



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO.

DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES.

**INOCULACIÓN CON HONGOS ECTOMICORRÍZICOS
EN *Pinus patula* Schl. et Cham. Y *Pinus greggii* Engelm.
EN INVERNADERO**

T E S I S

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

**MAESTRO EN CIENCIAS, EN CIENCIAS
FORESTALES**

P R E S E N T A

ALICIA CARRERA NIEVA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

Chapingo, Edo. de México Abril de 2004

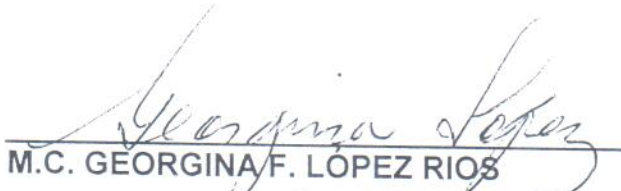


INOCULACIÓN CON HONGOS ECTOMICORRÍZICOS EN *Pinus*
patula Schl et Cham Y *Pinus greggii* Engelm EN
INVERNADERO

Tesis realizada por ALICIA CARRERA NIEVA, bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIAS FORESTALES

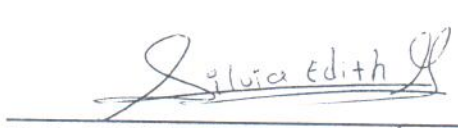
DIRECTOR:


M.C. GEORGINA F. LÓPEZ RÍOS

ASESOR:


DR. JESUS PÉREZ MORENO

ASESOR:


M.C. SILVIA EDITH GARCÍA DÍAZ

ASESOR:


DR. DANTE ARTURO RODRÍGUEZ TREJO

Esta tesis fue dirigida por el Dr. Jesús Pérez Moreno,
Microbiología, Edafología-IRENAT, del Colegio de
Postgraduados y concluida en abril del 2004.

AGRADECIMIENTOS

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA por facilitarme los medios económicos para realizar el postgrado.

A LA DIVISIÓN DE CIENCIAS FORESTALES por brindarme las facilidades para mi formación.

AL COLEGIO DE POSTGRADUADOS- INSTITUTO DE EDAFOLOGIA por brindarme dentro de sus instalaciones las herramientas necesarias para la realización de la presente investigación.

AL AREA DE MICROBIOLOGIA –LABORATORIO DE MICORRIZAS por haberme permitido un espacio para la realización de la presente investigación.

AL DR. JESUS PÉREZ MORENO por su valiosa asesoría y dirección de la presente investigación, así como por brindarme todas las facilidades para la realización del presente trabajo.

A M.C. GEORGINA F. LÓPEZ por la orientación que me brindo durante mi desarrollo académico dentro de la División de Ciencias Forestales, por las aportaciones y apoyo brindado en la revisión de la presente investigación.

A LA M.C. SILVIA EDITH GARCÍA DÍAZ por su disponibilidad, asesorías y acertada participación en la presente investigación.

AL DR. DANTE ARTURO RODRIGUEZ TREJO, por facilitarme sus valiosos conocimientos, asesorías, buena disposición y por su excelente revisión del trabajo de investigación.

AL ING. CELERINO CIGARRERO Y AL ING. SALVADOR CASTRO ZAVALA por el apoyo brindado tanto a mí como a los alumnos de esta institución, por permitir ser un vínculo entre el conocimiento generado en aulas y su aplicación.

AL ING. FARFAN distribuidor de semillas de especies forestales, por su invaluable apoyo al proporcionarme el material vegetal para el desarrollo de la presente investigación.

AL DR. JORGE VALDÉS del Instituto de Fitopatología, Colegio de Posgraduados, por su valiosa ayuda técnica en la fotomicroscopía.

A LA LAB. MARI MARCOS del Laboratorio de Fisiología por su ayuda en la parte histológica.

A LA ING. MAGDALENA CRUZ MARTÍNEZ E NG. LEONARDO GARCÍA RODRÍGUEZ, por proporcionarme el inóculo utilizado en la presente investigación.

A MIS AMIGOS (AS) Araceli, Caty, Rocío, Raúl, Robert, Erika, Cob, Alex, Hugo, Mario, Andrés y Luis, por su amistad y buena disposición hacia mí así como por hacer de lo cotidiano algo diferente.

Afectuosamente dedicada a
mi madre AMADA NIEVA
por ser un aliciente en
mi vida y un ejemplo
de fortaleza

DATOS BIOGRÁFICOS

Nací en junio de 1977, en Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca; realicé mis estudios básicos: primaria y secundaria, en el pueblo de San Martín, Toxpalan, Oaxaca.

En el año de 1993, ingresé a la Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, posteriormente ingresé a la División de Ciencias Forestales, donde en junio de 2000, terminé mis estudios de licenciatura obteniendo el título de Ingeniero en Restauración Forestal.

En diciembre de 2000 laboré en Servicios Técnicos Forestales en la Sierra Negra de Puebla hasta mayo de 2001. En agosto de 2001, ingresé al programa de posgrado de la División de Ciencias Forestales en la Universidad Autónoma Chapingo, donde en julio de 2003 culminé mis estudios de Maestría en Ciencias, con orientación en Ecología y Restauración de Ecosistemas.

CONTENIDO

RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Aspectos generales de <i>Pinus patula</i> Schl et Cham y <i>Pinus greggii</i> Engelm	3
2.1.1. <i>Pinus patula</i> Schl et Cham	3
2.1.2. <i>Pinus greggii</i> Engelm	4
2.2. Definición de micorriza	6
2.3. Tipos de micorrizas	7
2.3.1. Micorriza arbuscular	7
2.3.2. Micorrizas ericáceas	11
2.3.2.1. Micorriza ericoide	11
2.3.2.2. Micorriza arbutoide	14
2.3.2.3. Micorriza monotropoide	14
2.3.3. Micorriza orquideoide	15
2.3.4. Ectendomicorriza	16
2.3.5. Ectomicorriza	17
2.3.5.1. Fitobiontes	20
2.3.5.2. Micobiontes	22
2.3.5.2.1. Especificidad micobionte-fitobionte	24
2.4. Ecofisiología de las ectomicorrizas	28
2.4.1. Transferencia de carbohidratos	29

2.4.2. Mejora de la estructura del suelo	30
2.4.3. Asimilación de nutrimentos	31
2.4.3.1. Fósforo	32
2.4.3.2. Nitrógeno	34
2.4.4. Resistencia a sequía	36
2.4.5. Protección contra patógenos	38
2.4.6. Protección contra metales pesados	39
2.4.7. Equilibrio ecológico	42
2.5. Selección de hongos para producción de inoculantes	45
2.5.1. Tipos de inóculo	48
2.5.1.1. Inoculantes esporales	48
2.5.2. Calidad de inoculantes	50
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	54
3.1. Objetivo general	54
3.1.1. Objetivos particulares	54
3.2. Hipótesis	55
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	56
4.1. Colecta de hongos ectomicorrízicos en Santa Catarina del Monte y caracterización del área	56
4.2. Evaluación de la especificidad, infectividad y efectividad de hongos ectomicorrízicos en plantas de <i>Pinus patula</i> y <i>Pinus greggii</i>	57
4.2.1. Material biológico	57
4.2.1.1. Descripción de la procedencia de semillas	57
4.2.1.2. Descripción de la procedencia de hongos	58

4.2.1.3. Obtención de inóculo	59
4.2.1.3.1. Concentración de inóculo	60
4.3. Establecimiento del experimento	63
4.4. Diseño experimental y análisis estadístico	64
4.5. Cosecha y variables evaluadas	65
4.5.1. Variables de la raíz	66
4.5.1.1. Micelio externo	66
4.5.1.2. Número total de raíces cortas	66
4.5.1.3. Colonización micorrízica	66
4.5.2. Variables de crecimiento	66
4.5.2.1. Altura (mm)	66
4.5.2.2. Diámetro del tallo (mm)	66
4.5.2.3. Número de ramillas secundarias	67
4.5.3. Peso anhidro (mg)	67
4.6. Caracterización morfológica de ectomicorrizas	67
4.6.1. <i>Pinus patula</i> y <i>Suillus pseudobrevipes</i> , <i>Pinus patula</i> y <i>Boletus clavipes</i> , <i>Pinus patula</i> y <i>Laccaria laccata</i> , <i>Pinus patula</i> y <i>Hebeloma aff. mesophaeum</i>	67
4.6.2. <i>Pinus greggii</i> y <i>Boletus clavipes</i> , <i>Pinus greggii</i> y <i>Laccaria laccata</i> , <i>Pinus greggii</i> y <i>Suillus pseudobrevipes</i> , <i>Pinus greggii</i> y <i>Pisolithus tinctorius</i>	68
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	69
5.1. Especies de hongos ectomicorrízicos en Santa Catarina del Monte, Texcoco, México	69
5.2. Evaluación de la especificidad, infectividad y efectividad de diferentes hongos ectomicorrízicos en plantas de <i>Pinus patula</i>	75
5.2.1. Variables de la raíz	76

5.2.1.1. Evaluación de la cobertura de micelio externo en la superficie del cepellón	76
5.2.1.2. Número total de raíces cortas	78
5.2.1.3. Colonización micorrízica	81
5.2.2. Variables de crecimiento	86
5.2.2.1. Altura	86
5.2.2.2. Diámetro del tallo	89
5.2.2.3. Número de ramillas secundarias	91
5.2.3. Peso anhidro	92
5.2.3.1. Relación peso anhidro parte aérea:raíz	97
5.2.4. Correlación de variables de crecimiento y colonización ectomicorrízica	98
5.2.5. Caracterización morfológica de ectomicorrizas de <i>Pinus patula</i> y <i>Suillus pseudobrevipes</i> , <i>Pinus patula</i> y <i>Boletus clavipes</i> , <i>Pinus patula</i> y <i>Laccaria laccata</i>	100
5.2.6. Evaluación de la respuesta de crecimiento y colonización en plantas de <i>Pinus patula</i> inoculadas con <i>Hebeloma aff. mesophaeum</i>	108
5.2.6.1. Observación de la fructificación de <i>Hebeloma aff. mesophaeum</i>	111
5.2.6.2. Caracterización morfológica de ectomicorrizas de <i>Pinus patula</i> y <i>Hebeloma aff. mesophaeum</i>	118
5.2.7. Concentración de esporas de hongos ectomicorrízicos estudiados	121
5.3. Evaluación de la especificidad, infectividad y efectividad de hongos ectomicorrízicos en plantas de <i>Pinus greggii</i>	123

5.3.1. Variables de la raíz	123
5.3.1.1. Evaluación de la cobertura de micelio externo en la superficie del cepellón	124
5.3.1.2. Número total de raíces cortas	125
5.3.1.3. Colonización micorrízica	128
5.3.2. Variables de crecimiento	133
5.3.2.1. Altura	133
5.3.2.2. Diámetro del tallo	135
5.3.2.3. Número de ramillas secundarias	137
5.3.3. Peso anhidro	138
5.3.3.1. Relación peso anhidro parte aérea:raíz	143
5.3.4. Correlación de variables de crecimiento y colonización ectomicorrízica	143
5.3.5. Caracterización morfológica de ectomicorrizas de <i>Pinus greggii</i> y <i>Boletus clavipes</i> , <i>Pinus greggii</i> y <i>Laccaria laccata</i> , <i>Pinus greggii</i> y <i>Suillus pseudobrevipes</i> , <i>Pinus greggii</i> y <i>Pisolithus tinctorius</i>	145
Cristales de <i>Suillus pseudobrevipes</i>	146
VI. CONCLUSIONES	156
VII. LITERATURA CITADA	159
VIII. APÉNDICE	188
IX. GLOSARIO	195

RESUMEN

INOCULACIÓN CON HONGOS ECTOMICORRÍZICOS EN *Pinus patula* Schl et Cham Y *Pinus greggii* Engelm EN INVERNADERO

Carrera Nieva Alicia, maestro en Ciencias en Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales, M.C. Georgina F. López Ríos.

Con el propósito de establecer la capacidad simbiótica de diferentes hongos ectomicorrízicos con *Pinus patula* y *Pinus greggii* en este trabajo se evaluaron ocho hongos ectomicorrízicos, los cuales se seleccionaron debido a su amplia distribución y comestibilidad. Los porcentajes de colonización micorrízica variaron entre especies de 9 a 66%. Las plantas inoculadas independientemente de la especie forestal con *Laccaria laccata* y *Suillus pseudobrevipes* presentaron un mayor porcentaje de colonización y desarrollaron un micelio externo abundante. Los valores medios mas altos en altura, peso seco y diámetro del tallo se observaron en plantas inoculadas con *L. laccata*, *S. pseudobrevipes* y *Boletus clavipes* en comparación con el testigo. Doce meses después de la inoculación con *Hebeloma aff. mesophaeum* se observó su fructificación con una planta de *P. patula*. La caracterización micromorfológica mostró una asociación típica de gimnospermas con una red de Hartig penetrando varias capas de células corticales.

Palabras clave: Hongos ectomicorrízicos, asociación ectomicorrízica, *Pinus patula*, *Pinus greggii*, inoculación.

ABSTRACT

INOCULATION WITH EDIBLE ECTOMYCORRHIZAL FUNGI IN *Pinus patula* Schl et Cham AND *Pinus greggii* Engelm UNDER GREENHOUSE CONDITIONS

Carrera Nieva Alicia, maestro en Ciencias en Ciencias Forestales, Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales, M.C. Georgina F. López Ríos.

The objective of this research was to establish the symbiotic capacity of eight ectomycorrhizal fungi with *P. patula* and *P. greggii*. These eight ectomycorrhizal fungi were chosen due to their wide distribution and edibility. The percentages of mycorrhizal short roots varied among species from 9 to 66 %. *P. patula* and *P. greggii* seedlings inoculated with *Laccaria laccata* and *Suillus pseudobrevipes* respectively exhibited a higher degree of infection, bore more mycorrhiza and developed more abundant external mycelium. The highest mean values of height, dry weight and caliper stem were obtained with seedlings inoculated with *Laccaria laccata*, *Suillus pseudobrevipes* and *Boletus clavipes* which showed better growth compared with the control. One year after inoculation *Hebeloma aff. mesophaeum* fructification appeared associated with a *P. patula* seedling. Histological examination of these pine mycorrhizas showed an ectomycorrhizal association typical of gymnosperms with an intercellular Hartig net penetrating between several layers of cortical cells.

Key words: Ectomycorrhizal fungi, ectomycorrhizal association, *Pinus patula*, *Pinus greggii*, inoculation.

I. INTRODUCCIÓN

Pinus patula Schl et Cham y *Pinus greggii* Engelm son especies forestales mexicanas de gran importancia ecológica y económica, forman masas puras o mezcladas, asociándose en ocasiones. Debido a sus características de rápido crecimiento y adaptación a condiciones edáficas nutrimentalmente pobres, son ampliamente utilizadas en plantaciones de tipo comercial (Donahue y López-Upton, 1996) en México y en países como la India, Indonesia, Brasil, Sudáfrica y Colombia (Neil, 1991; Dvorak *et al.*, 1996; Aver y Grigoletti, 1997; Smith *et al.*, 2002). Estas especies, particularmente, *Pinus greggii*, representan un verdadero potencial para plantaciones de restauración. Una de las formas de incrementar su supervivencia en estas condiciones es a través de la inoculación de hongos ectomicorrízicos (ECM) (Brundrett *et al.*, 1984; Imo y Timmer, 1998), por los múltiples beneficios que aportan en asociación con las plantas (Selosse *et al.*, 1999).

La importancia ecológica de la asociación ectomicorrízica se fundamenta en que aumenta la capacidad de la planta para la adquisición de nutrimentos minerales y agua del suelo, la resistencia de las plantas a patógenos, reducción de la toxicidad de metales pesados y otros contaminantes (Ross y Marx, 1972; Dixon *et al.*, 1983; Burgess *et al.*, 1993; Egerton-Warburton y Griffen, 1995) e incremento del crecimiento de la planta (Dixon *et al.*, 1984; Hatchell y Marx, 1987; Burgess *et al.*, 1994) . Cabe también señalar la gran importancia comercial de este grupo de hongos por su interés culinario (Varela y Estrada,

1997; Espigol *et al.*, 1999) lo que supone un valor añadido en la repoblación de áreas forestales con estas plantas.

Recientemente, en algunos viveros se han empezado a utilizar hongos ECM con el objetivo de incrementar la supervivencia y tasas de crecimiento de los árboles en el vivero y en el campo. En México existe poca investigación al respecto, no obstante la importancia que presupone la utilización de especies de rápido crecimiento como es el caso de *P. greggii* y *P. patula* en áreas con problemas de regeneración, en simbiosis con hongos ECM comestibles.

Con esta consideración, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la especificidad, infectividad y efectividad de diversos hongos ECM comestibles y de amplia distribución en México en condiciones de vivero. El estudio incluyó también la caracterización micromorfológica de los hongos ECM inoculados para corroborar su colonización en el sistema radical de las especies de pinos estudiadas.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Aspectos generales de *Pinus patula* Schl. et Cham. y *Pinus greggii* Engelm

2.1.1. *Pinus patula* Schl et Cham

Pinus patula es una especie mexicana, la cual se distribuye de manera natural en los estados de Tamaulipas, Hidalgo, Puebla, Oaxaca, Chiapas, Veracruz, algunas áreas del estado de Querétaro y San Luis Potosí (Farjon y Styles, 1997).

El intervalo altitudinal donde se desarrolla esta especie va de los 1,600 a 3,000 msnm con una precipitación media anual superior a los 1,000 mm (Vela, 1980) y con temperaturas medias anuales de 10°C, contribuyendo la frecuente neblina al incremento de la humedad disponible y a la disminución de la evaporación, evitando por lo tanto las variaciones de temperatura. El clima más común de su área de distribución es de tipo C(fm) templado con temperatura promedio mensual de -3 a 18°C, precipitación del mes más seco mayor a 40 mm y con lluvia invernal. También se puede encontrar el subtipo C(m), C(W₂). Todos los subtipos anteriores tienen temperaturas medias superiores a 10°C durante 4 meses o más, la oscilación térmica es de 5 a 7°C y en menor grado de 7 a 14°C. El mes más caliente se presenta antes del solsticio de verano (Vela, 1980).

Se desarrolla sobre terrenos de escasa pendiente y en suelos moderadamente profundos a muy profundos, con suelos de textura franca o migajosa en el horizonte A y arcillosos en las partes más profundas del perfil. El horizonte A,

por lo general, presenta un bajo contenido de piedra y grava así como alta capacidad de intercambio catiónico (Arteaga, 1985).

A esta especie se le puede encontrar en masa puras o mezcladas con especies arbóreas como *Pinus pseudostrobus*, *Pinus teocote*, *Pinus leiophylla*, *Pinus montezumae*, *Abies religiosa*, *Liquidambar styraciflua*. En el estrato inferior se encuentran *Quercus affinis*, *Quercus crassifolia*, *Alnus arguta* y *Alnus firmifolia* (Gutiérrez, 1998).

Debido a características deseables como buena conformación, alto vigor, rápida velocidad de crecimiento, tolerancia edáfica, resistencia a patógenos y calidad maderable traducida ésta en una apreciable aptitud celulósica (Barret, 1972; Santillán, 1991), se ha propiciado su utilización en plantaciones de tipo comercial en varias localidades de la región central de México y en países como Colombia (Endo, 1994), India (Misra *et al.*, 1997), Argentina (Mutarelli, 1988), Guinea (Vincenti, 1989), Kenia (Kariuki, 1998) Sudáfrica (Fonseca y Louzada, 1986) y Brasil (Aver y Grigoletti, 1997); en donde se han establecido plantaciones con diferentes objetivos, desde recuperación de áreas degradadas, escénicas, con fines industriales, protección de cultivos agrícolas, energéticas hasta comerciales las cuales en su mayoría han resultado exitosas.

2.1.2. *Pinus greggii* Engelm

Pinus greggii Engelm es una especie endémica mexicana, la cual se distribuye en los estados de Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Querétaro, Hidalgo y Puebla, en la Sierra Madre Oriental (Dvorak *et al.*, 1996), entre los paralelos 20°00' a 25°40' de latitud norte y 97°40' a 101°20' de longitud oeste. El intervalo altitudinal donde se desarrolla esta especie va de los 1,200 a 2,700

msnm con precipitación de 450 a 1,800 mm anuales para la localidad más seca y más húmeda respectivamente (Plancarte, 1990).

Esta especie se presenta en dos regiones separadas en México. Las poblaciones del norte se desarrollan en climas más fríos y secos que las poblaciones del sur. Las poblaciones del sur (Hidalgo y Querétaro), han demostrado un crecimiento más rápido que las poblaciones del norte (Coahuila y Nuevo León), en ensayos de procedencias (Donahue y Lopez-Upton, 1996), por lo que son recomendables para plantaciones, sin embargo, Smith *et al.* (2002) encontraron que árboles de *P. greggii* de procedencias del sur fueron más susceptibles a infecciones naturales de algunos patógenos.

Con frecuencia forma masas puras de bajas densidades en cañadas y laderas semiabiertas, con exposiciones suroeste y sureste. Cuando se asocia lo hace con *P. patula*, *P. teocote*, *P. cembroides*, *P. arizonica*, *Pseudotsuga* spp. y *Juniperus* spp. ocasionalmente con *P. pseudostrobus*, *Liquidambar styraciflua*, *Platanus* spp, *Cupressus* spp. y *Quercus* spp. (Beristain, 1992). Se desarrolla en suelos delgados, de textura migajón-areno-arcillosa, pedregosos, café rojizos y calizos, normalmente pobres en materia orgánica; con pH casi neutro (Perry, 1991) con buenos crecimientos en edades tempranas en estas condiciones, por lo cual representa un verdadero potencial para plantaciones forestales, ya sea con fines de restauración o comerciales a lo largo de un amplio intervalo de ambientes tropicales (Barnes y Styles, 1983).

Dadas las características mencionadas anteriormente, y por presentar una alta producción de semilla y de gran calidad con un porcentaje de semillas viables de 98.5 a 95.2 % y un porcentaje de germinación de 89 a 85 % (Plancarte,

1988), ha despertado gran interés en plantaciones como especie exótica de rápido crecimiento, por lo cual se ha introducido en países como la India (Neil, 1991), Sudáfrica (Kietzka *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2002), Indonesia, Brasil (Aver y Grigoletti, 1997) y Colombia (Dvorak *et al.*, 1996), en donde ha mostrado una excelente tasa de crecimiento. De acuerdo con Dvorak *et al.* (1996) *P. greggii* es una especie que debe ser introducida donde la baja precipitación y el frío sean factores limitantes para el buen desarrollo de *P. patula*, ya que ha demostrado mayor supervivencia y crecimiento en estas condiciones (Kietzka *et al.*, 1996).

2.2. Definición de micorriza

El termino micorriza, significa literalmente “hongo-raíz”, este concepto fue introducido por Frank en 1885 para describir la asociación mutualista entre las raíces de las plantas y el micelio del hongo. La característica distintiva de esta simbiosis es el movimiento bidireccional de nutrimentos, es decir, existe un flujo de carbono hacia el hongo y diferentes nutrimentos inorgánicos se traslocan a la planta (Hibbett *et al.*, 2000; Chalot *et al.*, 2002), estableciéndose de este modo un vínculo entre el sistema radical y el suelo (Tarkka, 2000).

Dentro de los beneficios que aporta esta simbiosis a la planta se encuentra una mejora en la nutrición, resistencia a sequía, toxicidad por metales y protección contra patógenos (Egerton-Warburton y Griffien, 1995). Los beneficios a la comunidad vegetal, especialmente importantes en áreas a restaurar, es la de una diversidad mucho más alta en las especies vegetales, mayor asimilación de nutrimentos (Smith y Read, 1997), incremento en la supervivencia de las plantas y la mejora en la estructura del suelo, así como el desarrollo de un

sistema radical eficiente, aspecto crítico para el éxito de las plantas vasculares en un ambiente pobre en nutrientes y seco (Simon *et al.*, 1993).

2.3. Tipos de micorrizas

Las diferentes formas de micorrizas presentes en la naturaleza han sido clasificadas de acuerdo a las estructuras que forma el hongo en la raíz en la madurez, tipo de hongo y la planta asociada, así como características morfológicas y estructurales de las mismas, reconociéndose siete tipos diferentes (Honrubia *et al.*, 1992).

El tipo de micorriza más antigua en términos evolutivos y ampliamente estudiada es el de las micorrizas arbusculares (Smith y Read, 1997). Otros tipos de micorrizas son las micorrizas ericoides, arbutoides, monotropoides, orquideoides, ectendomicorrizas y ectomicorrizas.

2.3.1. Micorriza arbuscular (MA)

Las micorrizas arbusculares evolucionaron con la primera colonización de las plantas a la tierra hace 450-500 millones de años y en la actualidad persisten en la mayoría de los taxa vegetales (Cairney, 2000).

El desarrollo de esta asociación altamente compatible requiere de una diferenciación molecular y celular de ambos simbioses para formar interfases especializadas a través de las cuales la transferencia bidireccional de nutrientes se realice (Harrison, 1999). La característica distintiva de este tipo de micorriza son las estructuras que se producen cuando, tras la germinación de una espora, las hifas entran en contacto con una raíz receptiva y se extienden cerca de la superficie de la misma, formando apresorios por contacto intercelular, los cuales son estructuras que se forman al disolverse una porción

de la pared de la célula contactada. Por ahí se introducirán las hifas, entre y dentro de las células de la rizodermis o de los pelos radicales. Existen pocos puntos de penetración y sólo una pequeña porción, 5-10 μm de la raíz, queda alterada.

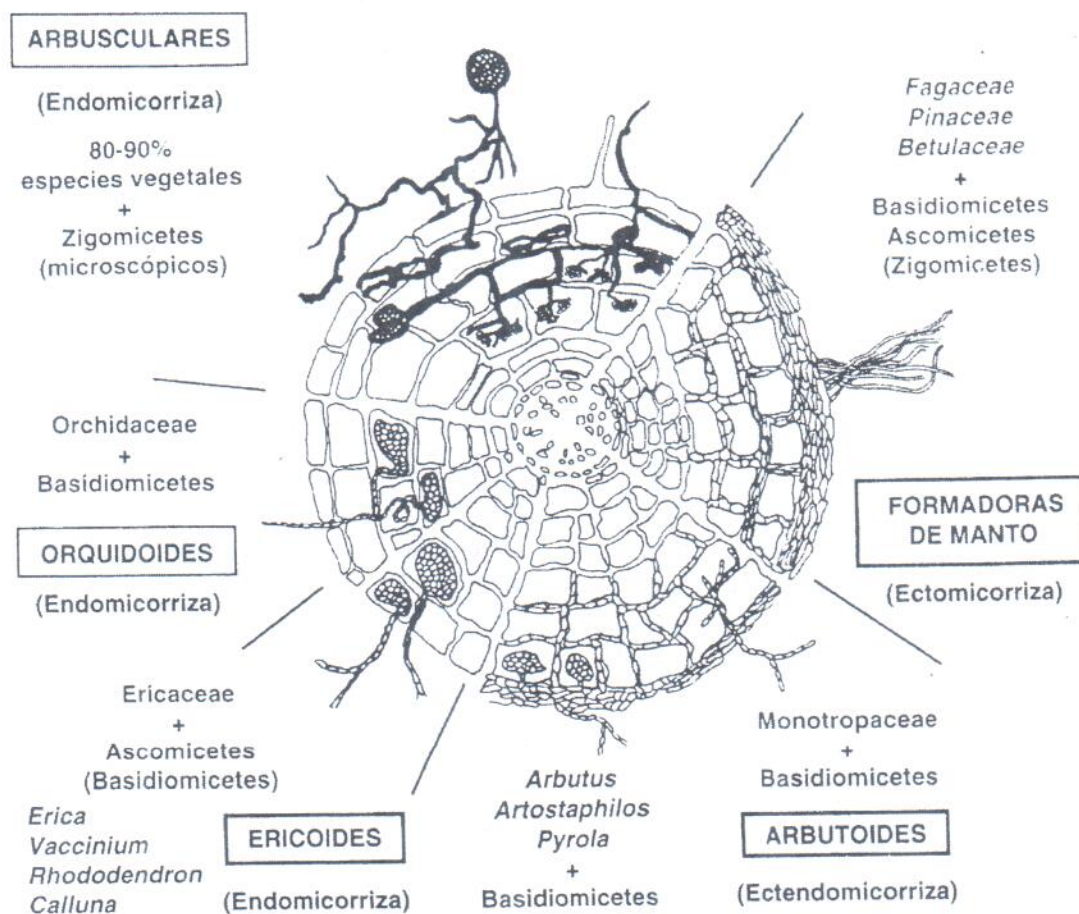


Figura 1. Diagrama de un corte transversal de raíz micorrizada de *Pinus* spp. formada por diferentes tipos de micorrizas (Fuente: Barea, 1998).

El hongo crece inicialmente entre las células corticales, sin embargo, penetra la pared celular del hospedero y crece al interior de la célula, formando enrollamientos de hifas las cuales colonizan el apoplasto y células del cortex para acceder al carbono elaborado por la planta (Harrison, 1999). En esta

asociación ni la pared celular del hongo ni la membrana celular del hospedero sufren ruptura.

En las capas de células corticales intermedias, el hongo forma las vesículas, que producen modificaciones en las células del hospedero, estas estructuras son ricas en lípidos y poseen paredes delgadas, consideradas como reservorios energéticos del hongo. Se forman usualmente en los espacios intercelulares y proveen un sumidero análogo para fotosintatos de la planta hospedero. Aproximadamente 20 % del carbono total asimilado por las plantas puede ser transferido al hongo. Esta transferencia de carbono algunas veces es considerada como un dren sobre el hospedero, sin embargo, la planta hospedero puede incrementar la actividad fotosintética después de la colonización micorrízica, y por ende compensar esta pérdida. Se cree que su principal función es de almacén; sin embargo, las vesículas pueden también servir como propágulos reproductivos para el hongo. En las capas más internas, cerca del estele, el hongo también penetra en las células y las hifas se ramifican dicotómicamente, formando los denominados arbuscúlos, los cuales se caracterizan por que son proyecciones de paredes delgadas que invaginan la membrana del huésped creando un nuevo compartimento donde el material de alta complejidad molecular es depositado. Este espacio apoplástico previene el contacto directo entre la planta y el citoplasma del hongo, favoreciendo una transferencia eficiente de nutrientes entre los simbioses, permitiendo al mismo tiempo que las células de la raíz permanezcan vivas y activas metabólicamente (Harrison, 1999). Otra de las funciones de los arbuscúlos es incrementar el metabolismo de los orgánulos y sistemas de

membranas de las células del hospedero, las cuales son responsables del intercambio bidireccional de nutrientes entre los simbiontes pero, curiosamente, se colapsan cuando han transcurrido entre 4 y 15 días, aunque siguen produciéndose de manera continua en otras células.

Las hifas del hongo crecen extensivamente desde la raíz hacia el suelo donde desarrollan una red tridimensional de micelio especializado en colonizar y explorar eficazmente los microhábitats del mismo para captar elementos minerales y agua, actuando como “puentes” cuyo objetivo es superar la “zona de agotamiento” de nutrientes que rodea la raíz (llegan a distancias incluso de varios centímetros de la superficie de la misma). La función del micelio externo es particularmente crítica para la captación de nutrientes poco móviles, como son fosfato amonio y algunos micronutrientes (Harrison, 1999). Otras estructuras producidas por algunos hongos MA incluyen, células auxiliares y esporas sexuales. Las células auxiliares se forman en el suelo y pueden adquirir forma de espiral o de nudos. La función de esas estructuras es desconocida. Las esporas reproductivas pueden formarse ya sea en la raíz o en el suelo (Morton, 1988).

La mayor parte de los hongos que forman este tipo de micorriza, pertenecen a la familia Endogonaceae de los Glomales (Morton y Redecker, 2001). Recientemente, este tipo de hongos han sido reclasificados dentro de un nuevo phylum llamado Glomeromicota (Schüßler *et al.*, 2001), cuyos representantes son los géneros *Glomus*, *Sclerocys*, *Gigaspora* y *Acaulospora* (Azcón y Barea, 1980). Otros géneros de igual importancia son: *Entrophospora* y *Scutellospora*, incluyendo aproximadamente 130 especies, las cuales son responsables de la

dependencia micotrófica presentada por más del 90 % de las plantas terrestres en todo el globo. Tales especies colonizan un vasto grupo taxonómico de herbáceas y árboles, incluyendo angiospermas, gimnospermas, pteridofitas y algunas briofitas (Harrison, 1999), lo que indica una ausencia de especificidad del hospedero.

Dentro de los principales efectos de la inoculación con este tipo de micorrizas se encuentra la estimulación del enraizamiento y crecimiento de las plantas, mejora de la supervivencia y desarrollo durante la aclimatación de plantas micropropagadas; reducción de requerimientos externos de fosfato; incrementos de resistencia de las plantas al ataque de patógenos que afectan a la raíz, mejora la tolerancia a estrés abiótico, incremento en la producción de frutos y uniformidad de la producción (Harrison, 1999), de ahí su importancia económica en ecosistemas manejados.

