</i>	UBC:F28014	USA	MZ817039	MZ817039			GenBank
<i>X. amylosporus</i>	SAT-18-273-02		MT946693	MT946693			GenBank
<i>X. atropurpureus</i>	NS120712	USA	KM213641	KM213642			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. atropurpureus</i>	JLF3620	USA	KU144749	KU144750	MW737517	MW737495	Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. atropurpureus</i>	NY1193858			KF030271	KF030366	KF030416	Nuhn <i>et al.</i> 2013
<i>X. bolinii</i>	MEXU 30421	Mexico	OL763321	OL763327	In process	In process	In this study
<i>X. bolinii</i>	MEXU 30422	Mexico	In process	In process	In process	In process	In this study
<i>X. bolinii</i>	JAB_133	USA	MW675729	MW675729			Farid <i>et al.</i> 2021
<i>X. bolinii</i>	JAB_110	USA	MW675728	MW675728	MW737507		Farid <i>et al.</i> 2021
<i>X. bolinii</i>	JAB_95	USA	MW675735	MW675735	MW737511	MW737491	Farid <i>et al.</i> 2021
<i>X. cisalpinus</i>	LUGO:ECC19102 906	Spain	MW376718	MW376718			GenBank
<i>X. cisalpinus</i>	KR-M-0044831	Germany	MT006036	MT006036			GenBank
<i>X. cisalpinus</i>	AT2005034	Finland		KF030354	KF030367	KF030417	Nuhn <i>et al.</i> 2013
<i>X. chrysenteron</i>	DQ533981	USA	DQ533981				Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. chrysenteron</i>	18177	Italy	JF908799				Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. cf. chrysenteron</i>	JLF5684	USA	MH168533				Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. diffractus</i>	NS120612	USA	KM213650	KM213651			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. diffractus</i>	JLF3554	USA	KU144769	KU144770			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. diffractus</i>	JLF5745	USA	MH168534		MW737519		Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. dryophilus</i>	CFS3Nov11-2	USA	KM213645	KX534074			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. dryophilus</i>	JLF4134	USA	KX534076	KY659593		MW737493	Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. mendocinensis</i>	JLF2775	USA	KM213653	KM213654			Frank <i>et al.</i> 2020

Taxon	Voucher	Country	ITS	LSU	RPB1	TEF1	References
<i>X. mendocinensis</i>	CFS1Nov11_1	USA	KM213656	KM213657			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. mendocinensis</i>	CFS10Nov2012_1	USA	KM213659	KM213660			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. mendocinensis</i>	JLF3558	USA	KU144785	KU144786			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. mendocinensis</i>	HDT18392	USA	KM213655				Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. pruinatus</i>	G.M. 2015-09-23	Germany	MW603181	MW603181			GenBank
<i>X. ripariellus</i>	301	Spain	MN685108	MN685108			GenBank
<i>X. ripariellus</i>	VDKO0404	Belgium				MH614746	GenBank
<i>X. rainisiae</i>	OKM25915	USA	KM213664				Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. rainisiae</i>	JLF3523	USA	KU144789	KU144790	MW737515		Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. salicicola</i>	CS_5Mar2014-1	USA	KU144791	KU144792			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. salicicola</i>	UCSC-F-1028	USA	KU144793	KU144794			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. salicicola</i>	B391	USA	MW675727	MW662569	MW737496		Farid <i>et al.</i> 2021
<i>X. sarnarii</i>	ML900101XE	Italy	MH011930	MH011930			Loizides <i>et al.</i> 2019
<i>X. truncatus</i>	Halling6878	USA	KM213665				Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. truncatus</i>	HDT22426	USA	KU144798				Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. truncatus</i>	SGT-2012	USA	JX030249	JX030249			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. zelleri</i>	JLF2977	USA	KM213666	KU144799			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. zelleri</i>	W.A. 105	USA	KU144803				Frank <i>et al.</i> 2020
<i>X. perezmorenoi</i>	MEXU 30410	Mexico	OK350679	OK350681	OQ015753	OQ017656	Martínez-Reyes <i>et al.</i> 2023
<i>X. perezmorenoi</i>	MEXU 30411	Mexico	OK350680	OK350682	OQ015754	OQ017657	Martínez-Reyes <i>et al.</i> 2023
<i>X. perezmorenoi</i>	MEXU 30412	Mexico	OQ077193	OQ101206	OQ015755	OQ017658	Martínez-Reyes <i>et al.</i> 2023
<i>X. piedracanteadensis</i>	MEXU 30418	Mexico	OL763323	OL763329	In process	In process	In this study
<i>X. piedracanteadensis</i>	MEXU 30417	Mexico	OL763322	OL763328	In process	In process	In this study
<i>X. piedracanteadensis</i>	MEXU 30419	Mexico	OL763324	OL763330	In process	In process	In this study

Taxon	Voucher	Country	ITS	LSU	RPB1	TEF1	References
<i>X. piedracanteadensis</i>	MEXU 30420	Mexico	OL763325	OL763331	In process	In process	In this study
<i>X. piedracanteadensis</i>	MEXU 30430	Mexico	OL763326	OL763332	In process	In process	In this study
<i>X. poederi</i>	AH 44050	Spain	NR_155971	NG_060000			GenBank
<i>Hortiboletus cf. rubellus</i>	JLF3093	USA	KU144805				Frank <i>et al.</i> 2020
<i>H. campestris</i>	DD614	USA	MH168538	MH203598			Frank <i>et al.</i> 2020
<i>H. campestris</i>	MICH KUO- 08240502	USA		MK601740		MK721094	Kuo and Ortiz-Santana 2020

1.5 RESULTS

The matrices of *Xerocomellus piedracanteadensis* were formed to ITS by 50 exemplars (598 characters) LSU by 43 exemplars (592 characters), RPB1 by 17 exemplars (684 characters) and TEF1 by 17 exemplars (600 characters). Morphological characters, ecology, and support from 1PPB/100ML in phylogenetic analyses showed that *Xerocomellus piedracanteadensis* is a new species, with *X. amylosporus* as a sister group, while another species was identified as *X. bolinii*, recorded here for the first time from Mexico, being the second record of the species previously only known from Florida, USA.

1.5.1 Taxonomy

Xerocomellus piedracanteadensis O. Ayala-Vásquez, Pérez-Moreno J. & Martínez-Reyes M. sp. nov. (Figure 1.1).

Mycobank no. MB842074; GenBank OL763323, OL763329

1.5.1.1 Diagnosis

Xerocomellus piedracanteadensis has medium sized epigeous basidiomata with dry, tomentose to rivulose or areolate surface revealing whitish flesh, pale yellow to pale red pileus, with elongate to cylindrical (8–)10–11–14 (15) × (3)–5 μm basidiospores and pileipellis formed by trichoderm 300 μm thick, with terminal cells 13–55 × (8–)10–23 μm, cylindrical, ovoid, subglobose to mammillate with rounded or acute apex coarsely encrusting in lower elements ringed look wall, dark brown. It grows in mixed pine-oak forests in Central Mexico.

1.5.1.2 Type

MEXICO. Tlaxcala state, Nanacamilpa municipality, San Felipe Hidalgo town, Piedra Canteada Reserve, Los chapotaderos place, 0542935W, 2151564N, 24 July 2021, O. Ayala-Vásquez, Pérez-Moreno J. & Martínez-Reyes M., (CPM21, MEXU 30417).

1.5.1.3 Etymology

The name *piedra + canteadensis* refers to Piedra Canteada locality, which has a firefly sanctuary visited by thousands of tourists annually, located in Central Mexico, where the species was first found.

Pileus 30-47mm diam., broad, hemispherical to convex when young, eventually broadly convex, nearly plane, pale brown, greyish-brown (5D2,5E2,5F2), surface dry, tomentose, rivulose, at maturity cracks, areolate, showing the flesh whitish or beige to red (11A6-11A8) tones. Hymenophore adnate, pores 0.3-0.8 mm, round light-yellow (4A5-4A6) bruising strongly blue-green (25A8-25B8), (24D5-24D6) when damaged, later dark blue (23E8), tubes 4-5 mm in length, concolorous with the pores. Context 6-7 mm thick, whitish, somewhat yellowish pale blue (23A4) when damaged, context stipe fibrillose, apex and middle part whitish to silky yellow (4A4-4A5); base wine-red to dark red, bluish-green (25A8-25B8), (24D5-24D6) to blue-gray (23D6) when damaged. Stipe 70-80 × 10-12 mm cylindrical, pale brown color from the middle part to the apex, the rest red (11A6-11A8) to pink red (11A4-11A5) surface fibrillose, bluish-green (25A8-25B8) when damaged. When applying KOH in pileus and stipe in fresh there was no color change, while in hymenophore and context a brown-orange color was recorded. Mycelium whitish to pale yellow. Whitish pseudosclerotia measuring 20 × 10 mm, with a spongy texture, spongy ovoid, globose to subglobose with long rhizomorphs (Figure 1.2A-E).

Basidiospores (12-) 13-15 (-16) × (4)-6 (7) μm, Q= 2.7-3 μm, Qav=2.89 μm, (2 basidiomata, N= 60), elongate, cylindrical, some truncate with suprahilar depression, pale yellow in KOH, amyloid with Melzer solution, guttulate, thick walled 0.8-1 μm. Basidia (26-) 28-42 (-47) × (8-) 9-12 μm, clavate, hyaline in KOH, pale yellow in Melzer solution, with granulose content, short sterigmata. Basidioles 20-26 × 7-10 μm. Hymenophoral trama boletoid, with central hyphae 4- 6 μm, cylindrical, hyaline to pale yellow, lateral hyphae 4-14 μm, cylindrical hyaline to pale yellow in KOH. Pleurocystidia 30-38 × 5-7 μm, subfusoid-

ventricose, fusoid, hyaline in KOH, pale yellow in Melzer's solution, thin-walled. Cheilocystidia 35–52×7–9µm, subfusoid-ventricose, fusoid, hyaline in KOH, pale yellow in Melzer solution, thin-walled. Pileipellis formed by trichoderm 300 µm thick, with terminal cells 13–55× (8–)10–23 µm, cylindrical, ovoid, subglobose to mammillate with rounded or acute apex, yellow in KOH, orange-brown in Melzer's solution, coarsely encrusting in lower elements with brown extracellular pigments ringed look wall, dark brown. Caulocystidia 17–25×7–9µm, mammillate, pale yellow in KOH, yellow in Melzer's solution; caulobasidia 17–38 × 9–10µm, 4-sterigmata, hyaline in KOH, pale yellow in Melzer's solution. Clamp connections absent (Figure 1.2F-K).

Some specimens were heavily parasitized by *Hypomyces microspermus* (ON231595), which covered the entire surface of the basidiomata showing a white to pale yellow color with a cottony layer. This parasite was molecularly identified and the corresponding sequence was deposited in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

1.5.1.4 Habitat, habit, distribution

Solitary to scattered. Recorded from mixed forests either *Pinus-Quercus*, under *Quercus aff. crassipes*, or *Abies-Pinus-Quercus* forests, under *Quercus laurina*.

1.5.1.5 Specimens examined

MEXICO, Tlaxcala state, Nanacamilpa municipality, San Felipe Hidalgo Town, Piedra Canteada, Los Chapoteaderos place, 14 July 2021, Mycoredes (CPM3- MEXU 30418); Piedra Canteada place, 2952 m.a.s.l., 8 September 2021, Mycoredes (CPM74- MEXU 30419), Los Chapoteaderos place, 8 September 2021, Mycoredes (CPM60); El Plano place, 25 August 2021, Mycoredes (CPM209); El Plano place, 15 September 2021, Mycoredes (CPM210); El Plano place, 22 September 2021, Mycoredes (CPM211); El Plano place, 29 September 2021, Mycoredes (CPM212); Rumbo a las Flores place, 0539661 W, 2151732N, 3152

m. a. s. l., 29 September 2021, Ayala-Vásquez O., (CPM152- MEXU 30420), El Plano place, 0539326 W, 2151947N, 3020 m. a. s.l., 29 September 2021, Ayala-Vásquez O., (CPM153- MEXU 30430).

1.5.2 *Xerocomellus bolinii*

J.A. Bolin, A.E. Bessette, A.R. Bessette, L.V. Kudzma, J.L. Frank & A. Farid, in Farid, Bessette, Bessette, Bolin, Kudzma, Franck & Garey, *Mycosphere* 12(1): 1056 (2021)

1.5.2.1 Taxonomic note

Xerocomellus bolinii is distinguished by a small to medium-sized basidioma (Figure 1.3). Pileus 33–80 mm, pale brown, pinkish brown, hymenophore adnexed, pores 0.5–1mm, yellow, dull yellow angular to irregular, bluish-green to blue when cut, tubes 20–60 mm, concolorous of the pores, Context of pileus creamy white or a mixture of creamy white and yellow becoming yellow to orange in the stipe and rapidly stains blue when exposed, Basidiospores (10–)13–15 (–16) × (4–) 4.5–6 μm, pale yellow, pale grayish yellow in KOH, dull yellow in Melzer's, Cheilocystidia and pleurocystidia scattered, (36–) 40–60 (71) × 9–11.5 μm, fusoid-ventricose, smooth, thin walled, hyaline, yellow to ochraceous in KOH, ochraceous in Melzer's, Pileipellis formed by trichoderm with terminal hypha 30–75 × 6–11 μm, hyaline to pale yellow in KOH, yellow-gold in melzer solution, thin walled, the basidiospores of the specimens studied from Mexico are two microns larger than the specimens described from Florida, as do cystidia measuring (40–) 45–60 (–71) × (5–) 6–9 (–13) μm, while those in the USA measure 36–48.5 × 9–11.5 μm. The biogeographic distribution area is expanded; *X. bolinii* is distributed from East coast of the United States and in the transverse Neovolcanic axis from Mexico at altitude 40– 3000 m, Solitary or scattered in sandy soil associated with *Quercus* and *Pinus*; in Mexico with *Quercus aff. crassipes* and *Pinus teocote* and *P. pseudostrobus*.

1.5.2.2 Specimens examined

MEXICO, Tlaxcala state, Nanacamilpa municipality, San Felipe Hidalgo Town, Piedra Canteada, entrance to the Piedra Canteada Reserve; km 1 entrance to the Piedra Canteada Reserve 8 September 2021, Mycoredes (CPM55- MEXU 30421); km 1 entrance to the Piedra Canteada Reserve, 15 September 2021, Mycoredes (CPM75- MEXU 30422); km 1 entrance to the Piedra Canteada Reserve, 22 September 2021, Mycoredes (CPM213).