2.3.2. Micorrizas ericaceas

El término ericácea es aplicado a las asociaciones micorrízicas que se presentan en plantas pertenecientes al orden Ericales. Estas asociaciones se caracterizan por que las hifas en la raíz pueden penetrar las células corticales (hábito endomicorrízico); sin embargo, no existe formación de arbusculos. Dentro de este tipo de micorriza se encuentran tres formas principales, la ericoide, la arbutoide y la monotropoide, las cuales se describen a continuación:

2.3.2.1. Micorriza ericoide

Las micorrizas ericoides son simbiosis complejas cuya formación requiere sinergismos enzimáticos y compatibilidad mutualista resultado de la

cooperación de sistemas de reconocimiento y defensa tanto de la planta como del hongo (Cullings, 1996). De acuerdo con Cairney (2000), las micorrizas ericoides evolucionaron hace aproximadamente 100 millones de años, una vez que el contenido de materia orgánica de algunos suelos antiguos incrementó y la vegetación esclerófila estuvo presente, se desarrollaron como una respuesta a suelos pobres en nutrimentos. Este tipo de asociación al parecer es el resultado de procesos coevolutivos relativamente difusos, es decir, por la presencia de cambios recíprocos genéticos en plantas ancestrales y hongos en respuesta a cambios ambientales.

Perotto *et al.* (1995) mencionó que las micorrizas ericoides presentan un alto potencial saprofítico, dado que pueden degradar diferentes polímeros orgánicos presentes en el suelo. Asimismo, presentan enzimas con capacidad de degradar la pared celular. Diferentes estudios inmunocitoquímicos sobre la producción de enzimas degradadoras de pectinas durante el proceso de infección de la planta hospedero, sugieren que los mecanismos de regulación de la producción de enzimas que degradan la pared celular *in vivo* pueden ser un aspecto crucial para el establecimiento de las micorrizas en la planta hospedero.

Las micorrizas ericoides se desarrollan sobre *Calluna*, *Rhododendron* (azaleas y rododendros) y *Vaccinium* que tienen sistemas radicales muy finos, tales plantas dominan en suelos ácidos, con porcentajes altos de materia orgánica en regiones subárticas y subalpinas; sin embargo, estudios recientes han demostrado que pueden colonizar plantas de taxas muy distintos (Perotto *et al.*, 2002). Dentro de los hongos que forman micorrizas de este tipo se encuentran:

Ascomycetes como *Hymenoscyphus ericae*, *Gymnascella dankaliensis*, *Myxotrichum setosum*, y *Pseudogymnoascus roseus*, hifomicetes tales como *Oidiodendron griseum*, *O. cereales*, *O. rhodogenum*, *O. maius*, *Mycelium radialis myrtillis*, y basidiomicetes como *Clavaria argillacea* y *C. oronoensis* (Dalpé, 1989).

Gracias a la simbiosis con hongos micorrízicos ericoides, las plantas ericáceas son capaces de crecer en ambientes altamente contaminados, donde los iones metálicos alcanzan niveles tóxicos en el suelo (Leake *et al.*, 1989; Perotto *et al.*, 2002); los mecanismos para mantener la homeostasis de los metales no son claramente entendidos (Martino *et al.*, 2003).

Este tipo de micorriza se caracteriza por un extenso crecimiento al interior de las células corticales (intracelular), y en muy poca extensión al suelo, mostrando poco cambio en la morfología de la raíz. El hongo produce enzimas extracelulares que desdoblan la materia orgánica, haciendo de esta manera posible que la planta asimile nutrimentos mineralizados a partir de compuestos orgánicos presentes en el material coloidal que rodea a las raíces (Molina *et al.*, 1992). Read *et al.* (1989) mostraron que un amplio número de micorrizas ericoides pueden obtener nitrógeno y otros nutrimentos de fuentes secundarias de materia orgánica a partir de biomasa microbiana muerta. Este tipo de micorrizas puede tener una importante función en el ciclo del nitrógeno en suelos orgánicos altamente ácidos donde ellas predominan.

En la superficie de la raíz se forma una trama de hifas, pero sin originar un manto o una red de Hartig. La asociación esta activa 3 ó 4 semanas, y cuando la hifa degenera la célula radical infectada muere, por lo que este proceso

parece estar ligado al desarrollo de nuevas raíces. El sitio de colonización fúngica es la epidermis de la raíz, en donde se observa un material mucilaginoso compuesto por polisacáridos complejos (Honrubia *et al.*, 1992; Peterson y Farquhar, 1994). Al igual que las EM, las micorrizas ericoides transforman los carbohidratos del hospedero en un almacén de carbohidratos fúngicos en forma de manitol y trehalosa, favoreciendo su transporte al hongo.

2.3.2.2. Micorriza arbutoide

Este tipo de asociación se puede presentar en plantas con asociaciones ECM y endomicorrizas. Son muy semejantes a las anteriores pero con la formación de manto y la red de Hartig, las hifas están restringidas a la epidermis de la raíz. Estas asociaciones se desarrollan sobre *Arbutus*, *Arctostaphylos* y algunas especies de la familia *Pyrolaceae*. Los hongos que forman este tipo de simbiosis pertenecen a los ascomicetos y basidiomicetos que incluso pueden llegar a ser los mismos hongos que colonizan hospederos ECM en la misma región (Peterson y Farquhar, 1994).

2.3.2.3. Micorriza monotroipoide

El hongo coloniza plantas aclorofílicas (ausentes de clorofila) pertenecientes a la familia *Monotropaceae* (p.e. pipa india) las cuales han desarrollado un modo complejo de nutrición en el cual el micobionte juega un papel fundamental (Young *et al.*, 2002).

Este tipo de micorriza se caracteriza por presentar red de Hartig restringida a la epidermis y un manto delgado. El mismo hongo también puede desarrollar asociaciones ECM con árboles, sobre todo gimnospermas de las proximidades, y por lo tanto formar un vínculo a través del cual el carbono y otros nutrimentos

pueden fluir desde el hospedero autotrófico al heterotrófico (planta parásita) (Honrubia *et al.*, 1992), a través de las conexiones de sus hifas (Young *et al.*, 2002). Los carbohidratos son transferidos por el hongo a través de un tipo especial de haustorio. Al igual que la micorriza arbutoide y la ectendomicorriza, el tipo monotropoide parece ser una variante de las ectomicorrizas (Molina *et al.*, 1992; Peterson y Farquhar, 1994). Este tipo de micorriza, de acuerdo con Young *et al.* (2002) presenta una baja diversidad y una alta especificidad, tal es el caso de *Monotropa uniflora* la cual se asocia exclusivamente con hongos de la familia *Russulaceae*. Por su parte, Kretzer *et al.* (2000) y Bidartondo y Bruns (2002) puntualizan que el nivel de especificidad es mucho más alto, sugiriendo que la macro y microevolución de las especies vegetales pertenecientes al orden Monotropoideae están relacionadas ampliamente con sus simbiontes micorrízicos.

2.3.3. Micorriza orquideoide

Los hongos micorrízicos tienen un papel único en el ciclo de vida de las plantas pertenecientes a la familia *Orchidaceae*. La colonización de la planta por el hongo micorrízico se realiza después de la germinación, con el objetivo de que el hongo micorrízico suministre carbono y vitaminas al embrión en desarrollo, es decir, esta simbiosis se establece en las fases tempranas del desarrollo de la planta, debido a que ésta depende de una fuente externa de carbono, ya que sus semillas tienen un embrión muy pequeño y una mínima reserva de sustancias, sin embargo en algunas especies esta dependencia se prolonga hasta la etapa adulta (Rasmussen, 2002). Es durante esta etapa en que la

principal función de este tipo de micorriza es la asimilación y traslocación de nutrimentos (Peterson y Farquhar, 1994).

El hongo crece al interior de la célula vegetal, invaginando la membrana celular y formando hilos de hifas dentro de la célula. Esos hilos están activos por algunos días, después de los cuales pierden turgencia, degenerando y el contenido de nutrimentos es absorbido por la orquídea en desarrollo. Los hongos que participan en esta simbiosis son basidiomicetos similares a los que participan en la descomposición de la madera (p.e. *Coryolus*, *Fomes*, *Marasmius*) y en la patogénesis (p.e. *Armillaria* y *Rhizoctonia*), capaces de utilizar la celulosa de las plantas leñosas que transforman en carbohidratos para las orquídeas. En esta asociación el equilibrio entre mutualismo y parasitismo es muy difícil de determinar ya que puede desplazarse en uno u otro sentido (Honrubia *et al.*, 1992; Peterson y Farquhar, 1994).

2.3.4. Ectendomicorriza

La ectendomicorriza es un tipo de asociación micorrízica putativa, confinada a *Pinus* spp. y *Larix* spp., en etapa de plántula, muy común en viveros y hábitats perturbados (Yu *et al.*, 2001), siendo remplazada por EM en la etapa adulta (Peterson y Farquhar, 1994). Esta asociación se caracteriza por la combinación única de un manto fúngico, red de Hartig e hifas intracelulares (Yu *et al.*, 2001). Forma estructuras típicas de EM, excepto el manto ya que puede ser delgado o estar ausente y las hifas en la red de Hartig pueden penetrar las células corticales. Scales y Peterson (1991) estudiaron la estructura y desarrollo de las ectendomicorizas entre *Pinus banksiana* y *Wilcoxina mikolae* var. *mikolae*

observando que el manto varió en grosor y la presencia de gran cantidad de mucigel sobre la superficie radical.

Las especies fúngicas incluidas en la formación de ectendomicorrizas fueron inicialmente llamadas cepa E y su identificación se basó en características de hifas y clamidosporas. Con el descubrimiento de teleomorfos en algunos de esos hongos, se determinó que eran Ascomycetes. Sin embargo, recientemente, con la utilización de métodos moleculares para la determinación de su filogenia, aparentemente la mayoría pertenece a dos especies *Wilcoxina mikolae* y *W. rehmlii*. Dos especies de hongos dematiaceous y un miembro de los Pezizales, *Sphaerosporella brunnea*, también han sido reportados (Yu *et al.*, 2001). *Wilcoxina mikolae* forma ectendomicorrizas con *Pinus* y *Larix* y ectomicorrizas con *Abies*, *Picea*, *Pseudotsuga* y *Tsuga* (Mikola, 1988). Estos hongos pueden formar ectendomicorrizas con sus hospederos sobre un amplio intervalo de pH y pueden utilizar algunos substratos como fuente de carbono. En función de estas características, las ectendomicorrizas pueden ser importantes en la revegetación de sitios perturbados y en el establecimiento de coníferas en sitios recientemente quemados (Yu *et al.*, 2001), no así en suelos forestales naturales, donde los hongos nativos van a remplazarlas rápidamente (Mikola, 1988).

2.3.5. Ectomicorriza (EM)

En bosques boreales y templados las ectomicorrizas (EM) son asociaciones simbióticas muy comunes en árboles y arbustos. Las EM se presentan principalmente en sitios pobres en nutrientes solubles asimilables y donde existe una gran acumulación de mantillo sobre la superficie del suelo. Los

hospederos que la forman pertenecen a las familias: *Pinaceae*, *Fagaceae*, *Betulaceae* y *Myrtaceae*, incluyendo también algunas monocotiledóneas y helechos (Wilcox, 1996).

Las EM son particularmente importantes para el crecimiento del árbol en regiones con deficiencias nutrimentales o sujetas a estrés por déficit de agua, ya que se ha demostrado que favorecen la absorción de nutrimentos inmóviles, como el fósforo (Perry *et al.*, 1992) además de proporcionar resistencia a la planta a condiciones adversas como heladas y sequías (Honrubia *et al.*, 1992). Asimismo, los pelos radicales ECM sobreviven por más tiempo que los pelos no micorrízicos, alcanzando edades de hasta un año, esto se debe a que el manto fúngico origina una reducción en la respiración de la raíz incrementando su longevidad (Isaac, 1992).

Las EM se forman usualmente entre las raíces finas y el micelio dicariótico de diferentes géneros pertenecientes a los Basidiomycetes. Algunos Ascomycetes pueden llegar a formarlas, por ejemplo, miembros del orden Tuberales, y algunos miembros de los Zygomycetes (Isaac, 1992).

Sundaran *et al.* (2001) puntualizaron que la iniciación ECM, desarrollo y mantenimiento funcional incluye cambios morfológicos que son mediados por la activación y supresión de varios genes de la planta y el hongo. Ellos identificaron un gene, *Lbras*, en el hongo ECM *Laccaria bicolor* perteneciente a la familia de genes *ras*, el cual en otros sistemas esta asociado con el control del crecimiento y la proliferación celular.

Las hifas del hongo forman una estructura micelial que envuelve por completo las raíces cortas, tal estructura es conocida como manto fúngico el cual

presenta variaciones en profundidad. Las hifas del manto exterior están conectadas a un micelio extramatricial cuya función es la nutrición mineral y la asimilación de agua a los tejidos simbióticos. Por su parte, las hifas del manto interno forman una red de ramificaciones, las cuales se extienden entre las células epidérmicas (angiospermas) y las células corticales (gimnospermas) de la planta hospedero (Kottke y Oberwinkler, 1986; Barker *et al.*, 1998), formando una estructura llamada red de Hartig que es el sitio donde se lleva a cabo la transferencia de nutrimentos vía el hongo y el intercambio de fotosintatos elaborados por la planta, los cuales pasan a un almacén de carbohidratos fúngicos, en forma de manitol y trehalosa que tiene la función de favorecer su transporte hacia el hongo (Tarkka, 2000). Para que se realice este proceso, los hongos ECM producen enzimas clave requeridas para la degradación de los componentes de la pared celular del fitobionte. Dada la naturaleza intercelular; para que se presente esta simbiosis (Peterson y Farquhar, 1994), se requiere de una regulación estricta de la actividad enzimática, la cual puede existir en la interfase hongo-raíz (Cairney y Burke, 1994).

En el suelo el hongo forma una red de hifas que se ramifican abundantemente y que son las encargadas de la absorción de nutrimentos. Esta red de hifas incrementa el volumen de suelo que puede ser explorado por la planta. En muchas especies se pueden formar además cordones miceliales o rizomorfos (*Pisolithus tinctorius*), los cuales tienen mayor capacidad exploratoria, toleran condiciones adversas más fácilmente y su período de vida es más largo que el de las hifas. Se ha comprobado que estas estructuras juegan un papel muy importante en el transporte de agua y de otras sustancias (Isaac, 1992).

2.3.5.1. Fitobiontes

Las especies involucradas en este tipo de simbiosis se encuentran distribuidas ampliamente en el planeta y dominan en los bosques templados boreales y australes del globo o zonas modificadas por el hombre. Este tipo de micorriza se presenta en el 3 % de las especies de plantas vasculares, las cuales se asocian a hongos en su mayoría basidiomicetos y ascomicetos (Barea, 1991), incluyendo una gran cantidad de especies de importancia forestal, pertenecientes a las familias: *Pinaceae*, *Salicaceae*, *Betulaceae*, *Fagaceae*, *Ulmaceae*, *Dipterocarpaceae*, *Rosaceae*, *Caesalpinaceae*, *Sapindaceae*, *Aceraceae*, *Tiliaceae* y *Ericaceae* (Meyer, 1973).

A nivel mundial se estima que existen 2,000 especies (10 % de la flora mundial) de plantas leñosas capaces de formar EM (Pirozynski, 1981). Dichas plantas son en su mayoría fanerógamas, tanto angiospermas como gimnospermas.

Dentro de la división Angiospermae se pueden encontrar los siguientes géneros: *Acer*, *Allophyllus*, *Alnus*, *Betula*, *Carpinus*, *Carya*, *Castanea*, *Castanopsis*, *Casuarina*, *Cereocarpus*, *Chamaebatia*, *Corylus*, *Crataegus*, *Dryas*, *Eucalyptus*, *Fagus*, *Fraxinus*, *Calium*, *Juglans*, *Bactuca*, *Lithocarpus*, *Malus*, *Nothofagus*, *Platanus*, *Populus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Quercus*, *Rhahmnus*, *Ribes*, *Robinia*, *Rosa*, *Salix*, *Nassafrass*, *Sorbus*, *Tilia*, *Ulmus* y *Ficus*. En la división Gimnospermae se encuentran los siguientes géneros: *Abies*, *Araucaria*, *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*, *Cedrus*, *Cupressus* y *Juniperus* (Honrubia *et al.*, 1992; Brundrett *et al.*, 1996).

Dentro de estas dos grandes divisiones se encuentran plantas micótrofas obligadas, que no sobreviven sin sus respectivos simbiontes y micótrofas

facultativas capaces de vivir y prosperar en presencia o ausencia del hongo simbiote (Meyer, 1973; Honrubia *et al.*, 1992; Brundrett *et al.*, 1996).

En ecosistemas naturales, las plantas con asociaciones micorrízicas facultativas son comunes en hábitats muy secos, húmedos o fríos donde la productividad de la planta esta limitada por las condiciones suelo/ambiente, o en hábitats perturbados donde el inóculo fúngico es limitado. Los árboles que carecen de micorrizas son raros, sin embargo, existen géneros de gran importancia en la agricultura y horticultura incluyendo miembros de la familia *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae*, *Polygonaceae*, *Brassicaceae*, *Scrophulariaceae*, *Commelinaceae*, *Juncaceae* y *Cyperaceae* (Brundrett, 1991).

Se ha demostrado que las especies no se limitan a presentar un sólo tipo de micorriza. En el caso de la familia *Pinaceae* generalmente presentan EM, *Pseudotsuga menziesii*, *Abies lasiocarpa* y *Tsuga mertensiana* así como MA con hongos del género *Glomus*, al mismo tiempo (Cázares y Trappe, 1983).

Las asociaciones ECM predominan en coníferas y arbustos; también se presentan en algunas plantas herbáceas incluyendo *Kobresia* (*Cyperaceae*) y especies de *Polygonum* (*Polygonaceae*); *Angianthus*, *Lactuca*, *Waitzia* (*Compositae*); *Poranthera* (*Euphorbiaceae*); *Brunonia*, *Goodenia* (*Goodenaceae*); *Pyrola* (*Pyrolaceae*); *Galium* (*Rubiaceae*) y *Stylidium* (*Stylidiaceae*) (Warcup, 1980; Harley y Smith, 1983; Kope y Warcup, 1986; Pérez-Moreno, 1995). Estas especies son dominantes en regiones boreales frías o regiones alpinas, y algunos bosques de hoja ancha en regiones templadas o regiones mediterráneas, pero ellos también se presentan en

algunos bosques tropicales, sabanas tropicales y bosques lluviosos (Brunddrett, 1991), aunque son menos abundantes (Moyersoen *et al.*, 2001).

La presencia de especies fúngicas ECM en bosques boreales y templados es vital en la supervivencia del hospedero, dado que los nutrientes disponibles debido a la mineralización esta restringido por las bajas temperaturas y los suelos anóxicos. En estos ecosistemas, las fuentes externas y nutrientes en las plantas usualmente son mínimas, por lo que las asociaciones ECM permiten la asimilación de nitrógeno orgánico, permitiendo la reducción de la competencia de otros grupos de plantas sin la capacidad de utilizar este tipo de nitrógeno (Jonasson y Shaver, 1999).

2.3.5.2. Micobiontes

Actualmente se estima que existen más de 5, 000 especies de hongos ECM en cuando menos 2,000 especies de plantas leñosas (Pirozynski, 1981), capaces de generar o formar EM, por mencionar sólo al grupo de los basidiomicetos, con aproximadamente el 69 % de la micobiota mundial (Marx y Cordell, 1989; Honrubia *et al.*, 1992). Dichos hongos se encuentran distribuidos en cuatro clases dentro de los Eumycota: Ascomycotina, Basidiomycotina, Deuteromycotina y Zygomycotina (Trappe, 1962).

De la clase Ascomycotina se conocen como hongos capaces de formar EM a las especies pertenecientes a los géneros *Tuber*, *Elaphomyces*, *Sarcosoma*, *Sarcoscypha*, *Gyromitra* y *Helotium* entre otros (Honrubia *et al.*, 1992).

En la clase Basidiomycotina, tal vez la más diversa y abundante en cuanto a formas, colores y características exteriores, se pueden mencionar a sólo algunos de los muchos géneros conocidos que forman este tipo de asociación,

como *Boletus*, *Amanita*, *Suillus*, *Laccaria*, *Russula*, *Lactarius*, *Hygrophorus*, *Tricholoma*, *Cortinarius*, *Hebeloma*, *Ramaria*, etc. Dentro de esta clase se encuentra el grupo de los Gasteromicetos, con los géneros *Astraeus*, *Scleroderma*, *Hymenogaster*, *Hysterangium*, *Alpova*, *Melanogaster*, *Pisolithus* y *Rhizopogon* (Honrubia *et al.*, 1992).

Los hongos incluidos en la clase Deuteromycotina y hongos imperfectos, corresponden a fases asexuales de los ascomicetos, razón por lo cual se suelen incluir conjuntamente con ellos en las taxonomías modernas; la única especie de este grupo que es ECM es *Cenococcum geophilum* (Honrubia *et al.*, 1992).

Dentro de la clase Zigomycotina se clasifican a aquellos hongos responsables de la formación de la micorriza arbuscular, sin embargo, el género *Endogone* perteneciente al orden de los Endogonales, esta descrito como formador de EM: *Endogone lactiflua* Bk. et Br. y *Endogone flammicorona* Trappe et Berd (Miller, 1984; Honrubia *et al.*, 1992).

En general, se pueden mencionar que la mayoría de las especies pertenecientes a los grupos de hongos antes mencionados son ECM, sin embargo existen especies que pueden formar dos tipos de micorrizas las EM y las ectendomicorrizas o micorrizas ericoides; esto dependerá de la planta con la que vayan a formar la asociación (Honrubia *et al.*, 1992; Peterson y Farquhar, 1994).

Dentro de los géneros de hongos que son simbiontes obligados en condiciones naturales se encuentran: *Amanita*, *Boletus*, *Elaphomyces*, *Endogone*, *Hebeloma*, *Lactarius*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Scleroderma*,

Suillus, *Telephora* y *Tuber*. Otros son micorrízicos facultativos tales como: *Cenococcum graniforme*, *Laccaria laccata* o *Xerocomus subtomentosus* que pueden sobrevivir por varios años en forma de micelio de vida libre saprofítica (Meyer, 1973).

2.3.5.2.1. Especificidad micobionte-fitobionte

A pesar de que muchas de las plantas terrestres forman micorrizas y el número de las especies de hongos es de miles, muchas combinaciones hongo-hospedero son incompatibles (Molina *et al.*, 1992). La efectividad de la simbiosis va a depender de la compatibilidad entre el hongo y la planta, es decir de la variación genética y el origen de las especies forestales y fúngicas (van der Heijden y Kuyper, 2001).

El fenómeno de compatibilidad esta ligado a la ultraestructura, bioquímica y niveles genéticos de las interacciones entre hongos y plantas. El reconocimiento inicial, las alteraciones en la estructura celular, y establecimiento de interfases funcionales son vitales para balancear las relaciones e intercambio de metabolitos (Molina *et al.*, 1992).

Existen evidencias de que las micorrizas secretan glucoproteínas específicas capaces de reconocer y unir proteínas o estructuras de los polisacáridos presentes sobre la superficie de la raíz. Se ha sugerido que esas proteínas secretadas intervienen en la especificidad de alta afinidad en la interacción del hospedero y su micobionte (Martin *et al.*, 1994). Por su parte, Marks y Foster (1973) sugirieron que los taninos contienen polifenoles tóxicos para los hongos, además de resinas que tienen una conocida actividad fungistática. Estos compuestos son secretados por el hospedero y podrían actuar como un tamiz

biológico que va a seleccionar solamente especies de hongos capaces de tolerarlos.

Al utilizar la histoquímica se pueden detectar y localizar azúcares específicos en la interfase de la EM, revelando diferencias en la composición de la pared celular en los tejidos micorrízicos y no micorrízicos. La adhesión de los hongos es mediada por una matriz mucilagínosa que envuelve a la hifa y la superficie de la raíz en asociaciones compatibles. Una capa de polímeros fibrilares extracelulares está presente en la matriz del micelio de algunos hongos antes de la interacción con la raíz y son depositados en los sitios de contacto. En contraste, en las interacciones no compatibles este material no es secretado, y el desarrollo de la micorriza se retarda (Martin *et al.*, 1994). Otro síntoma de incompatibilidad es el rompimiento de la corteza y la lignificación de la raíz. Estas respuestas del hospedero sugieren un tipo de mecanismo de defensa fenólica como las observadas en muchas interacciones planta-patógeno (Molina y Trappe, 1982).

Algunos otros productos de la plantas inducen genes que pueden ser necesarios para el desarrollo y mantenimiento de la simbiosis. Los genes fúngicos de los cuales la expresión es específicamente inducida o reprimida en la planta, puede protagonizar la identificación de los factores desconocidos de la compatibilidad (Martín *et al.*, 1994).

Bruns *et al.* (2002) puntualizaron que el grado de especificidad varía entre los hongos. Las ventajas que esta implica son poco claras, sin embargo, estos autores mencionan que existe un incremento en los beneficios por parte de los especialistas, dadas sus adaptaciones fisiológicas, es decir, los hongos

especialistas pueden ayudar a sus hospederos a competir en ecosistemas complejos al reducir el epiparasitismo facultativo de otras plantas. Por otra parte, se considera que muchas especies de hongos pueden estar asociadas a diversas especies forestales, es decir, muestran compatibilidad con cualquier hospedero, sugiriéndose la existencia de algún factor de reconocimiento común. Existen alrededor del 72 % de hongos ECM potencialmente compatibles de amplio número de hospederos, tal es el caso de *Boletus edulis*, *Laccaria laccata*, *Cenococcum geophilum* Fr. y *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Cooke et Couch, que tienen la capacidad genética de formar EM con más de veinte géneros de plantas vasculares (Harley y Smith, 1983; Molina *et al.*, 1991), se ha demostrado experimentalmente que *Amanita muscaria* forma micorrizas con varias especies de *Pinus*, *Picea* y *Betula*. Probablemente lo mismo sucede con otros géneros, como *Cenococcum graniforme* que forma micorriza con 25 géneros de árboles, incluido *Nothofagus* y *Eucalyptus* (Trappe, 1964); un ejemplo de alta especificidad en el que una sola especie de hongo puede estar asociada con una sola especie de árbol, es el del género *Suillus grevillei* (Kl.) Sing. (Duddridge, 1985) y *Boletus elegans*, que sólo se asocian con el género *Larix*, *Alpova diplophloeus* (Molina, 1979) y *Amanita phalloides* con los robles (Ruehle y Marx, 1979; Molina y Trappe, 1982).

Entre las coníferas, el género *Pinus* muestra pocas diferencias infragenéricas en su capacidad para formar EM con varios hongos. Géneros ECM comúnmente asociados con *Betula* incluyen a *Russula*, *Leccinum*, *Boletus* y *Cortinarius* (Fleming, 1985; Deacon y Fleming, 1992; Molina *et al.*, 1992), por el contrario, *Pseudotsuga menziesii* y *Larix occidentalis* sólo pueden asociarse con

spp., *Tricholoma* spp.; *Hygrophorus* spp.; *Hydnellum peckii*, *Suillus tomentosus*, *Philoderma byssinum* y *Sarcodon scabrosus*, (Chu-Chou, 1979; Visser, 1995; Nara *et al.*, 2003).

Sin embargo, algunos hongos, principalmente especies de *Rhizopogon*, *Suillus brevipes*, *Inocybe* spp. *Cenococcum geophilum* y *Mycelium radialis atrovirens* presentan la capacidad para colonizar pinos jóvenes y viejos y persistir a través de la vida de la masa (Chu-Chou, 1979, Visser, 1995; Natarajan *et al.*, 1992).

2.4. Ecofisiología de las ectomicorrizas

Las comunidades microbianas en el suelo están integradas por bacterias, actinomicetos, hongos, algas, protozoarios, nematodos y microartrópodos como colembola (Sylvia *et al.*, 1998), presentando una mayor densidad en la rizósfera debido a que las raíces proporcionan mayores nutrimentos y factores de crecimiento cuya función es estimular la actividad microbiana (Bolton *et al.*, 1993).

Un componente dominante de la comunidad microbiana de la rizósfera de árboles de zonas forestales templadas son los hongos ECM. Este tipo de hongos forman simbiosis benéficas con las raíces finas de angiospermas o gimnospermas (Smith y Read, 1997). Dada la naturaleza heterótrofa de los micobiontes, estos obtienen compuestos de carbono derivados fotosintéticamente (Harley, 1989) a partir del hospedero, por su parte los fitobiontes reciben una mayor cantidad de nutrimentos minerales y agua, ya que las micorrizas sirven como extensiones de la raíz, así como protección contra patógenos y metales pesados (Duddridge *et al.*, 1980), ya que se ha

observado que la reducida formación micorrízica o su ausencia influye en su vulnerabilidad al estrés ambiental y por patógenos (Hampp *et al.*, 1999).

2.4.1. Transferencia de carbohidratos

Dentro de los múltiples beneficios que el fitobionte proporciona al micobionte se encuentra la transferencia de carbohidratos, ya que el hongo es incapaz de utilizar polisacáridos complejos como fuentes de carbono y energía (Bowen y Theodorou, 1973), la cual puede ser medida como una correlación negativa entre el crecimiento de la planta y la biomasa fúngica (Nylund y Wallander, 1989; Colpaert *et al.*, 1992). En estudios realizados por Bauer *et al.* (1991) se demostró la transferencia de carbohidratos hacia el córtex, la red de Hartig y el manto fúngico, dando evidencias de que potencialmente todos los carbohidratos necesarios para el crecimiento, tanto del hongo como de la planta, pueden ser proporcionados en los estadios iniciales de la formación de la EM, por la fotosíntesis.

Las hifas ECM sólo pueden utilizar hexosas como fuente de carbono y glucosa, las cuales son el resultado del catabolismo de la sacarosa considerada como la fuente primaria del carbono en las EM (Hampp *et al.*, 1999). La sacarosa es hidrolizada en la interfase apoplástica, y los monosacáridos son así tomados por el micobionte y las células corticales de la raíz. Por lo que el fitobionte reduce su capacidad de importarlos, debido probablemente al suministro de aminoácidos derivados al micobionte, ya que hasta un 30 % de la producción de fotoasimilados totales son transferidos. Los monosacáridos no son sólo importantes para el crecimiento fúngico y su función, sino que también

constituyen señales moleculares que regulan al hongo y la expresión de genes en la simbiosis (Nehls y Hampp, 2000).

La planta compensa esta pérdida de carbohidratos por un incremento en su eficiencia fotosintética. Harris *et al.* (1985) encontraron que la colonización ECM incrementó considerablemente el área foliar específica, resultando en un incremento en la asimilación de carbono. Por su parte, Dosskey *et al.* (1990) y Miller *et al.* (1998) observaron que la tasa fotosintética específica del hospedero incrementó diferencialmente por la infección de algunas especies de hongos micorrizicos y dado que los compuestos carbonados provienen de la fotosíntesis se espera una mayor aportación de la planta al hongo. Uno de los factores que van a determinar como diferentes hongos afectan la fotosíntesis y las relaciones hídricas es el estrés por agua. Dosskey *et al.* (1991) evaluaron el papel de la demanda de fotosintatos en la respuesta de plantas de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco inoculadas con *Rhizopogon vinicolor*, *Laccaria laccata* y *Hebeloma crustuliniforme*; demostraron que en ausencia de efectos nutrimentales y de asimilación de agua, la tasa de fotosíntesis neta y la conductancia estomatal estuvieron correlacionadas con la tasa de exportación de fotosintatos al hongo micorrízico. Puntualizaron que la fuerte demanda de la micorriza por fotosintatos estimuló la fotosíntesis, por lo que una de las respuestas es la apertura de los estomas a pesar del estrés de agua.

2.4.2. Mejora de la estructura del suelo

La mejora en la estructura del suelo es importante en la salud de la vegetación, dado que ésta facilita la infiltración de agua, aireación, crecimiento radical y movimiento de los organismos del suelo. Tanto los hongos ECM como MA

mejoran la estructura del suelo al unir los agregados del suelo, uno con otro y las raíces de las plantas. Las bacterias cementan las partículas y contribuyen de manera importante a la estructura, por su parte las hifas de las micorrizas ayudan al suministrar algunos de los compuestos que las mantienen vivas (Sylvia, 1990).

Los hongos ECM cuyas hifas extramatriciales producen enzimas hidrolíticas tales como proteasas y fosfatasas presentan un impacto importante sobre la mineralización de la materia orgánica y la disponibilidad de nutrimentos, otra de sus funciones es la de unir las partículas del suelo y por ende mejoran la agregación del mismo (Sylvia, 1990). Por su parte, las micorrizas arbusculares contribuyen a la formación de estructuras agregadas relativamente estables. Las raíces fibrosas y las hifas fúngicas arbusculares presentan la apariencia de una bolsa pegajosa cuya función es unir partículas del suelo para formar macroagregados, así como producir una glicoproteína, la glomalina, que es depositada sobre las paredes externas de las hifas sobre las partículas del suelo adyacentes. La glomalina es un pegamento hidrofóbico estable que puede reducir la ruptura de los macroagregados durante eventos de humedecimiento y desecamiento, al retardar el movimiento del agua al interior de los poros generando la estructura agregada (Miller y Jastrow, 2000).

2.4.3. Asimilación de nutrimentos

Las comunidades vegetales y fúngicas en la naturaleza están inmersas en un proceso constante de competencia, por ello el acceso a nutrimentos es de gran importancia en un ambiente circundante competitivo, una forma de salir adelante es vía asimilación de nutrimentos (Van der Heijden *et al.*, 1998). Dentro de los

beneficios reportados por el micobionte a la planta se encuentra la transferencia de nutrimentos minerales de baja movilidad (N, P, Mg, Ca, K, S, Fe, Cu, Bo y Mn) del suelo a través de las hifas a grandes distancia hasta la región de intercambio en la micorriza (Ashford y Allaway, 2002). Las vacuolas de las hifas probablemente tengan un papel central en este transporte, dado que contienen elementos de importancia nutrimental en abundancia. El microanálisis de tales estructuras indica que existe un alto contenido de P, K y polifosfatos, en el manto y la red de Hartig.

2.4.3.1. Fósforo

La distribución y función de las hifas extramatriciales en la eficiencia de la asimilación de nutrimentos es clave. O'Keefe y Sylvia (1991) señalaron que el diámetro de las hifas incrementó el área de la superficie absorbente por lo que existe una exploración eficiente de grandes volúmenes de suelo, ya que el gradiente de difusión para un nutrimento esta inversamente relacionado con el radio de la unidad absorbente. Las hifas se distribuyen mas allá de la zona de agotamiento de nutrimentos, zona que se caracteriza porque los nutrimentos son removidos de la solución del suelo más rápidamente de lo que ellos pueden ser remplazados por difusión (O'Keefe y Sylvia, 1991), al crear puentes que traspasan esta zona, exploran suelos con un suministro adecuado de nutrimentos. Dentro de estos nutrimentos se encuentra el fósforo, el cual esta generalmente presente en el suelo en forma inorgánica insoluble y en forma orgánica; las plantas sólo pueden absorber formas solubles de P y su asimilación causa esta zona de agotamiento alrededor de las raíces. El efecto benéfico que los hongos ECM tienen sobre la asimilación de fósforo se debe a

que este elemento no se mueve a grandes distancias en el suelo comparado con el N y el S, de ahí su importancia (Yao *et al.*, 2001), por lo que la formación ECM incrementa su contenido en la planta y su capacidad para asimilarlo (Finlay y Read, 1986; Pérez-Moreno y Read, 2000) como polifosfato de las hifas a la planta y posteriormente incorporarlo al tejido vascular (Smith y Read, 1997; Kothe *et al.*, 2002). Por su parte, el micelio extramatricial proporciona una alta afinidad para el sistema de asimilación de nutrimentos al liberar enzimas proteasas, fosfatasas y oxidasas (Bending y Read, 1995) que facilitan su solubilización del suelo al acelerar la mineralización de la materia orgánica, teniendo como resultado la liberación de fósforo inorgánico (Antibus *et al.*, 1997). Las raíces de las plantas y otros microorganismos del suelo también producen fosfatasas, sin embargo, los hongos micorrízicos indudablemente intensifican esta actividad

En un estudio realizado por Bending y Read (1995) se demostró que la capacidad de incrementar la asimilación de nutrimentos es causada por un incremento en el área superficial del sistema radical por un extenso micelio extramatricial. Ellos inocularon plantas de *Pinus sylvestris* L con *Suillus bovinus* (Fr.) O. Kuntze y *Thelephora terrestris* (Ehrh.), con el objetivo de evaluar el crecimiento micelial en cámaras, a las cuales se le adicionaron muestras de materia orgánica colectada del piso forestal de una masa de pinos. Observaron que el micelio colonizó el horizonte orgánico, reduciendo las concentraciones de N, P y K. Estos resultados concuerdan con los reportados por Rosseau *et al.* (1994) quienes encontraron un incremento en el área superficial micelial y por ende una mayor absorción de nutrimentos en plantas de *Pinus taeda* L.

inoculadas con *Pisolithus tinctorius* Pers. Coker. Por su parte, Colpaert *et al.* (1999) puntualizaron que el micelio externo de los hongos ECM *Paxillus involutus*, *Suillus luteus*, *Suillus bovinus* y *Thelephora terrestris* influenciaron fuertemente la capacidad de asimilación de P en plantas de pino. El incremento en la asimilación de P estuvo correlacionado con la biomasa fúngica. La tasa de asimilación más alta se presentó en plantas asociadas con hongos que produjeron abundante micelio externo, sin embargo, el incremento en la tasa de asimilación no resultó en un incremento en la transferencia de nutrientes a los tejidos vegetales.

Brandes *et al.* (1998) evaluaron la contribución del micelio extramatricial en la nutrición de N y P en plantas de *Picea abies* (L.) Karst confirmando una contribución hifal de 73 % y 76 % a la asimilación de N y P total, respectivamente. Yao *et al.* (2001) encontraron que la asimilación y concentración de fósforo en los brotes fue más alta en las plantas cuando se inocularon con hongos micorrízicos que en las plantas control. Por su parte, Thomson *et al.* (1994) puntualizaron que el efecto de la inoculación ECM en el incremento en crecimiento estuvo relacionada con un incremento en la asimilación de nutrientes por la planta.

2.4.3.2. Nitrógeno

Un bajo suministro de nitrógeno (N) limita el crecimiento vegetal en bosques boreales y templados debido a la lenta tasa de descomposición de la materia orgánica (Read, 1991). Los hongos ECM traslocan compuestos nitrogenados a las plantas al mejorar su movilización, facilitando el acceso a fuentes orgánicas de N y por el incremento de la toma de este nutriente vía hifas

extramatriciales (Read, 1991; Perez-Moreno y Read, 2000). Las hifas movilizan el N orgánico por medio de enzimas secretadas tales como las proteasas y lo absorben a través de transportadores aminoácidos de alta afinidad (Bending y Read, 1995; Wallenda y Read, 1999). Las formas predominantes del N transferido al hospedero son la glutamina, glutamato y asparagina (Smith y Read, 1997).

Berredjem *et al.* (1999) demostraron que a pesar de que el amonio es una de las fuentes de N para los hongos ECM algunos pueden utilizar nitratos. Al evaluar la capacidad de asimilación de NO_3^- y NH_4^+ en *Scleroderma verrucosum* observaron que cuando se tenían concentraciones iguales de amonio y nitrato, la tasa de asimilación de amonio fue más alta que la de nitrato. Puntualizaron que una limitada concentración de amonio es un prerequisite para la asimilación de nitratos. Tales resultados concuerdan con los encontrados por Baar *et al.* (1997) quienes observaron que la biomasa y la tasa de crecimiento de *Lactarius hepaticus* y *Paxillus involutus* en medios con concentraciones de amonio fue mayor que en un medio con glicina como fuente de nitrógeno.

Mientras que la investigación micorrízica enfatiza el papel de la simbiosis en la facilitación de la captura de esos nutrimentos en forma iónica, Read y Pérez-Moreno (2003) estudiaron la movilización de N y P de substratos naturales (detritos), los cuales son las fuentes primarias de esos elementos en los ecosistemas terrestres. Puntualizan el papel de las micorrizas ericoides y EM en la movilización de N y P a partir de polímeros estructurales y orgánicos, forma en que tales elementos son secuestrados. Estos resultados sustentan la

hipótesis que la selección ha favorecido a este tipo de micorrizas con capacidades saprofíticas bien desarrolladas en ecosistemas caracterizados por retención de N y P así como complejos orgánicos en el suelo.

2.4.4. Resistencia a sequía

La resistencia a sequía en plantas micorrizadas ha sido extensivamente documentada (Nelsen, 1987) siendo asociada con la concentración de P en la planta (Nelsen y Safir, 1982). Esta tolerancia se debe a que las plantas micorrízicas presentan un incremento en la turgencia, potencial de agua foliar, conductancia estomatal, conductividad hidráulica de la raíz, capacidad de absorción, capacidad de adquirir agua del suelo a potenciales de agua menores, recuperación más rápida de la capacidad fotosintética y un incremento en la capacidad de supervivencia durante la sequía (Bethlenfalvay *et al.*, 1988). Recientemente, Ruiz-Lozano *et al.* (1995) sugirieron que los cambios en el potencial osmótico pueden contribuir a una mayor tolerancia a sequía.

Dixon *et al.* (1983) observaron una disminución en los efectos de la sequía en plantas de *Quercus vellutina* colonizadas con *Pisolithus tinctorius*. Resultados similares son los reportados por Walker *et al.* (1989) mostraron que plantas de *Pinus taeda* colonizadas con *Pisolithus tinctorius* mostraron potenciales de agua menores a diferencia del control. Lu-Quan *et al.* (2000) inocularon plantas de *Castanea mollissima* con *Boletus edulis*, *Xerocomus chrysenteron*, *Cortinarius sublanatus*, *Cortinarius* sp., *Lepista personata*, *Hydnum* sp., *Boletus* sp. y *Pisolithus tinctorius*. Observaron que la inoculación incrementó la resistencia a sequía de las plantas así como incrementos en el contenido de agua foliar de

12.08-57.49 % bajo condiciones de estrés de agua, disminución y rápida recuperación del marchitamiento de 0.2 – 1.2 días después de la irrigación, una disminución en el coeficiente de marchitamiento de 21.95-58.04 % y un incremento en la tasa fotosintética de 3.84%-230.72 %. Otros cambios que se presentaron en plantas inoculadas fue un incremento en el grado de succulencia foliar de 0.09%-7.88%, y en el área específica foliar de 2.67-18.83%. Otras características fisiológicas afectadas por la inoculación fue un incremento en la capacidad de agua foliar y una disminución de 3.54 %-29.61 % del déficit de saturación de agua. Adicionalmente, la tasa de transpiración, expresada como resistencia estomatal y conductancia de plantas inoculadas fue menor que el control bajo condiciones de estrés, pero mucho más alta bajo condiciones normales. Se observó una mejora en la eficiencia en el uso de agua, la cual fue de 7.89-79.79 % bajo estrés por agua, y de 4.78-63.89 % bajo condiciones normales. El contenido de prolina libre incrementó rápidamente en el control bajo condiciones de estrés de 50-54 % indicando una deficiencia en el suministro de agua. Este fenómeno permite que las plantas ectomicorrízicas presenten una resistencia menor a la pérdida de agua por vapor a través de los estomas que las plantas no micorrizadas, favoreciendo que la fotosíntesis se presente a bajos potenciales de agua (Allen *et al.*, 1981; Stahl y Smith, 1984; Stahl *et al.*, 1988 ; Yanai *et al.*, 1995). Este mecanismo es indudablemente importante para las plantas de pino en sitios muy secos, ya que tales características ayudan a extender el crecimiento del árbol en periodos donde la asimilación de nutrimentos y agua por las raíces secundarias es restringida por la disponibilidad de la humedad del suelo (Cairney, 1992).

2.4.5. Protección contra patógenos

Se ha comprobado que el hongo propicia un antagonismo microbiano en la zona de la rizósfera, proporcionando una mayor resistencia a las plantas en contra de agentes patógenos, sobre todo cuando los árboles están en estado de brinzal (Dixon y Marx, 1984). Esto le proporciona a la planta cierta resistencia a las enfermedades, por lo que su desarrollo no se ve afectado.

Las enfermedades de raíz causada por patógenos fúngicos son el principal problema en los viveros. Algunos basidiomycetes ECM pueden suprimir los patógenos pudridores de la raíz. Por ejemplo, *Laccaria laccata* (Scop. Ex. Fr.) Berk. et Br. y *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch inhiben *Fusarium oxysporum* Schlecht. Em. Snyder. & Hans. y *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Schotten. En cultivos asépticos protegieron plantas de coníferas contra patógenos de la raíz (Sinclair *et al.*, 1982; Chakravarty y Unestam, 1987). Así también, *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. puede suprimir la pudrición de la raíz causada por *F. oxysporum* sobre *Pinus resinosa* Ait. y en menor grado sobre *P. strobus* in vitro (Duchesne *et al.*, 1989; Farquhar y Peterson, 1990).

Dentro de los mecanismos propuestos para explicar este efecto protector se incluyen: el desarrollo de una barrera física —el manto de la EM— a manera de escudo, que bloquea el libre acceso de los fitopatógenos de la raíz, así como la producción de compuestos antibióticos que suprimen su desarrollo, competencia por nutrientes, incluyendo producción de sideróforos y la inducción de mecanismos generalizados de defensa (Garbaye, 1994), dentro de los cuales se encuentra la inhibición de conidios de algunos hongos patógenos

como *Truncatella hartigii* por la disrupción de la turgencia de la célula (Kope *et al.*, 1991).

2.4.6. Protección contra metales pesados

Las altas concentraciones de cationes de metales presentan efectos adversos sobre los microorganismos y procesos microbianos. Entre los microorganismos del suelo, los hongos micorrízicos son los únicos que proporcionan un vínculo directo entre el suelo y las raíces, por lo que son de gran importancia en la disminución o eliminación del efecto de metales pesados y toxicidad a las plantas (Leyval *et al.*, 1997). Se ha encontrado que las micorrizas tienen la capacidad de mitigar los efectos tóxicos a las plantas causados por Al, Cd, Cu y Zn (Bradley *et al.*, 1982) al reducir su traslocación a la planta hospedero (Jentschke y Godbold, 2000).

Turnau *et al.* (2002) evaluaron las propiedades de bioabsorción e inmovilización de metales pesados en micorrizas de *Pinus sylvestris* en desechos de zinc en Polonia y Francia. Encontraron que las micorrizas de *Hebeloma* fueron más frecuentes a diferencia de las micorrizas formadas por hongos suilloides, quienes presentaron un efecto biofiltrador de Pb y Zn por el manto fúngico, sin embargo, el análisis del sistema radical mostró un porcentaje alto de raíces cortas no micorrízicas, sugiriendo la inhibición de su formación o una disminución en el número de propágulos micorrízicos. Martino *et al.* (2002) explican esta adaptación al hecho de que los iones de zinc inducen modificaciones en el arreglo de las proteínas secretadas, con un cambio hacia la producción de polipéptidos de bajo peso molecular. Observaron también que en *Oidiodendron maius* se presentaron enzimas hidrolíticas (nucleasa,

proteínasa, lysozima) y dos isoformas dismutasa superóxida. Las dos primeras son enzimas antioxidantes conocidas por jugar un papel en la respuesta de plantas, animales y microorganismos a metales pesados. Determinaron altas concentraciones de Cu y Cd en el micelio extramatricial de *Hebeloma* e *Inocybe*, mientras que ninguna o baja concentración de esos elementos dentro del manto fúngico. Por su parte, Ahonen-Jonnarh *et al.* (2003) demostraron que la presencia del micelio ECM disminuyó la lixiviación de cationes base y de aluminio del suelo a plantas de esta misma especie. Estos resultados confirman parcialmente, que bajo condiciones de suelo ácidas la asimilación de metales pesados se incrementó. Dos mecanismos explican ampliamente esta respuesta. Los sitios electronegativos sobre las paredes celulares de las hifas unen los cationes de los metales pesados cargados positivamente (Galli *et al.*, 1994). Es posible que la protonación de sitios cargados negativamente en la planta o paredes del hongo resulte en menos unión y mayor asimilación de cationes de los metales. La segunda vía es la inmovilización de los cationes por complexation en vacuolas con polifosfatos (Martin *et al.*, 1994) o asociado a péptidos como metalotionina. Es decir, en las EM, las hifas de los tejidos fúngicos contienen polifosfatos vacuolares, los cuales tienen la capacidad de unir el Al, metales pesados, radionuclidos y N. Esos polímeros negativos de los fosfatos representan un almacén efectivo y un mecanismo desintoxicante, el cual está ausente en las raíces (Brunner, 2001). En un estudio realizado por Reddy *et al.* (2002) al evaluar la influencia del Al en la nutrición mineral del hongo ECM, *Pisolithus* sp y *Cantharellus cibarius* encontraron que la actividad de la fosfatasa ácida de las hifas se incrementó en presencia de Al en ambos

hongos sugiriendo el papel de esas enzimas en la desintoxicación de este elemento. Por otro lado, Entry *et al.* (1994) demostraron que algunos tipos de micorrizas en *Pinus ponderosa* y *Pinus radiata* pueden remover cantidades apreciables de Sr-90 del suelo, un radionuclido característico de accidentes de reactores y armas nucleares y almacenarlo en el tejido vegetal. Estas EM fueron capaces de remover 3-5 veces más Sr-90 de suelo contaminado a diferencia del control. Turnau *et al.* (2001) determinaron que las micorrizas de *Suillus luteus* presentaron una fuerte acumulación de Ca, Fe, Zn y Pb dentro del manto fúngico y en los rizomorfos. El tejido vascular fue enriquecido con P, S y K mientras que altas concentraciones de Si y Cl estuvieron presentes en la endodermis. El Cu fue el único elemento que mostró elevadas concentraciones en la región del cortex.

Colpaert y van Assche (1987) aislaron cepas de *Suillus luteus* de suelos contaminados con zinc que fueron capaces de crecer en presencia de 1,000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de este elemento a diferencia de las cepas obtenidas de carpóforos de suelos no contaminados las cuales no mostraron crecimiento. Por su parte, Martino *et al.* (2003) puntualizaron que las cepas fúngicas derivadas de suelos contaminados y no contaminados movilizan compuestos inorgánicos insolubles a diferentes extensiones. Observaron que las cepas de suelos contaminados mostraron poca capacidad para solubilizar Zn de ZnO y $\text{Zn}^{-3}(\text{PO}_4)^2$, a diferencia de las cepas de suelos no contaminados las cuales mostraron un potencial de solubilización mayor. Estos resultados sugieren que las cepas de suelos contaminados y el control pueden interactuar de manera diferente con tales contaminantes asimismo enfatizan que tal comportamiento puede reflejar

estrategias específicas para mantener la homeostasis de metales esenciales bajo diferentes condiciones de suelo.

Uno de los aspectos a considerar para la potencial utilización de hongos ECM en áreas con altas concentraciones de metales es su adaptación a tales factores, dentro de las características idóneas se encuentra un incremento en la asimilación metales así como promover un rápido crecimiento en plantas y una rápida ganancia en biomasa (Khan *et al.*, 2000). La selección natural de ecotipos micorrízicos conlleva una variación en la sensibilidad genotípica a altas concentraciones de metales (Griffien *et al.*, 1994).

2.4.7. Equilibrio ecológico

No sólo el crecimiento de plantas individuales, sino que la mayoría de procesos fundamentales al ecosistema dependen de miles de especies fúngicas asociadas a un gran número de especies forestales y microorganismos, por lo que actualmente existe interés en determinar la importancia funcional de tal diversidad en ecosistemas naturales y manejados (Cairney, 1999). La teoría ecológica predice una relación positiva y asintótica entre la diversidad vegetal y la productividad del ecosistema basada en la capacidad de comunidades vegetales más diversas en la utilización de recursos limitantes más eficientemente (Klironomos *et al.*, 2000). De acuerdo con estos autores, en ecosistemas naturales, la productividad vegetal está usualmente en función de la presencia y composición de las asociaciones micorrízicas.

Los hongos ECM exhiben una alta diversidad aún en pequeños bosques de monocultivo en donde se han contabilizado de 20 a 35 especies. Tal diversidad puede ser explicada en el contexto de la competencia por recursos, según

Bruns (1995) los hongos micorrízicos compiten por dos tipos de recursos: carbono derivado del hospedero y suelo o detritus derivados de nutrimentos minerales. Ambos tipos de recursos están distribuidos en el espacio (p.e. profundidad del suelo, distancia al árbol) y el tiempo (p.e. estación, etapas sucesionales del hospedero). Algunas especies se distribuyen en espacio y tiempo a diferentes escalas, sin embargo, la pregunta de su patrón de distribución no tiene respuesta a la fecha. Una posible respuesta es la distribución de los recursos minerales, los cuales se presentan en sustratos discretos en el suelo, mantillo y dentro de los microorganismos del suelo; la diversidad bioquímica exhibida por los hongos puede traducirse en diferencias en el acceso a esos recursos entre las especies.

Varios investigadores han hipotetizado que las micorrizas pueden regular las relaciones vegetales competitivas, la composición, la diversidad de especies y la dinámica sucesional de algunas comunidades vegetales (Fitter, 1977; Allen y Allen, 1984; Connell y Lowman, 1989; Perry *et al.*, 1989; Allen, 1991; Miller y Allen, 1992; Hartnett, 1999), aunque los patrones y mecanismos llegan a ser objeto de mucho debate. Varios autores han demostrado que tanto hongos endomicorrízicos (Janos, 1980; Yocum, 1983; Allen y Allen, 1992; Benjamin y Allen, 1987; Bellgard *et al.*, 1994) como hongos ECM (Perry *et al.*, 1989; Amaranthus y Perry, 1989; Trappe y Luoma, 1992) regulan la dirección y alteran la trayectoria de la sucesión secundaria posterior a un disturbio.

Los disturbios naturales a pequeña escala que dañan raíces, mezclan los horizontes del suelo y las capas de mantillo, o cambian el pH local y la disponibilidad de nutrimentos, probablemente crean hábitats adicionales para

los hongos ECM. Evidencias de los patrones de fructificación y las diferencias en las estrategias de colonización sugieren que tales disturbios pueden ser importantes para el establecimiento de algunas especies. Por lo que el reemplazo competitivo entre especies tiene el potencial teórico de incrementar la diversidad, sin embargo, a pesar de la evidencia no se ha demostrado el papel que juegan en el mantenimiento de la diversidad (Bruns, 1995).

Dickie *et al.* (2002) propusieron que la diferenciación del nicho para diferentes substratos del suelo han sido propuestos como un mecanismo que contribuye a la diversidad fúngica ECM. Esta hipótesis es muy inestable debido a la escasez de técnicas que estudien la distribución *in situ* de las hifas de hongos ECM. Estos autores desarrollaron una técnica basada en la extracción de DNA del suelo con el objetivo de realizar un análisis genético denominado PCR y T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) a través del cual identificaron la distribución vertical de hifas fúngicas en cuatro capas del piso forestal de una plantación de *Pinus resinosa*. El análisis cluster sugirió seis diferentes patrones de utilización de recursos: especialistas de la capa de mantillo, generalistas de la capa de mantillo, especies exclusivas de la capa F, especies de la capa H y del horizonte B.

Un estudio realizado por Simard *et al.* (1997) utilizando CO₂ marcado radiactivamente con ¹⁴C demuestra que existió intercambio de nutrimentos entre árboles comunicados por redes de filamentos de hongos. Esto tiene gran importancia en el equilibrio ecológico de la comunidad forestal, ya que se observó que los árboles expuestos a la luz solar proporcionaban alimento a los que presentaban deficiencia de luz, factor indispensable para la fotosíntesis.

Este hecho contribuye a que los árboles jóvenes puedan desarrollarse hasta alcanzar alturas considerables y fotosintetizar eficientemente, ya que en las primeras etapas de su vida se encuentran a la sombra de los árboles adultos. Tal conocimiento es necesario para diseñar prácticas de manejo forestal que sustenten la producción comercial de madera y la diversidad biológica (Goodman y Trofymow, 1998) en los ecosistemas.

2.5. Selección de hongos para producción de inoculantes

La necesidad de la utilización de planta inoculada en la reforestación de zonas con escasa regeneración, esta justificada por el incremento del desarrollo y la supervivencia de la planta en campo que supone la presencia de hongos ECM en asociación simbiótica con las raíces de especies forestales (Gómez-Sánchez *et al.*, 2002). La reforestación con planta inoculada con hongos ECM conlleva, como pasos previos a la introducción de la planta en campo, la selección de hongos. Si todas las especies de hongos fueran igualmente benéficas, existirían pocos puntos de comparación o discusión.

Dentro de los criterios de selección de hongos se señalan: 1) Especificidad, 2) Adaptaciones ecológicas especiales como tolerancia a pH extremos, altas temperaturas y contaminación por metales, 3) Efectividad para colonizar, 4) Amplia gama de hospederos y 5) Comestibilidad.

Dentro de los aspectos a tomar en cuenta en cualquier programa de manejo de EM es la naturaleza variable de la especificidad hongo-hospedero (Molina *et al.*, 1992). Es recomendable tomar en cuenta especies fúngicas ECM de los primeros estadios de la sucesión con el fin de garantizar la asociación con la planta, ya que la falta de organismos simbiotes en las fases tempranas de

desarrollo de cualquier especie forestal utilizada para proyectos de reforestación es la causa primordial de la elevada mortandad de las especies que se producen en vivero (Honrubia *et al.*, 1992). Thomson *et al.* (1994) encontraron que las especies fúngicas colonizadoras tempranas (*Descolea maculata*, *Hebeloma westraliense*, *Laccaria laccata* y *Pisolithus tinctorius*) en masas de *Eucalyptus globulus* Labill fueron más efectivas al incrementar el crecimiento a diferencia de las especies de etapa tardía (*Cortinarius* spp, e *Hysterangium* spp.). De acuerdo con Hutchison y Piche (1995), los hongos ECM colonizadores de etapa temprana con un amplio número de hospederos dependen menos de un suministro de carbohidratos exógenos para una formación exitosa de EM a diferencia de los hongos de etapa tardía (*Lactarius subpurpureus*).

Es fundamental producir plantas en vivero que tengan asociados hongos ECM que presenten adaptaciones ecológicas especiales para cada sitio: tolerancia a pH extremo o temperaturas adversas (Molina y Trappe, 1984), ya que sólo así se garantizará que las mismas tengan asociados los hongos mejor adaptados a las condiciones bióticas y abióticas del lugar donde se ejecutará la restauración forestal (Cannon, 1984). Desafortunadamente, la mayoría de la investigación se enfoca a la respuesta en crecimiento de las plantas sin tomar en cuenta las condiciones climáticas y edáficas del hongo, lo que ha ayudado a crear la falsa impresión que la mayoría de los hongos son funcionalmente equivalentes (Abbott y Robson, 1991; Brundrett, 1991). Existen reportes en donde se observa que en algunos sitios forestales no existió efecto o se observaron efectos negativos de la inoculación, probablemente porque el tipo fúngico

utilizado no era el más adecuado para la zona y para el fitobionte. Un ejemplo de esto es la baja frecuencia de respuesta en coníferas a la inoculación con *Pisolithus tinctorius* en el SW de Oregón donde *Rhizopogon* spp. están mejor adaptadas a los suelos y el ambiente, por lo que son más efectivos para incrementar el crecimiento (Castellano y Trappe, 1991).

Dentro de las características de los hongos seleccionados a utilizar como inóculo es que deben tener un amplio número de hospederos (Malajczuk *et al.*, 1990), ser capaces de formar EM abundantes sobre la planta hospedero inmediatamente después de que las raíces secundarias sean producidas, deben ser agresivos en sus hábitos, asimismo deben ser seleccionados principalmente por su efectividad en la supervivencia de árboles en el campo y no en el ambiente del vivero forestal (Grove y Le Tacon, 1993).

Aún cuando la comestibilidad es uno de los últimos criterios que se toman en cuenta para la selección de este tipo de hongos, es importante mencionar que muchos de ellos son especies comestibles internacionalmente apreciadas. Tal es el caso del hongo blanco del "ocote" (*Tricholoma magnivelare*), "yemitas" (*Amanita caesarea*), "pambazo" (*Boletus edulis*) entre otros (Varela y Estrada, 1997). El criterio anterior es aplicado por Espigol *et al.* (1999) en un estudio realizado para la obtención de inóculos ECM a partir de *Hygrophorus latitabundus* Briz., especie fúngica de gran importancia culinaria en los Pirineos Centrales de España, para inocular una de las especies más importantes en esta región, *Pinus sylvestris*. Esta especie fúngica es ampliamente apreciada en el NE de España, vendiéndose en mercados de octubre a diciembre.

Sin duda, especies fúngicas ECM que presenten todas estas características es muy probable que sean altamente competitivas y capaces de formar EM, una vez inoculadas en la planta hospedero. Esto es de vital importancia en proyectos de reforestación masivos enfocados a la recuperación de áreas perturbadas (Molina y Palmer, 1991; Honrubia *et al.*, 1992).

2.5.1. Tipos de inóculo

Un inóculo es un conjunto de propágulos de algún organismo simbiote que pueden colonizar y por tanto beneficiar a alguna planta. Dentro de los tipos de inóculo utilizados se encuentra el suelo forestal y plantas micorrizadas. En el caso de las plantas que forman la EM, donde la mayoría es de importancia forestal, los inóculos miceliares y esporales de hongos ECM les brindan muchas ventajas entre las cuales se encuentran su supervivencia, crecimiento y desarrollo.

2.5.1.1. Inoculantes esporales

El uso de basidiosporas como inóculo para la inoculación de plantas a gran escala ha sido ampliamente utilizada ya que es uno de los métodos más sencillos y eficaces, además de prácticos y baratos debido al alto número de esporas que se obtienen; las cuales son relativamente fáciles de aplicar como una mezcla en los suelos de vivero previo a la plantación o en el riego en las camas y contenedores. La inoculación con suspensiones esporales es un método eficiente para la obtención de plantas micorrízicas con hongos que no crecen bien o lentamente en cultivo. Asimismo, se considera un método alternativo para la inoculación de plantas en vivero con hongos que no toleran los disturbios que implica la preparación del inóculo vegetativo o no sobreviven

hasta el momento de que las plantas jóvenes producen raíces cortas susceptibles de colonizar (Parladé *et al.*, 1996).

Sin embargo, presenta numerosas desventajas en cuanto a su obtención, manutención y viabilidad. Por ejemplo, las esporas sólo se pueden obtener en la temporada de lluvias; por otro lado, tienen una viabilidad muy corta, ya que pierden su capacidad de germinación en poco tiempo. Además, se tiene la desventaja de que tardan mucho en germinar y comenzar a colonizar las raíces (Marx y Cordell, 1989; Honrubia *et al.*, 1992; Castellano, 1994), otro inconveniente es la restricción de las especies de hongos que producen esporocarpos abundantes y gran cantidad de esporas usualmente requeridas para la colonización de las raíces (Cordell *et al.*, 1987). Asimismo, de acuerdo con Parladé *et al.* (1996) otra característica que debe reunir la especie fúngica a utilizar como inóculo a gran escala es su capacidad de colonización a tasas relativamente bajas

En el plano teórico, este método presenta numerosas ventajas, especialmente para el envío del inóculo a grandes distancias. El peso y el volumen del inóculo es mínimo y el riesgo de introducción de enfermedades se reduce al mínimo. Si las esporas de los hongos ECM permanecieran vivas y viables durante todo un año, incluso en condiciones secas, el método sería realmente adecuado. Sin embargo, actualmente se conoce muy poco sobre la capacidad de germinación de las esporas de diferentes especies y sobre los factores que influyen en la germinación para poder recomendar la inoculación por esporas o esporóforos a escala de campo. A nivel mundial es el tipo de inóculo más utilizado en especies forestales principalmente.

2.5.2. Calidad de inoculantes

Los inoculantes son microorganismos vivos, bacterias y/o hongos, que permiten a la planta acceder a nutrimentos poco disponibles. Existen dos tipos de inoculantes fúngicos micorrízicos disponibles comercialmente: inoculantes endomicorrízicos y ectomicorrízicos. La mayoría están disponibles en forma seca. Los ectomicorrízicos están en forma de esporas y los endomicorrízicos están disponibles en forma de esporas, fragmentos de raíces e hifas (http://www.inoculants.com/encyclopedia_1.html).

Dentro de las formas de inoculantes disponibles se encuentran el inóculo esporal (Marx *et al.*, 1984), inoculante producido por cultivo de substratos sólidos (Marx y Kenney, 1982; Le Tacon *et al.*, 1988), "slurries" miceliares (Boyle *et al.*, 1988; Gagnon *et al.*, 1988), y micelio pre-crecido encapsulado (Le Tacon *et al.*, 1985; Mauperin *et al.*, 1987; Deacon y Fox, 1988).

Los inoculantes ectomicorrízicos contienen cepas seleccionadas de hongos ECM de baja especificidad lo que va a permitir una rápida colonización de las raíces de las plantas para proveer las mejores condiciones posibles para las raíces que lleguen a ser micorrízicas durante el período de establecimiento y desarrollo. Los esfuerzos en la utilización de inoculantes se han enfocado en la selección de la cepa, la formulación del producto y la aplicación sin la manipulación o mejoramiento del funcionamiento del sistema simbiótico. La industria de los inoculantes ha desarrollado desde sus inicios en 1900 productos a través de la industria privada, federal y universidades hasta unas cuantas compañías en USA. Actualmente, un mayor número de países producen inoculantes, entre los cuales se encuentran: Canadá, Francia,

Australia, Ruanda, Zimbabwe, Kenya, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Tailandia quienes han establecido estándares de calidad en inoculantes de leguminosas para su venta (Olsen *et al.*, 1994).

Un cambio significativo en las formulaciones de los inoculantes se han ido operando a través del tiempo, desde inoculantes sólidos orgánicos baratos e inorgánicos hasta las formulaciones líquidas estables más actuales (Smith, 2003). Dentro de las formulaciones existen diferencias en su eficiencia tal y como lo demuestran diferentes investigaciones las cuales mencionan que los inoculantes ECM a partir de micelios pueden ser más infectivos a diferencia de los que contienen esporas. Hua *et al.* (1991) evaluaron la síntesis de *Pisolithus tinctorius* en diferentes especies forestales utilizando esporas y micelio vegetativo observando un mayor desarrollo de raíces ectomicorrízicas con inoculo vegetativo a diferencia de las que recibieron inoculo esporal en pellets.