1.6 DISCUSSION

Phylogenetic analysis shows that *Xerocomellus piedracanteadensis* is closely related to *Xerocomellus amylosporus*, but morphologically it has differences; *Xerocomellus piedracanteadensis* has a medium pileus of 30-47 mm wide, pileus pale brown, greyish-brown, hymenophore adnexed, stipe pale brown color from the middle part to the apex, the rest red to pink red, whitish pseudosclerotia measuring 20 × 10 mm, with a spongy texture, spongy ovoid, globose to subglobose with long rhizomorphs, basidiospores with av Q = 2.9 µm, while *Xerocomellus amylosporus* has medium to large, ranging from 40 mm to 100 mm wide, pileus dark olive brown to grayish brown, to vinaceous brown, Hymenophore slightly sunken around stipe, stipe reddish brown over much of the stipe to extensively brown with a red band at apex, basidiospores with av Q = 2.5 µm. Meanwhile, *Xerocomellus mendocinensis*, another phylogenetically related species, has blackish brown to brown-olivaceous pileus, a stipe extensively red to rose red with red punctation over a yellow ground color and (9.7-)11.7-15.1(-16.7) × 4.3-5.4(-5.8) µm, inamyloid basidiospores. *Xerocomellus bolinii* was recently described by Farid *et al.* (2021) and currently it was only known from Florida, USA in *Pinus-Quercus* forests. Here, we expand the distribution to Central Mexico, while in Florida it is distributed at an altitude that range from sea level to 150 m, in contrast our specimens were sampled in altitudes ranging from 2300 to 2500 m, showing that the species has a wide ecological range altitude than previously unknown. The macroscopic

characteristics are similar to the type species, but the Mexican specimens have longer basidiospores (12–)13–15 (–16) × (–4) 4.5– 6 μm , and longer cheilocystidia (40–) 45–60 (–71) × (5–) 6–9 μm ; while the North American specimens have basidiospores (10–)12–13(–14) × 4.5–6 μm and cheilocystidia 36–48.5 × 9–11.5 μm . *Xerocomellus piedracanteadensis* and *Xerocomellus bolinii* are recorded for the first time as edible species enriching the mycocultural heritage of Mexico; one the most important centers of edible wild mushrooms in the world as mentioned by Pérez-Moreno *et al.* (2021a; 2021b), both it is consumed by some local people of San Felipe Hidalgo, in addition, two of the coauthors corroborated the edibility.

1.7 CONCLUSION

A new species of *Xerocomellus* named *Xerocomellus piedracanteadensis* is described from Central Mexico growing in *Pinus-Quercus* and *Abies-Pinus-Quercus* forests. *Xerocomellus bolinii*, previously documented from Florida, USA is newly recorded from Mexico expanding its distribution, and altitudinal range, from 150 m in the areas where it is known to 2500 m in Mexico. Both species

are locally consumed in the study area enriching the world mycocultural heritage of known edible wild mushrooms.

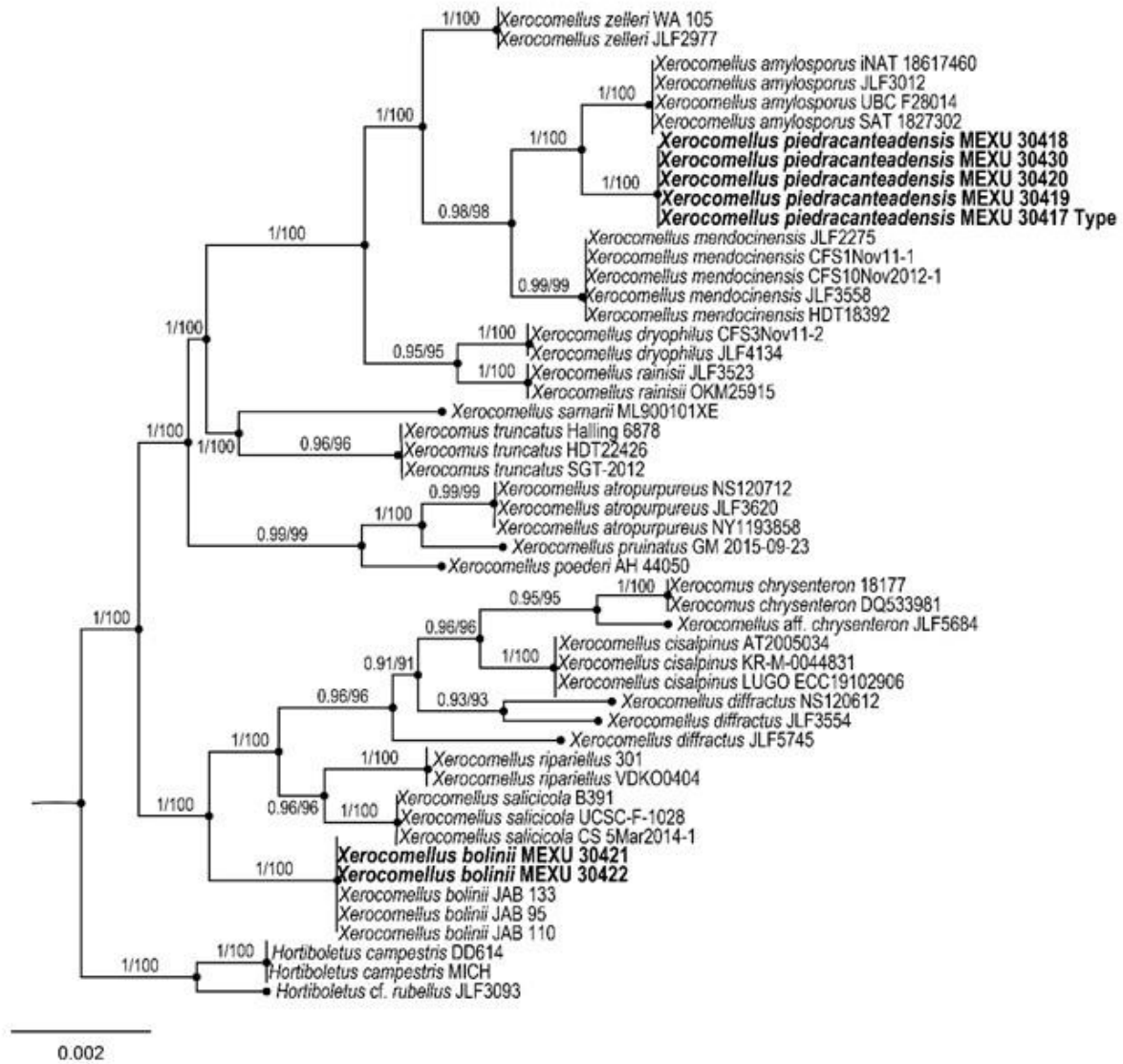


Figure 1.1. Tree based on maximum likelihood and Bayesian posterior probability phylogenetic analysis generated from the concatenate dataset (ITS, rDNA-LSU, RPB1, TEF1) of *Xerocomellus piedracanteadensis* and *X. bolinii* relationships with other species in the genus. Bold face names represent samples sequenced for this study.

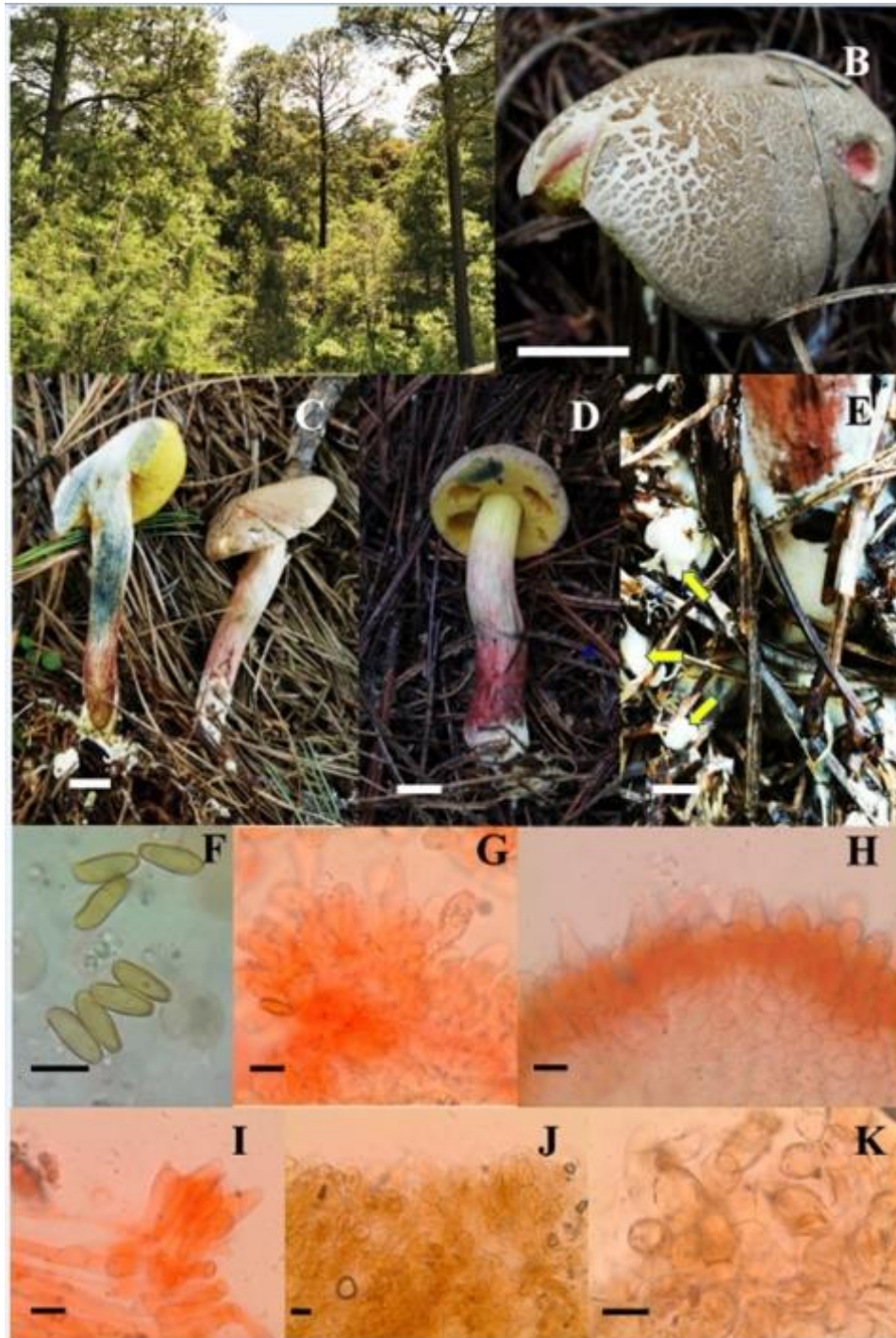


Figure 1.1. *Xerocomellus piedracanteadensis* (Holotype); A) Habitat of the type specimen showing a pine-oak mixed forest; B) pileus surface; C) crossed-section of type specimen; D) basidiomata; E) pseudosclerotia (yellow arrows) nearby the stipe base; F) basidiospores; G) pleurocystidia; H) cheilocystidia; I) Caulocystidia and caulobasidia; J-K) pileipellis. Scale bars: B-E: 10mm. F-K:10 μ m.

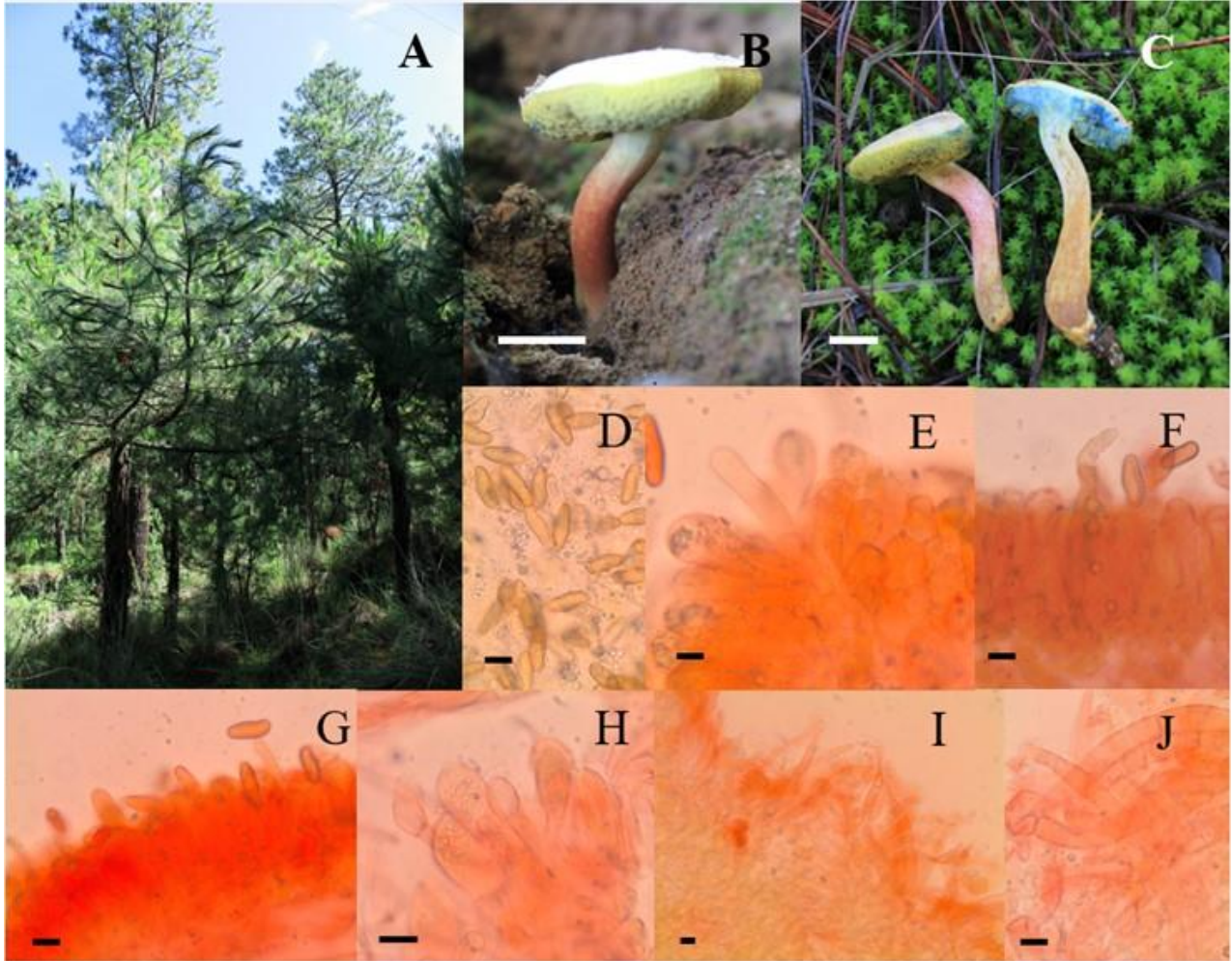


Figure 1.2. *Xerocomellus bolinii* (MEXU 30430); A) Vegetation type where some specimens were sampled, showing a mixed forest; B) basidioma in its natural habitat; C) cross-section of basidioma; D) basidiospores; E) basidia and pleurocystidia; F-G) cheilocystidia; H) Caulobasidia; I-J) pileipellis. scale bars B-C:10mm, D-J: 10 μ m.

**CAPÍTULO II. CRECIMIENTO Y CONTENIDO NUTRIMENTAL EN *Pinus pseudostrobus* Y *Pinus montezumae* CON EL HONGO COMESTIBLE
ECTOMICORRÍZICO *Laccaria squarrosa***

2.1 RESUMEN

La deforestación es una problemática de manera constante en nuestro país, y la reforestación es la actividad forestal de mayor importancia para recuperar las áreas deforestadas o degradadas. Sin embargo, las especies forestales producidas en vivero tienen bajo porcentaje de supervivencia en campo, debido principalmente a la falta de sus hongos simbiontes ectomicorrízicos, además algunas especies de hongos ectomicorrízicos son comestibles y constituyen un recurso forestal no maderable de enorme importancia para la conservación de los bosques. Debido a la importancia ecológica y fisiológica de los hongos ectomicorrízicos, se estudiaron los efectos de la inoculación con el hongo ectomicorrízico *Laccaria squarrosa* en *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae* sobre el crecimiento (diámetro y altura), peso seco de la parte aérea, radical y total, contenido de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S y Na) y micronutrientes (Fe, Zn, Mn, Cu, B, Ni y Mo) y la caracterización de la ectomicorriza formada en *P. pseudostrobus* (Pps) y *P. montezumae* (Pm). *Laccaria squarrosa* (Ls) es un hongo comestible registrado recientemente en el estado de Veracruz. Los tratamientos fueron: i) plantas de Pps inoculadas con Ls; ii) plantas de Pps no inoculadas; iii) plantas de Pm inoculadas con Ls; iv) plantas de Pm no inoculadas. Todas las variables muestreadas fueron altamente significativas para ambas especies de pino inoculadas con respecto a las no inoculadas. El porcentaje de micorrización fue muy alto, *P. pseudostrobus* (95.7%), y *P. montezumae* (98.7%). Los resultados demuestran el enorme potencial biotecnológico de la inoculación con el hongo ectomicorrízico comestible *L. squarrosa* en la producción de plantas de *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* para reforestación bajo condiciones de invernadero.