Uno de los aspectos a considerar durante el proceso de obtención del inoculante es su calidad, lo cual no es fácil de evaluar, sin embargo, una de las mejores formas es a través del número de propágulos por unidad de volumen (concentración). Los propágulos incluyen esporas, hifas y fragmentos de raíz. En algunos casos es posible contar esporas directamente, pero en otros es muy difícil (Sylvia, 1994). Además de la concentración otro parámetro útil es la viabilidad del inoculante, el cual es un índice seguro de su calidad (Brockwell y Bottomly, 1995; Lupwayi *et al.*, 2000, Rice *et al.*, 2003) ya que garantiza su posterior germinación e inicio de la colonización.

La apropiada inoculación aún con un inoculante de alta calidad no siempre resulta en la mejora del crecimiento y desarrollo de la planta. No obstante,

incrementando el número de propágulos viables aplicado, usualmente va a incrementar su efecto, especialmente -bajo condiciones de estrés (Rice *et al.*, 2003). Estos dos parámetros junto con la capacidad simbiótica del hongo ECM seleccionado, la ausencia de contaminantes, contener una cepa efectiva, formulaciones estables, facilidad de aplicación, así como su capacidad para sobrevivir durante el periodo comprendido entre la inoculación del sustrato y la formación de micorrizas (Sylvia, 1994, Lupwayi *et al.*, 2000) van a determinar la efectividad de la inoculación en campo. Otra forma de garantizar que un inoculante sea de alta calidad es que su efecto benéfico se manifieste en campo, es decir, una vez que las plantas sean llevadas a su lugar definitivo de crecimiento. Los efectos en el vivero pueden permitir la producción de plantas con una calidad fisiológica y morfológica adecuada para el transplante, sin embargo, incrementar el crecimiento de las plantas en vivero no debe constituir un objetivo en sí mismo (Jeffries, 1987) dado que se tiene el inconveniente que las condiciones para el desarrollo micorrízico han sido optimizadas. El comportamiento de la simbiosis hongo-planta durante la fase de vivero y después del transplante a campo puede ser muy diferente; así por ejemplo, hongos que no estimulan el crecimiento de la planta en vivero pueden dar mejores resultados en campo (Rossi *et al.*, 2002). Una prueba definitiva para determinar la efectividad de las cepas ECM lo constituye el establecimiento de plantaciones experimentales para la comparación integrada de resultados a largo plazo.

Dentro de los parámetros que un inoculante de calidad debe conservar es que el aislamiento a partir del cual se obtiene sea capaz de penetrar y dispersarse

en la raíz así como incrementar el crecimiento o la tolerancia al estrés del hospedero (Sylvia *et al.*, 1993), que pueda ser aplicado en dosis pequeñas y sin embargo, presentar un rápido efecto en la planta (Abbott y Robson, 1984; Jarstfer y Sylvia, 1992) y no necesariamente los que tengan un mayor porcentaje de colonización (Hung *et al.*, 1990).

A la fecha no existe un programa de calidad de inoculantes ECM, por lo que la investigación en este aspecto es relativamente escasa. Sin duda, las consideraciones numéricas son de tal importancia en la determinación de la efectividad del inoculante que la necesidad para un control de calidad es ampliamente reconocido (Rice *et al.*, 2003), haciéndose necesario un programa de evaluación que garantice un incremento significativo en la calidad de los inoculantes ofrecidos.

La industria de los inoculantes representa una parte relativamente pequeña pero potencialmente importante de un sector competitivo global, el cual es un sustituto del uso de fertilizantes comerciales. Dentro de los beneficios que aportan es la productividad y rentabilidad de la producción así como apoyar el progreso social en algunos países subdesarrollados y disminuir los efectos ambientales de la agricultura comercial. Es importante mencionar que los inoculantes muestran un incremento significativo en la recuperación de ciertas áreas, especialmente en áreas marginadas (Phillips, 2003).

III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. Objetivo general

Identificar algunas especies de hongos ECM asociadas a masas forestales en una zona forestal y evaluar el efecto de la inoculación con diferentes hongos ECM en el desarrollo de *Pinus patula* y *Pinus greggii* bajo condiciones de invernadero.

3.1.1. Objetivos particulares

Reconocer e identificar algunas especies de hongos ECM asociados al arbolado de masas forestales en una zona forestal (Santa Catarina del Monte, Texcoco, México).

Evaluar la infectividad de la inoculación de 10 especies de hongos ECM en plantas de *P. patula* y *P. greggii*.

Evaluar la efectividad de 10 especies de hongos ECM en *P. patula* y *P. greggii* en términos de altura, diámetro, biomasa.

Describir las ectomicorrizas formadas entre *P. patula* y *P. greggii* y cinco especies de hongos ECM inoculados.

3.2. Hipótesis

La inoculación con hongos ECM mejora el crecimiento de *Pinus patula* y *Pinus greggii* en comparación con aquellas plantas no colonizadas.

La especificidad micobionte-fitobionte, así como la agresividad para colonizar son factores que determinan la efectividad de la simbiosis ECM en *Pinus patula* y *Pinus greggii*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Colecta de hongos ectomicorrízicos en Santa Catarina del Monte y caracterización del área

En la comunidad de Santa Catarina del Monte, Texcoco, Edo. de México se realizaron recorridos de campo con el objetivo de coleccionar e identificar hongos ECM de dicha área. Una de las razones para seleccionar esta región es la amplia tradición del aprovechamiento de los hongos comestibles silvestres existente, por su ubicación, así como por el periodo tan corto de fructificación. La colecta se realizó en la época de fructificación que ha sido reportada en otras áreas en el país (Pérez-Moreno *et al.*, 1993; García-Jiménez *et al.*, 1998) que va de junio a septiembre, en masas forestales de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*. Los carpóforos se colocaron en bolsas de papel, eliminando previamente restos de suelo y hojarasca adheridos a la superficie de los mismos, para su transporte al laboratorio para su identificación.

La zona forestal de esta comunidad se encuentra ubicada en la parte oriental del Estado de México, a los 98°44' de longitud oeste y 19°25'44'' de latitud norte a 2,500 msnm (González, 1981), siendo la especie arbórea predominante *Pinus hartwegii* con una cobertura del 56 %. En el estrato herbáceo predominan *Alchemilla procumbens*; *Lupinus campestris*; *Euphorbia furcillata*, *Muhlenbergia quadridentata*, *Senecio salignus*, *Senecio calcarius*, *Stipa* sp. y *Acaena elongata*. El clima se clasifica como C (W₂)(W)b'i templado muy húmedo con lluvias en verano, bien distribuidas, mayores a 1000 mm anuales y temperaturas extremas entre 3°C y 22°C. Las lluvias de invierno son escasas con promedio estacional de 9 mm. Esta zona está constituida por materiales

ígneos del terciario como peridotitos, andesitas y tobas volcánicas, originando suelos derivados de cenizas volcánicas, de formación reciente, de naturaleza andesítica, negros, profundos, textura media, ricos en materia orgánica correspondiendo a un phaeozem háplico de acuerdo al sistema de clasificación FAO-UNESCO (Moreno-Zarate, 1990). Esta zona se caracteriza por presentar una fuerte degradación tanto de suelo como de vegetación, presentándose graves problemas de sanidad además de la explotación inadecuada de sus recursos.

4.2. Evaluación de la especificidad, infectividad y efectividad de hongos ectomicorrízicos en plantas de *Pinus patula* y *Pinus greggii*

El trabajo se realizó en el invernadero perteneciente al Área de Microbiología del Programa de Edafología del Colegio de Posgraduados, en Montecillo, Texcoco, Estado de México, durante 2003.

4.2.1. Material biológico

4.2.1.1. Descripción de la procedencia de semillas

Las semillas de *Pinus patula* Schl. et Cham. y *Pinus greggii* Engelm ex Part utilizadas fueron colectadas en un bosque natural en La Venta, Municipio de Chignahuapan, Puebla y en la localidad El Piñón, Municipio de Jacala, Hidalgo, la cual corresponde a la región sur del área natural de distribución de la especie (Dvorak, 2002), respectivamente. El germoplasma utilizado en la presente investigación es empleado para reforestación en diversas partes de México. Se utilizaron estas especies debido a su rápido crecimiento y amplio uso en programas de reforestación.

4.2.1.2. Descripción de la procedencia de hongos

Los hongos ECM utilizados y las localidades en las que se colectaron se muestran en los cuadros 2 y 3.

Cuadro 2. Procedencia del material fúngico utilizado para inocular *Pinus patula*.

Especie	Procedencia	Nombre común	Fecha de colecta
¹ <i>Laccaria laccata</i>	San Nicolas de los Ranchos, Puebla	"Xocoyotl"	20/07/02
¹ <i>Suillus pseudobrevipes</i>	Parque Nacional Zoquiapan, Estado de México	"Mazayel" *	20/07/02
¹ <i>Amanita fulva</i>	Parque Nacional Zoquiapan, Estado de México	"Venado" **	08/07/02
¹ <i>Amanita caesarea</i>	Parque Nacional Zoquiapan, Estado de México	"Yema"	8/07/02
¹ <i>Suillus granulatus</i>	Parque Nacional Zoquiapan, Estado de México		8/07/02
² <i>Boletus clavipes</i>	Chignahuapan, Puebla	"Quetas" o "Panzas"	19/07/02
² <i>Hebeloma aff. mesophaeum</i>			

snc=sin nombre común *nombre común en bosques de *Pinus* spp. en San Pablo Ixayoc, Estado de México **nombre común en bosques de *Pinus patula*, Chignahuapan, Pue. ¹Colecta efectuada por el Dr. Jesús Pérez Moreno, Microbiología-Edafología, IRENAT, CP. ²Colecta efectuada por Ing. Magdalena Cruz Martínez, estudiante de maestría del Colegio de Postgraduados.

Cuadro 3. Procedencia del material fúngico utilizado para inocular *Pinus gregii*.

Especie	Procedencia	Nombre común	Fecha de colecta
¹ <i>Laccaria laccata</i>	Mercado de Jamaica, México Distrito Federal	"Xocoyotl"	11/08/02
¹ <i>Suillus pseudobrevipes</i>	Parque Nacional Zoquiapan, Estado de México	"Mazayel" *	8/07/02
¹ <i>Boletus clavipes</i>	Mercado de Texcoco, Estado de México	"Quetas" o "Panzas"	19/07/02
³ <i>Pisolithus tinctorius</i>	"La Sabana" Mpio. de San Juan Cotzocon Mixe, Oaxaca		

*Nombre náhuatl dado en diversas partes del centro de México, que significa "hígado de venado". ¹Colecta efectuada por el Dr. Jesús Pérez Moreno, Microbiología-Edafología, IRENAT, CP. ²Colecta efectuada por la Ing. Magdalena Cruz Martínez, estudiante de maestría del Colegio de Postgraduados. ³Colecta efectuada por el Ing. Leonardo García Rodríguez, estudiante de maestría del Colegio de Postgraduados.

4.2.1.3. Obtención de inóculo

Para la obtención del inoculante, posterior a su identificación, los cuerpos fructíferos fueron deshidratados en una incubadora a 37°C durante 2 a 4 días, dependiendo de los contenidos de humedad presentes inicialmente. Para *L. laccata* (Peck) Peck., *Hebeloma aff. mesophaeum*, *Amanita fulva* (Schaeff.) Krombh y *A. caesarea* (Scopoli:Fries) Persoon fueron utilizados sólo los píleos, para *S. pseudobrevipes* Smith et Thiers, *Suillus granulatus* (L. ex Fr.) Kunt y *B. clavipes* (Peck) Pilat et Dermek se utilizaron sólo los himenios y para *P. tinctorius* (Pers.) Coker et Couch [= *Pisolithus arhizus* (Scop. Pers. Pers.) Rauschet] se usaron los cuerpos fructíferos completos. Posterior a su deshidratación estas partes de los cuerpos fructíferos fueron molidas y el tamaño de partícula así generado fue homogeneizado en un tamiz con abertura de 1 mm. El inóculo así obtenido se colocó en diales de 1.5 cm³ en las cantidades señaladas en los Cuadros 4 y 5.

Cuadro 4. Cantidad de inóculo aplicado para los diferentes tratamientos de *Pinus patula*.

Especie	Cantidad de inóculo adicionada (cm ³)
<i>Laccaria laccata</i>	3.0
<i>Suillus pseudobrevipes</i>	3.0
<i>Amanita fulva</i>	3.0
<i>Amanita caesarea</i>	3.0
<i>Suillus granulatus</i>	3.0
<i>Boletus clavipes</i>	3.0
<i>Hebeloma aff. mesophaeum</i>	3.0
Testigo	0.0

Cuadro 5. Cantidad de inóculo aplicado para los diferentes tratamientos de *Pinus gregii*.

Especie	Cantidad de inóculo adicionada (cm ³)
<i>Laccaria laccata</i>	3.0
<i>Suillus pseudobrevipes</i>	3.0
<i>Boletus clavipes</i>	3.0
<i>Pisolithus tinctorius</i>	*
Testigo	0.0

*En este caso se inoculó con 10 ml de una solución equivalente a 10⁶ esporas.

4.2.1.3.1. Concentración del inóculo

Para determinar la concentración se preparó una suspensión de los fragmentos fúngicos en agua estéril, tween 20 diluido al 80 % e inóculo fúngico en una proporción 1:1:0.1 en ml:ml:g respectivamente.

Esta suspensión se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente con una pipeta Pasteur estéril se tomó una muestra de la suspensión y se aplicó al centro de la cámara de Neubauer, se vació la pipeta y se repitió el proceso anterior para la cámara opuesta, se montó al microscopio y se ubicó el rayado de una de las cámaras con el objetivo de 40x.

Al tomar en cuenta las dimensiones de las esporas, de mayor a menor tamaño las especies quedaron ordenadas como se muestra en el cuadro 6. Con fines

metodológicos para obtener la densidad de esporas en los inóculos, *B. clavipes*, *A. fulva*, *A. caesarea* y *L. laccata* fueron consideradas como “esporas grandes” y *S. pseudobrevipes* y *P. tinctorius* como “esporas pequeñas”. Es necesario aclarar que para la determinación del tamaño de esporas se tomó un criterio subjetivo, sin embargo, fue el mejor acercamiento posible, dado que la forma de las esporas de los hongos estudiados varió de globosa, subglobosa, fusiforme, subfusiforme a elipsoide.

Cuadro 6. Dimensiones de las esporas de las especies ECM utilizadas para inocular *Pinus patula* y *Pinus greggii*

Especie	Dimensiones
<i>Laccaria laccata</i>	8 µm -8.8 µm X 7.2 µm -8.0 µm
<i>Suillus pseudobrevipes</i>	7 µm -8.5 µm X 2.8 µm -3.7 µm
<i>Boletus clavipes</i>	16-24 µm X 5.2-7 µm
<i>Amanita fulva</i>	10µm -11µm
<i>Amanita caesarea</i>	8.5 µm -9.5 µm X 5.5 µm -6.5 µm
<i>Pisolithus tinctorius</i> (= <i>P. arrhizus</i>)	7-12 µm

La cámara de Neubauer utilizada para este trabajo presentó un rayado (Fig. 2) de 9 mm² (3 mm por lado) dividido en 9 cuadrados principales de 1 mm por lado. Para el caso de esporas grandes (*A. fulva*, *A. caesarea*, *L. laccata*, *B. clavipes*) se contó el contenido de 5 cuadrados principales (A, B, C, D y E en la Fig. 2).

Para calcular la concentración por cm³ se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{SUMA de 5 cuadrados principales} \times 2,000 = \text{número/ cm}^3$$

Para el caso de esporas pequeñas (*S. pseudobrevipes* y *P. tinctorius*) se utilizó el cuadrado principal central (E) que está dividido en 25 cuadrados secundarios de 0.2 mm por lado, cada uno de los cuales está dividido en 16 cuadrados

menores de 0.05 mm por lado. Para calcular la concentración se utilizó la siguiente formula:

$$\text{NÚMERO en el cuadrado principal central} \times 10,000 = \text{número/cm}^3$$

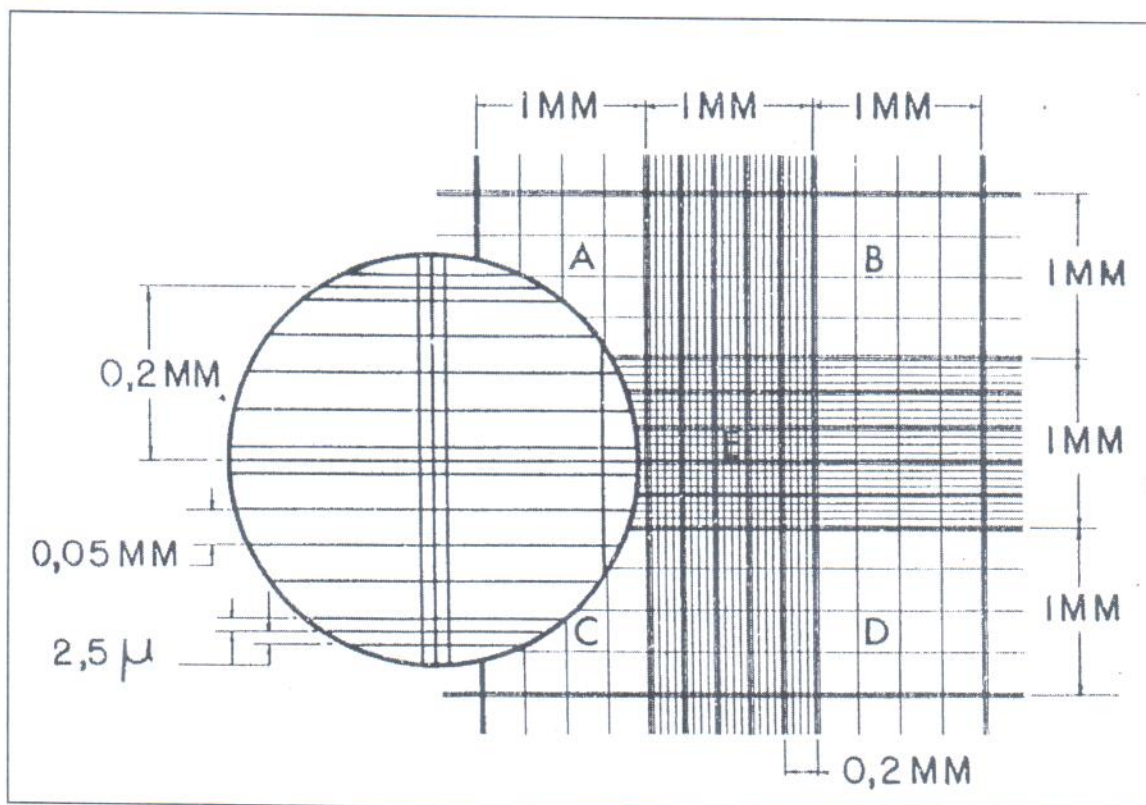


Figura 2. Rayado "Neubauer" mejorado del hematócmetro Spencer, tomado de French y Hebert (1982).

Las esporas que estaban sobre las líneas de los márgenes de los cuadrados se contaron sólo en dos de éstos, los de los lados izquierdo y superior. Los conteos se repitieron sobre el segundo rayado de la otra cámara. Las observaciones se promediaron para determinar la concentración de la suspensión de propágulos por cm^3 .

Con los datos obtenidos se determinó la concentración de esporas aplicada a cada planta de pino de acuerdo a la especie fúngica evaluada.

4.3. Establecimiento del experimento

Las semillas de *P. patula* y *P. greggii* fueron mantenidas en refrigeración a 5°C hasta su utilización. Previo a su siembra, fueron esterilizadas con H₂O₂ a 30% durante 30 minutos. Una vez desinfectadas se lavaron durante 40 minutos con agua destilada estéril. La siembra fue efectuada a una profundidad de 2 cm. Se utilizaron contenedores tipo tubete de plástico negro de 62 mm de diámetro, 180 mm de largo y 250 cm³ de volumen. Previo a su utilización estos contenedores fueron desinfectados por inmersión en alcohol al 90% durante 5 minutos. Posteriormente, fueron llenados en condiciones axénicas con el substrato, el cual consistió en una mezcla de suelo agrícola: arena de río en proporción 1:2, previamente esterilizado en vapor durante 3 horas a 20 libras. Las características químicas del suelo empleado se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Características químicas del suelo empleado*

Característica	Unidad	Valor	Interpretación
pH en H ₂ O(1:2)		6.2	Ligeramente ácido
Materia orgánica	%	4.97	Rico
N total	%	0.25	Rico
Ca Intercambiable	Cmol _c kg ⁻¹	17.13	Alto
Mg Intercambiable	Cmol _c kg ⁻¹	12.47	Alto
K Intercambiable	Cmol _c kg ⁻¹	0.77	Alto
Na Intercambiable	Cmol _c kg ⁻¹	0.08	Sin problema
P Intercambiable	Cmol _c kg ⁻¹	2	Muy pobre

* efectuado en el Área de Química de Suelos, del IRENAT, Colegio de Postgraduados

Cuando así correspondió a los tratamientos el inoculante ECM fue colocado a una profundidad de 3 cm superficiales. Cada planta fue inoculada con alrededor de 10⁶ esporas. Posteriormente el inoculante se cubrió con una capa de substrato hasta llenar el contenedor y se adicionó una capa de tezontle el cual había sido esterilizado también durante 3 horas a 20 lbs.

En este estadio el experimento fue colocado en invernadero, donde se mantuvo durante 11 meses con riegos de agua destilada estéril. Durante los dos primeros meses posterior a la germinación se aplicó una solución de Captán en dosis de 2 g por litro de agua cada tercer día, durante 15 días, para posteriormente realizar una aplicación por semana durante los dos primeros meses. En su página de información técnica la compañía Planth Health Care Inc señala que dicho fungicida “no tiene efecto sobre las micorrizas” asimismo señala que “ningún fungicida erradica las micorrizas, sino que sólo reducen su desarrollo por un tiempo corto después de la aplicación del producto (dependiendo de su persistencia)” (www.planthealthcare.com). Adicionalmente, O’neill y Mitchell (2000) encontraron que la aplicación de Captán estimuló la longitud de la raíz y la colonización ECM de *Picea sitchensis* y el peso anhidro de *Fraxinus excelsior* en relación a las plantas control.

Originalmente se sembraron 5 semillas por tubete, sin embargo, un mes después de la germinación se realizó la eliminación de plantas adicionales, dejando sólo una en cada tubete, para lo cual se seleccionaron aquellas plantas cuyas alturas eran en ese momento de 4 cm, para homogeneizar el experimento. Antes de ubicar las unidades experimentales en el invernadero se efectuó una aleatorización de acuerdo al diseño experimental empleado.

4.4. Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar que incluyó los siguientes tratamientos: Para el caso de *P. patula*: i) inoculación con *L. laccata*; ii) inoculación con *S. pseudobrevipes*; iii) inoculación con *A. fulva*, iv) inoculación con *A. caesarea*, v) inoculación con *S. granulatus*, vi) inoculación con *B.*

clavipes vii) inoculación con *Hebeloma aff. mesophaeum* y ix) sin inoculación, el cual fue considerado como testigo. En el caso de *P. greggii*: i) inoculación con *L. laccata*; ii) inoculación con *S. pseudobrevipes*; iii) inoculación con *B. clavipes*; iv) inoculación con *P. tinctorius* y v) sin inoculación, el cual fue considerado como testigo. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones originando 40 unidades experimentales para *P. patula* y 25 unidades experimentales para *P. greggii*. A las diferentes variables evaluadas se les realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha < 0.05$). Se realizó la comparación de la media general de las variables evaluadas entre plantas inoculadas y plantas no inoculadas, de acuerdo con la prueba t-Student ($P < 0.05$). Cuando los datos eran porcentajes, previo al análisis estadístico los valores originales fueron transformados a sus valores arco seno. Adicionalmente, en algunos casos se calcularon los coeficientes de correlación (Pearson) entre las diferentes variables. Se tomó un valor de $R > 70$, para considerar que existió correlación entre variables.

4.5. Cosecha y variables evaluadas

Las plantas de todos los tratamientos de *P. patula* fueron cosechadas 9 meses después de la siembra, excepto para el tratamiento *Hebeloma aff. mesophaeum*, el cual se cosechó 12 meses después. En el caso de *P. greggii*, las plantas fueron cosechadas 11 meses después de la siembra. Todas las plantas de cada tratamiento fueron medidas para todas las variables evaluadas.

4.5.1. Variables de la raíz

4.5.1.1. Micelio externo

Se extrajeron las plantas y los cepellones de los tubetes y se evaluó la presencia de micelio externo en la superficie de los cepellones, estimando la abundancia de dicho micelio. Para el análisis estadístico estos datos fueron transformados a sus valores arco seno.

4.5.1.2. Número total de raíces cortas

El sistema radical fue lavado cuidadosamente con agua corriente para eliminar el suelo de la raíz. Éste fue examinado con estereomicroscopía para contar el número de raíces cortas ECM y no ECM siguiendo los métodos propuestos por Grand y Harvey (1984).

4.5.1.3. Colonización micorrízica

El porcentaje de colonización fue calculado como el número total de raíces cortas formadas por los hongos inoculados/número total de raíces cortas ECM X 100. Para el análisis estadístico estos datos fueron transformados a sus valores arco seno.

4.5.2. Variables de crecimiento

4.5.2.1. Altura (mm)

Se obtuvo por medición directa utilizando una regla graduada a la precisión de 1 mm.

4.5.2.2. Diámetro del tallo (mm)

Su medición se realizó con un Vernier marca Scala.

4.5.2.3. Número de ramillas secundarias

Se realizó por conteo directo al momento de la medición de la altura y el diámetro.

4.5.3. Peso anhidro (mg)

Tanto la parte aérea como el sistema radical fueron deshidratados a 80°C durante 48 horas para determinar su peso anhidro.

4.6. Caracterización morfológica de ectomicorrizas

4.6.1. *Pinus patula* y *Suillus pseudobrevipes*, *Pinus patula* y *Boletus clavipes*, *Pinus patula* y *Laccaria laccata*, *Pinus patula* y *Hebeloma aff. mesophaeum*

Se utilizaron ectomicorrizas sintetizadas en el Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados, entre *S. pseudobrevipes*, *L. laccata*, *B. clavipes* y *P. patula*. Los cortes se realizaron con el microtomo de congelación Mod. 880 American optical Corp. a 45 micras con la técnica de hielo seco. Posteriormente se elaboraron preparaciones semipermanentes para la caracterización anatómica. Las observaciones micromorfológicas se realizaron utilizando las técnicas de campo claro y de microscopía de contraste de interferencia de Nomarski con un microscopio Zeiss y se realizaron fotomicrografías con una cámara Pixera, en la Unidad de Fotomicroscopía del Programa de Entomología del Colegio de Posgraduados.

La apariencia de la superficie del manto, el tamaño del elemento hifal en el manto, el diámetro y la textura de la superficie, fueron descritos en base a Agerer (1991).

**4.6.2. *Pinus greggii* y *Boletus clavipes*, *Pinus greggii* y *Laccaria laccata*,
Pinus greggii y *Suillus pseudobrevipes*, *Pinus greggii* y *Pisolithus tinctorius***

Para el análisis micromorfológico de los morfotipos involucrados se tomaron muestras de las raíces ECM para cada una de las especies inoculadas. Para la evaluación de éstas raíces ECM se utilizaron los métodos descritos por Curtis (1986) que se describen brevemente enseguida. Las raíces cortas ECM a ser evaluadas se fijaron en FAA. El material fijado se lavó y deshidrató en una serie gradual de alcohol etílico y xilol. Las fracciones de tejido se colocaron individualmente en cada molde con parafina para ser cortados. Los bloques de parafina se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se montaron en soportes de madera. El material así incluido se cortó en un microtomo rotatorio. De cada muestra se obtuvieron 5 cortes de 9 μm de grosor, los cuales se colocaron en portaobjetos con adhesivo de Huupt y una gota de formol al 10% a una temperatura de $\pm 30^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. De esta manera los cortes se extendieron y se adhirieron a los portaobjetos. Los cortes se desparafinaron, se hidrataron en una serie gradual de alcohol etílico y se tiñeron con los colorantes safranina-verde rápido. Las observaciones micromorfológicas se realizaron utilizando las técnicas de campo claro y de microscopía de contraste de interferencia de Nomarski con un microscopio Zeiss y se realizaron fotomicrografías con una cámara Pixera, en la Unidad de Fotomicroscopía del Programa de Entomología del Colegio de Posgraduados.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Especies de hongos ectomicorrízicos en Santa Catarina del Monte, Texcoco, México

Dentro de las 20 especies de hongos ECM identificados, un 85 % son Basidiomycetes (Fig. 3) pertenecientes al orden Agaricales (Cuadro 8) y el resto fueron Ascomycetes. Sólo se identificó un Gasteromycete: *Lycoperdon umbrinum*. Un aspecto bastante conocido es la diversidad de especies ECM en los bosques templados y boreales así como su abundancia al comparárseles con los macromicetos saprobiontes y parásitos. Por citar algunos ejemplos, Guzmán y Villarreal (1984) en el Cofre de Perote, Veracruz reportaron un total de 114 especies de las cuales un 49, 49 y 2 % se adscribieron a los grupos tróficos ECM, saprobionte y parásito, respectivamente. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de la simbiosis ECM en el mantenimiento de las comunidades templadas. La proporción de hongos ECM adscritos a los Basidiomycetes en el área de estudio es similar a la reportada a nivel mundial. Molina *et al.* (1992) reconocieron que a nivel mundial existen más de 5,000 mil especies de hongos ectomicorrízicos, dentro de las cuales alrededor del 90 % son Basidiomycetes. Por su parte, Garza y Arias (2001), en bosques de "cerro El Potosí" ubicado en el estado de Nuevo León, reportaron 23 especies de hongos ECM y 74 morfotipos de EM de 8 categorías; 27 cultivos puros fueron obtenidos a partir de EM y 20 mil plantas fueron inoculadas con micelios sólo o mezclados de *Cantharellus cibarius*, *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma verucosum* en vivero.

Cuadro 8. Especies de algunos hongos ectomicorrízicos colectados en bosques de *Pinus hartwegii* en Santa Catarina del Monte, Texcoco, Edo. de México.

Especies de hongos	Importancia
ASCOMYCOTA	
ASCOMYCOTINA	
Pezizales	
Helvellaceae	
<i>Helvella crispa</i> Scop. : Fr.	CA
<i>Morchella conica</i> Pers.*	CA
BASIDIOMYCOTINA	
Holobasidiomycetidae	
Aphyllorphorales	
Cantharellaceae	
<i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	CA
Hydnaceae	
<i>Hydnum imbricatum</i> L.:Fr	CB
Hygrophoraceae	
<i>Hygrocybe conica</i> (Scop.:Fr.) P. Kumm	CA
<i>Hygrophorus</i> sp.	SIE
Agaricales	
Amanitaceae	
<i>Amanita caesarea</i> (Scop. : Fr.) Grev. Cokeri (Gil. Et Jun.) Gil.	CA
<i>Amanita rubescens</i> (Pers. : Fr.) S.F. Gray	CA
<i>Amanita flavoconia</i> G.F. Atk.	T
<i>Amanita fulva</i> Schaeff.: Pers.	CB
Tricholomataceae	
<i>Clitocybe gibba</i> (Pers. : Fr.) Kumm.	CA
<i>Collybia dryophila</i> (Bull. : Fr.) Quél. *	CB
Russulales	
Russulaceae	
<i>Lactarius salmonicolor</i> Heim et Leclair	CA
<i>Lactarius deliciosus</i> (L. : Fr.) S.F. Gray	CA
<i>Russula brevipes</i> Peck	CA
Boletales	
Boletaceae	
<i>Boletus edulis</i> Bull.:Fr. <i>sensu lato</i>	CA

<i>Xerocomus badius</i> (Fr.:Fr) Gilb.	CB
Cortinariaceae	
<i>Cortinarius</i> sp.	SIE
Clavariaceae	
<i>Ramaria botrytis</i> (Fr.) Rick. *	CA
GASTEROMYCETES	
Lycoperdales	
Lycoperdaceae	
<i>Lycoperdon umbrinum</i> Pers. *	CB

El sistema de clasificación utilizado está basado en Ainsworth (1973). CA=comestible en el área de estudio, CB= Comestible según bibliografía (Lincoff, 1984; Pérez-Silva y Herrera-Suárez, 1991; García-Jiménez *et al.*, 1998), SIE= sin importancia económica, T= tóxico, *= estatus ectomicorrízico no definido totalmente.