Palabras clave: pinos, planta forestal, producción invernadero, inoculación.

**CHAPTER II. GROWTH AND NUTRIENT CONTENT IN *Pinus pseudostrobus*
AND *Pinus montezumae* WITH THE ECTOMYCORRHIZAL EDIBLE FUNGI
*Laccaria squarrosa***

2.2 ABSTRACT

Deforestation is a constant problem in our country, and reforestation is the most important forestry activity to recover deforested or degraded areas. However, the forest species produced in nurseries have a low percentage of survival in the field, mainly due to the lack of their symbiont ectomycorrhizal fungi, in addition, some species of ectomycorrhizal fungi are edible and constitute a non-timber forest resource of enormous importance for the conservation of the forests. Due to the ecological and physiological importance of ectomycorrhizal fungi, the effects of inoculation with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria squarrosa* in *Pinus pseudostrobus* and *Pinus montezumae* on growth (diameter and height), dry weight of the aerial, root and total parts were studied, macronutrient content (N, P, K, Ca, Mg, S and Na) and micronutrients (Fe, Zn, Mn, Cu, B, Ni and Mo) and the characterization of the ectomycorrhiza formed in *P. pseudostrobus* (Pps) and *P. montezumae* (Pm). *Laccaria squarrosa* (Ls) is an edible mushroom recently recorded in the state of Veracruz. The treatments were: i) Pps plants inoculated with Ls; ii) uninoculated Pps plants; iii) Pm plants inoculated with Ls; iv) uninoculated Pm plants. All the sampled variables were highly significant for both inoculated pine species with respect to the non-inoculated ones. The percentage of mycorrhization was very high, *P. pseudostrobus* (95.7%), and *P. montezumae* (98.7%). The results demonstrate the enormous biotechnological potential of inoculation with the edible ectomycorrhizal fungus *L. squarrosa* in the production of *P. pseudostrobus* and *P. montezumae* plants for reforestation under greenhouse conditions.

Keywords: pines, forest plant, greenhouse production, inoculation.

2.3 INTRODUCCIÓN

Los bosques son vitales para la supervivencia y el bienestar de la humanidad, albergan al 66% de las especies animales, vegetales y fúngicas del planeta (Burrola-Aguilar *et al.*, 2011). México cuenta con una riqueza y diversidad de pinos, posee 49 de las 120 especies del género *Pinus* en el mundo (Germandt y Pérez-de la Rosa, 2014; Ramos *et al.*, 2017), desafortunadamente estos han sufrido una reducción de su cubierta vegetal ocasionado por diversos factores como, cambio de uso de suelo donde grandes extensiones de bosques son talados y convertidos en superficies dedicadas a la agricultura, (Argüelles-Moyao y Garibay-Orijel, 2018), los incendios forestales causados por fenómenos naturales o actividades antropogénicas, así como los efectos del calentamiento global, los cuales sin duda representan una gran amenaza para las especies de bosque de coníferas y su desarrollo (Germandt y Pérez-de la Rosa, 2014; Koizumi y Nara 2020; Carballo-Sánchez *et al.*, 2022).

Por otro lado, en el suelo, las plantas y los microorganismos se encuentran estrechamente relacionados, puesto que ambos aportan sustancias nutritivas uno al otro (Smith y Read, 2008). Las relaciones benéficas planta-microorganismo tienen mayor abundancia en la zona de influencia de la raíz, llamada rizósfera (Brimecombe *et al.*, 2007; Smith y Read, 2008; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2016; Ochoa-Hueso *et al.*, 2018), donde los exudados radicales funcionan como atrayentes y los organismos edáficos dependen de estos compuestos carbonatados exudados por las raíces (Bonkowski *et al.*, 2009); además de la presencia de los consorcios microbianos o las distintas especies de microorganismos, que aumentan el efecto positivo en el crecimiento de las plantas y el mejoramiento de las condiciones del suelo (Rasouli-Sadaghiani *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2020). En consecuencia, la comunidad vegetal se ve sometida a una serie de costos y beneficios que brindan dinamismo y estructura a los ecosistemas terrestres (Parladé *et al.*, 1999).

En el ecosistema terrestre, los hongos son organismos valiosos de gran importancia que juegan un papel esencial y viven prácticamente en todos los medios, participan en el reciclaje de la materia orgánica, la formación y conservación del suelo, así como mantener el equilibrio de los ecosistemas naturales, a través de sus relaciones con otros organismos (Domínguez *et al.*, 2013; Guo *et al.*, 2020; Lak *et al.*, 2020). También son capaces de formar asociaciones con numerosos árboles, aproximadamente 95% de las plantas terrestres forma algún tipo de asociación con la raíz, esta es llamada micorriza, la cual beneficia al crecimiento de diferentes especies vegetales como las coníferas, y que en condiciones naturales son indispensables para su sobrevivencia (Carranza, 2006).

La característica principal en esta asociación es el intercambio bidireccional de nutrimentos entre ambos organismos, así como la protección contra organismos patógenos como hongos y nematodos, además, induce y aumenta la producción de hormonas necesarias para mantener por más tiempo fisiológicamente activas las raíces asociadas que aquellas raíces no micorrizadas. La micorriza es una simbiosis que ha evolucionado entre una gran diversidad de plantas terrestres y hongos del suelo, donde los hongos adquieren carbono fotosintético de las plantas y, a cambio, proporcionan a la planta huésped una mayor absorción de nutrientes del suelo (Smith y Read, 2008; Kariman *et al.*, 2019).

Actualmente se conocen siete tipos de simbiosis micorrízica; las arbusculares, ectendomicorrizas, ericoides, arbutoides, ectomicorrizas, monotropoides y orquideoides. Uno de los más importantes desde el punto de vista ecológico y biogeográfico es la ectomicorriza término propuesto por Peyronel *et al.* (1969), esta simbiosis se establece entre el hongo y la raíz de la planta en la cual el hongo crece y forma un manto en la superficie de la raíz en donde sus hifas penetran el córtex intercelularmente para producir una red conocida como “red de Hartig”, por lo que las estructuras diagnósticas de la ectomicorriza son el manto fúngico, red de Hartig y micelio externo vegetativo que emerge a partir

de las raíces (Pérez-Moreno y Read, 2004; Martínez-Reyes, 2010). Estas estructuras son un conjunto de hifas que interconectan al hongo ectomicorrízico con las células corticales y la corteza de la raíz en forma de redes, que ayudan al intercambio de nutrimentos en ambas direcciones (Hogberg y Hogberg, 2002; Smith y Read, 2008; Pérez-Moreno *et al.*, 2010).

Los hongos ectomicorrízicos, a través de sus hifas asociadas promueven la absorción de nutrimentos orgánicos e inorgánicos, principalmente nitrógeno y fósforo, en retribución, los hongos reciben carbono (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 2000; Read y Pérez-Moreno, 2003; Smith y Read, 2008). El nitrógeno es el principal nutriente que limita el crecimiento de las plantas en los ecosistemas terrestres y la transformación del nitrógeno inerte a formas asimilables por las plantas es debido a los microorganismos del suelo (Moreau *et al.*, 2019). Es decir, sin la simbiosis ectomicorrízica no habría bosques en el planeta. Un estudio reciente analizo 1.1 millones de parcelas forestales en todo el mundo y estimo que el 60% de todos los árboles del planeta están asociados con ectomicorrizas (Steidinger *et al.*, 2019). Aunado a lo anterior, el desarrollo biotecnológico de inoculación de especies forestales con hongos ectomicorrízicos es una necesidad para la restauración de los bosques (Hernández-Santiago, 2016; Bueno *et al.*, 2017; Bueno *et al.*, 2019).

Se ha demostrado los efectos de estos hongos en términos de crecimiento, fisiología y translocación de nutrientes de los árboles inoculados. La tasa de supervivencia en campo también ha aumentado como consecuencia de la inoculación de hongos ectomicorrízicos (Smith y Read, 2008; Barroetaveña *et al.*, 2012). Por lo tanto, las especies con potencial biotecnológico en la aplicación de inoculantes ectomicorrízicos en especies forestales son *Amanita caesarea*, *Cantharellus cibarius*, *Laccaria laccata*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius volemus* y *Tricholoma magnivelare*, debido a que: i) se han registrado que forman simbiosis con plantas forestales en condicione naturales; ii) se encuentran en grandes cantidades en los mercados donde se comercializan; y iii) se tiene registros de la formación de micorrizas en plantas forestales, (Jiménez-Ruiz *et*

al., 2013). La vida útil de los bioinoculantes a base de esporas es mucho más larga que la del micelio y puede durar de uno a dos años según la especie. La desventaja de esta biotecnología es que es estacional, es decir, depende de la época de producción natural de los hongos, que con el cambio climático se ha vuelto cada vez más difícil de predecir con precisión (Carballo-Sánchez *et al.*, 2022). Hasta la fecha, 132 combinaciones de hongos y árboles (pinos y encinos) nativos de México han sido probadas con éxito con esta biotecnología, que es eficiente, rentable y sencilla y ya está lista para producción a escala industrial (Pérez-Moreno *et al.*, 2020).

Pinus pseudostrobus Lindl es un árbol con alturas de 30 a 40 m y diámetro normal de 40 a 80 cm; se desarrolla principalmente en los estados de México, Morelos, Puebla, Hidalgo, Ciudad de México, Oaxaca, Chiapas y Guerrero, con un rango altitudinal que va de 1900 a 3000 m (Delgado *et al.*, 2007; Farjón, 2017). Se ha utilizado en programas de reforestación, especialmente en suelos degradados, y su resina y madera son altamente comercializadas (CONAFOR, 2001; Gómez-Romero *et al.*, 2013). De acuerdo con CONAFOR (2010), la calidad de la planta es uno de los factores que condicionan el éxito de la plantación, los parámetros que debe tener una planta producida en vivero para que sea considerada de calidad antes de salir a campo para especies no cespitosas, deberá tener un diámetro del tallo mínimo de 4 mm, altura de 15 a 25 cm, la raíz con un eje central y raíces laterales bien distribuidas, sin raíces envolventes o creciendo hacia arriba; sin malformaciones o nudos y abundantes puntos de crecimiento, abarcando el 70 u 80% del cepellón, una micorrización mínima del 40% de cobertura en el cepellón, con una lignificación de 2/3 partes del tallo principal, evitando planta excesivamente alta y delgada, plantas vigorosas, sin daños físicos o mecánicos, sin alteraciones morfofisiológicas y libre de plagas y enfermedades.

Por su parte *P. montezumae* Lamb. es una especie con una altura de 20 a 30 m y un diámetro que puede alcanzar los 100 cm (Forjón y Styles, 1997). En México se ha reportado en los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas,

Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Veracruz, Estado de México, Michoacán, Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Colima, Morelos, Querétaro, y Zacatecas; el rango altitudinal va de 1150 a 3350 m. Es una especie maderable de gran importancia económica, excelente para la fabricación de papel, adicionalmente es la segunda especie más utilizada en los programas de reforestación y restauración de suelos degradados (Rodríguez-Franco, 1997; CONAFOR, 2007). De acuerdo con CONAFOR (2010), la calidad de la planta para especies cespitosas debe tener un diámetro del tallo mínimo de 6 mm, la altura no tiene dimensión mínima para especies de tipo cespitoso; la raíz con un eje central y raíces laterales bien distribuidas, sin raíces envolventes o creciendo hacia arriba. Sin malformaciones o nudos y abundantes puntos de crecimiento abarcando el 70 u 80% del cepellón, una micorrización mínima del 40% de cobertura en el cepellón, la lignificación con 2/3 partes del tallo principal, evitando planta excesivamente alta y delgada, plantas vigorosas, sin daños físicos o mecánicos, sin alteraciones morfofisiológicas y libre de plagas y enfermedades.

Laccaria squarrosa Bandala, Montoya y Ramos; fue escrita por Ramos *et al.* (2017) de un bosque relicto de *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. La especie se caracteriza por un basidioma mediano, de color rosa a marrón-anaranjado, superficie del píleo lisa a finamente escamosa, especialmente en el estípite, basidiosporas globosas, equinuladas, cistidios subcilíndricos a estrangulados y pileipellis formado por una dermis.

El presente trabajo habla de Bioprospección, por lo que en este apartado definiremos el concepto, el cual proviene del griego βίο: vida, y del latín prospectio: exploración, es el estudio de la naturaleza dedicado al hallazgo de organismos y sustancias con posibles usos para beneficio del ser humano que pueden tener un valor comercial significativo en sectores como el industrial, alimentario, cosmético y farmacéutico (Wikipedia, 2020). La bioprospección relacionada con biodiversidad, se podría definir como la búsqueda sistemática de genes, componentes naturales y organismos completos, de la naturaleza, buscando darles un potencial para el desarrollo de productos (Castree, 2003).

De una forma abreviada, bioprospección se puede definir como la explotación de la biodiversidad con el fin de otorgar valor comercial a los recursos genéticos y bioquímicos (Laird y Ten Kate, 2002); para ello los estudios se deben enfocar en aquellas especies y componentes que presentan características físicas y biológicas particulares, capaces de producir sustancias especiales y de adaptarse a condiciones extremas para su supervivencia. En la bioprospección se hace uso de las técnicas moleculares empleadas en biotecnología para beneficio de la humanidad, a través de la actividad de la industria química, farmacéutica, agrícola, entre otras. Se define como la búsqueda dirigida de (micro)- organismos con capacidades económicas útiles, como la producción de nuevos fármacos (antibióticos), enzimas, nutrientes, etc. Es una herramienta científica que ha contribuido al progreso social y científico de la especie humana (Duarte, 2006; Gallant, 2009).

Para llevar a cabo un proceso de bioprospección, se recomienda en primera instancia la investigación literaria y revisión científica acerca de la biodiversidad. Para esto, son necesarias la recolección y lectura pertinentes de libros y artículos dedicados a las especies de plantas y animales, y compuestos naturales a tratar. Con base en el estudio bibliográfico elaborado, el paso a seguir consiste en realizar expediciones a los lugares de origen de la especie o elemento, para recolectar muestras, o establecer convenios con centros de investigación del lugar, en la medida de lo posible. Finalmente, se debe analizar y probar el material recolectado con el fin de identificar algún producto con aplicaciones potencialmente comerciales (Duarte, 2006).

Hasta el momento no se tienen reportes de la síntesis ectomicorrízica de *L. squarrosa* con las especies de *Pinus pseudostrobus* y *P. montezumae*, además de la producción de planta micorrizada en invernadero; por lo que la presente investigación se realizó con la finalidad de contribuir al conocimiento biotecnológico y de diversidad ectomicorrízica asociada a estas especies.

2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se realizó en el laboratorio de micorrizas e invernadero del Posgrado de Edafología del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, estado de México.

2.4.1 Material vegetal e inóculo

Las semillas de *Pinus pseudostrobus* Lindl y *Pinus montezumae* Lamb. (Figura 2.1 a y b) procedieron del estado de Hidalgo, las cuales fueron conservadas en refrigeración a 5°C hasta su utilización. El material fúngico de *Laccaria squarrosa* Bandala, Montoya y Ramos fue recolectado en bosques de *Quercus spp.* y *Quercus-Pinus* en el bosque de Piedra Canteada, municipio de Nanacamilpa, en el estado de Tlaxcala, (Figura 2.1 c y d).



Figura 2.1. Material vegetal y micológico: a) Árbol de *Pinus pseudostrobus* en bosque natural; b) Planta de *Pinus montezumae* en estadio juvenil; c) Esporoma de *Laccaria squarrosa* en estadio maduro; d) Cuerpos fructíferos en diferentes estadios de *L. squarrosa*.

2.4.2. Establecimiento del experimento

La metodología empleada para la preparación del inóculo fue la propuesta por, Carrasco-Hernández *et al.*, (2011), Martínez-Reyes *et al.*, (2012) y Hernández-Santiago, (2016). De los esporomas maduros de *L. squarrosa* se utilizaron los píleos, debido a que aquí se concentran las esporas, que son las estructuras reproductivas de los hongos. Los píleos fueron pesados y triturados en una licuadora (Oster) en una proporción 1:1 con agua destilada estéril; por

último, se almacenaron en contenedores de plástico a una temperatura de 5°C hasta su utilización (Figura 2.2).



Figura 2.2. Preparación de inóculo ectomicorrízico de *Laccaria squarrosa*. a) Esporomas de *L. squarrosa* en bosque de pino-encino; b) Fotografía taxonómica del cuerpo fructífero de *L. squarrosa* en campo; c) Píleos de *L. squarrosa* con las esporas en los himenios; d) Preparación de inóculo en proporción 1:1 de agua destilada estéril y píleos de la especie de hongo.

En la germinación de las semillas y el crecimiento de *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* se empleó sustrato denominado “Colpos” que consiste en una mezcla de arena, corteza de pino y suelo forestal en proporción 2:2:1; Ambos

sustratos fueron mezclados y depositados en costales de rafia de 20 kg para su esterilización con vapor de agua, a una temperatura de 120°C durante 4 h, posteriormente se dejó reposar 48 h, al término de ese tiempo se realizó una segunda esterilización por 4 h más, para que el sustrato estuviera completamente esterilizado.

2.4.3 Siembra e inoculación

Anterior a su siembra, las semillas se colocaron en un recipiente con agua destilada durante 24 h, con el objetivo de separar las semillas vanas. Posteriormente, las semillas fueron esterilizadas con H₂O₂ a 30% por 20 minutos, para eliminar el residuo del peróxido de hidrogeno, estas fueron lavadas varias veces con agua estéril.

La siembra de *P. pseudostrobis* y *P. montezumae* se realizó el 22 de septiembre del 2020. Para ello, se utilizaron tubetes de plástico de 125 cm³ con algodón estéril en su parte inferior. Cada tubete fue llenado a una capacidad del 80% con el sustrato, de manera directa se colocaron de dos a tres semillas de *P. pseudostrobis* o *P. montezumae*, según el tratamiento, a una profundidad de uno a dos cm aproximadamente. De manera conjunta con la siembra, se realizó una primera inoculación con el HEC *L. squarrosa* de 15 ml a una concentración de 10⁸ esporas, al término de la inoculación se agregó una capa de sustrato (Figura 2.3). Así mismo, se efectuó un riego periódico en promedio de tres veces por semana con agua destilada, alternando un riego con el fungicida “Captan” para evitar la presencia de “damping off”, la aplicación fue a una proporción de 2g/L con agua destilada durante los tres primeros meses, hasta la lignificación del tallo. A los cuatro meses, las plantas fueron inoculadas por segunda ocasión también con 15 ml (Figura 2.3). Los tratamientos se mantuvieron durante 22 meses en condiciones de invernadero.



Figura 2.3. Inoculación de *Laccaria squarrosa* en *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae*. a) Siembra e inoculación del hongo comestible ectomicorrízico *L. squarrosa*; b) Medida del inóculo a utilizar por tubete o contenedor; c) Segunda inoculación en plantas de *P. pseudostrobus* y; d) En plantas de *P. montezumae*.

2.4.4 Diseño experimental

El diseño experimental es completamente al azar: como tratamiento la especie de pino (*P. pseudostrobus* y *P. montezumae*) e inóculadas con *L. squarrosa* y un tratamiento de plantas sin inocular; por lo cual, el experimento consto de 4 tratamientos, con 45 repeticiones cada uno, lo que nos da un total de 180 unidades experimentales.

2.4.5 Variables evaluadas

2.4.5.1 Biomasa seca y crecimiento vegetal

La altura se midió a los 22 meses de edad después de la germinación, esta se midió desde la base del tallo hasta la yema apical con ayuda de una regla graduada en mm, por otro lado, el diámetro se tomó en la base del tallo con un vernier digital marca Truper con precisión 0.001 mm. Simultáneamente se determinó el peso seco de la parte aérea, radical y total de seis plantas de forma aleatoria por tratamiento. A través de un análisis destructivo las plantas fueron extraídas de los tubetes, separando la raíz y el tallo, posteriormente fueron colocadas en bolsas de papel de forma independiente en una estufa de secado (Sartorius AC210S, Alemania) durante 72 h a 70°C hasta obtener valores constantes de la parte aérea y radical con una balanza analítica (Santorius AC210S, Alemania).

2.4.5.2 Análisis nutrimental

El análisis de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S y Na) y micronutrientes (Fe, Zn, Mn, Cu, B, Ni y Mo) se realizaron de la parte aérea y radical de las seis plantas seleccionadas aleatoriamente para la evaluación del peso seco, correspondiente a cada tratamiento. Las determinaciones de estos nutrientes fueron analizadas en el Laboratorio de Análisis Agrícolas Fertilab (Figura 2.4). El contenido de N se determinó por el método de Dumas. En tanto el fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S), sodio (Na), hierro (Fe), zinc (Zn), manganeso (Mn), cobre (Cu), boro (B), níquel (Ni) y molibdeno (Mo) fueron determinados por Digestión ácida multielemental en microondas, preparado de acuerdo al método AOAC 2006.03.



Figura 2.4. Análisis nutrimental de las plantas ectomicorrizadas: a) Biomasa aérea y radical de *Pinus pseudostrobus*; b) Muestra enviada a laboratorio (Fertilab) para análisis nutrimental.

2.4.5.3 Colonización ectomicorrízica y caracterización macro y micro morfológicas de los morfotipos

Para evaluar el porcentaje de colonización ectomicorrízica se seleccionaron al azar tres plantas inoculadas y no inoculadas de cada especie de pino. Cada planta se dejó remojando durante 24 h y posteriormente se separó la parte aérea de la radical, esta última parte fue enjuaga con agua a presión empleando tres tamices de malla de 1.19, 0.18 y 0.08 mm de diámetro de abertura, para colectar la mayor cantidad de raíces cortas. Las raíces obtenidas fueron almacenadas en viales de plástico con agua destilada y puestas en 5 °C hasta su análisis. Finalmente se realizó el conteo de raíces cortas vivas micorrizadas, raíces muertas micorrizadas, raíces vivas no micorrizadas y raíces muertas no micorrizadas con ayuda de un microscopio estereoscopio (Leica MZ6, Alemania, (Figura 2.5). El porcentaje de colonización ectomicorrízica se obtuvo mediante la fórmula: Raíces cortas vivas micorrizadas / (Raíces cortas vivas micorrizadas + Raíces cortas vivas no micorrizadas) * 100 (Martínez-Reyes *et al.*, 2012).



Figura 2.5. Conteo de raíces cortas de las plantas de pino inoculadas con el hongo ectomicorrízico *Laccaria squarrosa* en el microscopio estereoscópico Leica.

La caracterización morfoanatómica de la ectomicorriza consistió en seleccionar los morfotipos maduros y en buen estado de conservación, a los cuales, se les efectuaron cortes histológicos, fotografías y se elaboraron preparaciones semipermanentes. Con base a la caracterización y medición de las estructuras propuestas por Agerer, (1991) y DEEMY, (2021) se realizaron observaciones con microscopia de campo claro y de contraste, donde se observaron las características distintivas de cada micorriza: a) tipo de ramificación; b) coloración: c) tipo de manto, d) hifas y, e) red de Hartig.

2.4.6 Análisis estadístico de variables

Para las variables de crecimiento, peso seco de la parte aérea y raíz, así como del porcentaje de micorrización y análisis nutrimental, se realizó un análisis de varianza mediante PROC ANOVA y se hizo una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (Hernández-Santiago, 2016) mediante el software estadístico “The SAS system 9.0”. Los datos del porcentaje de colonización ectomicorrízica fueron transformados mediante la fórmula $(\% \text{ colonización} + 0.05)^{1/2}$ utilizada por Alves *et al.* (2010).

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Biomasa seca y crecimiento vegetal

En las plantas de *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* hubo mayor biomasa en comparación con las plantas no inoculadas; así mismo existieron diferencias entre plantas inoculadas y plantas no inoculadas en términos de peso seco de la parte aérea, radical y total. De las especies de pinos, *P. montezumae* registró un mayor peso seco en comparación a las plantas de *P. pseudostrobus* tanto en peso seco de parte aérea, radical y total; comparando las plantas inoculadas de ambas especies de pino se observó mayor biomasa total en comparación a sus testigos (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Altura, diámetro y peso seco de la parte aérea, radical y total de plantas de *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae* inoculadas o no con *Laccaria squarrosa*, 22 meses después de la siembra.

Tratamiento	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Peso seco (g)		
			Parte aérea	Raíz	Total
Pps+Lsq	29.5 ± 6.6 a	3.7 ± 0.5 a	2.9 ± 0.3 a	2.0 ± 0.0 a	4.9 ± 0.3 a
Ppsni	23.1 ± 4.3 b	2.8 ± 0.4 b	1.6 ± 0.7 b	0.8 ± 0.3 b	2.4 ± 1.0 b
Pm+Lsq	4.7 ± 2.4 a	6.3 ± 1.6 a	3.1 ± 1.2 a	2.2 ± 0.9 a	5.4 ± 1.6 a
Pmni	2.6 ± 1.1 b	4.4 ± 0.6 b	1.0 ± 0.4 b	0.9 ± 0.6 b	2.0 ± 0.8 b

Los valores representan promedios ± desviación estándar n=24, para altura y diámetro; n=6 para peso seco. Los valores con la misma letra en cada columna son iguales de acuerdo a Tukey (p≤0.05); Pps+Lsq= *Pinus pseudostrobus* inoculado con *Laccaria squarrosa*; Ppsni = Plantas *Pinus pseudostrobus* no inoculadas; Pm+Lsq= *P. montezumae* inoculados con *L.*; Pmni = Plantas *Pinus montezumae* no inoculadas.

A los 22 meses después de la siembra, la altura y el diámetro de las plantas inoculadas fue mayor en plantas inoculadas respecto a las no inoculadas independientemente de la especie de pino, (Cuadro 2.1).

Las plantas de *P. pseudostrobus* presentaron mayores alturas que las plantas de *P. montezumae*, esto debido a que esta última especie es cespitosa, y el desarrollo de la altura solo se da cuando la planta ya está establecida en campo y su calidad de sitio es buena.

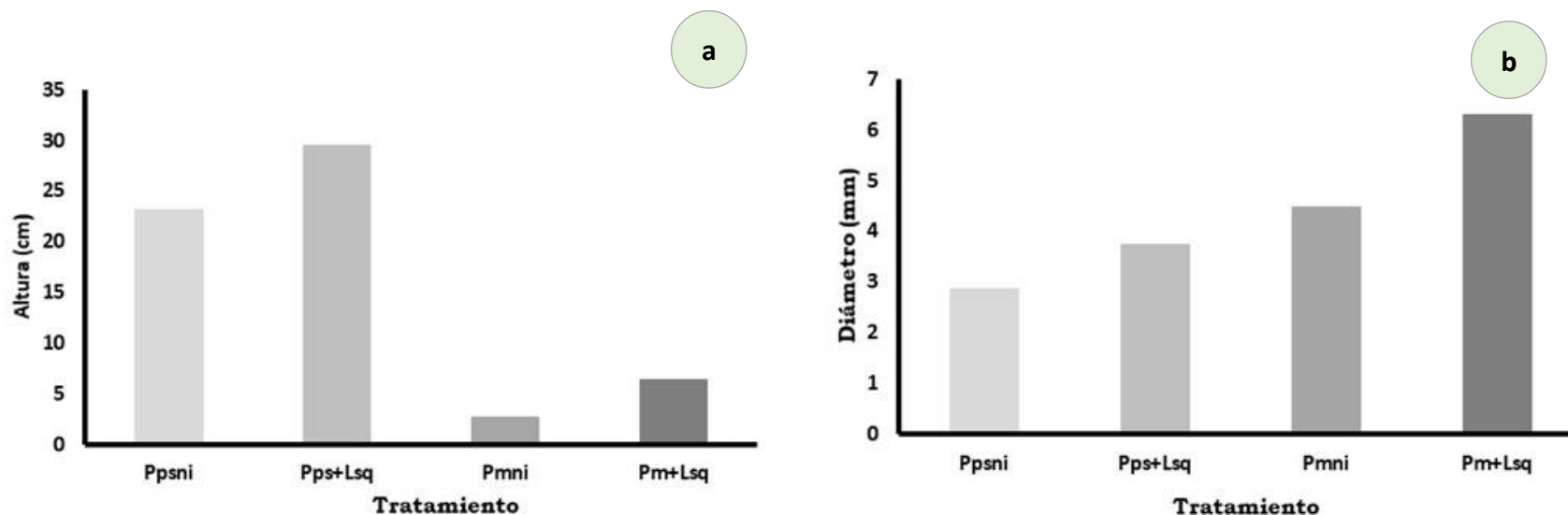


Figura 2.6. a) Altura de plantas de *Pinus pseudostrobus* no inoculadas (Ppsni), plantas de *P. pseudostrobus* inoculadas con *Laccaria squarrosa* (Pps+Lsq), plantas de *Pinus montezumae* no inoculadas (Pmni), plantas de *P. montezumae* inoculadas con *L. squarrosa* (Pm+Lsq); b) Diámetro de plantas de *Pinus pseudostrobus* no inoculadas (Ppsni), plantas de *P. pseudostrobus* inoculadas con *Laccaria squarrosa* (Pps+Lsq), plantas de *Pinus montezumae* no inoculadas (Pmni), plantas de *P. montezumae* inoculadas con *L. squarrosa* (Pm+Lsq).