Se puede señalar que dicha distribución se encuentra influenciada por el carácter simbiótico de las especies arbóreas dominantes en las regiones templadas. Resultados similares son reportados por Moreno-Zárte (1990) que al estudiar los bosques de *Abies* y *Pinus* en el área de estudio observó una gran diversidad de macromicetos en bosques de *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii*. En algunas de las especies encontradas en el presente trabajo se han efectuado estudios ecológicos detallados, por ejemplo, Pérez-Moreno (1992) en un estudio realizado en Zoquiapan, Estado de México encontró que dentro del género *Amanita* existen algunas tendencias interesantes, mientras que *A. cokeri*, *A. flavoconia* y *A. muscaria* sólo se encontraron en los rodales maduros, *A. fulva* y *A. gemmata* fueron localizadas únicamente en rodales jóvenes, por su parte *A. rubescens* fue localizada en ambos tipos de rodales. Lo anterior demuestra que existen diferencias en la plasticidad ecológica de los taxones. Algunas de las especies de hongos ECM son específicas en sus asociaciones, un ejemplo de alta especificidad en el que una especie de hongo puede estar

asociada con un género de plantas es el de *Suillus grevillei* (Kl.) Sing. (Duddridge, 1985) y *Boletus elegans* que sólo se asocian con el género *Larix*, por el contrario *Alpova diplophloeus* (Molina, 1979) y *Amanita phalloides* se asocian exclusivamente con los robles (Harvey *et al.*, 1976; Ruehle y Marx, 1979; Molina y Trappe, 1982). Otros pueden asociarse con más hospederos, por ejemplo, *Boletus edulis*, *Laccaria laccata*, *Cenococcum geophilum* Fr. y *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Cooke et Couch, que tienen la capacidad genética de formar EM con más de veinte géneros de plantas vasculares (Harley y Smith, 1983). Asimismo, se ha demostrado experimentalmente que *Amanita muscaria* forma micorrizas con varias especies de *Pinus*, *Picea* y *Betula* probablemente lo mismo sucede con otros géneros como *Cenococcum graniforme* que forma micorriza con 25 géneros de árboles, incluido *Nothofagus* y *Eucalyptus* (Trappe, 1964).

La importancia ecológica y económica de los hongos ECM en las zonas templadas en México ha sido escasamente investigada. Una de las formas de conocer la misma es a través del estudio de la estructura de la comunidad ECM y su relación simbiótica a través de estructuras reproductivas sexuales fúngicas (cuerpos fructíferos o esporocarpos), es decir, dada la gran diversidad y abundancia de cuerpos fructíferos que se observan en el bosque durante periodos de humedad se consideran como una prueba de su amplia relación micorrízica en las raíces de los pinos. Otros métodos que permiten determinar los hongos ECM asociados directamente en las raíces son los estudios moleculares (Chen *et al.*, 2003) y el método conocido como morphotyping (Palfner, 2001).



Figura 3. Panorámica general y algunos hongos ectomicorrízicos de la región de Santa Catarina del Monte, Texcoco, México. **a:** Vista parcial del bosque de *Pinus hartwegii* de la región, **b:** *Lactarius deliciosus*, **c:** *Hygrocybe conica*, **d:** *Xerocomus badius*, **e:** *Amanita fulva*, **f:** *Clitocybe gibba*, **g:** *Amanita flavoconia*, **h:** *Amanita caesarea sensu lato* ya que recientemente Guzmán y Ramírez (2001) observaron que en México este es en realidad un complejo de especies.

Uno de los aspectos a considerar en la colecta de hongos ECM con fines ya sea comerciales o de investigación es la época de fructificación, siendo clave para estudios ecológicos o biotecnológicos. En el Cuadro 9 se presenta la época de fructificación de algunas especies de hongos ECM localizados en

bosques de *P. hartwegii* de la comunidad de Santa Catarina del Monte, Texcoco, México.

Cuadro 9. Nombres vulgares y época de fructificación de algunas especies de hongos ectomicorrízicos en bosques de *Pinus hartwegii* en Santa Catarina del Monte, Texcoco, México.

Especie	Nombre vulgar	Periodos de Fructificación
<i>Amanita caesarea</i>	Yema ³	Julio-Diciembre**
<i>Amanita rubescens</i> a	Juan Diego ³	Julio-Diciembre**
<i>Boletus edulis</i>	Pambaso ¹	Junio-Diciembre**
<i>Cantharellus cibarius</i>	Duraznillo ²	Junio-Diciembre**
<i>Clitocybe gibba</i> a	Tablero ³	Julio-Octubre**
<i>Collibya dryophila</i>		Marzo-Noviembre**
<i>Cortinarius</i> sp.		
<i>Helvella crispa</i>	Señorita ²	Agosto-Diciembre***
<i>Higrocybe conica</i> *		Septiembre***
<i>Hydnum imbricatum</i>		Agosto-septiembre***
<i>Hygrophorus</i> sp.	Nixtamalito ³	Agosto-octubre
<i>Lactarius deliciosus</i>	Enchilado blanco ²	Julio-Diciembre**
<i>Lactarius salmonicolor</i>	Enchilado rojo ²	Julio-Diciembre**
<i>Lycoperdon umbrinum</i>	Popote ³	Marzo-Noviembre***
<i>Morchella conica</i>	Mazorca ¹	Agosto-Diciembre**
<i>Ramaria botrytis</i> *	Escobeta amarilla ²	Mayo-Agosto***
<i>Russula brevipes</i>	Borrego ³	Julio-Diciembre**
<i>Scleroderma</i> sp.		Agosto-septiembre***

¹ Apipilhuasco, Texcoco, ² Santa Catarina del monte, Texcoco y ³ Bibliografía (Herrera y Guzmán, 1961; Moreno-Zarate, 1990; Villarreal, 1996; González, 1997; Florencio-Cruz y García-Martínez, 1998), **Estimaciones basadas en entrevistas a pobladores de la región, ***Basados en recorridos quincenales efectuados en la región, *= estatus ectomicorrízico no definido.

La mayoría de las especies se localizan durante un periodo corto a mediados de la estación, probablemente debido a que el dosel es muy abierto y una capa de mantillo poco profunda, originada por la escasa incorporación de materia orgánica, por lo que se conserva muy poco la humedad residual en los horizontes superficiales del suelo al final del año.

5.2. Evaluación de la especificidad, infectividad y efectividad de hongos ectomicorrízicos en plantas de *Pinus patula*

El estudio de los efectos positivos que causa la inoculación de especies fúngicas ECM en plantas destinadas a la recuperación de áreas degradadas es muy importante ya que incrementan el porcentaje de supervivencia en campo, además de generar información necesaria sobre la compatibilidad del hongo y el hospedero en algunas especies de pinos mexicanos.

Dentro de los estudios realizados sobre inoculación con diferentes especies fúngicas ECM y *P. patula* se encuentra el realizado por Mohan *et al.* (1993, 1993b y 1993c) quienes inocularon basidiosporas de *Amanita muscaria*, *L. laccata*, *S. pseudobrevipes*, *Rhizopogon luteolus* y *Scleroderma citrinum* presentándose asociación.

Por su parte Sudhakara-Reddy y Natarajan (1996) observaron que la inoculación de *Laccaria laccata* y *Scleroderma citrinum* iniciaron la formación micorrízica 6 semanas después de la inoculación con excepción de *Amanita muscaria* quien no formó micorrizas durante el periodo de observación. Los mismos autores en 1997 evaluaron la eficacia de la coinoculación de diferentes hongos ECM en plantas de *P. patula* bajo condiciones de invernadero, observando una respuesta positiva.

5.2.1. Variables de la raíz

El análisis general de las variables micelio externo, número total de raíces cortas ectomicorrízicas y no ectomicorrízicas y colonización mostró que existieron diferencias significativas entre tratamientos para todas las variables excepto para la variable número total de raíces cortas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de la raíz evaluadas en *P. patula*

F.V.	GL	Micelio externo (%)	Número total de raíces cortas	Número de raíces ECM	Número de raíces no ECM	Colonización (%)
Tratamiento	6	0.46**	1152427.92 NS	1516835.51**	2668595.23**	0.31**
Error	28	0.02	668868.97	133134.89	420843.79	0.01
C.V.		35.90	30.06	36.23	40.35	18.67
Media general		0.45	2721.09	1007.06	1607.76	0.65

FV= Fuente de variación; GL=grados de libertad, CV=coeficiente de variación; **altamente significativo con $\alpha = 0.05$ NS=no significativo

En el apéndice II, III y IV se presentan los promedios generales para estas variables. Las plantas inoculadas presentaron para estas variables valores mayores en comparación al testigo, excepto el número total de raíces cortas.

5.2.1.1. Evaluación de la cobertura de micelio externo en la superficie del cepellón

Para la variable micelio externo, existieron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($p < 0.0001$). Al realizar la comparación de medias se encontró que el hongo ECM inoculado que mostró el mayor valor de crecimiento de micelio extramatricial fue *S. pseudobrevipes*, valor estadísticamente similar al observado para *L. laccata* (Fig. 4). Asimismo, tanto *S. pseudobrevipes* como *L. laccata* fueron superiores comparados con *A.*

fulva, *A. caesarea* y *B. clavipes*. Asimismo, *S. pseudobrevipes* tuvo mayores valores que *S. granulatus*. En el caso de *A. fulva* y *B. clavipes* no existieron diferencias estadísticas significativas (Prueba de Tukey, $p < 0.05$) entre el efecto de estos hongos ECM inoculados. Los resultados de la presente investigación mostraron que si bien los diferentes hongos ECM inoculados en *P. patula* presentaron diferente crecimiento micelial en la superficie de los tubetes, éste exhibió variaciones, dependiendo de la especie fúngica ECM.

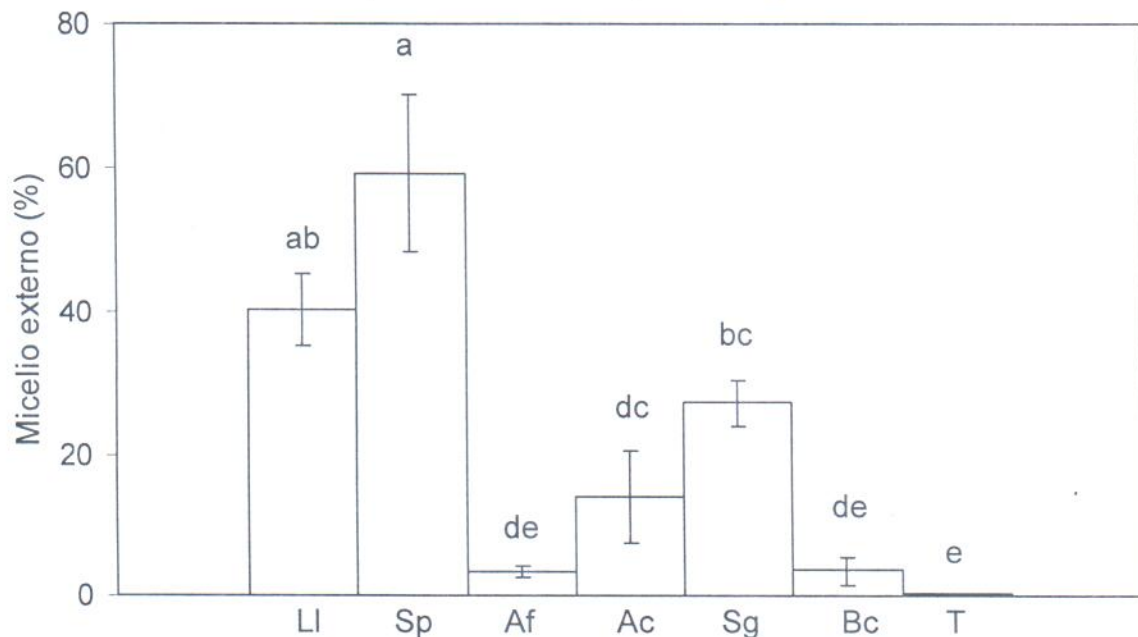


Figura 4. Cobertura de micelio externo en la superficie del cepellón con plantas de *Pinus patula* inoculadas con hongos ectomicorrízicos. La evaluación fue efectuada 9 meses después de la inoculación. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). LI=*Laccaria laccata*; Sp=*Suillus pseudobrevipes*; Af=*Amanita fulva*; Ac=*Amanita caesarea*; Sg=*Suillus granulatus*; Bc=*Boletus clavipes*; T=Testigo.

Una de las posibles explicaciones del bajo porcentaje de desarrollo micelial en algunos tratamientos (Fig. 4) podrían ser las variaciones genéticas que existen entre las diferentes especies de hongos ECM para producir esta estructura (Smith y Read, 1997).

La importancia del micelio extramatricial radica en que permite incrementar la superficie de absorción (Allen *et al.*, 1981; Stahl *et al.*, 1988; Yanai *et al.*, 1995) favoreciendo la movilización y captura de nutrimentos y agua en el suelo (Read, 1992) a mayor distancia así como hacer disponibles micrositios que son inaccesibles para las raíces (Jongmans *et al.*, 1997), de ahí su importancia para el fitobionte. Esto permite que las plantas micorrízicas presenten menor resistencia a la pérdida de vapor de agua a través de los estomas que las plantas no micorrízicas, favoreciendo que la fotosíntesis ocurra a potenciales de agua de suelo menores.

5.2.1.2. Número total de raíces cortas

La variable número total de raíces cortas (Fig. 5) no presentó efecto significativo entre tratamientos ($p=0.152$). En el caso del número total de raíces con ECM y sin ECM, existió efecto de los diferentes hongos ECM inoculados sobre estas variables (Figs. 6 y 7).

Para la variable número total de raíces cortas independientemente de la especie de hongo ECM inoculado no existieron diferencias significativas (Fig. 5) entre los distintos tratamientos y con respecto al testigo. Para las variables número de raíces ECM y no ECM (Figs. 6 y 7) existieron diferencias significativas entre las plantas inoculadas con los distintos hongos ECM inoculados. En el caso del número de raíces cortas ECM, los mayores valores se observaron cuando se inoculó con *L. laccata* y *S. pseudobrevipes*, siendo este valor estadísticamente similar al efecto observado con los hongos ECM *S. granulatus*, *B. clavipes* y *A. fulva*; pero superior comparado con *A. caesarea* o el testigo (Fig. 6).

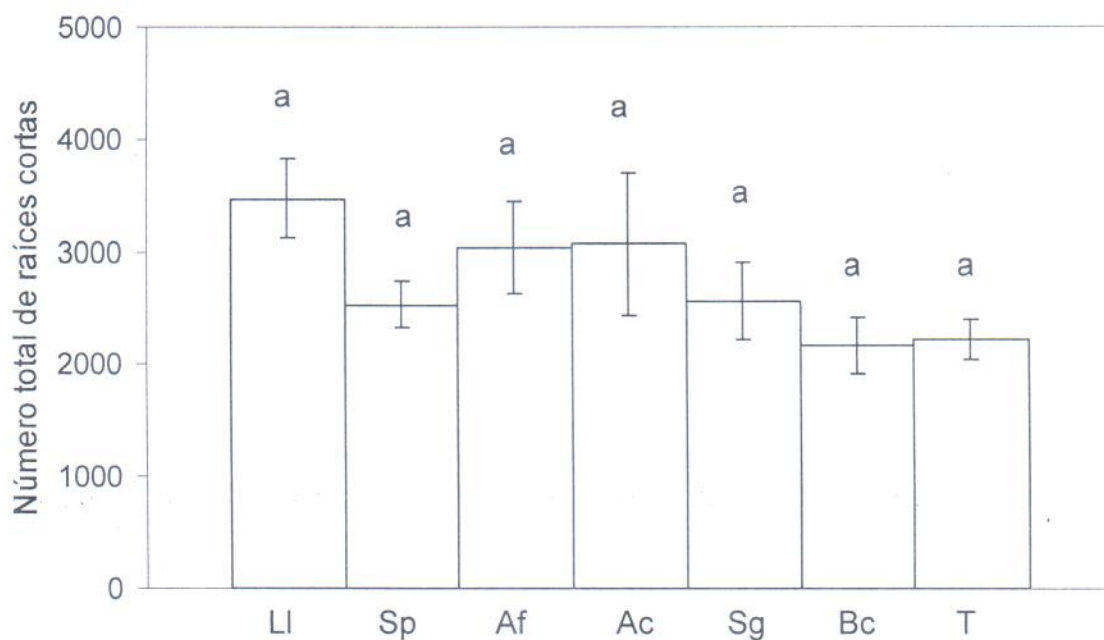


Figura 5. Número total de raíces cortas de plantas de *Pinus patula* inoculadas con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 4.

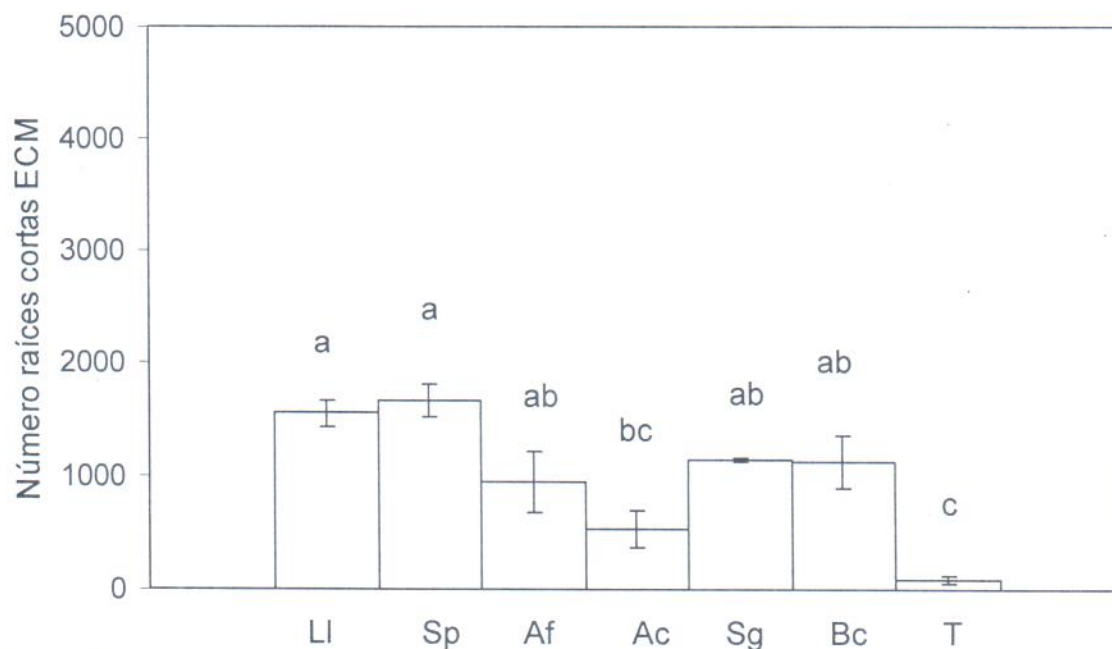


Figura 6. Número total de raíces cortas ECM de plantas de *Pinus patula* inoculadas con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 4.

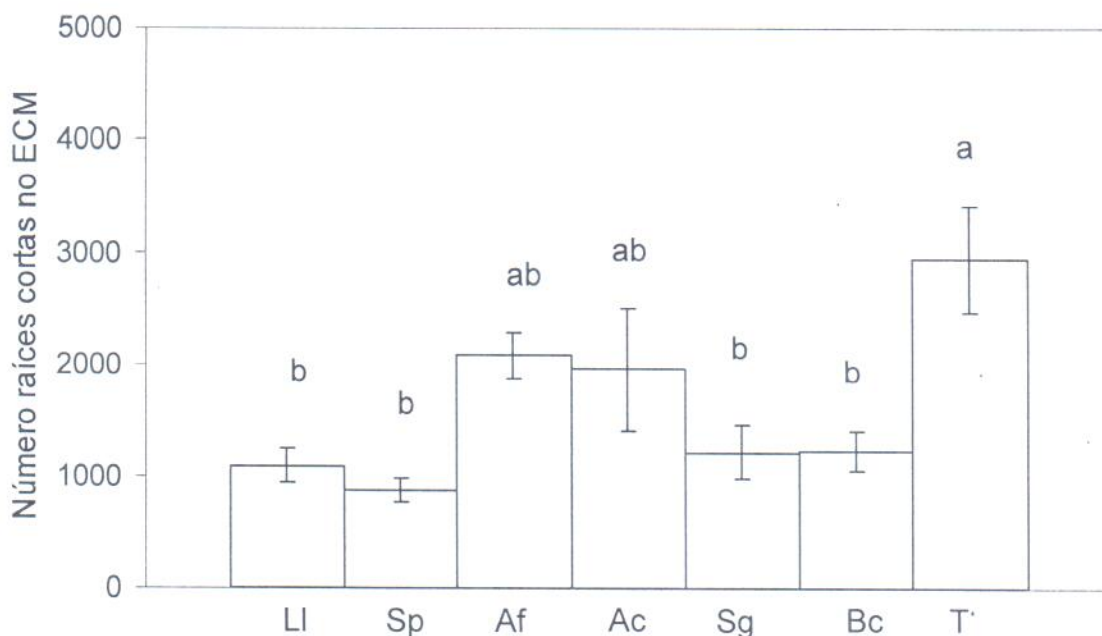


Figura 7. Número total de raíces cortas no ECM de plantas de *Pinus patula* inoculadas con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 4.

Sudhakara-Reddy y Natarajan (1997) evaluaron el efecto de la inoculación de inóculo micelial de *L. laccata* en el crecimiento de *P. patula* en la India. Diez meses después de la inoculación encontraron diferencias estadísticas en el número de raíces cortas con ECM en relación al testigo. En este estadio, sus valores fueron menores a los encontrados en el presente trabajo, ya que dichos autores encontraron 641 raíces cortas.

En el caso del número de raíces cortas no ECM, se observó que el testigo no tuvo diferencias significativas cuando se le comparó con *A. fulva* y *A. caesarea*. Sin embargo, si las hubo con respecto a los demás tratamientos. No hubo diferencias para esta variable entre ningún tratamiento con distintas especies de hongos ectomicorrízicos (Fig. 7).

5.2.1.3. Colonización micorrízica

Para el porcentaje de colonización micorrízica existió efecto significativo de las diferentes especies fúngicas ECM inoculadas en la respuesta de las plantas (Prueba de Tukey, $p < 0.05$). Al realizar la comparación de medias se observó que el mayor porcentaje de colonización se presentó cuando se inocularon las plantas con *S. pseudobrevipes* siendo este valor no estadísticamente mayor que el observado para el hongo ECM inoculado *L. laccata* y *S. granulatus* pero sí superior al valor observado con los tratamientos de *A. fulva*, *A. caesarea* y *B. clavipes* (Fig. 8). De acuerdo con la clasificación de Grand y Harvey (1984) y Marx *et al.* (1991), los tratamientos que presentaron buena colonización fueron *L. laccata*, *S. pseudobrevipes* y *S. granulatus*; moderada colonización con *A. fulva* y *B. clavipes* y pobre colonización con *A. caesarea*.

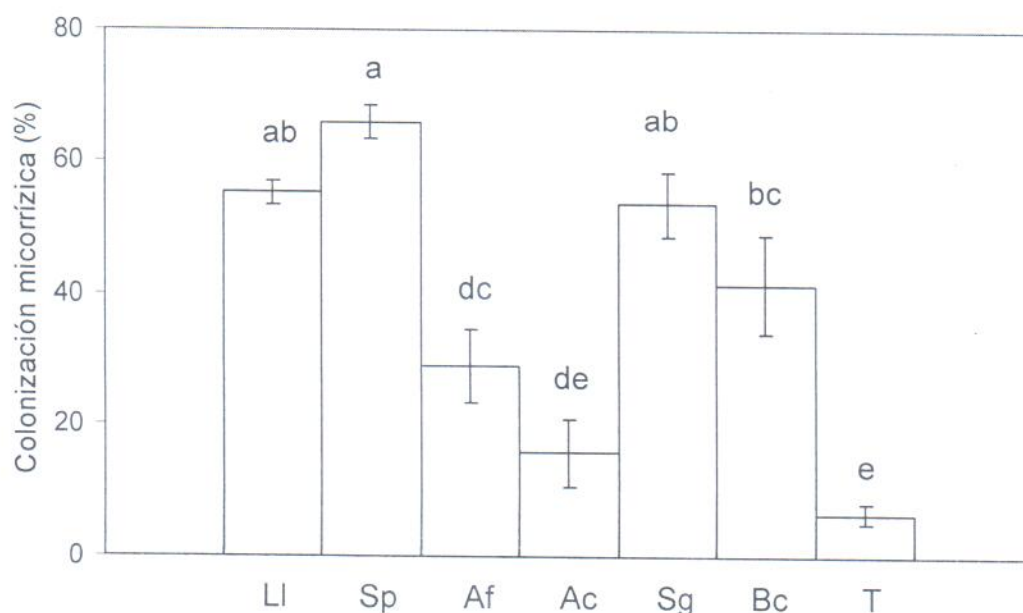


Figura 8. Colonización micorrízica de plantas de *Pinus patula* inoculadas con distintas especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 4.

Si bien, esta respuesta probablemente estuvo relacionada con la concentración esporal aplicada, la cual fue más alta para *S. pseudobrevipes* (10^8 esporas/planta) tratamiento que presentó el mayor valor de colonización a diferencia de la menor concentración esporal aplicada para el tratamiento *A. fulva* (10^5 esporas/planta) y *A. caesarea*, tratamientos que presentaron una menor colonización, sin embargo, para el caso del hongo ECM *L. laccata*, su inoculación en plantas presentó un efecto similar al observado para *S. pseudobrevipes*, a pesar de que se aplicó igual concentración esporal que *A. fulva*, tal respuesta induce a pensar que *L. laccata* presentó una mayor agresividad para colonizar a *P. patula*. Parladé *et al.* (1996) evaluaron el efecto de la concentración esporal en la colonización, encontrando que a mayores concentraciones esporales (10^7 esporas por planta) aplicadas se presentó mayor colonización.

Rincón *et al.* (2001) evaluaron el efecto de la concentración esporal de *Melanogaster ambiguus*, *P. tinctorius*, *Rhizopogon luteolus* y *Scleroderma verrucosum* en la colonización de plantas de *Pinus pinea*. Cinco meses después de la inoculación encontraron diferencias estadísticas en la colonización del sistema radical con las diferentes especies fúngicas ECM inoculadas en relación al testigo. Observaron que para *Melanogaster ambiguus* el porcentaje de colonización obtenido a 10^7 (100%) esporas fue significativamente mayor que a 10^6 (76%) esporas. En el caso de *P. tinctorius* el porcentaje de colonización observado a 10^6 , 10^7 y 10^8 esporas fue de 52, 43 y 52% respectivamente. Para *R. luteolus* el porcentaje de colonización a 10^4 y

10^5 (64 y 67%) fue significativamente menor que el obtenido a 10^6 , 10^7 y 10^8 (>80%). *S. verrucosum* formó ectomicorrizas a 10^5 esporas por planta. Los porcentajes de colonización (54-62%) a 10^5 a 10^8 esporas no fueron significativamente diferentes. En el caso de la presente investigación a los 9 meses sus valores de colonización a 10^5 y 10^6 esporas fueron mayores a los encontrados con las especies fúngicas ECM evaluadas. En el caso de 10^8 esporas, se observó un valor de colonización similar al reportado por estos autores (52%).

Sin duda, otro de los factores que favorecieron la colonización fue la utilización de especies de hongos ECM de etapa temprana a diferencia de los de etapa tardía, ya que son más exitosas que estas últimas (Mason *et al.*, 1983). Un número muy limitado de hongos ECM presentan estas características en plantaciones de *Pinus patula* (Natarajan *et al.*, 1992). En el presente estudio se utilizó *Laccaria laccata* debido a su naturaleza de etapa temprana, alta capacidad de colonización (Thomson *et al.*, 1994; Sudhakara-Reddy y Natarajan, 1996) así como su mayor efecto sobre la planta que otros hongos como *A. muscaria*, *R. luteolus*, *Scleroderma citrinum* y *Suillus brevipes* asociados con *P. patula* (Mohan, 1991). Los resultados de la presente investigación mostraron que *S. pseudobrevipes* y *L. laccata* fueron los tratamientos que presentaron mayor capacidad de colonización y efecto sobre el crecimiento de plantas.

La especie fúngica ECM *B. clavipes* fue utilizada debido a que son las especies de hongos ECM reportados en plantaciones de *P. patula* (Khalil *et al.*, 1999). Aunque los efectos de la colonización de *Amanita spp.* es difícil de establecer

debido a su baja ocurrencia en bosques de sucesión temprana, *A. fulva* ha sido seleccionada por el mejoramiento del crecimiento de plantas lo cual se ha demostrado experimentalmente (Trappe, 1977).

El género *Suillus* fue utilizado dado que tiene la capacidad para colonizar pinos jóvenes y viejos, caracterizándose por resistir a través de la vida de un bosque, denominándose como hongo de etapa múltiple (Danielson, 1991; Visser, 1995; Nara *et al.*, 2003) así como presentar excelente micorrización en diferentes especies forestales (Villeneuve *et al.*, 1990). Para el tratamiento no ectomicorrízico se pudo observar colonización, aunque esta fue muy reducida y similar a la observada en experimentos de duración parecida (Sudhakara-Reddy y Natarajan, 1997).

Rincón *et al.* (1999) evaluaron la capacidad simbiótica de diferentes especies fúngicas ECM con *Pinus pinea* en la región de Cataluña, España. Cuatro meses después de la inoculación encontraron que las plantas inoculadas con *Suillus granulatus* (l. ex Fr.) O. Kuntze presentaron porcentajes de colonización de 58 %. A este estadio sus valores fueron similares a los encontrados con *Suillus pseudobrevipes* y *Suillus granulatus* en el presente trabajo.

Parladé *et al.* (1996) evaluaron la compatibilidad simbiótica de diferentes *Amanita* spp. con plantas de *Pseudotsuga menziesii*. Los porcentajes de colonización variaron marcadamente entre especies. *Amanita citrina* no formó micorrizas. En el caso de *Amanita aspera* (Fr.) Hooker se observaron valores de colonización de 26-50%, *A. muscaria* 1-25% de colonización y *A. rubescens* presentó los mayores valores de colonización 51-75%. En el caso de la presente investigación se observaron valores similares a los reportados por

estos autores para *A. muscaria*. Los resultados de la presente investigación mostraron baja especificidad de las especies de amanitas evaluadas en *P. patula*. Los mismos autores estudiaron la compatibilidad simbiótica y el potencial de colonización de *Boletus edulis*, *Suillus luteus* y *S. bovinus*. Observaron que estas especies presentaron valores de colonización de 1-25% y 26-50% para las dos últimas especies respectivamente. En el caso de *B. edulis* esta especie no formó ectomicorrizas.

Los resultados de la presente investigación sugieren que a pesar que las diferentes especie fúngicas ECM inoculadas presentaron compatibilidad con *P. patula* y con la etapa de desarrollo de la planta, esta respuesta fue diferencial dependiendo de la especie fúngica ECM inoculada. La importancia de estos resultados radica en el hecho de que la falta de hongos ECM en las fases tempranas de desarrollo de plantas de pino utilizada para proyectos de reforestación es la causa principal de la elevada mortandad de las especies que se producen en vivero (Honrubia *et al.*, 1992).

Estudios realizados con *L. laccata* y *P. pinea* por Rincón *et al.* (2001), encontraron que el porcentaje de colonización para esta especie varió de 11-40 % resultados similares a los encontrados en este estudio (55.07 %), a pesar de que *L. laccata* se reporta como un excelente micobionte en diversos estudios, en el presente trabajo se encontró que esta especie fue superada por *S. pseudobrevipes* (65.92%). Estos valores de colonización son considerados usualmente adecuados para propósitos de reforestación (Kropp y Langlois, 1990). De acuerdo con Quoreschi y Timmer (2001), valores menores, limitan el crecimiento de la planta.

5.2.2. Variables de crecimiento

Se realizó la comparación de las variables: altura, diámetro y número de ramillas secundarias. Lo anterior con la finalidad de identificar el efecto de los hongos ECM, encontrándose que existió efecto de éstos en la altura, diámetro del tallo y número de ramillas secundarias.

Cuadro 11. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables morfológicas evaluadas en *P. patula*

F.V.	GL	Altura (mm)	Diámetro del tallo (mm)	Número de ramillas secundarias
Tratamiento	6	5927.913**	0.796**	251.94*
Error	35	1118.60	0.093	75.79
C.V.		20.58	19.014	102.42
Media general		162.48	1.604	8.50

FV= Fuente de variación; GL= grados de libertad; CV= coeficiente de variación; *Significativo $\alpha = 0.05$ **altamente significativo $\alpha = 0.05$ NS=no significativo

En las figuras 9, 10 y 11 se presentan los promedios generales para las variables altura, diámetro y número de ramillas secundarias. De las variables estudiadas el promedio de todos los tratamientos para cada variable fue mayor en relación al testigo.

5.2.2.1. Altura

En la presente investigación, se observó que la inoculación con los diferentes hongos ECM presentaron respuestas diferentes (Fig. 9). Los hongos ECM *B. clavipes*, *S. pseudobrevipes* y *L. laccata* presentaron los mayores valores siendo éstos no estadísticamente mayores a los presentados por *A. fulva*, *A. caesarea* y *S. granulatus* pero si superiores comparados con el testigo. Esta variable fue 1.7 veces mayor cuando se inoculó con *L. laccata* comparado con el testigo.