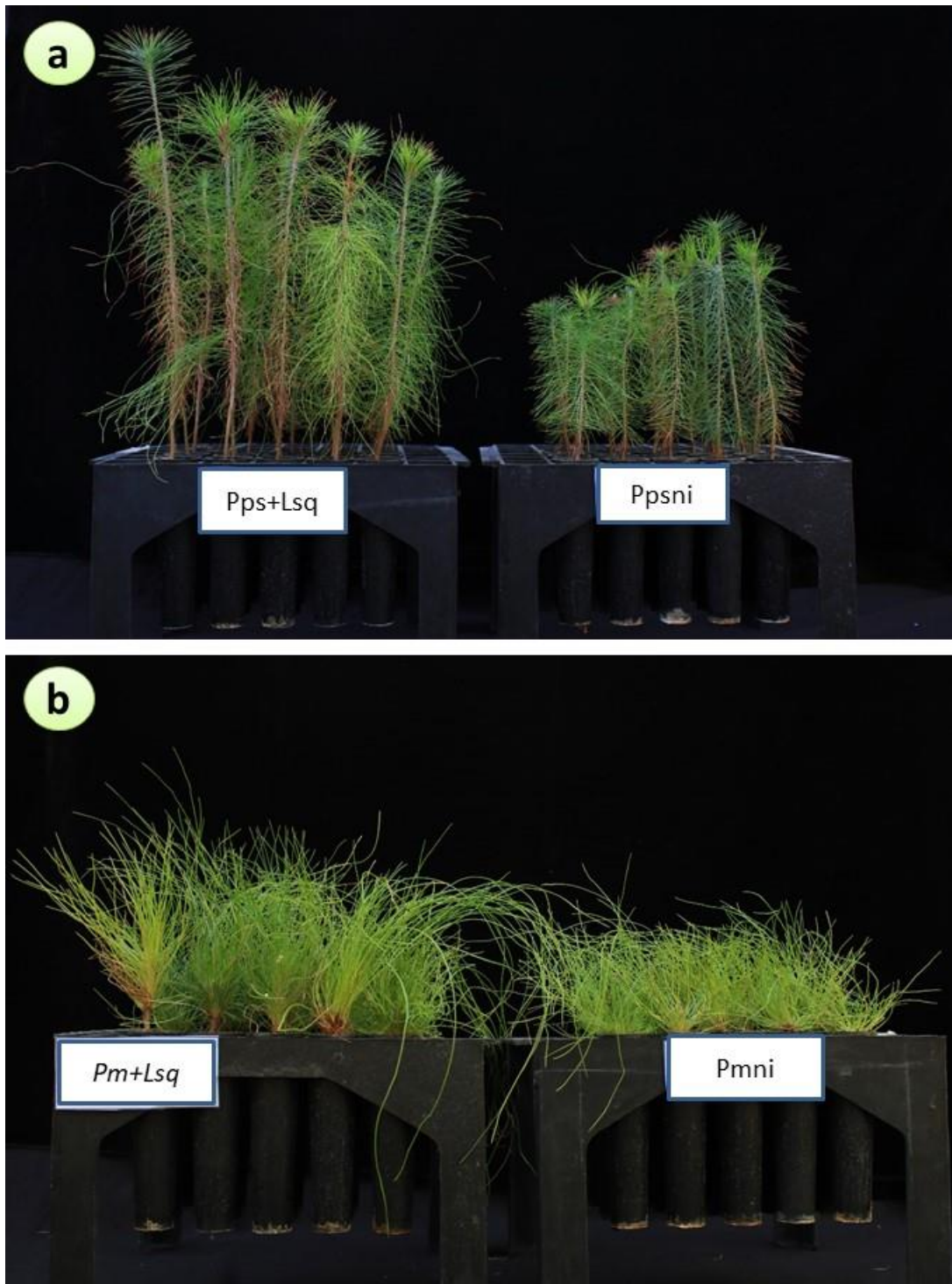


Figura 2.7. a) Crecimiento de la parte aérea de *Pinus pseudostrobus* inoculadas con *Laccaria squarrosa* (Pps+Lsq) y plantas de *Pinus pseudostrobus* no inoculadas (Ppsni); b) Crecimiento de la parte aérea de *Pinus montezumae* inoculadas con *Laccaria squarrosa* (Pm+Lsq) y plantas de *Pinus montezumae* no inoculadas (Pmni).

2.5.2 Contenido nutrimental

2.5.2.1 Macronutrientes

El contenido de macronutrientes de las plantas inoculadas en cualquiera de las dos especies de pinos fue mayor, tanto en la parte aérea, radical y total comparado con las plantas no inoculadas (Cuadro 2.2). En los contenidos totales se encontraron en mayor proporción N, K y Ca y en menor cantidad P. Al comparar las dos especies de pino, las mayores concentraciones fueron para *P. montezumae* tanto en la parte aérea, radical y total con respecto a *P. pseudostrobus* (Figura 2.8)

Cuadro 2.2. Contenido de macronutrientes de la parte aérea, radical y total de plantas de *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae* inoculadas o no con *Laccaria squarrosa*, 22 meses después de la siembra.

Tratamiento / Macronutriente (mg planta-1)	<i>P. pseudostrobus</i> - <i>L. squarrosa</i> (Pps+Lsq)	Plantas no inoculadas (Ppsni)	<i>P. montezumae</i> - <i>L. squarrosa</i> (Pm+Lsq)	Plantas no inoculadas (Pmni)
N				
Aérea	19.25 ± 2.12 a	10.41 ± 4.53 b	25.89 ± 9.82 a	6.62 ± 2.67 b
Raíz	15.00 ± 0.18 a	6.22 ± 2.40 b	19.79 ± 8.10 a	5.77 ± 4.10 b
Total	34.25 ± 1.98 a	16.63 ± 6.73 b	45.68 ± 13.41 a	12.39 ± 4.91 b
P				
Aérea	3.50 ± 0.38 a	1.92 ± 0.83 b	3.83 ± 1.45 a	0.97 ± 0.39 b
Raíz	1.62 ± 0.02 a	0.79 ± 0.30 b	2.69 ± 1.10 b	0.85 ± 0.60 b
Total	5.12 ± 0.37 a	2.72 ± 1.11 b	6.53 ± 1.92 a	1.82 ± 0.72 b
K				
Aérea	17.50 ± 1.93 a	13.14 ± 5.72 a	21.41 ± 8.12 a	6.51 ± 2.62 b
Raíz	5.88 ± 0.07 a	2.39 ± 0.92 b	5.62 ± 2.30 a	2.55 ± 1.81 b
Total	23.38 ± 1.87 a	15.54 ± 6.54 b	27.04 ± 8.68 a	9.07 ± 3.20 b
Ca				
Aérea	6.12 ± 0.67 a	5.12 ± 2.23 a	14.06 ± 5.33 a	5.10 ± 2.05 b
Raíz	17.64 ± 0.21 a	9.68 ± 3.73 b	22.49 ± 9.20 a	8.05 ± 5.71 b
Total	23.77 ± 0.51 a	14.81 ± 5.79 b	36.56 ± 11.14 a	13.15 ± 6.08 b
Mg				
Aérea	5.54 ± 0.61 a	4.80 ± 2.09 a	10.23 ± 3.88 a	3.36 ± 1.35 b
Raíz	6.28 ± 0.07 a	3.19 ± 1.23 b	7.42 ± 3.03 a	3.03 ± 2.15 b
Total	11.82 ± 0.55 a	8.00 ± 3.22 b	17.65 ± 5.18 a	6.39 ± 2.55 b
S				
Aérea	5.25 ± 0.58 a	3.52 ± 1.53 b	5.11 ± 1.94 a	1.41 ± 0.56 b
Raíz	3.04 ± 0.03 a	1.42 ± 0.54 b	3.59 ± 1.47 a	1.23 ± 0.87 b
Total	8.29 ± 0.55 a	4.94 ± 2.03 b	8.71 ± 2.56 a	2.64 ± 1.04 b
Na				
Aérea	12.54 ± 1.38 a	6.09 ± 2.65 b	6.07 ± 2.30 a	1.51 ± 0.61 b
Raíz	4.66 ± 0.05 a	2.57 ± 0.99 b	12.37 ± 5.06 a	5.59 ± 3.96 b
Total	17.20 ± 1.34 a	8.66 ± 3.55 b	18.44 ± 5.79 a	7.10 ± 4.01 b

Los valores representan promedios ± desviación estándar n=6. Valores con la misma letra en cada fila por especie de pino son iguales de acuerdo con Tukey (p≤0.05).

2.5.2.2 Micronutrientes

Al igual que en los macronutrientes los datos obtenidos son mayores en las especies de pinos inoculados en los micronutrientes en la parte aérea, radical y total, en contraste con los pinos no inoculados (Cuadro 2.3).

En cuanto al contenido total de nutrimentos *P. montezumae* presento mayor contenido en casi todos los micronutrientes evaluados, excepto en Mo donde *P. pseudostrobus* fue mayor. El micronutriente que estuvo más presente en cualquiera de las dos especies es Fe. De acuerdo a lo anterior, los pinos inoculados de cualquier especie tuvieron la capacidad para absorber los nutrientes del suelo y a su vez translocarlos a la parte aérea en comparación con los pinos no inoculados (Figura 2.8).

Cuadro 2.3. Contenido de micronutrientes de la parte aérea, radical y total de plantas de *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae* inoculadas o no inoculadas, con *Laccaria squarrosa*, 22 meses después de la siembra.

Tratamiento / Micronutriente (mg planta ⁻¹)	<i>P.</i> <i>pseudostrobus</i> - <i>L. squarrosa</i> (Pps+Lsq)	Plantas no inoculadas (Ppsni)	<i>P. montezumae</i> - <i>L. squarrosa</i> (Pm+Lsq)	Plantas no inoculadas (Pmni)
Fe				
Aérea	0.198 ± 0.02 a	0.119 ± 0.05 b	0.225 ± 0.08 a	0.113 ± 0.04 b
Raíz	2.610 ± 0.03 a	1.624 ± 0.62 b	4.762 ± 1.94 a	1.476 ± 1.04 b
Total	2.809 ± 0.02 a	1.743 ± 0.67 b	4.987 ± 1.96 a	1.590 ± 1.04 b
Zn				
Aérea	0.081 ± 0.00 a	0.059 ± 0.02 a	0.317 ± 0.12 a	0.093 ± 0.03 b
Raíz	0.120 ± 0.00 a	0.081 ± 0.03 b	0.153 ± 0.06 a	0.063 ± 0.04 b
Total	0.202 ± 0.00 a	0.141 ± 0.05 b	0.470 ± 0.14 a	0.157 ± 0.05 b
Mn				
Aérea	0.653 ± 0.05 a	0.510 ± 0.28 a	0.671 ± 0.25 a	0.188 ± 0.07 b
Raíz	0.190 ± 0.00 a	0.179 ± 0.07 a	0.463 ± 0.19 a	0.148 ± 0.10 b
Total	0.844 ± 0.05 a	0.689 ± 0.35 a	1.134 ± 0.33 a	0.337 ± 0.13 b
Cu				
Aérea	0.010 ± 0.00 a	0.004 ± 0.00 b	0.015 ± 0.00 a	0.005 ± 0.00 b
Raíz	0.018 ± 0.00 a	0.011 ± 0.00 b	0.083 ± 0.03 a	0.011 ± 0.00 b
Total	0.029 ± 0.00 a	0.015 ± 0.00 b	0.099 ± 0.03 a	0.017 ± 0.00 b
B				
Aérea	0.094 ± 0.01 a	0.075 ± 0.03 a	0.095 ± 0.03 a	0.031 ± 0.01 b
Raíz	0.059 ± 0.00 a	0.031 ± 0.01 b	0.074 ± 0.03 a	0.025 ± 0.01 b
Total	0.153 ± 0.01 b	0.106 ± 0.04 b	0.169 ± 0.05 a	0.057 ± 0.02 b
Ni				
Aérea	0.001 ± 0.00 a	0.000 ± 0.00 b	0.001 ± 0.00 a	0.000 ± 0.00 b
Raíz	0.003 ± 0.00 a	0.002 ± 0.00 b	0.006 ± 0.00 a	0.002 ± 0.00 b
Total	0.005 ± 0.00 a	0.003 ± 0.00 b	0.007 ± 0.00 a	0.002 ± 0.00 b
Mo				
Aérea	0.001 ± 0.00 a	0.000 ± 0.00 b	0.000 ± 0.00 a	0.000 ± 0.00 b
Raíz	0.001 ± 0.00 a	0.001 ± 0.00 a	0.002 ± 0.00 a	0.001 ± 0.00 a
Total	0.002 ± 0.00 a	0.001 ± 0.00 a	0.002 ± 0.00 a	0.001 ± 0.00 a

Los valores representan promedios ± desviación estándar n=6. Los valores con la misma letra en cada fila por especie de pino son iguales de acuerdo a Tukey (p≤0.05)



Figura 2.8 a) Diferencia de biomasa aérea y radical de *Pinus pseudostrobus* inoculadas con *Laccaria squarrosa* (Pps+Lsq) y plantas no inoculadas (Pni); b) Diferencia de biomasa aérea y radical de *P. montezumae* en su estadio cespitoso con abundante biomasa aérea (Pm+Ls) en comparación con las plantas sin inocular (Pni).

2.5.3 Colonización micorrízica y caracterización macro y micro morfológica de los morfotipos

Los porcentajes de raíces cortas ectomicorrizadas en las plantas inoculadas con *L. squarrosa* fueron cercanos al 100% en ambas especies de pinos. *P. montezumae* presentó una colonización de 98.7% y *P. pseudostrobus* con un porcentaje de 95.7 (Figura 2.9).

Se presentó un mayor número de raíces cortas en las plantas inoculadas con respecto a las plantas sin inocular, para ambas especies de fitobiontes. *P. montezumae* tuvo una diferencia significativa. Por otro lado, al comparar las dos especies de pino, se registró un mayor número de raíces cortas totales en *P. montezumae* con un promedio de 2804 raíces, mientras que *P. pseudostrobus* presentó con 2509 raíces cortas totales (Cuadro 2.4).

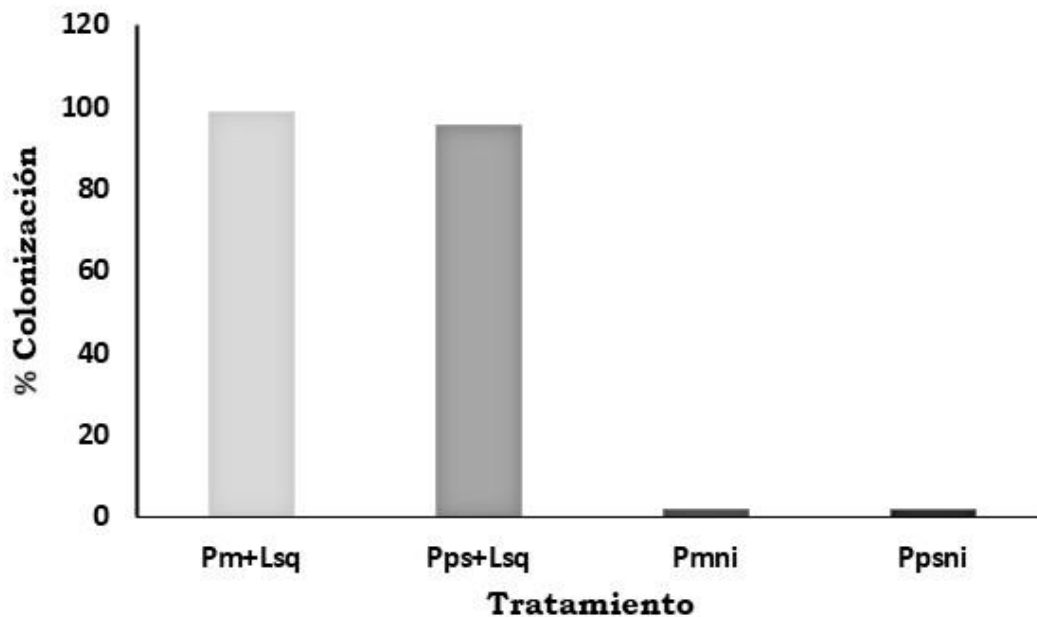


Figura 2.9. Porcentaje de colonización de *Pinus montezumae* (Pm+Lsq) y *Pinus pseudostrobus* (Pps+Lsq) inoculadas con *Laccaria squarrosa* comparado con (Pmni) Plantas *P. montezumae* no inoculadas y (Ppsni) Plantas *P. pseudostrobus* no inoculadas 22 meses después de la siembra. Valores promedio \pm desviación estándar n=3.

Cuadro 2.4. Porcentaje de colonización micorrízica y promedio de raíces cortas vivas y muertas micorrizadas y no micorrizadas en plantas de *Pinus pseudostrobus* y *Pinus montezumae* inoculadas o no, con *Laccaria squarrosa*, 22 meses después de la siembra.

Tratamiento	% Colonización	Raíces cortas vivas		Raíces cortas muertas		TOTAL
		Micorrizadas	No Micorrizadas	Micorrizadas	No Micorrizadas	
Pps+Lsq	95.7 a	1839 ± 980 a	22 ± 16 b	557 ± 417 a	90 ± 92 b	2509 ± 659 a
Ppsni	1.9 b	24 ± 14 b	1703 ± 536 a	16 ± 13 b	624 ± 212 a	2368 ± 704 a
Pm+Lsq	98.7 a	2088 ± 198 a	21 ± 7 b	682 ± 254 a	12 ± 7 b	2804 ± 62 a
Pmni	1.9 b	20 ± 8 b	1536 ± 475 a	8 ± 5 b	54 ± 65 b	1620 ± 492 b

Los valores representan promedios ± desviación estándar n=3. Los valores con la misma letra en cada columna son iguales de acuerdo con Tukey (p≤0.05); Pps+Lsq = *P. pseudostrobus* inoculado con *L. squarrosa*; Ppsni = plantas *P. pseudostrobus* no inoculadas; Pm+Lsq = *P. montezumae* inoculados con *L. squarrosa*; Pmni = plantas *P. montezumae* no inoculadas.

Las características morfoanatómicas de las ectomicorrizas registradas fueron para *P. pseudostrobus* inoculadas con *L. squarrosa* presento morfotipos con ramificación simple a dicotómica, con una longitud de 0.3 a 2.5 mm. En su etapa juvenil presentaron superficie de color miel con ápice blanquecino (Figura 2.10e), y en la etapa adulta se tornaron a marrón dorado con ápices color miel y terminación cilíndrica (Figura 2.10c). La red de Hartig se extendió dentro de la raíz penetrando una capa de células corticales y presencia de manto plectenquimatoso (Figura 2.10d).

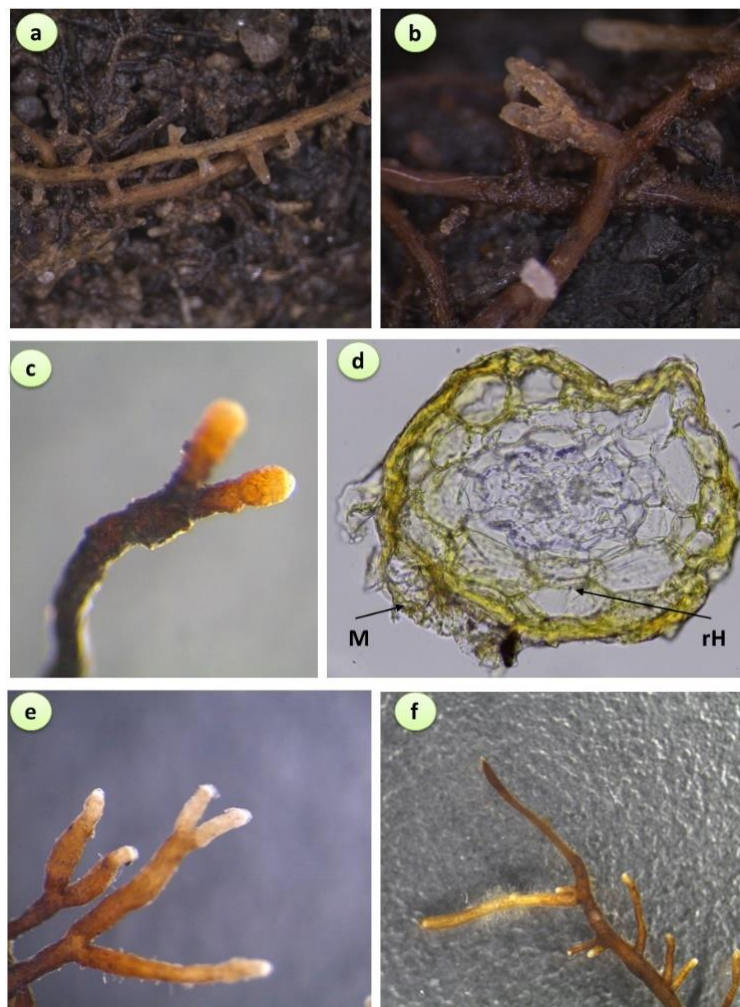


Figura 2.10. Raíces cortas ectomicorrizadas de *Pinus pseudostrobus*. a y b) Raíces cortas micorrizadas de *Laccaria squarrosa* vista a 0.63X; c) Morfotipo maduro de coloración ocre a café obscuro visto a 3.2X; d) Corte histológico transversal de raíz colonizada presentando estructuras diagnósticas como red de Hartig (rH) y manto (M) vista a 40X; e) Morfotipo en estadio juvenil de *L. squarrosa* con coloración ocre y en el ápice color blanquecino vista a 1.60X; f) Raíces cortas de una planta sin inocular con presencia de pelos radicales, vista a 0.63X.

Las raíces cortas ectomicorrizadas de *P. montezumae* inoculadas con *Laccaria squarrosa* tuvieron ramificación simple o dicotómica, cuya longitud fue de 0.5 a 3.8 mm. En etapa juvenil presentaron superficie de color café claro con ápice blanquecino (Figura 2.11c), y en la etapa adulta se tornaron marrón con ápices amarillentos a marrón dorado y terminación cilíndrica (Figura 2.11d). La red de Hartig se extendió dentro de la raíz penetrando dos capas de células corticales y manto plectenquimatoso.

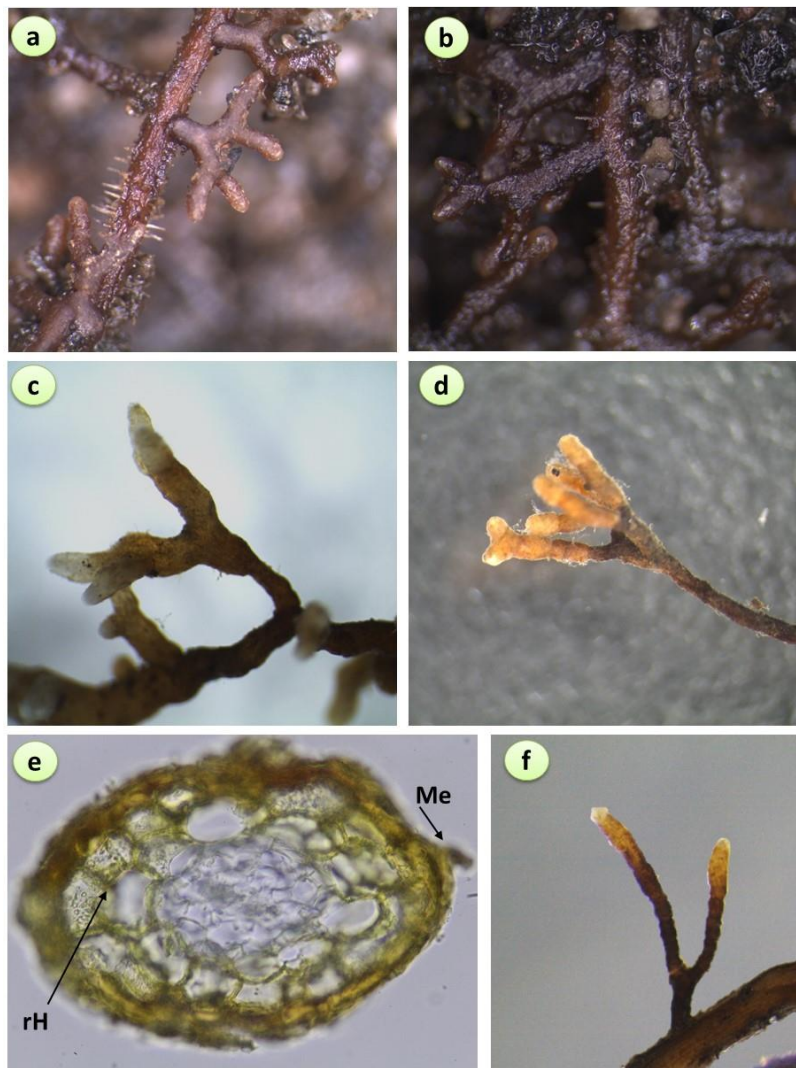


Figura 2.11. Ectomicorrizas de *Pinus montezumae* (Pm) inoculadas con *Laccaria squarrosa* (Lsq). a y b) Micorrizas de Lsq con Pm, aun con presencia de pelos radicales, vista a 1.25X y 1.6X, respectivamente; c) Morfotipo en estadio juvenil de Lsq, vista a 1.25X; d y f) Morfotipos maduros, visto a 1.6X y 2.25X, respectivamente) Corte transversal de la ectomicorriza con las estructuras diagnóstico: red de Harti (rH) y micelio externo (Me) vista a 40X.

2.6 DISCUSIÓN

2.6.1 Crecimiento vegetal

Las plantas inoculadas de ambas especies de pino tuvieron mayor peso seco total comparadas con las plantas no inoculadas, entre las especies de pino inoculadas, las plantas de *P. montezumae* registraron mayor peso seco total con respecto a *P. pseudostrobus*, lo cual concuerda con Ma *et al.* (2008) quienes mencionan que las micorrizas promueven el crecimiento del cuello de la raíz, mayor biomasa radical, aérea y total. *P. montezumae* es una especie cespitosa que invierte sus carbohidratos en el desarrollo de su raíz y su diámetro; y posteriormente en el crecimiento de la parte aérea; en contraste *P. pseudostrobus* desarrolla la parte aérea y parte radical en una proporción similar, por lo que estas dos especies no pueden ser comparados en términos de diámetro y altura en sus estadios tempranos. Se han realizado diferentes estudios en México con respecto al crecimiento vegetal de plantas ectomicorrizadas donde en la mayoría de las veces las plantas inoculadas presentaron mayor crecimiento vegetal en comparación con las plantas no inoculadas (Pérez-Moreno *et al.*, 2020).

2.6.2 Análisis nutrimental

Zhang *et al.* (2019) mencionan que los hongos ectomicorrízicos asociados con las raíces de las plantas juegan un papel importante para facilitar la absorción de nutrientes por parte de las plantas. Los árboles ectomicorrízicos obtienen nitrógeno (N) del suelo a través de la absorción directa de la rizosfera por las raíces finas, pero también a través del micelio extramatricial de los hongos ectomicorrízicos, por lo cual se vuelve fundamental la asociación de las plantas con los hongos ectomicorrízicos. Quoreshi y Khasa (2008) sugieren que el incremento en el crecimiento del fitobionte por hongos ectomicorrízicos parece estar directamente relacionado con la producción de un sistema radical relativamente eficiente, así como una capacidad eficiente en la utilización de los nutrientes por las plantas micorrizadas, lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo por el contenido nutrimental de las plantas

inoculadas y por el número de raíces que se encontraron en las especies de pino ectomicorrizadas.

Carrasco-Hernández *et al.* (2011) evaluaron el efecto de la inoculación en el contenido de nutrientes de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* en *P. patula* y *P. pseudostrobus*, donde observaron un mayor contenido de N, P y K, este estudio obtuvo los mismos resultados además del contenido de Ca; lo que demuestra que una especie inoculada puede absorber y translocar nutrimentos tanto a la raíz como a la parte aérea de ambas especies estudiadas; a su vez Hernández-Santiago (2016) evaluó el efecto de la inoculación con el hongo ectomicorrízico *L. trichodermophora* en el crecimiento, contenido de macro (N, P, K, Ca y Mg) y micronutrimentos (Fe, Cu, Zn y Mn) en *P. oaxacana* y *Q. castanea*. Los resultados indicaron que el contenido total de macro y micronutrimentos fueron mayores en las plantas inoculadas. En el caso del nitrógeno (N), los incrementos observados son de gran significancia ecofisiológica, debido a que es un elemento limitante en los ecosistemas forestales templados, presente principalmente de forma orgánica (Read y Pérez-Moreno, 2003); así mismo, Méndez *et al.* (2011) reportan que las plantas inoculadas con hongos ectomicorrízicos tienen incrementos superiores en términos de producción de biomasa, porcentaje de colonización y contenido de N; lo que concuerda con esta investigación, donde ambas especies de pino obtuvieron mayor contenido en comparación a las plantas sin inocular. En el presente estudio también se observó un mayor contenido de N, comprobando la alta eficiencia del género *Laccaria* de absorber los nutrimentos del suelo a través de la raíz y translocarlo a la parte aérea de las plantas inoculadas.

Arteaga-León *et al.* (2019) evaluaron el efecto de la inoculación micorrízica sobre el crecimiento y contenido nutricional de *P. ayacahuite* utilizando dos hongos ectomicorrízicos comestibles, después de 2 años se presentaron mayores concentraciones de N, P, Ca, Mg y Fe en los brotes de las plantas inoculadas en comparación con las plantas no inoculadas; en el presente estudio al evaluar un

mayor número de macro y micronutrientes se observó mayor concentración de N, K, Ca, Fe, Ma y B, para beneficio de los fitobiontes asociados.

Zhang *et al.* (2018) reportan que en el bosque boreal la reabsorción de P fue un 76% mayor para los árboles ectomicorrizicos en comparación con los arbusculares. En los subtrópicos los árboles arbusculares recibieron 30% más N que los ectomicorrizicos, y en los bosques templados los árboles ectomicorrizados absorbieron 15% más N que los árboles arbusculares; esto nos indica que una planta al estar colonizada obtiene mayor absorción de nutrientes dependiendo del ecosistema en el que se encuentre, permitiendo así su desarrollo.

2.6.3 Colonización ectomicorrízica

La inoculación con hongos silvestres comestibles en *P. montezumae* se ha realizado con especies de los géneros *Laccaria* como *L. laccata*, (Villegas, 2014) *L. trichodermophora*, (Galindo-Flores *et al.*, 2015; Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2017) *L. bicolor* (Santiago-Martínez *et al.*, 2003; Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2017) y *L. próxima* (Carrasco-Hernández *et al.*, 2010); con el género *Hebeloma* a *H. mesophaeum* (Villegas, 2014; Barragán-Soriano *et al.*, 2018) y *H. leucosarx*, (Villegas-Olivera *et al.*, 2017) y para *Suillus* con *S. tomentosus* (Galindo-Flores *et al.*, 2015); A su vez la inoculación de *P. pseudostrobus* se ha realizado con las especies de *L. laccata*, (Méndez, 2007; Carrasco-Hernández *et al.*, 2011; Ramírez, 2017) *L. proxima* (Carrasco-Hernández *et al.*, 2011; Jiménez, 2011) y *L. bicolor*, (Pérez-Moreno *et al.*, 2009; Carrasco-Hernández *et al.*, 2011) además de *Hebeloma alpinum*, (Carrasco-Hernández *et al.*, 2011) *H. leucosarx*, (Carrasco-Hernández *et al.*, 2011) y *H. mesophaeum*, (Méndez, 2007; Pérez-Moreno *et al.*, 2009; Carrasco-Hernández *et al.*, 2011; Heredia, 2011) y con la especie de *Suillus pseudobrevipes*, (Méndez, 2007; Pérez-Moreno *et al.*, 2009; Flores-Armas, 2017) obteniéndose en todos los casos una micorrización alta, sin embargo, el presente trabajo obtuvo una micorrización cercana al 100% con la inoculación de *L. squarrosa*.