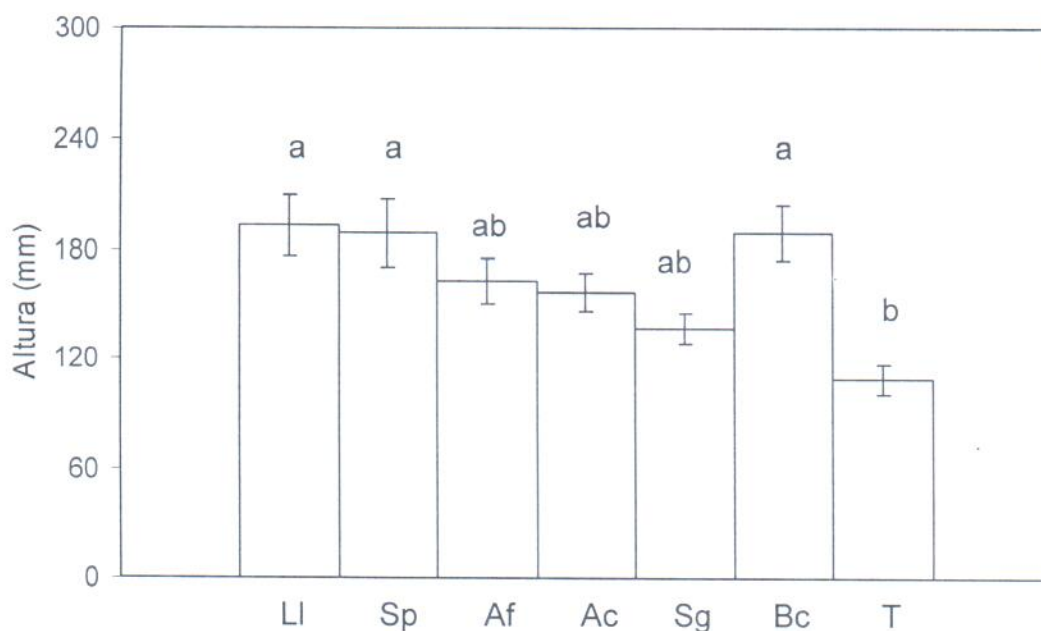


Figura 9. Altura de plantas de *Pinus patula* inoculadas o no con distintas especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=6$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 4.

Sudhakara-Reddy y Natarajan (1997) encontraron en un estadio similar al estudiado en el presente trabajo la existencia de diferencias significativas entre plantas de *P. patula* inoculadas con *L. laccata* respecto al testigo. Para esta variable sus valores fueron menores, en el caso de plantas inoculadas y sin inocular, a los encontrados en el presente trabajo, estos autores encontraron 14.2 y 9.7 cm de altura, respectivamente. Estas diferencias respecto a la presente investigación pueden estar relacionadas con la fuente de obtención del hongo ECM, ya que algunas investigaciones han demostrado que este factor contribuye a la variación en los niveles de efectividad cuando se inoculan las mismas especies de plantas obtenidas de varias fuentes genotípicas (Dixon *et*

al., 1987), lo cual demuestra la importancia de conocer las condiciones en donde se desarrollan ambos simbioses.

El efecto significativo de la inoculación con diferentes hongos ECM observado en la presente investigación se explica por el hecho de que las ectomicorrizas favorecen que exista una mayor superficie de absorción de nutrimentos y de agua en la raíz, que aquellas plantas que tienen poca colonización o carecen de ella.

Los hongos ECM inoculados que presentaron valores no estadísticamente mayores respecto al testigo son *A. caesarea*, *A. fulva* y *S. granulatus*. Resultados similares son los reportados por Parladé *et al.* (1996) quienes al inocular esporas de *Melanogaster ambiguus* y *Tuber maculatum* en *Pseudotsuga menziesii*. Cinco meses después no encontraron diferencias significativas para esta variable en los tratamientos inoculados en relación al testigo. A este estadio sus valores fueron mayores a los reportados para el presente trabajo en el caso de *M. ambiguus*. Los valores reportados para las plantas inoculadas con *T. maculatum* fueron mayores comparados con *A. fulva*, *A. caesarea* y *S. granulatus* pero menores en relación a plantas inoculadas con *Laccaria laccata*, *Suillus pseudobrevipes* y *Boletus clavipes*, 21.2 cm y 17.3 cm para *M. ambiguus* y *T. maculatum* respectivamente. Existieron diferencias también en el caso de plantas sin inocular, valores mayores en el caso de Parladé *et al.* (1996), con una altura de 171 cm y 167 cm respectivamente. Estas diferencias respecto a la presente investigación pueden estar relacionadas con la adición de fertilizantes y micronutrientes a las plantas

evaluadas de *P. menziesii*, lo cual probablemente no permitió observar el efecto potencial que podrían tener estas especies fúngicas ECM.

La existencia de diferencias entre las alturas medias alcanzadas por las plantas de los distintos tratamientos en relación al testigo en la presente investigación, demostró que la existencia de ectomicorrizas en el sistema radical afecta el crecimiento en altura de las plantas de *P. patula*, si bien el efecto es variable dependiendo de la especie fúngica ECM inoculada.

5.2.2.2. Diámetro del tallo

Los diferentes hongos ECM inoculados presentaron un efecto altamente significativo en el diámetro del tallo de las plantas de *P. patula* ($p < 0.0001$). Existieron respuestas variables de acuerdo con las especies fúngicas ECM inoculadas (Fig. 10). El mayor valor para esta variable fue observado con el hongo *L. laccata*, sin embargo, este valor no fue estadísticamente mayor al observado cuando se inoculó con *S. pseudobrevipes*, *A. fulva* y *B. clavipes*, pero sí fue superior comparado con las especies fúngicas *A. caesarea*, *S. granulatus* y el testigo (Fig. 10). El diámetro observado cuando se inoculó con *L. laccata* fue 2.1 veces mayor respecto al testigo.

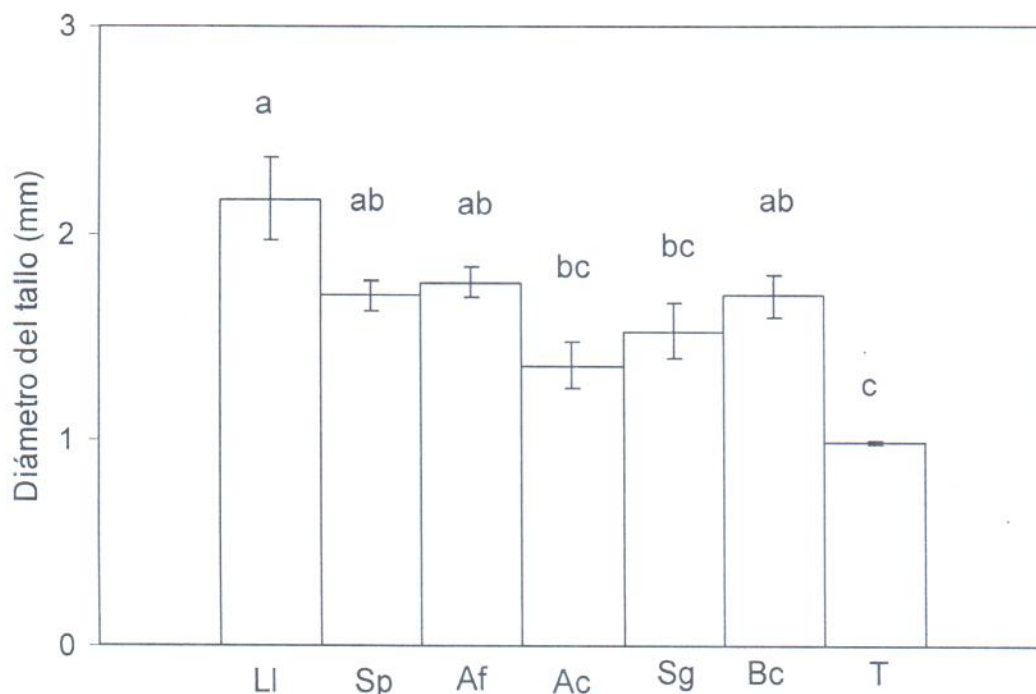


Figura 10. Diámetro del tallo de plantas de *Pinus patula* inoculadas o no con distintas especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=6$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 4.

Rincón *et al.* (2001) inocularon plantas de *P. pinea* con inóculo micelial de *L. laccata*, después de cinco meses observaron valores mayores que los encontrados en el presente trabajo, 3.9 mm. Los mismos autores observaron que no existieron diferencias entre las plantas inoculadas con *L. laccata* y el control. En general, no existió un incremento significativo en el diámetro del tallo de las plantas debido a la inoculación. Dentro de las posibles explicaciones de los autores a este fenómeno se encuentran: las reservas de los cotiledones en *P. pinea* son grandes y probablemente las plantas no dependieron de su asociado micorrízico para el crecimiento durante el periodo de observación. Otros factores son el uso de sustratos artificiales, el espacio del contenedor y la fertilización constante, factores que pudieron suprimir la influencia del hongo en el desarrollo de la planta. A diferencia de lo reportado por estos autores,

Gómez-Sánchez *et al.* (2002) evaluaron el efecto de la inoculación de esporas de *Suillus bellinii*, *S. collinitus* y *S. mediterraneus* en el crecimiento de *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis*. Encontraron un gran efecto sobre las variables de crecimiento. Resultados similares son los reportados por Beckjord y McIntosh (1983) quienes observaron incrementos de 11-34 % en diámetro de tallo en plantas de *Quercus rubra* inoculadas con diferentes especies fúngicas ECM.

5.2.2.3. Número de ramillas secundarias

El número de ramillas secundarias se contó 9 meses después de la inoculación. El tratamiento que promovió un mayor número de ramillas secundarias fue *L. laccata*, sin embargo, este valor no fue estadísticamente mayor que el valor observado para *S. pseudobrevipes*, *A. fulva*, *A. caesarea* y *B. clavipes* pero sí superior comparado con *S. granulatus* y el testigo, tratamientos que no presentaron diferencias respecto a esta variable (Fig. 11). Esta variable es de gran importancia en la calidad de planta, ya que probablemente en condiciones de campo éstas tienen la función no sólo de realizar mayor fotosíntesis y ser reservorio para la planta mientras emite nuevas raíces sino que toman el lugar del brote primario en caso de daño físico, disminuyendo así la mortalidad.

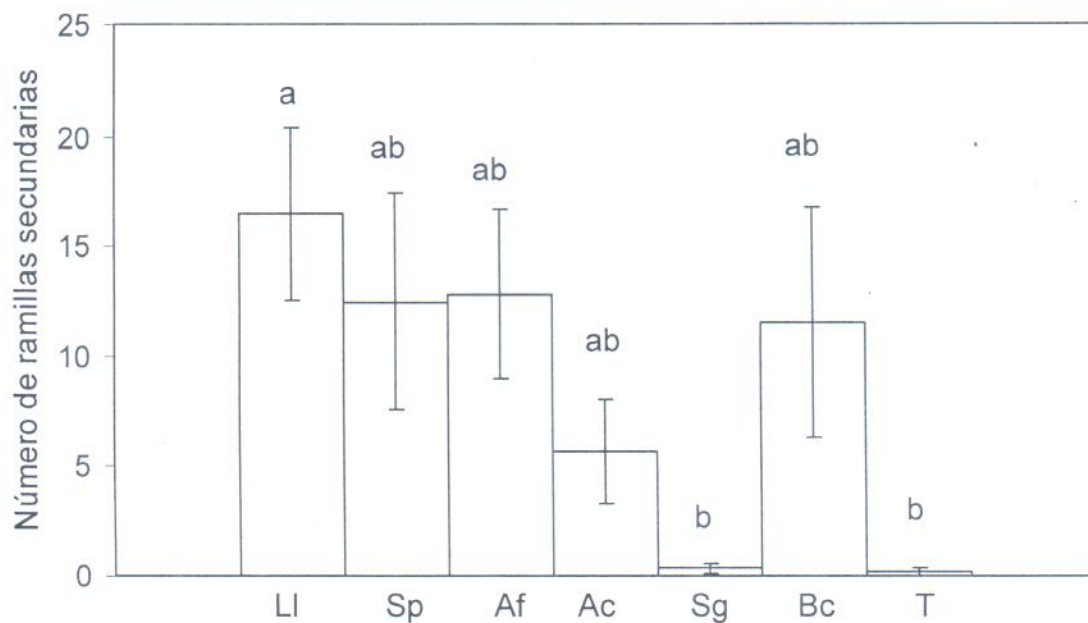


Figura 11. Número de ramillas secundarias de plantas de *Pinus patula* inoculadas con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=6$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 4.

5.2.3. Peso anhidro

Los análisis de las variables peso anhidro de la parte aérea, radical y total mostraron diferencias estadísticas significativa ($p<0.0007$, $p<0.008$ y $p=0.0003$) con respecto al efecto de los tratamientos.

Cuadro 12. Cuadrados medios y niveles de significancia para el peso anhidro evaluadas en *P. patula*

F.V	GL	Peso anhidro total	Peso anhidro parte aérea	Peso anhidro radical
Tratamiento	6	472836.457**	184943.562**	102418.314**
Error	28	85510.586	51222.957	16575.286
C.V.		25.06	30.558	28.870
Media general		1166.71	740.629	445.943

FV= fuente de variación; GL= grados de libertad; CV= coeficiente de variación; *Significativo $\alpha = 0.01$ **altamente significativo $\alpha = 0.01$ NS=no significativo

Para la variable peso anhidro total se observó una respuesta diferencial entre las plantas inoculadas con las distintas especies fúngicas ECM inoculadas, el mayor valor fue observado en plantas inoculadas con *L. laccata*, valor que no fue estadísticamente mayor al observado cuando se inoculó con *S. pseudobrevipes*, pero sí superior comparado con los hongos ECM inoculados *A. fulva*, *A. caesarea*, *S. granulatus* y *B. clavipes* y el testigo (Fig. 12). Estos resultados mostraron que *L. laccata* y *S. pseudobrevipes* estimularon una mayor biomasa cuando se inoculó a plantas de *P. patula*, existiendo por lo tanto una respuesta positiva. Para esta variable existió un aumento de 2.2 veces cuando se inoculó con *L. laccata* comparado con el testigo.

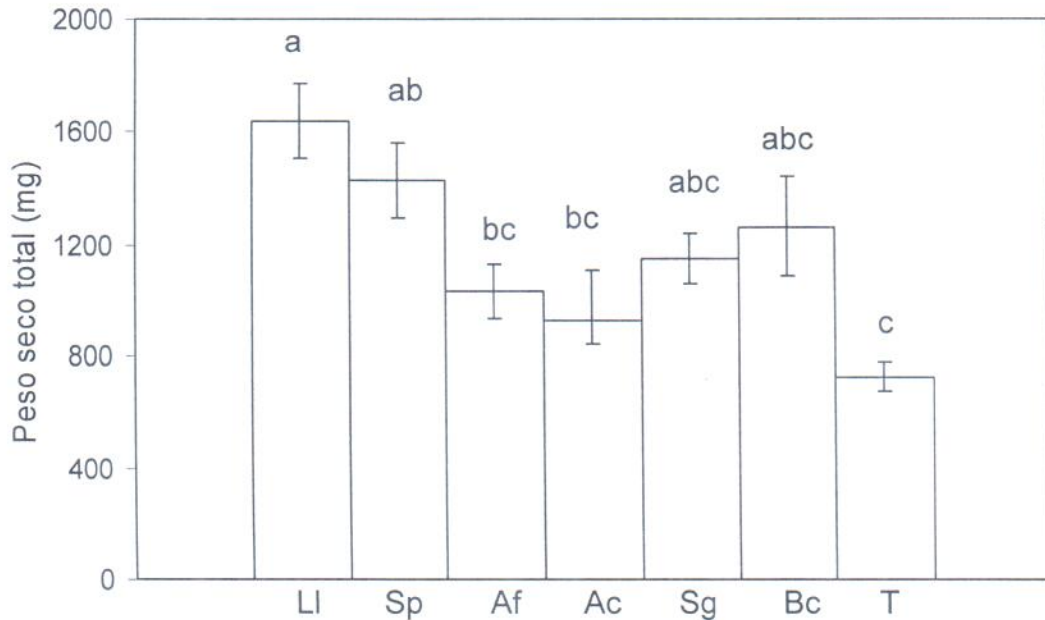


Figura 12. peso anhidro total de plantas de *Pinus patula* inoculadas con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 4.

Parladé *et al.* (1996) evaluaron el efecto de la inoculación de diferentes concentraciones de esporas de tres especies de hongos ECM en el crecimiento de *Pinus pinaster* en el norte de España. Cinco meses después de la inoculación no encontraron diferencias significativas para la variable peso anhidro total en las plantas inoculadas con las diferentes especies fúngicas ECM y concentraciones evaluadas. Sus valores observados fueron menores para el caso de plantas inoculadas con *Melanogaster ambiguus* y *Rhizopogon roseolus* a una concentración de 10^5 esporas a diferencia de *Scleroderma citrinum* que presentó un valor mayor que los encontrados en el presente trabajo con las plantas inoculadas con esta concentración independientemente de la especie fúngica, estos autores encontraron 1,300 mg, 1,300 mg y 3,600 mg

respectivamente. En el caso de plantas inoculadas con una concentración de 10^6 esporas se observaron valores mayores para los tratamientos con *M. ambiguus* y *S. citrinum* y valores menores con *R. roseolus* que los encontrados en la presente investigación. Por su parte, Dell *et al.* (1994) inocularon varias especies forestales con aislamientos de *Scleroderma*. *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden mostró un incremento de 32 % en el peso anhidro. Resultados similares fueron obtenidos por Shirkot *et al.* (2001) en *Pinus roxburghii* inoculada con *P. tinctorius* observándose un incremento del peso anhidro. Los resultados coinciden con los encontrados por Honrubia (1994) en *P. halepensis* inoculados con *Pisolithus arhizus* (Pers) Rauschert, *R. roseolus* (Corda) Th M Fr y *S. collinitus* (Fr) O Kuntze obteniéndose valores de medias más altos de peso anhidro a diferencia del control. En el caso del peso anhidro aéreo, el mayor valor fue observado en plantas inoculadas con *L. laccata*, sin embargo, este valor no fue estadísticamente mayor al observado cuando se inoculó con *S. pseudobrevipes*, *A. fulva*, *A. caesarea*, *S. granulatus* y *B. clavipes* pero si superior comparado con el testigo (Fig. 13). Para la variable peso anhidro radical, el tratamiento que presentó el mayor valor fue *L. laccata*, valor estadísticamente similar al observado cuando se inoculó con *S. pseudobrevipes*; dichos tratamientos presentaron un efecto similar, superior al testigo (Fig. 14). Para esta variable existió un aumento de 2.5 veces cuando se inoculó con *L. laccata* en comparación al testigo. Es importante mencionar que esta variable adquiere en algunos casos mayor relevancia que el peso anhidro de la parte aérea, ya que de la capacidad de las plantas para emitir nuevas

raíces, depende en gran medida la supervivencia de las plantas en campo (Scagel y Linderman, 1998).

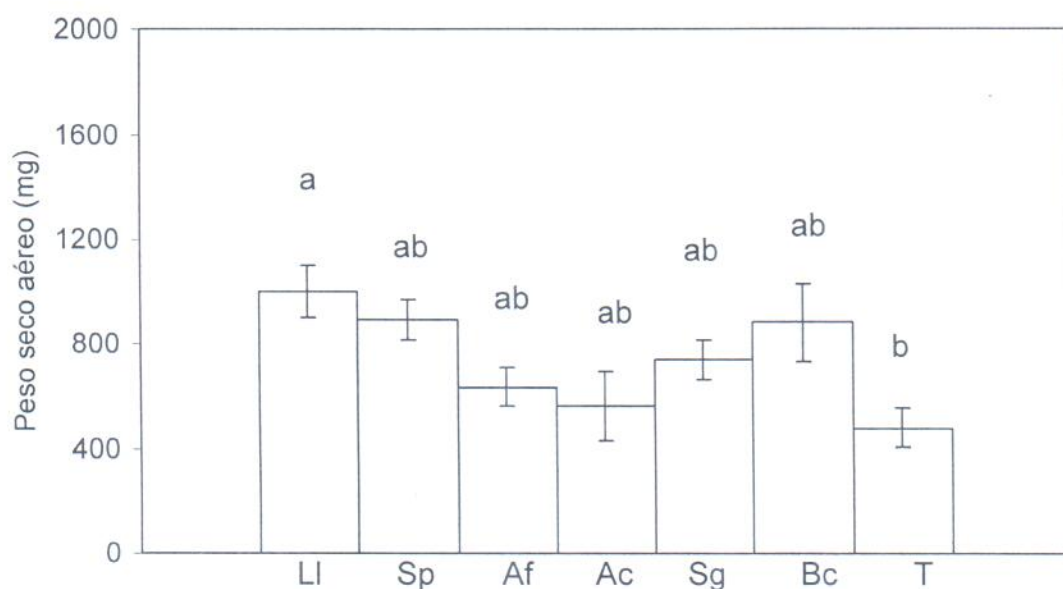


Figura 13. Peso anhidro parte aérea de plantas de *Pinus patula* inoculadas con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 4.

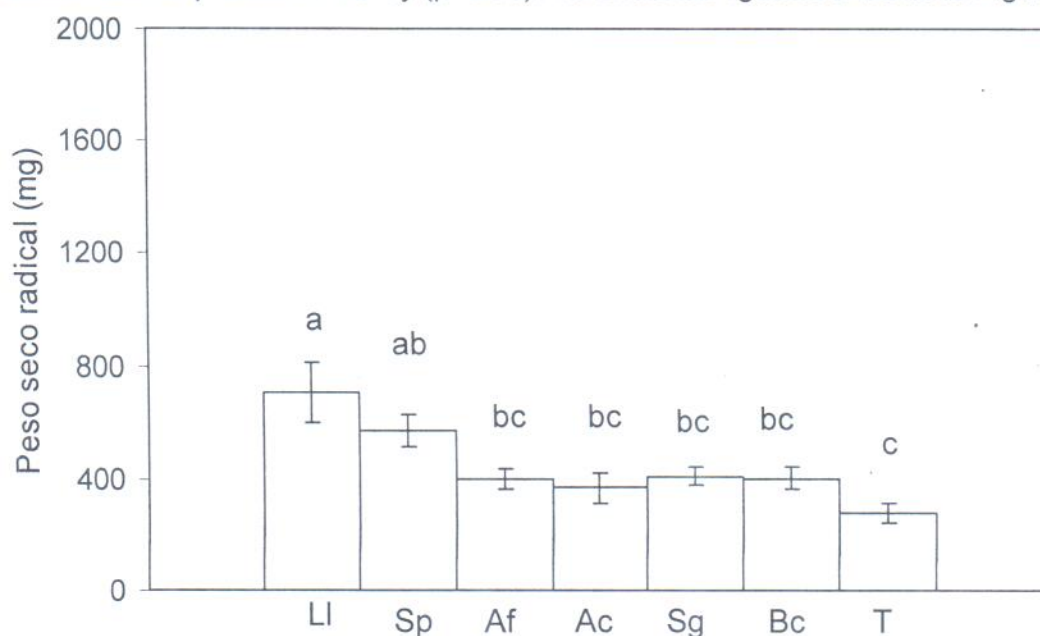


Figura 14. Peso anhidro radical de plantas de *Pinus patula* inoculadas con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 4.

Sudhakara-Reddy y Natarajan (1997) evaluaron el efecto de la inoculación de inóculo micelial de *L. laccata* en el crecimiento de *P. patula* en la India. Encontraron en un estadio similar al estudiado en el presente trabajo la existencia de diferencias estadísticas en el peso anhidro de la parte aérea y de la raíz en los tratamientos inoculados en relación al testigo. Sus valores fueron menores a los encontrados en el presente trabajo 576 y 366 mg de peso anhidro de la parte aérea y la raíz, respectivamente.

Estos autores observaron la existencia de diferencias significativas también en el caso de plantas sin inocular, valores menores en relación a los obtenidos en el presente trabajo. Estos autores reportaron un peso anhidro de la parte aérea y de la raíz de 334 y 128 mg, respectivamente.

5.2.3.1. Relación peso anhidro parte aérea:raíz

Las relaciones de peso anhidro de la parte aérea:raíz variaron de 1.52 en el caso de plantas inoculadas con *L. laccata* y *S. pseudobrevipes* a 2.29 en el caso de *B. clavipes*. Para el testigo dicho valor fue intermedio ente éstos, siendo de 1.88. A pesar de estas variaciones no existieron diferencias estadísticas significativas (Prueba de Tukey, $p < 0.05$) entre dicha relación de peso anhidro de la parte aérea y la raíz entre las plantas inoculadas con los diferentes hongos ECM utilizados y el testigo. Sin embargo, numéricamente para esta variable *B. clavipes* produjo la mayor proporción peso anhidro de la parte aérea:raíz a diferencia de *A. caesarea* y *L. laccata* que redujeron dicha proporción. Estos resultados mostraron que la inoculación con *L. laccata* originó

un mayor peso anhidro radical y una reducción en la relación peso anhidro de la parte aérea:raíz (Apéndice VIII) en relación a las plantas no inoculadas; resultado similar al obtenido por Rosado *et al.* (1993) y Brunner y Brodbeck (2001), quienes observaron un incremento del peso radical y una reducción en la proporción brote raíz en diferentes especies forestales inoculadas con distintos hongos ECM. Características de este tipo tienden a presentar un incremento en la tolerancia a la sequía (Duryea, 1985), por los fitobiontes, siendo ampliamente recomendadas en sitios con sequía estacional. Existe mayor aclimatación a suelos secos, dado que al existir mayor número de raíces, éstas tendrán la capacidad de absorber más cantidad de agua y nutrimentos.

5.2.4. Correlación de variables de crecimiento y colonización ECM

Se encontró una correlación positiva entre la colonización y micelio externo, raíces ECM, peso anhidro radical, peso anhidro parte aérea, diámetro del tallo y peso anhidro total, excepto para la variable raíces no ECM, la cual fue negativa (Cuadro 13). La correlación positiva entre variable indicó que al aumentar la colonización también se incrementó el diámetro, peso anhidro total, aéreo y radical, micelio externo. El menor valor fue observado en el caso del diámetro del tallo; mientras que el micelio externo presentó un valor de correlación intermedio. Estos resultados mostraron que los hongos que colonizan más profusamente las raíces fueron los más efectivos en incrementar la respuesta de las plantas a la inoculación.

Cuadro 13.- Coeficientes de correlación entre la colonización ECM y diferentes variables en *P. patula*.

Variables a correlacionar	Coeficiente de correlación
Colonización vs micelio externo	0.824 *
Colonización vs raíces ECM	0.975* *
Colonización vs raíces no ECM	-0.954* *
Colonización vs peso anhidro radical	0.774 *
Colonización vs peso anhidro parte aérea	0.884 **
Colonización vs diámetro del tallo	0.752*
Colonización vs peso anhidro total	0.886**

Nota: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Como puede observarse en el cuadro 13; el incremento en el peso anhidro parte aérea implicó una mayor colonización del sistema radical y viceversa, esto se explica por el hecho de que al existir una mayor área del follaje se promueve una mayor fotosíntesis presentándose un incremento en la asimilación de carbono (Harris *et al.*, 1985) y por lo tanto un mayor movimiento de carbohidratos de la planta al hongo y mayor movimiento de nutrimentos minerales del hongo a la planta, por lo que esto sugiere que los dos sistemas trabajan cooperativamente en el intercambio bidireccional. En este caso la colonización es de importancia ya que el resultado de tal transferencia es un incremento en el peso anhidro total.

El incremento en la colonización implicó un incremento en el micelio externo, permitiendo una mayor área superficial absorbente, ya que, dentro de las funciones del micelio se encuentra el tener una mayor adquisición de nutrimentos del suelo debido a una mayor capacidad de absorción y eficiencia en la asimilación del sistema radical ectomicorrízico (Smith y Read, 1997). De

acuerdo con Miller *et al.* (1989), el mayor almacén de carbono se encuentra en las hifas emanantes extramatriciales de las micorrizas. Tales características permiten a su vez que conforme incrementa la colonización exista un incremento en el diámetro por todos los beneficios anteriormente mencionados.

5.2.5. Caracterización morfológica de ectomicorrizas de *Pinus patula* y *Suillus pseudobrevipes*, *Pinus patula* y *Boletus clavipes*, *Pinus patula* y *Laccaria laccata*

En México, existe poca investigación enfocada al análisis morfológico y anatómico de las EM sintetizadas con especies forestales. Dentro de las investigaciones que se han realizado se encuentran las que abordan la ecología, distribución, identificación y descripción de especies fúngicas ectomicorrízicas en ecosistemas forestales destacando principalmente los estudios taxonómicos y silviculturales (Aguirre-Acosta y Pérez-Silva, 1978; León y Guzmán, 1980; García y Castillo, 1981).

El conocimiento anatómico de las raíces ECM de especies de coníferas con hongos ECM específicos es importante, dado que las funciones de las plantas están relacionadas con su estructura. Las EM formadas por diferentes hongos son estructuralmente distintas y difieren, por ejemplo, en nutrición y eficiencia para promover el crecimiento (Agerer, 2001), por lo que la caracterización morfológica proporciona información invaluable, especialmente cuando se vinculan características fisiológicas a micorrizas específicas. El objetivo de este capítulo fue describir anatómicamente las raíces ECM de diferentes especies

fúngicas con *P. patula* y *P. greggii*, bajo la premisa que existen diferencias entre las especies en la estructura anatómica de la raíz.

Debido a que la morfología de las EM está determinada por el hongo y el género de la planta que participa en la asociación (Agerer, 1991) la importancia de su descripción radica en el hecho de que algunas características de las mismas son esenciales funcionalmente, dado que influyen el crecimiento de los árboles en distinto grado debido a su variación anatómica, por lo que las diferencias entre ellas respecto a nutrición y eficiencia en la promoción del crecimiento pueden ser esperadas (Agerer, 2001).

Las EM formadas por *B. clavipes* y *L. laccata* se caracterizaron por presentar raíces cortas bifurcadas clasificadas como ectomicorrizas dicotómicas las cuales se localizaron a lo largo de las raíces laterales o secundarias cubiertas superficialmente por el manto fúngico, sitio primario de absorción en las raíces micorrízicas así como reservorio de carbohidratos y iones minerales acumulados, los cuales son liberados al hospedero en tiempos de deficiencia. Esta estructura es una ventaja selectiva para el hongo, el cual produce un micelio perenne.

Asimismo, el manto protege a la raíz de otros microorganismos y algunas toxinas ambientales, al reducir la cantidad de tejido radical susceptible expuesto a patógenos o al producir antibióticos. Esto es benéfico para el hospedero, sin embargo, el manto también excluye organismos benéficos tales como hongos MA y en algunos casos bacterias fijadoras de nitrógeno (Molina *et al.*, 1992; Smith y Read, 1997). Diferentes estudios sugieren que la adquisición y transporte es realizado exclusivamente por el micelio fúngico en el suelo,

especialmente por las partes más distales de las hifas rizomórficas (Unestam y Sun, 1995), mientras que el manto es un compartimento cuya función es el almacén e intercambio entre simbiontes (Smith y Read, 1997).

Las EM producidas por *S. pseudobrevipes* presentaron (Fig. 15a) una bien desarrollada red de Hartig, la cual penetró varias capas de células corticales presentando un adelgazamiento de la pared. Las células corticales fueron subglobosas, midiendo aproximadamente 28-35 x 12-15 µm. Las hifas presentaron paredes delgadas, con 1-3 µm de grosor, mostraron una ornamentación cristalina pronunciada de partículas similares a cristales o gotas adheridas a la superficie (Fig. 15d). La profundidad del manto fue de 30-60 µm. Las micorrizas vistas en plano presentaron un manto net prosenquimatoso, las hifas fueron semitransparentes sin conexiones de 1-3 µm de diámetro.

Mohan *et al.* (1993) describieron EM de plantas de *P. patula* inoculadas con basidiosporas de *S. brevipes*. Encontraron que las micorrizas fueron principalmente monopodiales y bipodiales y algunas tri y tetra podiales. Al igual que para *S. pseudobrevipes*, estos autores también encontraron inclusiones de cristales en las hifas emanantes y las hifas del manto lo cual es una característica distintiva del género *Suillus*. La profundidad del manto fue de 10 a 50 µm. Las células corticales fueron ligeramente ovales a elípticas midiendo 20-50 X 10-20 µm. Las micorrizas presentaron tres capas diferentes de manto a diferencia de las observadas en *S. pseudobrevipes*, el cual sólo presentó dos capas. En *S. brevipes*, la capa externa estuvo compuesta de un tejido simple, prosenquimatoso, las hifas fueron septadas, hialinas con 2-4 µm de diámetro.

La capa media estuvo compuesta de un tejido net prosenquimatoso con hifas similares a las de la capa externa. La capa interna consistió de un tejido irregular sinenquimatoso con hifas de 2-3 μm de diámetro.