Desde hace tiempo se ha reconocido que las especies de *Laccaria* son importantes asociados ectomicorrízicos de plantas en todo el mundo (Mueller 1992). En México, los reportes de la diversidad del género *Laccaria* incluyen alrededor de 17 especies, y en algunos casos se ha documentado la comestibilidad y uso de estas especies como alimento (Montoya *et al.*, 1987; Cifuentes *et al.*, 1990; Pérez-Silva *et al.*, 2006; Garibay-Origel *et al.*, 2009). La especie utilizada en la presente investigación se desarrolla en el predio forestal de Piedra Canteada y es consumida por algunos habitantes del poblado de San Felipe Hidalgo, municipio de Nanacamilpa en el estado de Tlaxcala; la denominan “chupirul” por el gran tamaño que puede tener. *L. squarrosa* es una especie descrita recientemente, solo se conocía en su localidad tipo, donde se asocia con *Fagus grandifolia* var. mexicana (Ramos *et al.*, 2017). Un reporte adicional es en un mercado en el oeste de México, donde fue identificada como especie rara por Farfán-Heredia *et al.* (2018) sin saber el tipo de vegetación ni el lugar donde se recolectaron los esporomas.

Un estudio reciente describió la ectomicorriza de *L. squarrosa* con *P. pseudostrobus* en condiciones naturales confirmando la identidad taxonómica de ambos simbiontes con análisis molecular. y sugieren que *L. squarrosa* podría ser una especie generalista que puede asociarse con angiospermas o gimnospermas (Herrera *et al.*, 2022); en la presente investigación se asoció con *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, sin embargo en la zona de recolección de esporomas se desarrollan árboles de *Abies religiosa*, *P. teocote*, *P. montezumae* y *Quercus* spp., por lo que se registra por primera vez la comestibilidad y la asociación simbiótica y caracterización de la ectomicorriza de *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* con el hongo ectomicorrízico comestible *L. squarrosa* en condiciones de invernadero con características similares al estudio donde se reporta por primera vez a la micorriza de *L. squarrosa*.

La sólida confirmación del establecimiento de la simbiosis ectomicorrízica entre *L. squarrosa* con *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* con evidencia

científica, abre un camino a futuras investigaciones biotecnológicas para mejorar el manejo forestal sostenible en el área de estudio.

Además de considerar a *L. squarrosa* en la producción de inoculantes pioneros en la producción de planta ya no solo de *P. pseudostrobus* sino también con *P. montezumae* es una perspectiva real como se ha demostrado previamente para otras especies de *Laccaria*. relacionadas filogenéticamente (Pérez Moreno *et al.*, 2020). Al hacerlo se espera que se pueda proteger la especie y el ecosistema forestal mediante la promoción de la producción eficiente de planta y la reforestación exitosa.

Entre los estándares que determinan la producción de planta en vivero tradicionalmente se han considerado exclusivamente las características morfológicas y fisiológicas de las plantas (Vicente-Arbona *et al.*, 2019), sin tomar en cuenta la importancia de la ectomicorrización. Sin embargo, uno de los criterios más importantes para la adaptación de las especies forestales en campo es la selección adecuada de micobiontes (Perez-Moreno y Martinez-Reyes, 2014). La promoción del crecimiento vegetal y la producción de biomasa en Pináceas han sido reportadas previamente como consecuencia de la inoculación ectomicorrízica. Entre los hongos ectomicorrízicos comestibles que se han utilizado como fuente de inóculo se han incluido previamente especies del género *Laccaria* (Pera y Parlade, 2005), las cuales son generalistas, pioneras, comestibles, relativamente fácil de identificar taxonómicamente, con abundante cantidad y precio accesible en los mercados de venta del centro de México; Por ello se considera que *L. squarrosa* es una especie con gran potencial para ser utilizada en la micorrización de *P. montezumae* y *P. pseudostrobus*, ya que se obtuvieron porcentajes de colonización cercanas al 100%, y puede utilizarse para los programas de reforestación en el país.

2.7 CONCLUSIONES

Se reporta por primera vez el efecto benéfico de la inoculación ectomicorrízica de *L. squarrosa* sobre el crecimiento, fisiología y contenido nutrimental de *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*.

Las plantas *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* inoculadas con *Laccaria squarrosa* presentaron mayor biomasa seca y crecimiento vegetal, en comparación con las plantas sin inocular.

Las dos especies de pino inoculadas presentaron porcentajes de colonización ectomicorrízica cercanas a 100%.

La sólida confirmación del establecimiento de simbiosis ectomicorrízica entre *L. squarrosa* con *P. pseudostrobus* y *P. montezumae* con evidencia biotecnológica abre un camino a futuras investigaciones biotecnológicas para mejorar el manejo forestal sostenible en el área de estudio.

Además de considerar a *L. squarrosa* en la producción de inoculantes pioneros en la producción de planta no solo de *P. pseudostrobus* sino también con *P. montezumae* es una perspectiva real como se ha demostrado previamente para otras especies de *Laccaria* relacionadas filogenéticamente (Pérez Moreno *et al.*, 2020). Al hacerlo se espera que se pueda proteger la especie y el ecosistema forestal en peligro de extinción mediante la promoción de la producción eficiente de planta y la reforestación exitosa.

Se documenta por primera ocasión, en términos morfológicos, la caracterización de los morfotipos de la ectomicorriza y el efecto de la inoculación del hongo comestible ectomicorrízico *L. squarrosa* en las especies *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*.

CONCLUSIONES GENERALES

Se describe una nueva especie de *Xerocomellus* denominada *Xerocomellus piedracanteadensis* del centro de México que crece en bosques de *Pinus-Quercus* y *Abies-Pinus-Quercus*.

Xerocomellus bolinii, previamente documentado en Florida, EE. UU., se registra en México, ampliando su distribución y rango altitudinal, desde 150 m en las áreas donde se conoce hasta 2500 m en México.

Ambas especies se consumen localmente en el área de estudio, lo que enriquece el patrimonio micocultural mundial de los hongos silvestres comestibles conocidos.

Se documenta por primera ocasión, en términos morfológicos, la caracterización de los morfotipos de la ectomicorriza y el efecto de la inoculación del hongo silvestre comestible ectomicorrízico *L. squarrosa* en las especies *P. pseudostrobus* y *P. montezumae*. Las plantas inoculadas presentaron un alto porcentaje de colonización por *L. squarrosa*, así como incrementos significativos en biomasa de parte aérea, raíz y contenido de macro y micronutrientes, respecto a las plantas no inoculadas.

Este campo biotecnológico de investigación proporciona pruebas convincentes de una relación positiva entre la biodiversidad y el funcionamiento del ecosistema al brindar diferentes beneficios mutuamente.

El conocimiento generado en la presente investigación es de gran interés, enorme importancia ecológica y gran potencial biotecnológico del recurso micológico en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas forestales estudiados.

LITERATURA CITADA

- Agerer, R. 1991. Characterization of ectomycorrhizae. *Methods in Microbiol.* 23: 25-73.
- Ariyawansa, H. A., Hyde, K. D., Jayasiri, S. C. *et al.* 2015. Fungal diversity notes 111–252 taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Diversity*. 75: 27–274.
- Argüelles-Moyao, A., Garibay-Orijel, R. 2018. Ectomycorrhizal fungal communities in high mountain conifer forests in central México and their potential use in the assisted migration of *Abies religiosa*. *Mycorrhiza*. 28: 509-521.
- Arteaga-León, C. 2014. Ectomicorrización con hongos de la sierra Nevada, México en el crecimiento y movilización nutrimental de *Pinus ayacahuite* Ehrenb. Ex Schltdl. Tesis de doctorado en Ciencias. Posgrado en Edafología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Montecillo. 118 p.
- Arteaga-León, C., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Victoria, D., Almaraz-Suárez, J. J., Silva-Rojas, H., Delgado-Alvarado, A. 2019. Ectomycorrhizal inoculation with edible fungi increases plant growth and nutrient contents of *Pinus ayacahuite*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 89: 1089-1099.
- Ashford, A. E., Allaway, W. G. 2002. The role of the motile tubular vacuole system in mycorrhizal fungi. *Plant and Soil*. 244: 177-187.
- Ayala-Sánchez, N., Soria-Mercado, I. E., Romero-Bautista, L., López-Herrera, M., Rico-Mora, R., Portillo-López, A. 2015. Los hongos agaricales de las áreas de encino del estado de Baja California, México. *Estudios en Biodiversidad*. 19. University of Nebraska. Lincoln. 315 pp.
- Ayala-Vásquez, O. 2021. Taxonomía, biogeografía y filogenia de los hongos del orden Boletales en la Sierra Norte de Oaxaca, México. Tesis de doctorado en Ciencias. Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria. Tamaulipas. 303 pp.
- Barragán-Soriano, JL., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, JJ. 2018. Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 24: 3–16.
- Barroetaveña, C., Bassani, N. V., Rajchenber, M. 2012. Inoculación micorrícica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimiento de las plántulas en vivero. *Bosque*. 33: 163-169.

- Brimecombe, M. J., Leij, F. A. A. M. D., Lynch, J. M. 2007. Rhizodeposition and microbial populations. In: Pinton, R., Varanini, Nannipieri, Z. P. Eds. *The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. Taylor and Francis Group. pp 73-110.
- Bonkowski, M., Villenave, C., Griffiths, B. 2009. Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant and Soil*. 321: 213-233.
- Bueno, C. G., Gerz, M., Zobel, M., Moora, M. 2019. Conceptual differences lead to divergent trait estimates in empirical and taxonomic approaches to plant mycorrhizal trait assignment. *Mycorrhiza*. 29: 1-11.
- Bueno, C. G., Moora, M., Gerz, M., Davison, J., Öpik, M., Pärtel, M., Helm, A., Ronk, A., Kühn, I., Zobel, M. 2017. Plant mycorrhizal status, but not type, shifts with latitude and elevation in Europe. *Global Ecology and Biogeography* 26: 690-699.
- Burrola-Aguilar, C., Garibay, O. R., Hernández, T. M. 2012. Los hongos comestibles silvestres del estado de México: propuesta para su aprovechamiento. In Sánchez, V. J. E., G. Mata Eds. *Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica*. Tapachula. pp.39-52.
- Carballo-Sánchez, M. P., Alarcón, A., Pérez-Moreno, J., Ferrera-Cerrato, R. 2022. Agricultural and forestry importance of microorganism-plant symbioses: a microbial source for biotechnological innovations. *Agricultural Science*. 10: 344-355.
- Carranza-Díaz, Z. 2006. Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo. Tesis de maestría en Ciencias. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Hidalgo. 110p.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J., Quintero-Lizaola, R., Torres-Aquino, M. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1: 567-577.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suarez, J. J., Quintero-Lizaola, R., Torres-Aquino, M. 2011. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural*. 84: 83-96.
- Castree, N. 2003. Bioprospecting: from theory to practice (and back again). *Transactions of the Institute of British Geographers*. 28: 35-55.

- Cifuentes, J., Villegas, M., Pérez-Ramírez, L., Bulnes, M., Corona, V., González, M. R., Jiménez, I., Pompa, A., Vargas, G. 1990. Observaciones sobre la distribución, hábitat e importancia de los hongos en Los Azufres, Michoacán. *Revista Mexicana de Micología*. 6: 133–149.
- Comandini, O., Rinaldi, C. A., Kuype, W. T. 2012. Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity a continuous challenge. In: *Mycorrhiza: Occurrence in Natural and Restored Environments*. (Eds.). Nova Science Publishers. New York. pp 165-200.
- CONAFOR, (Comisión Nacional Forestal). 2001. *Pinus pseudostrobus*. México. Disponible en <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/969Pinus%20pseudostrobus.pdf> (Consulta 1 de noviembre de 2022).
- CONAFOR, (Comisión Nacional Forestal). 2007. *Pinus montezumae*. Ficha técnica para la reforestación. 7 p.
- CONAFOR (Comisión Nacional Forestal). 2010. Prácticas de reforestación. Manual básico. Jalisco. 66 p.
- DEEMY. 2021. An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. Ludwig Maximilians, Universität München and Botanische Staatssammlung München. Munich. www.deemy.de (Consultado: octubre 9, 2022).
- Delgado, P., Salas-Lizana, R., Vázquez-Lobo, A., Wegier, A., Anzidei, M., Alvarez-Buylla, E. R., Vendramin, G. G., Piñero, D. 2007. Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb and *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Pinaceae): morphological and molecular (cpSSR) evidence. *International Journal of Plant Sciences*. 168: 861-875.
- Domínguez, D., Vázquez, H., Reyes, B. G., Arzaluz, J. I., Martínez, A. R. 2013. Aislamiento y purificación del hongo ectomicorrízico *Helvella lacunosa* en diferentes medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 16: 51-59.
- Duarte, O. 2006. La Bioprospección como mecanismo de cooperación para la construcción de capacidades endógenas en ciencia y tecnología y análisis de las capacidades de Colombia para adelantar procesos de bioprospección. Documento disponible en: https://web.archive.org/web/20070730061223/http://www.ocyt.org.co/esocite/Ponencias_ESOCITEPDF/CI2BRS073.pdf
- Farfán-Heredia, B., Casas, A., Rangel-Landa, S. 2018. Cultural, economic, and ecological factors influencing management of wild plants and mushrooms interchanged in Purépecha markets of Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 14: 56-68.

- Farid, A., Bessette, A. E., Bessette, A. R., Bolin, J. A., Kudzma, L. V., Franck, A. R., Garey J. R. 2021. Investigations in the boletes (Boletaceae) of southeastern USA: four novel species, and three novel combinations. *Mycosphere*. 12: 1038–1076.
- Farjon, A. 2017. *A Handbook of the world's conifers: Revised and Updated Edition*, 2nd ed. Brill. Leiden, Boston. pp. 765-768.
- Farjon, A., Styles. B. T. 1997. *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotropical Monograph*. New York Botanical Garden Press. New York. 291 p.
- Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Delgadillo-Martínez, Almaráz-Suárez, J. J., Pérez-Moreno, J. 2016. Los microorganismos rizosféricos y su impacto en la nutrición vegetal. In: Alcántara-González, G., Trejo-Téllez, L., Gómez-Merino, F. *Nutrición de cultivos*. Texcoco. pp. 423-439.
- Flores-Armas, L. 2017. Inoculación con el hongo ectomicorrízico comestible *Suillus pseudobrevipes* en *Pinus pseudostrobus* y *Pinus greggii*. Tesis de Biología. Instituto Tecnológico Superior de Perote, Veracruz. 67 p.
- Frank, J. L., Siegel, N., Schwarz, C. F., Araki, B., Vellinga, E. C. 2020. *Xerocomellus* (Boletaceae) in western North America. *Fungal systematics and Evolution*. 6: 265–288.
- Frandsen, P.B., Calcott, B., Mayer, C. Lanfear, R. 2015. Automatic selection of partitioning schemes for phylogenetic analyses using iterative k-means clustering of site rates. *Evolutionary Biology*. 15: 1–17.
- Galindo-Flores, G., Castillo-Guevara, C., Campos-López, A., Lara, C. 2015. Caracterización de las ectomicorizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences*. 93: 855-863.
- Gallant, D. 2009. La biopiratería y la bioprospección: Una nueva terminología para un problema antiguo. Documento disponible en: https://web.archive.org/web/20160304071717/http://www.redeverde.org/index.php?option=com_content&view=article&id=50&Itemid=0&lang=es. (Consulta 26 de febrero de 2023).
- Garibay-Orijel, R., Martínez-Ramos, M., Cifuentes, J. 2009. Disponibilidad de esporomas de hongos comestibles en los bosques de Pino-Encino de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80: 521–534.
- García-Rodríguez, J. L., Pérez-Moreno, J., Aldrete, A., Cetina-Alcalá, V, M., Vaquera-Huerta, H. 2006. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia*. 40: 665-676.