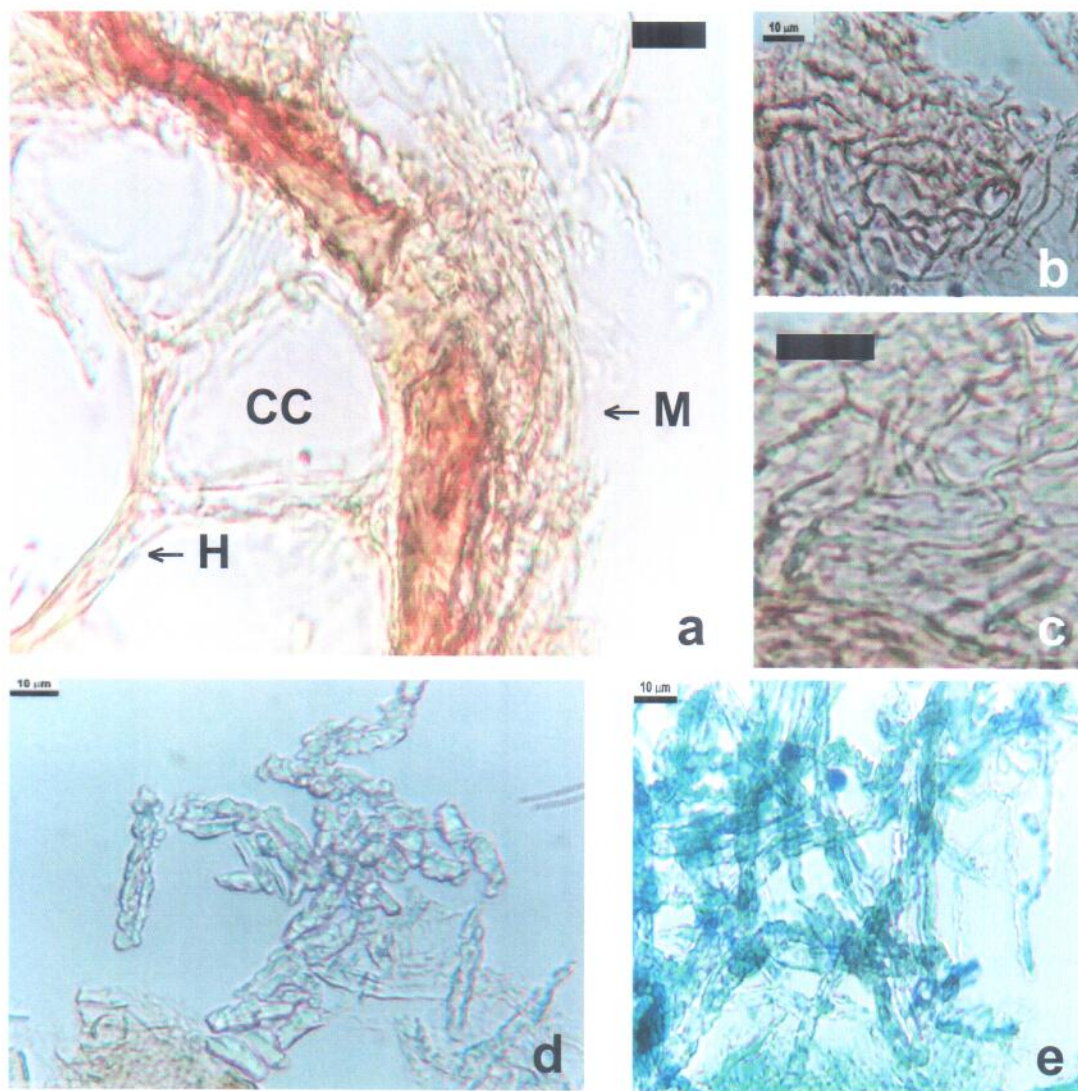


Figura 15. Micromorfología de ectomicorizas sintetizadas entre *Suillus pseudobrevipes* y *Pinus patula* en cortes de 50 μm de grosor. **a:** Sección transversal en donde se aprecian **CC:** Células corticales; **H:** Red de Hartig; **M:** Manto. Se observa el desarrollo de las hifas entre las células del hospedero **b:** Arreglo del manto **c:** Acercamiento a b; **d:** Hifas (*Suillus pseudobrevipes*) mostrando ornamentación cristalina **e:** Micelio externo de *Suillus pseudobrevipes*. Escalas de Figuras: a y c = 10 μm .

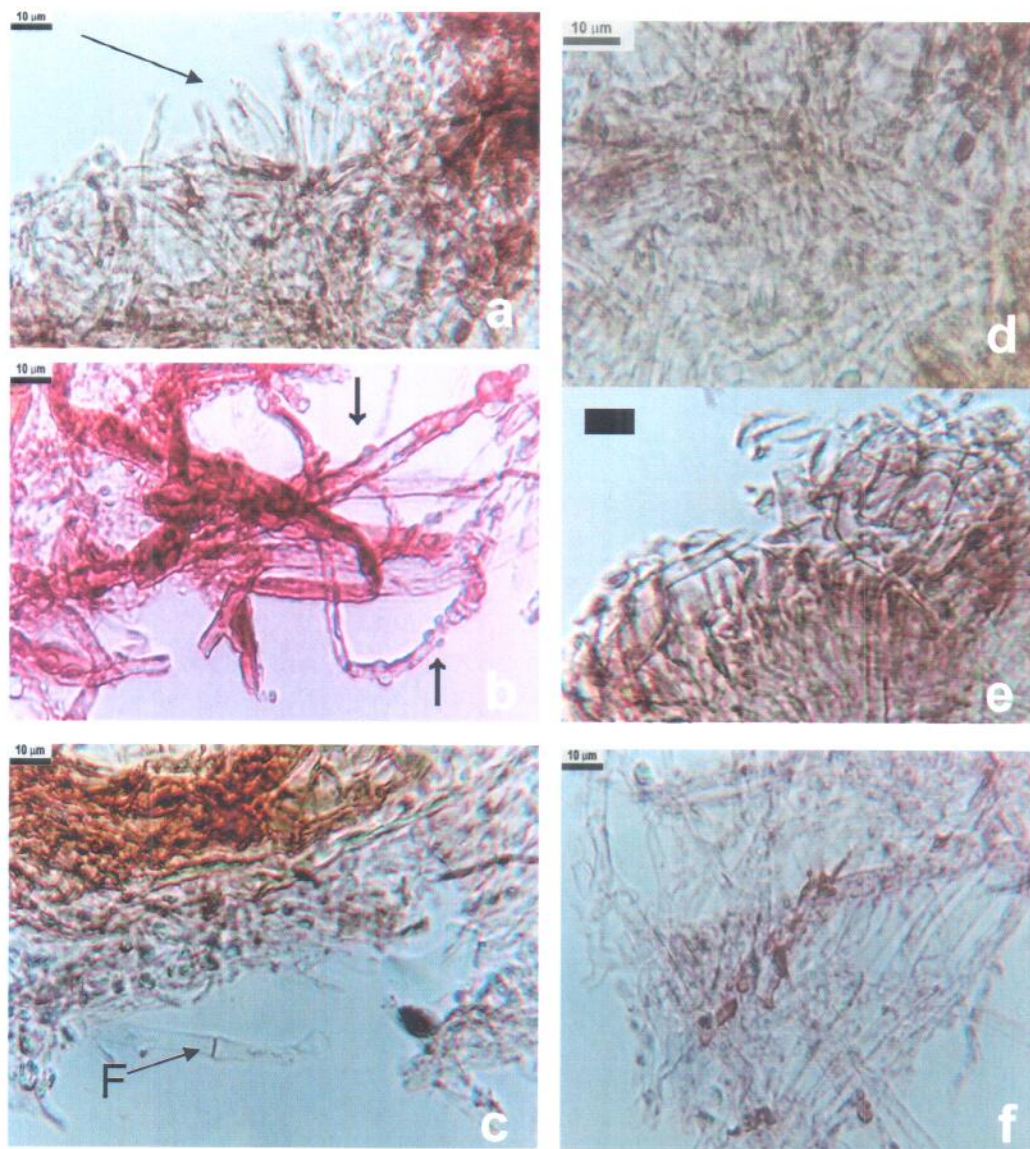


Figura 16. Micromorfología de ectomicorrizas sintetizadas entre *Boletus clavipes* y *Pinus patula* en cortes de 50 μm de grosor. **a**: Hifas emanantes de *Boletus clavipes* **b**: Hifas con incrustaciones de cristales **c**: Hifa de *Boletus clavipes* en la cual se observan las fíbulas (F) características de Basidiomycetes **d**: Arreglo del manto **e y f**: Densa cubierta de micelio externo. Escalas de Figuras: e: 10 μm .

Las EM producidas por *B. clavipes* se ilustran en las Figs. 16a-f. La profundidad del manto fue de 50 – 80 μm , las hifas fueron hialinas de paredes gruesas con inclusiones de cristales. Las hifas emanantes surgieron de la

superficie del manto, con 25-35 x 3-5 μm en longitud y diámetro respectivamente.

El manto presentó tres capas diferentes (Figs. 16d-f): la capa externa estuvo constituida de un tejido felt prosenquimatoso, no organizado, con abundantes espacios interhifales con hifas similares a hifas emanantes, las hifas presentaron 4-8 μm de diámetro. La capa interna consistió de un tejido net prosenquimatoso, poco organizado con espacios interhifales, muy similar a la capa anterior. Por su parte, Hu Hung (1996) observó que las micorrizas formadas entre *B. pinophilus* y *Quercus glauca* presentaron un manto externo e interno prosenquimatoso y pseudoparenquimatoso respectivamente, así como la presencia de cadenas hifales bien desarrolladas y cordones miceliales.

Las EM formadas por *L. laccata* se presentan en las Figs. 17a-e. Las hifas midieron de 4-7 μm de ancho. La profundidad del manto fue de 35-55 μm , estuvo constituido por tres capas: la capa externa consistió de un tejido felt prosenquimatoso, la capa media estuvo constituida por un tejido net prosenquimatoso y la capa interna consistió de un tejido net sinenquimatoso (Figs. 17c-e).

Las células corticales fueron subglobosas a elípticas midiendo 25-40 x 10-30 μm . La red de Hartig penetró varias capas de células corticales. La región de las células corticales externas mostró un manto fúngico compacto y una extensa red de Hartig (Fig. 17a). Tanto en *S. pseudobrevipes* como en *L. laccata*, se observó una distorsión de la pared de las células corticales del hospedero causada por la expansión de los elementos fúngicos que constituyen la red de Hartig.

De acuerdo con Mohan *et al.* (1993b), las EM formadas por *L. laccata* (Scop.) Berk. et Br., y *P. patula* fueron principalmente dicotómicas ramificadas, bipodiales y raramente mono, tri y tetrapodiales. El manto tuvo una profundidad de 10-50µm y consistió de un tejido simple, prosenquimatoso. La red de Hartig estuvo compuesta de una o dos hileras de células globosas de hifas de 3-8µm de grosor. Las células corticales fueron subglobosas a ampliamente elípticas de 25-60 X 20-50µm. El manto consistió de tres capas: la capa externa estuvo compuesta de un tejido felt prosenquimatoso. La capa media consistió de un tejido net sinenquimatoso. La capa interna estuvo compuesta de un tejido net sinenquimatoso con hifas de 3-5µm en diámetro. Una de las características distintivas de las micorrizas producidas por *L. laccata* fue su tamaño: fueron típicamente cortas presentando ramificación dicotómica; blanco-amarillentas cuando jóvenes, tornándose café-grisáceas cuando viejas; la superficie fue pubescente con hifas hialinas poco perceptibles.

Las características morfológicas y anatómicas de las EM producidas por *L. laccata* fueron estudiadas por Mohan *et al.* (1993b) en *P. patula*. Para las micorrizas producidas por *B. clavipes* a la fecha existe escasez de estudios de caracterización de esta asociación con *P. patula*. Sólo se encontró un reporte de un estudio realizado por Hu-Hung (1996) en *Quercus glauca*.

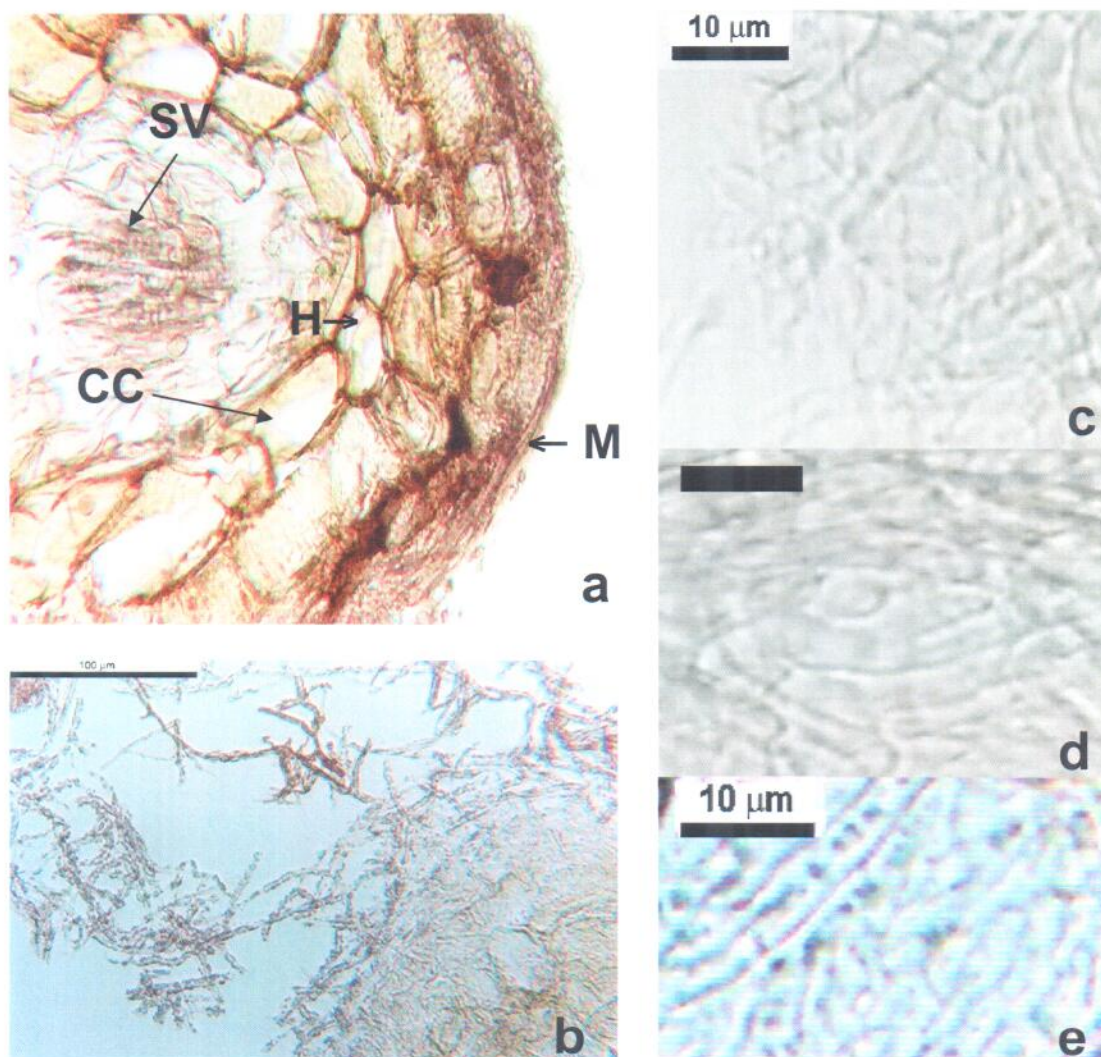


Figura 17. Micromorfología de ectomicorizas sintetizadas entre *Laccaria laccata* y *Pinus patula* en cortes de 50 μm de grosor. **a:** Ectomicorizas de *Laccaria laccata* en *Pinus patula* mostrando las células corticales (**CC**), la red de Hartig (**H**), el sistema vascular (**SV**) y el manto fúngico (**M**). Se observa una bien desarrollada red de Hartig entre las células corticales del hospedero. La región de las células corticales externas muestra un manto fúngico compacto y una extensa red de Hartig. **b:** Micelio externo de *Laccaria laccata* **c:** Capa externa del manto **d:** Capa media del manto **e:** Capa interna del manto. Escalas de Figuras: d= 10 μm

En lo que respecta a *S. pseudobrevipes*, uno de los pocos estudios sobre la estructura producida con *P. patula* a nivel de género es el de Mohan *et al.* (1993) con *S. brevipes*, cuyos resultados fueron similares con las observaciones realizadas en el presente trabajo. Las interacciones de *B. clavipes*, *L. laccata* y *S.*

pseudobrevipes con *P. patula* presentaron todas las características de una asociación ECM, desarrollo de una red de Hartig y manto fúngico. Se observó un manto fúngico que rodeó las raíces cortas de plantas inoculadas, y las paredes externas de las células corticales presentaron un adelgazamiento cuando estaban en contacto con las hifas fúngicas. Asimismo, se observó el desarrollo de la red de Hartig con penetración intercelular de hifas en las células epidérmicas y corticales, lo cual es la característica distintiva de la EM, dado que esta es la región donde el hospedero y el hongo entran en contacto y donde el intercambio de nutrimentos se realiza entre los dos simbios, las hifas fúngicas fueron confinadas a los espacios intercelulares.

5.2.6. Evaluación de la respuesta de crecimiento y colonización en plantas de *P. patula* inoculadas con *Hebeloma aff. mesophaeum*

Existió efecto del hongo ECM *Hebeloma aff. mesophaeum* inoculado en plantas de *P. patula* para todas las variables evaluadas excepto para el número total de raíces cortas y número de raíces no ECM (Cuadro 14). Esta especie fúngica fue utilizada debido a que es una especie comestible en el centro del país y a su estatus ECM.

Para la variable micelio externo y colonización, se encontró que el hongo ECM inoculado mostró un valor de 65.96% y 43.65%, respectivamente. En el testigo se observaron valores de colonización menores, lo cual es similar a lo reportado por Sudharaka–Reddy y Natarajan (1997) en experimentos de igual duración. Los resultados de la presente investigación mostraron que la especie fúngica ECM *Hebeloma aff. mesophaeum* es una especie que se asocia con *P. patula*, con crecimiento extramatricial activo en el sistema radical y con capacidad de

colonización, lo cual debido a la alta colonización probablemente podría tener un efecto protector contra patógenos cuando estas plantas son transplantadas.

Parladé *et al.* (1996) evaluaron el efecto de la inoculación de inóculo micelial de *Hebeloma sinapizans* (Paulet ex Fr.) Gill en plantas de *Pseudotsuga menziesii* en España. Sus valores fueron mayores que los encontrados en el presente trabajo, 51.75%. Estos resultados inducen a pensar que si bien las especies fúngicas ECM pertenecientes al mismo género se asocian con diferentes hospederos la colonización del sistema radical presenta variación.

Rincón *et al.* (1999) evaluaron la capacidad simbiótica de *Hebeloma sinapizans* y *Hebeloma crustuliniforme* con *Pinus pinea* en la región de Cataluña, España. Cuatro meses después de la inoculación encontraron variación en los valores de colonización entre especies. Estos autores encontraron valores de colonización de 90% en plantas inoculadas con *Hebeloma sinapizans* (Paul. Ex Fr.) Gillet. En el caso de los tratamientos con *Hebeloma crustuliniforme* (Bull. Ex St. Am.) Qué. se observaron valores de 45, 13 y 87 % de colonización.

Para la variable número total de raíces cortas no se observaron diferencias estadísticas significativas entre las plantas inoculadas con *Hebeloma aff. mesophaeum* y el testigo (Cuadro 14). En el caso del número de raíces cortas ECM, se observó que la especie fúngica ECM inoculada, *Hebeloma aff. mesophaeum* presentó el mayor valor a diferencia del número de raíces no ECM, donde las plantas inoculadas y el testigo presentaron valores estadísticamente similares.

Las plantas inoculadas, tuvieron mayor altura, diámetro del tallo y peso anhidro total que las plantas no inoculadas. Para estas variables, las plantas inoculadas

con el hongo ECM *Hebeloma aff. mesophaeum* produjeron los mayores aumentos. Éstos fueron 1.7, 2.2 y 4.4 veces mayores en altura, diámetro y peso anhidro total respectivamente en comparación con el testigo. En el caso del peso anhidro parte aérea y radical existió efecto significativo de la especie de hongo ECM inoculado. Para estas variables existió un aumento de 4.4 y 2.7 veces cuando se inoculó con *Hebeloma aff. mesophaeum* comparado con el testigo.

Cuadro 14.- Respuesta de crecimiento vegetal y colonización de plantas de *Pinus patula* inoculadas con *Hebeloma aff. mesophaeum* y plantas no inoculadas a los 365 días después de la inoculación.

Variables	Unidades	Plantas inoculadas con <i>Hebeloma aff. mesophaeum</i>			Plantas no inoculadas		
Altura	mm	303.4	± 12.4	a	179.4	± 11.6	b
Diámetro del tallo	mm	2.9	± 0.2	a	1.3	± 0.2	b
Número de ramillas secundarias	Su	55.8	± 5.9	a	12.6	± 3.6	b
Peso anhidro total	mg	4228.6	± 240.8	a	1193.8	± 162.1	b
Peso anhidro radical	mg	1664.4	± 177.5	a	605.6	± 62.6	b
Peso anhidro parte aérea	mg	2645.2	± 507.8	a	588.2	± 119.2	b
Micelio externo	%	65.9	± 2.5	a	0.9	± 0.2	b
Número total de raíces cortas	su	6631.6	± 421.3	a	5203.2	± 517.1	a
Número de raíces cortas ECM	su	2852	± 142.5	a	88.2	± 34.3	b
Número de raíces cortas no ECM	su	3779.6	± 434.5	a	5116.8	± 492.1	a
Colonización micorrízica	%	46.6	± 0.1	a	1.18	± 0.01	b

Su= sin unidad. Los valores son las medias ± error estándar de la media, n=5. Una misma letra dentro de cada una de las variables significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con t-Student (P<0.05).

La relación peso anhidro parte aérea:raíz presentó diferencias estadísticas (Prueba de Tukey, p<0.05) entre las plantas inoculadas respecto al testigo. En el caso de plantas inoculadas el valor fue de 1.5±0.21 y para el testigo 0.9±0.16

(media aritmética $n=5 \pm$ error estándar de la media). Estos resultados mostraron que la inoculación originó cambios en la relación del peso anhidro de la parte aérea y la raíz en plantas inoculadas en relación con el testigo. En general, los resultados de la presente investigación mostraron que la inoculación del hongo ECM *Hebeloma aff. mesophaeum* mejoró el crecimiento y desarrollo micorrízico de plantas de *P. patula* en el vivero en comparación al testigo.

Rincón *et al.* (2001) evaluaron el efecto de la inoculación de inóculo micelial de *Hebeloma crustuliniforme* en el crecimiento de *Pinus pinea* en la región Mediterránea. Cinco meses después de la inoculación no encontraron diferencias estadísticas en altura, diámetro del tallo y peso anhidro total en los tratamientos inoculados en relación al testigo. A este estadio sus valores fueron mayores para la variable diámetro del tallo que los encontrados en el presente trabajo, 3.6 mm, a diferencia de la altura y peso anhidro total, reportaron valores menores 23.2 cm de altura y 3,100 mg de peso anhidro total. Dado que existen diferencias significativas también en el caso de plantas sin inocular, valores mayores en el caso de Rincón *et al.* (2001), con una altura de 24.9 cm, peso anhidro total y diámetro del tallo de 3,400 mg y 3.7 mm respectivamente. Estas diferencias respecto a la presente investigación se deban probablemente a que estos autores adicionaron fertilizantes y micronutrientes por lo que esto provocó valores mayores.

5.2.6.1. Observación de la fructificación de *Hebeloma aff. mesophaeum*

En el caso de uno de los tubetes inoculados se observó la formación de una fructificación de *Hebeloma aff. mesophaeum*. Se efectuaron observaciones periódicas desde su formación hasta su senescencia. La formación del

primordio o botón de *Hebeloma aff. mesophaeum* se observó 12 meses después de la inoculación. A los cinco días de desarrollo tenía un diámetro de alrededor 8 mm y un color blanquecino (Fig. 18a). A los ocho días de desarrollo la porción superior del primordio se expandió formando el píleo y el velo interno que cubría a las láminas se rompió, permaneciendo adherido al estípite. Cuando el velo interno se rompió, quedaron porciones del mismo adheridas al sombrero, donde formó pequeñas escamas de color café claro (Fig. 18b). A los 11 días de desarrollo se observaron sobre la parte inferior del esporóforo, las laminillas. El análisis microscópico confirmó la presencia de basidios y basidiosporas características de *Hebeloma* spp. sobre la superficie de las laminillas. Las esporas fueron subglobosas a subelipsoides, hialinas, de $5\text{-}3 \times 10\text{-}8 \mu\text{m}$ (Fig. 18d). El tamaño de la fructificación alcanzó una altura de 3 cm. El sombrero excedió 2 cm de diámetro. El peso anhidro del cuerpo fructífero fue de 83 mg, lo cual representó alrededor del 2% comparado con el peso anhidro de la planta asociada. McLaughlin (1970) reportó valores de peso anhidro de basidiomas de *Boletus rubinelus* en condiciones *in vitro* en ausencia de hospedero. Este autor reportó un peso anhidro para esta especie de 3.5-11 mg. Por su parte, Godbout y Fortín (1992) evaluaron el efecto de la fertilización nitrogenada y el fotoperiodo en la formación de basidiomas de *Laccaria bicolor* asociadas con plantas de *P. banksiana* Lamb. Diez y seis semanas después observaron la fructificación de esta especie. Los basidiomas presentaron un peso anhidro de 17 a 127 mg, observando una correlación positiva entre el peso de la planta y el peso de los basidiomas.

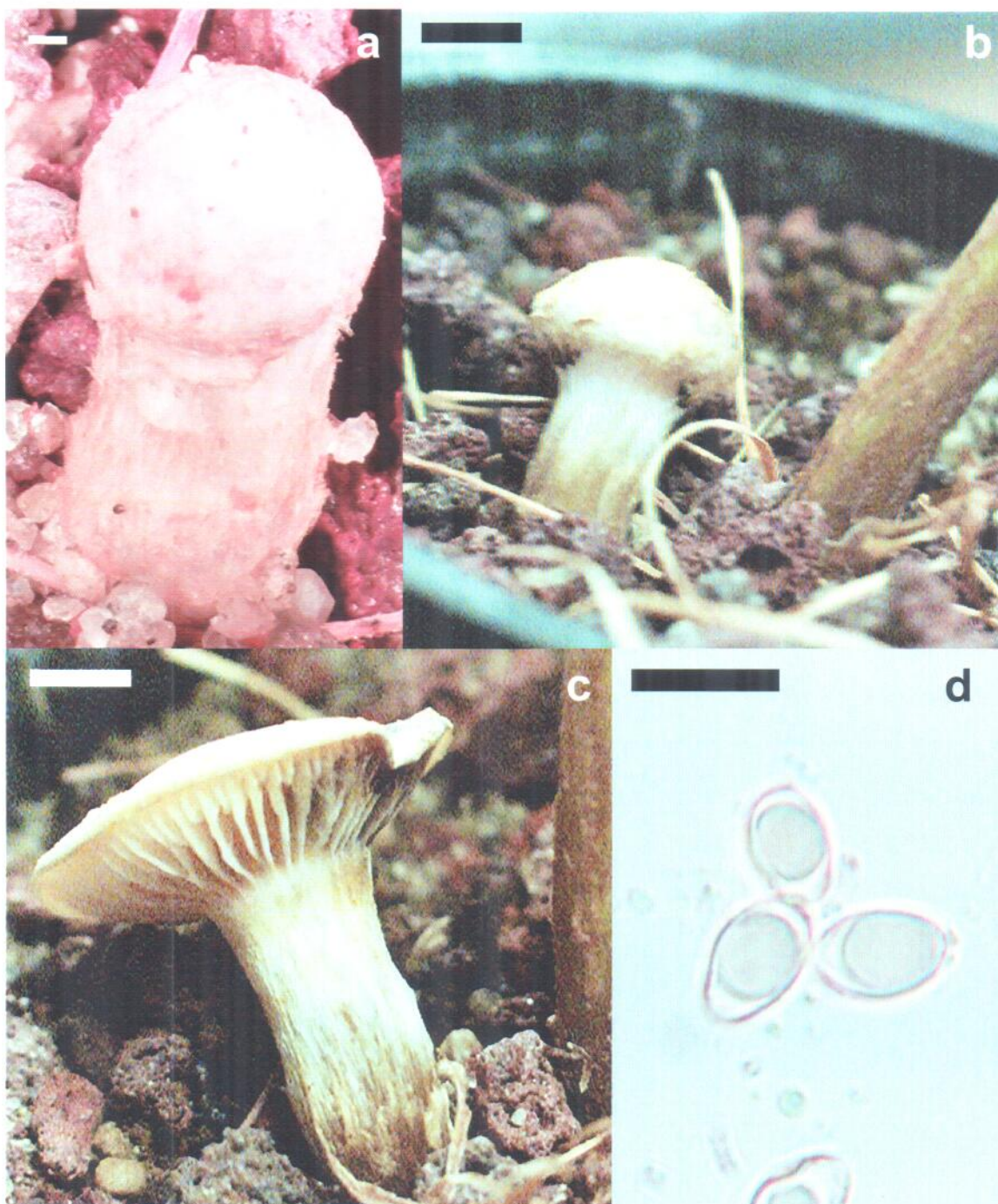


Figura 18. Etapas de desarrollo de la fructificación de *Hebeloma aff. mesophaeum* (Pes.) Quél. observadas en tubetes con *Pinus patula*. a: a los cinco días de desarrollo; b: a los ocho días de desarrollo; c: A los 15 días; d: Vista microscópica de las esporas unigutuladas. Escalas de Figuras: b y c = 5 mm a = 1 mm, d = 10 μ m.

La fructificación de los hongos ECM en condiciones *in vitro* o de vivero es un fenómeno que se ha observado sólo en determinadas especies. Los primeros estudios que reportan fructificaciones se remontan a los años 40 y a la década de los 60 con especies pertenecientes a la familia Boletaceae en cultivos puros (McLaughlin, 1970). Fassi y Fontana (1969) observaron fructificaciones de *Tuber maculatum* en asociación con *Pinus strobus* en invernadero. Ohta (1994) reportó la producción de cuerpos fructíferos de *Lyophyllum shimeji*, un hongo micorrízico en cultivos puros. Por su parte, Hall y Wang (1998) obtuvieron la fructificación a nivel comercial de *Tuber melanosporum* en Nueva Zelanda. Danell (1999) reportó la fructificación de *Cantharellus cibarius* con plantas hospedero jóvenes de *Pinus strobus* y *Quercus ilex* en invernadero. Yamada *et al.* (2001) reportaron la fructificación de *Rhizopogon rubescens*, *Tricholoma portentosum*, *T. saponaceum* y *Lactarius akahatsu* con *Pinus densiflora*. Bajo condiciones *in vitro*, estos hongos micorrízicos no formaron primordios ni basidiocarpos. En asociación con la planta hospedero se observó su formación. Cinco meses después de la inoculación, *Rhizopogon rubescens* desarrolló basidiocarpos maduros, 10 días después de la formación del primordio. *Tricholoma portentosum*, *T. saponaceum* y *Lactarius akahatsu* también produjeron basidiocarpos 6-9 meses después del trasplante.

En lo que respecta a la fructificación del género *Hebeloma*, Debaud y Gay (1987) reportaron la fructificación de *Hebeloma cylindrosporum* en asociación con plantas jóvenes de *Pinus pinaster* en condiciones *in vitro*. Estos autores observaron que esta especie de *Hebeloma* en ausencia de la planta hospedero no produjo cuerpos fructíferos maduros, sólo formaron pequeños primordios en

la superficie del substrato; en presencia de *P. pinaster*, *H. cylindrosporum* produjo cuerpos fructíferos maduros capaces de esporular con una altura de 5-10 cm y 1-2 cm de diámetro del píleo. La fructificación se observó mes y medio después de la inoculación. Reportaron el efecto significativo del estrés térmico ($\pm 6^{\circ}\text{C}$ a diferencia del control con 18°C) en la fructificación de *Hebeloma cylindrosporum* Romagnesi. Bruchet (1973) y Ohta (1998) observaron la fructificación de dos especies de *Hebeloma* en medios nutritivos sin la planta hospedero. Suzuki (1979) observó que la formación de primordios y basidiocarpos de *Hebeloma vinosophyllum*, fue inducido como una respuesta a la deficiencia de nutrimentos en el medio de crecimiento en ausencia de la planta hospedero.

A la fecha se han realizado diversas investigaciones enfocadas a determinar qué factores ambientales afectan la fructificación de este tipo de hongos en condiciones *in vitro* y de vivero. De acuerdo con McLaughlin (1970) dentro de estos factores se encuentran la temperatura, humedad, aireación y composición de CO_2 , luz y nutrición del cuerpo fructífero. Estos autores evaluaron la influencia de estos factores en el desarrollo del cuerpo fructífero de *Boletus rubinellus*. Observaron que la fructificación se presentó en un intervalo de pH de 4 a 5, a una temperatura de 17 a 29°C . El desarrollo del estípite se detuvo cuando no hubo aireación ó a 2% de CO_2 adicionado a los cultivos observándose cuerpos fructíferos anormales o abortivos, concluyendo que para esta especie la formación de cuerpos fructíferos es altamente sensible a un incremento en la concentración de CO_2 . La formación del cuerpo fructífero y la

maduración puede ocurrir en condiciones de luz continua. Al parecer la luz probablemente incrementó la iniciación del primordio. Estos autores concluyeron que la sensibilidad a la luz ambiental explicó en parte la dificultad de obtener fructificaciones de estos hongos en cultivos puros.