- Garza-Ocañas, F., García Jiménez, J., Guevara-Guerrero, G., Martínez-González, C. R., Ayala-Vásquez, O., de la Fuente, J. I. 2022. *Xerocomellus carmeniae* (Boletales, Basidiomycota), a new fungus from northeastern México. *Acta Botánica Mexicana*. 129: 2028-2039.
- Germandt, P. S., J. A. Pérez-de la Rosa. 2014. Biodiversidad de *Pinophyta* (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 126-133.
- Gómez-Romero, M., Villegas, J., Sáenz-Romero, C., Lindig-Cisneros, R. 2013. Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. *Madera y Bosques*. 19: 51-63.
- Guo, J., Ning, L., Zhaojie, C. 2020. Soil fungal assemblage complexity is dependent on soil fertility and dominated by deterministic processes. *New Phytologist*. 226: 232-243.
- Guzmán, G. 2008. Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*. 10: 209-217.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Herrera, M., Fu-Qiang, Y., Ramos-Rendon, D., Martínez-Reyes, M., Hernández-Santiago, F., Chater, C. C., Pérez-Moreno, J. 2022. Morphoanatomical and phylogenetic characterization of the ectomycorrhiza between *Laccaria squarrosa* with *Pinus pseudostrobus* and its relevance for reforestation programs. *Botanical Sciences*. 100: 397-411.
- Hernández-Santiago, F. 2016. Biotecnología, etnomicología y mesofauna asociada con hongos ectomicorrízicos comestibles en la Mixteca Oaxaqueña. Tesis de doctorado en Ciencias. Posgrado en Edafología Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Montecillo. 217p.
- Hogberg, M. N., Hogberg, P. 2002. Extramatrical ectomycorrhizal mycelium contributes one-third of microbial biomass and produces together with associated roots, half the dissolved organic carbon in a forest soil. *New Phytologist*. 154: 791-795.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. 2001. Mr. Bayes: Bayesian inference of phylogeny and Its impact on evolutionary biology. *Science*. 294: 2310-2314.
- Jiang, L., Huimin, W., Shengong, L. 2020. Mycorrhizal and environmental controls over root trait-decomposition linkage of woody trees. *New Phytologist*. 229: 284-295.

- Jiménez -Neri, M., Pérez-Moreno, J., Quintero-Lizaolo, R., Hernández-Acosta, E., Lara-Herrera, A. 2011. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* inoculado con tres hongos comestibles ectomicorrízicos. *Terra Latinoamericana*. 29: 73-81.
- Jiménez, R. M., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J. J., Torres-Aquino M. 2013. Hongos silvestres con potencial nutricional, medicinal y biotecnológico comercializados en Valles Centrales Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 4: 199-213.
- Kariman, K., Barker, S. J., Tibbett, M. 2019. Structural plasticity in root-fungal symbioses: diverse interactions lead to improved plant fitness. *Plant Biology*. 6: 38-52.
- Katoh, K., Standley, D. M. 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 772-780.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast fourier transform. *Nucleic Acids Research*. 30: 3059-3066.
- Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K. D. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*. 20: 1160-1166.
- Koizumi, T., Nara K. 2020. Ectomycorrhizal fungal communities in ice-age relict forests of *Pinus pumila* on nine mountains correspond to summer temperature, multidisciplinary. *Journal of Microbial Ecology*. 14: 189-201.
- Kornerup, A. Wanscher, J. H. 1978. *Methuen handbook of colors*, 3rd ed. Eyre Methuen, London. 348 p.
- Laird, S. A.; Wynberg, R. 2002. Institutional policies for biodiversity research. In: *Biodiversity and Traditional Knowledge. Equitable Partnerships in Practice*. Edited by Sarah A. Laird. London. pp 16-38.
- Lak, Z. A., Sandén, H., Mayer, M. 2020. Plasticity of root traits under competition for a nutrient-rich patch depends on tree species and possesses a large congruency between intra- and interspecific situations. *Forests*. 11: 512-528.
- Lanfear, R., Calcott, B., Kainer, D., Mayer, C., Stamatakis, A. 2014. Selecting optimal partitioning schemes for phylogenomic datasets. *Ecology and Evolution*. 14: 14-82.

- Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T., Calcott, B. 2016. Partition Finder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* 34: 772–773.
- Lodge, D. J., Ammirati, J. F., Dell, T. O., Mueller, G. M. 2004. Terrestrial and lignicolous macrofungi: Collecting and describing macrofungi. In: Mueller G, Bills GF and Foster MS (Eds) *Biodiversity of Fungi. Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press. London. pp. 128–158.
- Loizides, M., Bellanger, J. M., Assyov, B., Moreau, P. A. Richard, F. 2019. Present status and future of boletoid fungi (Boletaceae) on the island of Cyprus: cryptic and threatened diversity unravelled by ten-year study. *Fungal Ecology* 41: 65-81.
- Ma, L., Wu, X., Zheng, L. 2008. Mycorrhizal formation of nine ectomycorrhizal fungi on poplar cuttings. *Springer Link*. 3: 475-479.
- Maddison, W. P., Maddison, D. R. 2021. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.70. <http://mesquiteproject.org> (consulted may, 2022).
- Makarov, M. I. 2019. The role of mycorrhiza in transformation of nitrogen compounds in soil and nitrogen nutrition of plants: a review. *Eurasian Soil Science*. 52: 193-205.
- Martínez, L. B., Pugnaire, F. I. 2009. Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Ecosistemas*. 18: 44-54.
- Martínez-Reyes, M. 2010. Micorrización, crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* y *P. montezumae* inoculados con tres hongos comestibles. Tesis de doctorado en Ciencias. Posgrado en Edafología Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Montecillo. 180p.
- Martínez-Reyes, M., Pérez-Moreno, J., Villareal-Ruiz, L., Ferrera-Cerrato, R., Xoconostle-Cázares, B., Vargas-Hernández, J. J., Honrubia-García, M. 2012. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. Inoculado con el hongo comestibles ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. *Revista Chapingo serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 18: 183-192.
- Méndez, NM. 2007. Inoculación de pinos de importancia forestal útiles en restauración de áreas degradadas con hongos comestibles ectomicorrízicos. Tesis de Maestría en Ciencias. Postgrado en Edafología, Colegio de Postgraduados, Montecillo. Montecillo. 87 p.

- Montoya, L., Bandala, V. M., Guzmán, G. 1987. Nuevos registros de hongos del Estado de Veracruz, IV agaricales II (con nuevas colectas de Coahuila, Michoacán, Morelos y Tlaxcala). *Revista Mexicana de Micología*. 3: 83–107.
- Moreau, D., Bardgett, D. R., Finlay, R. D., Jones, L. D., Philippot, L. 2019. A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. *Functional Ecology*. 33: 540-552.
- Müller, K., Quandt, D., Müller, J., Neinhuis, C. 2005. PhyDE®-Phylogenetic data editor. Program distributed by the authors, versión 10.0. Available from: <https://www.phyde.de> (accessed 30 September 2021).
- Mueller, G. M. 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana Botany*. 30: 1-158.
- Nuhn, M. E., Binder, M., Taylor, A. F., Halling, R. E., Hibbett, D. S. 2013. Phylogenetic overview of the Boletineae. *Fungal Biology*. 117: 479-511.
- Ochoa-Hueso, R., Eldridge, D. J., Delgado-Baquerizo, M., Soliveres, S., Bowker, M. A., Gross, N., García-Gómez, M., Valencia, E., Arredondo, T., Beinticincinco, L., Coaguila, D., Dougill, A. J., Espinosa, C. I., Gaitán, J., Guuroh, R. T., Guzman, E., Gutiérrez, J. R., Hernández, R. M., Huber-Sannwald, E., Jeffries, T., Linstädter, A., Mau, R. L., Moneris, J., Prina, A., Pucheta, E., Stavi, I., Thomas, A. D., Zaady, E., Singh, B. K., Maestre F. T., Arredondo, T. 2018. Soil fungal abundance and plant functional traits drive fertile island formation in global drylands. *Journal of Ecology*. 106: 242-253.
- Ozgun, A., Gökşen, T. N., Ozlem, K., Isa, G. 2021. Green synthesis of silver nanoparticles using *armillaria mellea* and *Xerocomellus chrysenteron* extracts and evaluation of their antimicrobial and anticancer potentials. 3rd Eurasia biochemical approaches and technologies congress. Antalya, Turkey. 345 p.
- Pera, J., Parladé, J. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Departamento de protección vegetal*. 14:419-433.
- Perea-Estrada, V. M., Pérez-Moreno, J., Villarreal-Ruiz, L., Trinidad-Santos, A., Cetina-Alcalá, V. M., Tijerina-Chávez, L. 2009. Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32: 93-102.
- Pérez-Moreno, J., Read, D. J. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*. 29: 239-247.

- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Lorenzana-Fernández, A. 2009. Social and biotechnological of wild edible mushrooms in México, with emphasis in the Izta-Popo and Zoquiapan National Parks. *Acta Botanica Yunnanica*.16: 55–61.
- Pérez-Moreno, J., Lorenzana-Fernández, A., Carrasco-Hernández, V., Yescas-Pérez, A. 2010. Los hongos comestibles silvestres del parque nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACYT. Montecillo. 167p.
- Pérez-Moreno, J., Guerin-Laguette, A., Flores-Arzú, R., Yu, F. Q., Verbeken, A. 2020. Climate change, biotechnology, and Mexican Neotropical edible ectomycorrhizal mushrooms. In: *Mushrooms, humans and nature in a changing world: Perspectives from ecological, agricultural and social sciences*. Springer. Cham. Switzerland. pp. 61–99.
- Pérez-Moreno, J., Guerin-Laguette, A., Rinaldi, A. C., Yu, F-Q., Verbeken, A., Hernández-Santiago, F., Martínez-Reyes, M. 2021a. Edible mycorrhizal fungi of the world: What is their role in forest sustainability, food security, biocultural conservation and climate change? *Plants People Planet*. 3: 471–490.
- Pérez-Moreno, J., Mortimer, P. E., Xu, J., Karunarathna. S. C., Li, H. 2021b. Global perspectives on the ecological, cultural, and socioeconomic relevance of wild edible fungi. *Studies in Fungi*. 6: 408–424.
- Pérez-Silva, E., Esqueda, M., Herrera, T., Coronado, M. 2006. Nuevos registros de Agaricales de Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 77: 23–33.
- Pilz, D., Molina, R. 2002. Commercial harvests of edible mushrooms from the forests of the Pacific Northwest United States: issues, management, and monitoring for sustainability. *Forest Ecology Management*.155: 3-16.
- Powell-Jeff, R., Rillig-Matthias, C. 2019. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi and ecosystem function. *New phytologist*. 220: 1059-1075.
- Quoreshi, A. M., Khasa, D. P. 2008. Effectiveness of mycorrhizal inoculation in the nursery on root colonization, growth, and nutrient uptake of aspen and balsam poplar. *Biomass and Bioenergy*. 32: 381-391.
- Ramos, A., Bandala, V. M., Montoya, L. 2017. A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi, Basidiomycota) found in a relict forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *MycoKeys*. 27: 77-94.
- Ramos, D. B., Villaseñor, J.L., Ortiz, E., Gernandt, D. S. 2017. Biodiversidad, distribución y estado de conservación de la familia Pinaceae en Puebla, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 88: 215-223.

- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D., Drummond, A.J. 2014. Tracer v1.6. Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 30 September 2021).
- Rasouli-Sadaghiani, M. H., Barin, M., Khodaverdiloo, H., Siavash-Moghaddam, S., Damalas, A., Kazemalilou, S. 2018. arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria promote growth of Russian knapweed (*asciption repens* l.) in a cd-contaminated soil. *Journal of Plant Growth Regulation*. 36: 1-9.
- Read, D. J., Pérez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems a journey toward relevance. *New Phytologist Foundation*. 157: 475-492.
- Rodríguez-Franco, C. 1997. La silvicultura de *Pinus montezumae* Lamb. en a región central de México. *Ciencias Forestales en México*. 22: 81-115.
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Jacob-Cervantes, V. 2017. Mycorrhization of *Pinus montezumae* with simpatric and allopatric edible ectomycorrhizal species of *Laccaria* spp. In: Pérez-Moreno, J., Guerin-Laguette, A. Eds. *Mushrooms, humans and nature in a changing world, Proceedings of the 9th International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms (IWEMM9)* Colegio de Postgraduados and CONACYT, Texcoco. p 137.
- Rudawska, M., Wilgan, R., Janowski, D., Iwański, M., Leski, T. 2018. Shifts in taxonomical and functional structure of ectomycorrhizal fungal community of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) underpinned by partner tree ageing. *Pedobiologia. Journal of Soil Ecology*.71: 20-30.
- Saldivar, Á. E., García-Jiménez, J., Herrera-Fonseca, M.J., Rodríguez- Alcántar, O. 2021. Updated checklist and new records of Boletaceae (fungi, Basidiomycota, Boletales) from Jalisco, Mexico. *Polibotánica*. 52: 25-49. DOI: 10.18387/polibotanica.52.3
- Santiago-Martínez, G., Estrada-Torres, A., Varela, L. y Herrera, T. 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis in vitro de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia*. 37: 575-584.
- Smith, S. A., Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London. pp 637-768.
- Steidinger, B. S., Crowther, T. W., Liang, J., Van-Nuland, M. E., Werner, G. D. A. 2019. Climatic controls of decomposition drive the global biogeography of forest-tree symbioses. *Nature*. 569: 404-413.
- Šutara, J. 2008. *Xerocomus* s.l. in the light of the present state of knowledge. *Czech Mycology*. 60: 29–62.

- Snell, W. H., Dick, E. A. 1970. The Boleti of northeastern North America. Germany: J. Cramer. 115 p.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 30: 1312-1313.
- Stuart-Emiko, K., Plett, K., L. 2020. Digging deeper: In Search of the mechanisms of carbon and nitrogen exchange in ectomycorrhizal symbioses. *Frontiers in Plant Science*. 10: 16-58.
- Tatsumi, C., Taniguchi, T., Du, S., Yamanaka, N., Tateno, R. 2020. Soil nitrogen cycling is determined by the competition between mycorrhiza and ammonia-oxidizing prokaryotes. *Ecology*. 101: 29-63.
- Vicente-Arbona, J. C., Carrasco-Hernández, V., Rodríguez-Trejo, D. A., Villanueva-Morales, A. 2019. Calidad de planta de *Pinus greggii* producida en sustratos a base de aserrín. *Madera y Bosques*. 25: 14-32.
- Villegas, O. J. A. 2014. Factores que influyen en la formación de esporomas y micorrización de dos hongos comestibles ectomicorrízicos asociados con un pino neotropical. Tesis Maestría en Ciencias. Posgrado en Edafología Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Montecillo. 92 p.
- Villegas-Olivera, JA., Pérez-Moreno, J., Mata, G. 2017. Type of lingt, basidiomata frequency and development of two species of edible ectomycorrhizal mushrooms associated with neotropical pines. In: Pérez-Moreno, J., Guerin-Laguette, A. Eds *Mushrooms, humans and nature in a changing world, Proceedings of the 9th International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms (IWEMM9)* Colegio de Postgraduados and CONACYT, Texcoco. p 149.
- Wikipedia 2020. Bioprospección. Documento disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Bioprospecci%C3%B3n> (Consulta 28 de febrero de 2023).
- Wu, G., Li, Y. C., Zhu, X. T., Zhao, K., Han, L. H., Cui, Y. Y., Yang, Z. L. 2016. One hundred noteworthy boletes from China. *Fungal Diversity*. 81: 25-188.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7: 203-214.
- Zhang, H. Y., Lü X. T., Hartmann, H., Keller, A., Han, X. G., Trumbore, S., Phillips, R. P. 2018. Foliar nutrient resorption differs between arbuscular mycorrhizal and ectomycorrhizal trees at local and global scales. *Global Ecology Biogeography*. 27: 875-885.