Otro factor que influencia la formación de basidiomas es la variación en los niveles de nitrógeno y fósforo en el medio y el fotoperiodo. Godbodut y Fortín (1992) evaluaron el efecto de la fertilización nitrogenada y el fotoperiodo en la formación de basidiomas de *Laccaria bicolor* asociados con plantas de *P. banksiana* en contenedor. La fructificación se presentó 16–24 semanas después de la inoculación. La fructificación fue mayor con 5-6 mg de N adicionado y disminuyó con cantidades mayores o menores. Un régimen de fotoperiodo corto mejoró la frecuencia de la fructificación de *L. bicolor*. La respuesta de la fructificación a la adición de N fue mejorada con un fotoperiodo de nueve horas comparado con un fotoperiodo de 18 h. La biomasa de la planta fue influenciada principalmente por el nivel de fertilización de N y el fotoperiodo. Un incremento en la fertilización de N incrementó la biomasa de la parte aérea y radical observándose un mayor efecto en la parte aérea. Un fotoperiodo corto disminuyó la biomasa total al disminuir la biomasa de la parte aérea a diferencia de la biomasa radical. Estos resultados mostraron que el nivel de fertilización de N influenció la cantidad de biomasa fúngica vegetativa y la frecuencia de la formación de basidiomas, lo cual al parecer están íntimamente relacionadas. Dado que existe una fuerte correlación entre la formación del basidioma de *L. bicolor* y la extensión del micelio extramatricial con el suministro de carbohidratos a las raíces, estos autores observaron que el

contenido de carbohidratos se incrementó bajo condiciones de N moderado, por lo que probablemente esto haya influido para que se presentara la fructificación de *L. bicolor* en estas condiciones. Otra posible explicación es que el fotoperiodo corto que mostró los mejores resultados al parecer está relacionado con el efecto que tuvo sobre el crecimiento de la planta hospedero al inducir el cese del crecimiento del brote, por lo que se observa una menor biomasa del brote, a diferencia de la biomasa radical la cual no fue afectada por la reducción del fotoperiodo, tal cese de crecimiento probablemente haya mejorado la traslocación de fotosintatos a las raíces, promoviendo de este modo el desarrollo del basidioma. Apparently, la estimulación de la actividad radical por un incremento en el suministro de carbohidratos probablemente mejora la producción de varios metabolitos de la raíz que podrían jugar un papel activo en la formación de basidiomas. También, la elaboración de una cantidad suficiente de carbohidratos en el micelio puede estar relacionada con la formación del basidioma. Si bien, se observó que la biomasa de la planta incrementó con el nivel de fertilización de N y la biomasa del basidioma se incrementó con la biomasa de la planta, los resultados de Godbout y Fortín (1992) mostraron que la cantidad de carbohidratos fúngicos están positivamente relacionados con la fertilización de N.

Una explicación alternativa podría ser que el basidioma se desarrolla a partir de carbohidratos sintetizados por la planta hospedero e inmediatamente es traslocado al basidioma en crecimiento. Estos resultados concuerdan por lo observado por estos autores, el crecimiento del basidioma de *L. bicolor* detuvo su crecimiento cuando la planta hospedero se puso en condiciones de

oscuridad. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones específicas relacionadas con el suministro de carbohidratos y volumen en la planta y el hongo antes y durante el proceso de fructificación para entender el papel exacto de los carbohidratos así como otros factores que determinan el desarrollo de basidiomas de hongos ECM.

5.2.6.2. Caracterización morfológica de ectomicorrizas de *P. patula* y *Hebeloma aff. mesophaeum*

El desarrollo del micelio es notable y característico. Se observó la agregación del micelio a lo largo del sistema radical principal y alrededor de las raíces secundarias, aunque un gran porcentaje de raíces no presentaron una modificación aparente. En un experimento similar al de la presente investigación se observó que en plantas de *P. patula* inoculadas con esta especie fúngica ECM, sometidas a sequía intensa, el micelio se agregó a lo largo de la raíz principal (Fig. 19b). Probablemente, el micelio asimiló una mayor cantidad de agua y nutrimentos para poder persistir ante estas condiciones o incluso entrar en un estado de reposo hasta que las condiciones fuesen favorables para colonizar nuevas raíces. La agregación del micelio a lo largo del sistema radical es un fenómeno observado por Kranabetter y Friesen (2004) en la especie fúngica ECM *Hebeloma crustuliniforme*.

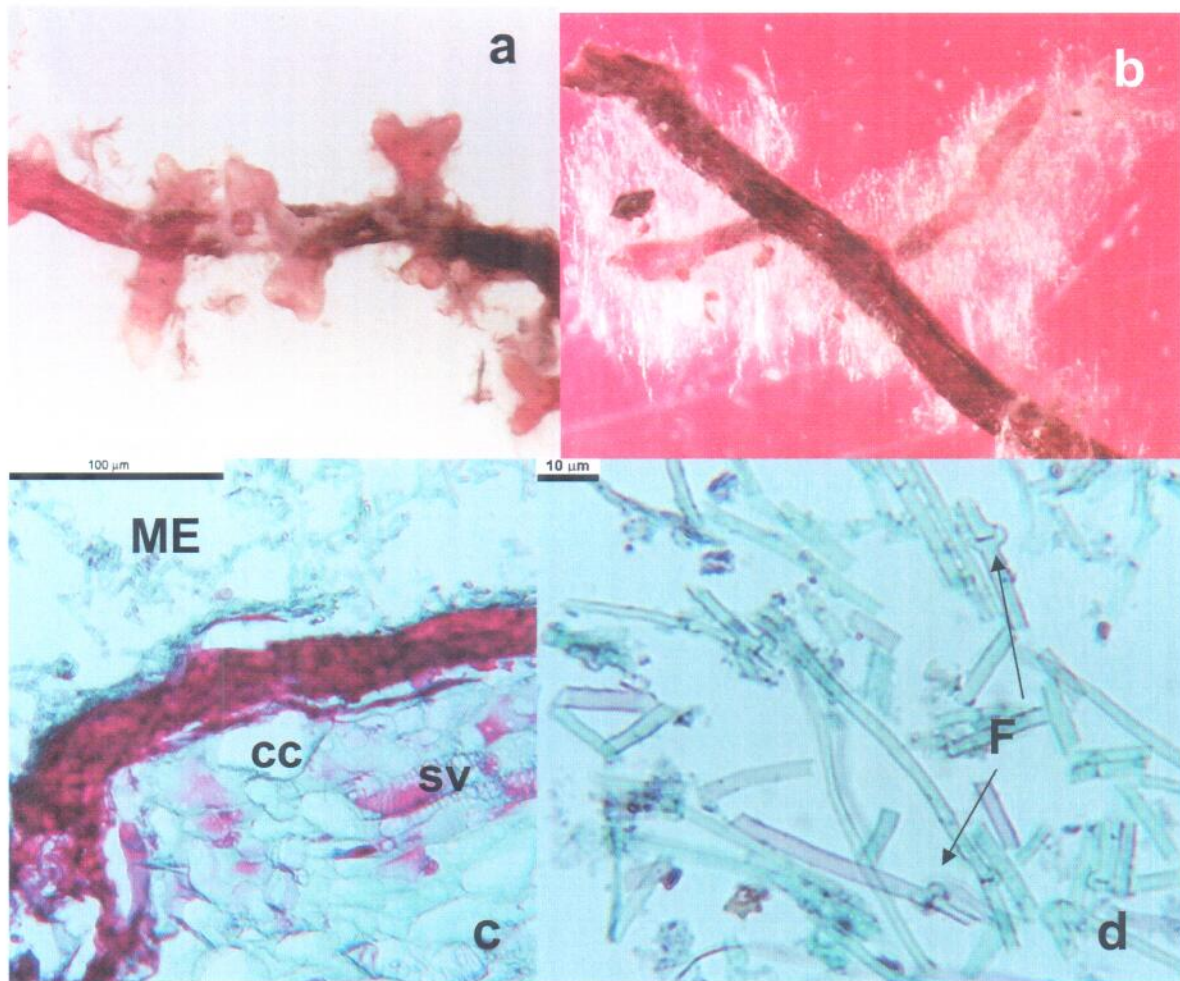


Figura 19. Macromorfología y micromorfología de ectomicorrizas sintetizadas entre *Hebeloma aff. mesophaeum* y *Pinus patula* en cortes de 9 μm de grosor. **a y b**: Macromorfología mostrando micelio externo **c y d**: Micromorfología **c**: Sección transversal en donde se aprecian las células corticales (**CC**), el micelio externo (**ME**) y el sistema vascular (**SV**) y respuesta de la planta a la colonización **d**: Figura que muestra las fíbulas, estructuras características de Basidiomycetes.

Las ectomicorrizas producidas por *Hebeloma aff. mesophaeum* se presentan en las Figs. 19a-d. Las micorrizas fueron dicotómicas (Fig. 19a). Las células corticales fueron elípticas midiendo 50 x 20 μm . Las hifas midieron de 2 a 4 μm de diámetro (Fig. 19d). Se observó un manto delgado (Fig. 19c), el cual presentó

5-7 μm de profundidad, así como la ausencia de una red de Hartig. La región de las células epidérmicas mostró lignificación (Fig. 19c). Este fenómeno probablemente se deba a una respuesta de defensa de la planta a la colonización.

Es sorprendente observar reacciones de defensa durante la asociación simbiótica. Diversos estudios revelan que los hongos ECM pueden inducir este tipo de reacciones en la planta hospedero. Probablemente, compuestos oligosacáricos no específicos y proteínicos son liberados durante la colonización de la raíz por los hongos ECM (Salzer *et al.*, 1996; 1997). Existe una gran variedad de compuestos fúngicos capaces de inducir respuestas de defensa en la planta hospedero cuando el hongo ECM penetra directamente a la raíz y degrada la pared celular (Boller, 1995). Por ejemplo, el hongo ECM *Hebeloma crustuliniforme* indujo enzimas quitinasas y peroxidasas en células de *Picea abies* (Salzer y Hager, 1993), lo cual limitó la formación de la red de Hartig, por la deposición de compuestos fúngicos en las células corticales, los cuales actuaron como una barrera física que no fue superada por el hongo.

Gea *et al.* (1994) evaluaron aspectos estructurales de la ectomicorriza formada por *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési en *Pinus pinaster*. 15 días después de la inoculación realizaron la caracterización. El manto fúngico fue relativamente delgado y disperso. La red de Hartig presentó pocos elementos hifales penetrando sólo las capas exteriores del cortex, sin embargo, no penetró entre las paredes. El manto fúngico fue formado por hifas con grandes vacuolas, con la ausencia de cualquier elemento cementante entre ellas. Las células del hospedero externas presentaron gran cantidad de vacuolas con depósitos

fenólicos en su periferia. Durante el proceso de penetración de las hifas entre las células corticales se observó una zona límite donde la pared celular del hospedero fue compacta entre células vecinas, no permitiendo su inclusión. La red de Hartig fue formada por hifas fúngicas con un citoplasma muy denso. Las observaciones de las micorrizas indicaron que existió un límite a la penetración, detectándose un engrosamiento de las células externas muy similar al reportado en el presente estudio para esta especie fúngica.

Feugey *et al.* (1999) inocularon plantas de *Betula pendula* con *Hebeloma cylindrosporum*, con el objetivo de evaluar la respuesta de defensa que limitan la formación de la red de Hartig en esta especie forestal. El análisis de las secciones de raíces micorrízicas indicó la presencia de compuestos fenólicos en las paredes celulares del hospedero localizadas en la región de la penetración hifal. Estos resultados sugirieron que la penetración hifal entre las células corticales desencadenó respuestas de defensa, lo cual, limitó la formación de la red de Hartig en las capas externas de la raíz y la penetración fúngica.

5.2.7. Concentración de esporas de hongos ectomicorrízicos estudiados

De las concentraciones de esporas obtenidas, la especie *S. pseudobrevipes* presentó la concentración más alta con 10^8 esporas por planta, siendo seguida por *A. caesarea*, *P. tinctorius* y *B. clavipes* con 10^6 esporas y *A. fulva*, *L. laccata* con 10^5 esporas por planta (Cuadro 15). La concentración de esporas es similar a la aplicada por Parladé *et al.* (1996), quienes inocularon suspensiones de esporas de cinco hongos ECM comúnmente encontrados en el NE de España en plantas de *Pseudotsuga menziesii* y *Pinus pinaster*.

Las concentraciones de esporas para *Melanogaster ambiguus*, *Rhizopogon roseolus* y *Scleroderma citrinum* fueron de 10^2 - 10^7 esporas por planta y 10^2 - 10^4 esporas por planta para *Tuber maculatum*.

Cuadro 15. Concentración de esporas de hongos ECM aplicadas a las plantas de *Pinus patula* y *Pinus greggii*.

Especie fúngica	Concentración de esporas ml	Concentración de esporas aplicadas por planta*
<i>Laccaria laccata</i>	$5.54 \times 10^5 - 6.57 \times 10^5$	$16.62 \times 10^5 - 19.71 \times 10^5$
<i>Suillus pseudobrevipes</i>	$42.23 \times 10^7 - 51.64 \times 10^7$	$12.63 \times 10^8 - 15.49 \times 10^8$
<i>Amanita fulva</i>	$4.37 \times 10^5 - 4.55 \times 10^5$	$13.11 \times 10^5 - 13.65 \times 10^5$
<i>Amanita caesarea</i>	$3.24 \times 10^5 - 4.00 \times 10^5$	$9.72 \times 10^5 - 12.00 \times 10^6$
<i>Boletus clavipes</i>	$9.02 \times 10^6 - 18.85 \times 10^6$	$27.05 \times 10^6 - 56.55 \times 10^6$

*Se aplicaron 3 ml por planta en todos los casos con excepción de *P. tinctorius*. Para esta especie ver nota aclaratoria en Cuadro 5.

El cálculo fue efectuado según se describe en la Sección 4.2.1.3.1. de Materiales y Métodos tomando para el mismo como “esporas pequeñas” a *S. pseudobrevipes* y como “esporas grandes” a *A. fulva*, *A. caesarea*, *L. laccata* y *B. clavipes*.

Concentraciones similares a las aplicadas en este trabajo son las utilizadas por Gómez-Sánchez *et al.* (2002) quienes aplicaron una suspensión acuosa de esporas obtenidas a partir de carpóforos de *Lactarius deliciosus*, *Suillus collinitus*, *S. mediterraneensis*, *Pisolithus tinctorius* y *Tuber melanosporum* en dosis de 10^4 y 10^7 esporas por planta de *Pinus halepensis* y *Pinus pinaster*.

5.3. Evaluación de la especificidad, infectividad y efectividad de hongos ectomicorrízicos en plantas de *Pinus greggii*

Existe escasa investigación sobre la inoculación de hongos ECM en la especie forestal *P. greggii*. La importancia de la presente investigación radica en el hecho de que esta especie forestal es ampliamente utilizada en programas de reforestación, por su rápido crecimiento y desarrollo en áreas degradadas (Dvorak, 2002). Una de las formas de garantizar un mejor establecimiento es la inoculación de hongos ECM, por los múltiples beneficios que aportan en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Algunos ejemplos de los trabajos sobre inoculación de especies fúngicas ECM utilizadas en la presente investigación han estudiado: *Pinus banksiana* Lamb. con *Pisolithus tinctorius*, (McAfee y Fortín, 1986), *Pinus taeda* L. con *P. tinctorius* (Dixon et al., 1987), *Pinus palustris* Mill., *P. taeda* y *P. clausa* var. *immuginata* D.B. Ward (Hatchell y Marx, 1987), *Pinus massoniana* Lamb y *Pinus elliottii* Engel con *Pisolithus tinctorius* (Tam, 1994), *P. patula* con *L. laccata* y *Thelephora terrestris* (Sudhakara-Reddy y Natarajan, 1997), *Pinus densiflora* con *Suillus granulatus*, *S. luteus* y *S. bovinus* (Yamada et al., 2001), *Pinus culminicola* con *P. tinctorius* (Garza y Arias, 2001) y *Pinus pinea* con *L. laccata* y *P. tinctorius* (Rincón et al., 2001).

5.3.1. Variables de la raíz

El análisis general de las variables micelio externo, número total de raíces cortas ECM y colonización mostró que existieron diferencias altamente significativas entre tratamientos para todas las variables excepto para la variable número total de raíces cortas y número de raíces no ECM (Cuadro 16).

Cuadro 16. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de la raíz evaluadas en *P. greggii*.

F.V.	GL	Micelio externo (%)	Número total de raíces cortas	Número de raíces con ECM	Número de raíces sin ECM	Colonización (%)
Tratamiento	4	0.50**	1167672.9NS	3580638.2**	1153605.5NS	0.19**
Error	19	0.03	1009013.47	659268.03	1060360.07	0.03
C.V.		34.00	22.49	79.65	29.87	39.86
Media general		0.46	4466.46	1019.33	3447.17	0.43

FV= Fuente de variación, GL= grados de libertad, CV= coeficiente de variación; *Significativo $\alpha = 0.05$ **altamente significativo $\alpha = 0.01$ NS=no significativo

De las variables estudiadas, el promedio de todos los tratamientos fue mayor en comparación al testigo, a diferencia del número total de raíces cortas y sin ECM, en donde no existieron diferencias significativas entre los diferentes hongos ECM inoculados en relación al testigo.

5.3.1.1. Evaluación de la cobertura de micelio externo en la superficie del cepellón

Para la variable micelio externo, existieron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.0001$). Al realizar la comparación de medias se observó que el tratamiento que presentó el mayor valor de micelio extramatricial correspondió al tratamiento *S. pseudobrevipes*, siendo este valor estadísticamente similar al valor observado cuando se inoculó con *L. laccata*, sin embargo, tal valor fue superior comparado con *B. clavipes*, *P. tinctorius* y el testigo (Fig. 20).

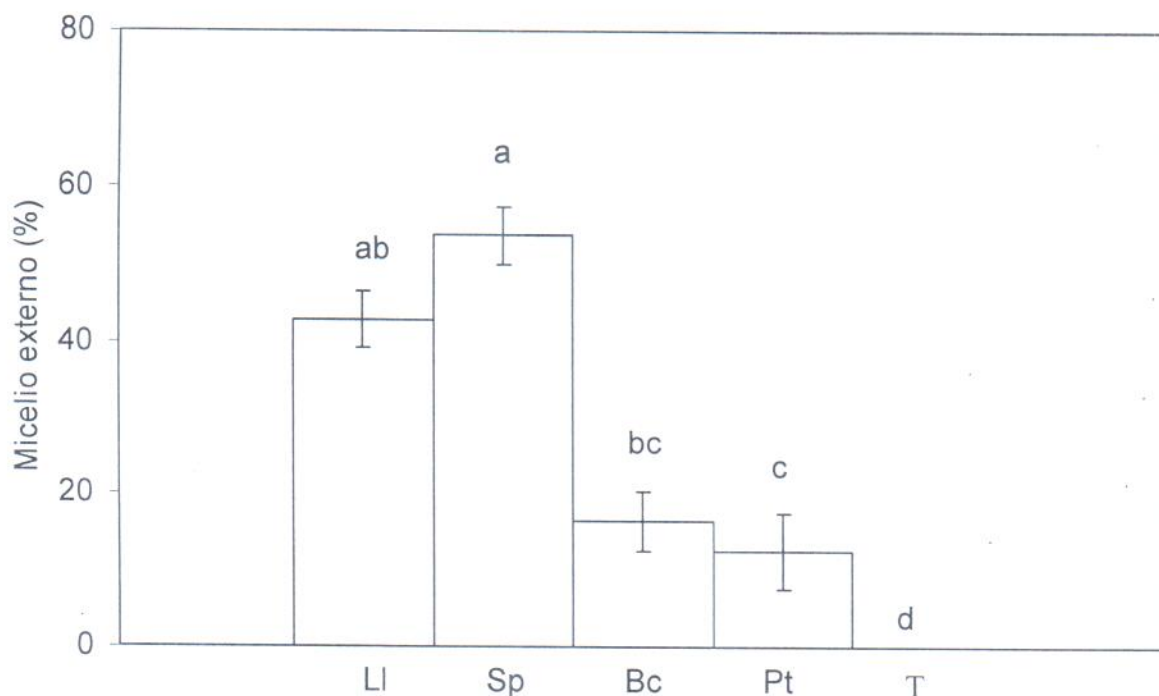


Figura 20. Cobertura de micelio externo en la superficie del cepellón con plantas de *Pinus greggii* inoculadas con hongos ECM. La evaluación fue efectuada 11 meses después de la inoculación. En el caso del testigo no existió micelio externo evidente. Los valores son las medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). LI=*Laccaria laccata*; Sp=*Suillus pseudobrevipes*; Bc=*Boletus clavipes*; Pt=*Pisolithus tinctorius*; T=Testigo.

5.3.1.2. Número total de raíces cortas

La variable número total de raíces cortas y número total de raíces cortas no ECM (Figs. 21 y 22) no presentaron efecto significativo entre tratamientos, teniendo una $p=0.360$ y $p=0.390$ respectivamente. Para la variable número de raíces cortas ECM existió efecto de la especie de hongo ECM utilizada con $p=0.004$. Numéricamente, *L. laccata* produjo un mayor número de raíces cortas en relación a *S. pseudobrevipes* y *P. tinctorius*. El hongo ECM inoculado *B. clavipes* disminuyó esta variable en las plantas inoculadas en relación al testigo. En el caso del número de raíces cortas ECM, la inoculación con las diferentes especies fúngicas ECM produjeron una respuesta diferente. El mayor

valor observado fue para las plantas inoculadas con *L. laccata*, valor que no fue estadísticamente mayor al observado cuando se inoculó con *S. pseudobrevipes* y *B. clavipes* pero superior al valor obtenido cuando se inoculó con *P. tinctorius* (Fig. 23).

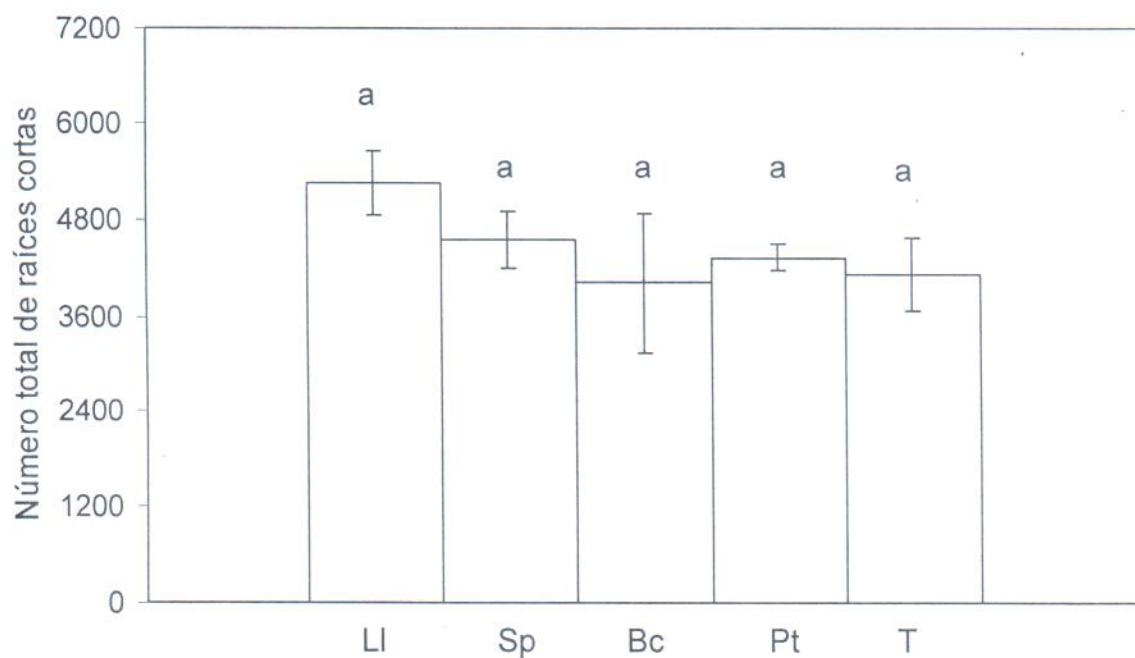


Figura 21. Número total de raíces cortas de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son las medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 20.

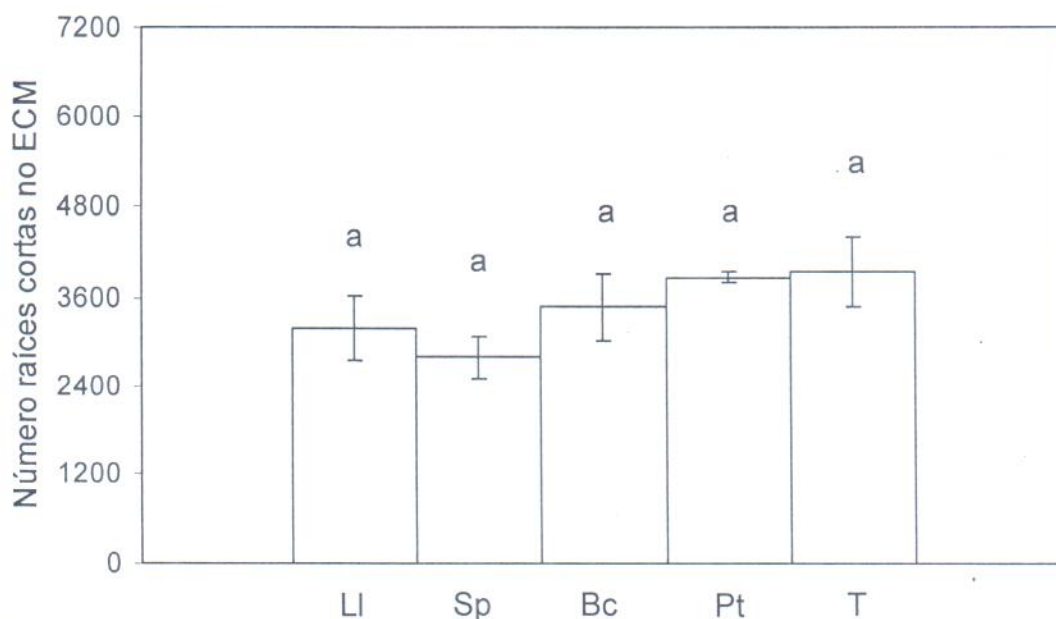


Figura 22. Número total de raíces cortas no ECM de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con diferentes especies fúngicas ECM. Los valores son las medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 20.

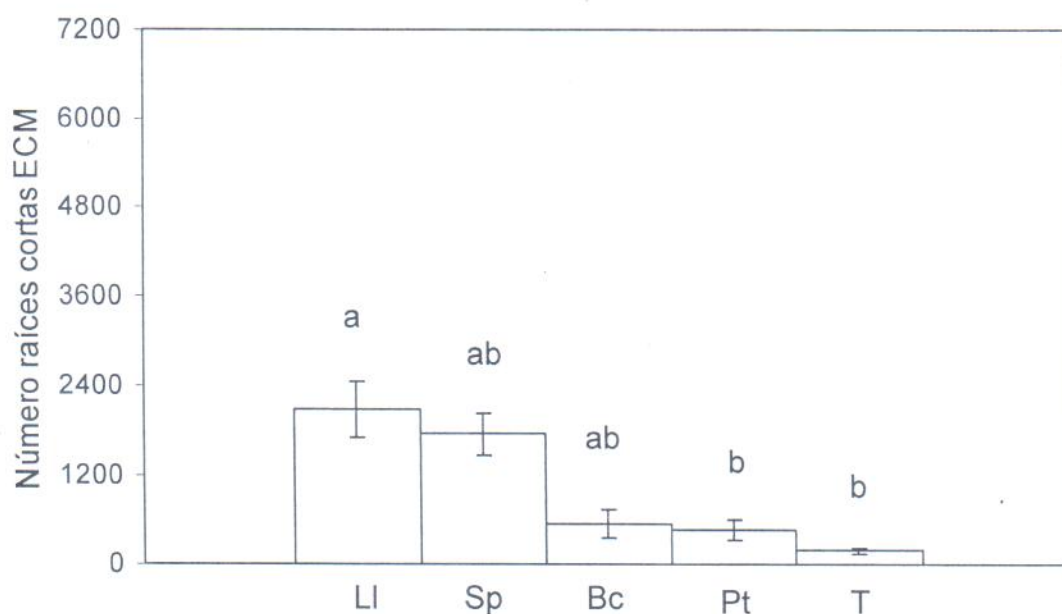


Figura 23. Número total de raíces cortas ectomicorrízicas de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 20.

Parladé y Álvarez (1993) reportaron en un estudio realizado con diferentes especies fúngicas ECM que *P. arrhizus* fue más efectivo en estimular la formación de raíces cortas que *Laccaria bicolor* a diferencia de lo reportado en este estudio. Browning y Whitney (1991) observaron una mayor densidad de raíces cortas en *Picea mariana* (Mill.) inoculada con *L. bicolor* (Maire) Orton, en relación al testigo. Asimismo, observaron que la colonización de *Pinus banksiana* Lamb. con *L. bicolor* o *P. tinctorius* (Pers.) Coker et Couch promovieron una mayor densidad de raíces cortas en comparación al control. Los resultados de la presente investigación mostraron que las diferentes especies fúngicas ECM inoculadas promovieron un mayor número de raíces cortas ECM en *P. greggii*, sin embargo, para la variables número total de raíces cortas y número total de raíces cortas no ECM independientemente de la especie inoculada presentaron una respuesta similar entre ellas y el testigo.

5.3.1.3. Colonización micorrízica

Para el porcentaje de colonización micorrízica, existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p=0.001$). Al realizar la comparación de medias se encontró que existieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($\alpha=0.05$). Para esta variable existieron respuestas diferenciales en función del hongo ECM inoculado, el mayor valor de colonización observado fue cuando se inocularon las plantas con *S. pseudobrevipes*, siendo esta valor no estadísticamente mayor que cuando se inoculó con el hongo ECM *L. laccata*, pero superior comparado con *B. clavipes* y *P. tinctorius* (Fig. 24). A pesar de que *P. tinctorius* se considera como una especie muy apropiada para inoculación en viveros con buenos resultados de

micorrización (Torres y Honrubia, 1994; Honrubia *et al.*, 1997), en la presente investigación ha mostrado valores de colonización bajos, lo cual puede estar vinculado con su procedencia, una plantación tropical de *Pinus caribaea*. Estos resultados mostraron que las diferentes especies fúngicas ECM utilizadas originaron diferentes valores de colonización más no una ausencia de infección.

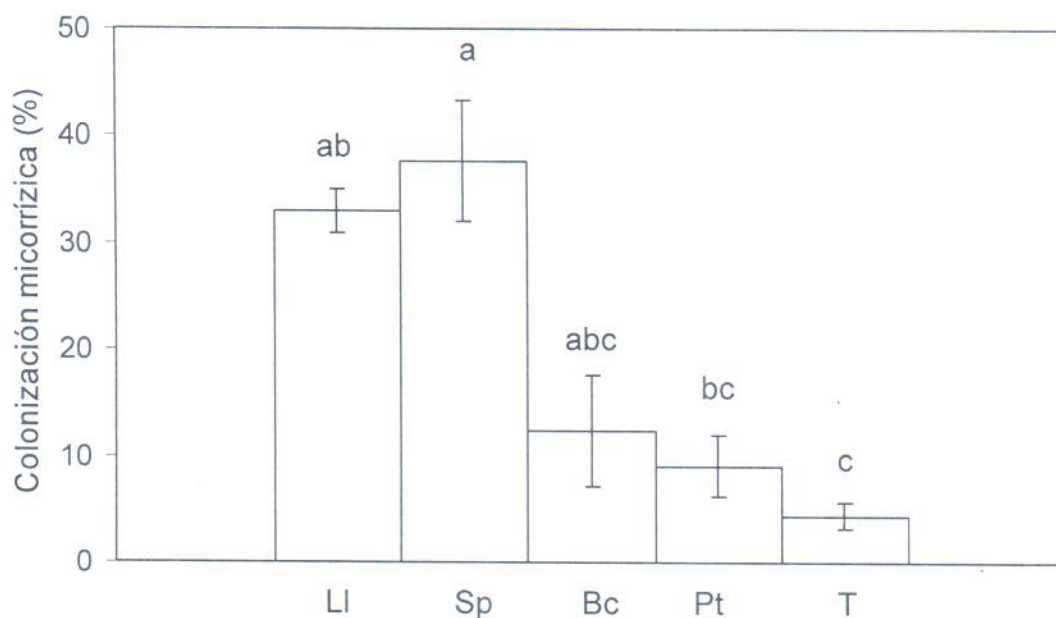


Figura 24. Colonización micorrízica de plantas de *Pinus greggii* inoculadas o no con distintas especies de hongos ECM. Los valores son las medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Datos transformados arco seno para el análisis estadístico. Abreviaturas iguales a las de la Figura 20.

Burgess *et al.* (1994) evaluaron el efecto de la inoculación de 20 aislamientos de *Pisolithus* procedentes de diferentes localidades geográficas en la colonización de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. 65 días después de la inoculación encontraron diferencias estadísticas en la colonización en las diferentes procedencias. Las plantas inoculadas con los aislamientos H529, H237, H375 y H506 presentaron menos del 20% de raíces micorrízicas, mientras que las plantas inoculadas con H556, M56, H4003, H2144, H4461,

H4334, H570, H498, H495, H481 y H4320 presentaron valores de colonización entre 40-60% y plantas inoculadas con H1101, H445, H77 y H215 presentaron valores superiores al 60% de raíces micorrízicas. Los mismos autores estudiaron el efecto de la inoculación con estos aislamientos en el crecimiento de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden, y a los 3 meses encontraron diferencias estadísticas en plantas inoculadas en comparación al control en términos de su altura y peso anhidro total. En función de su grado de estimulación, los aislamientos fueron divididos en cuatro grupos: i) poca o ninguna estimulación (2-10 veces de incremento en comparación al control); H529, H237, H375, H506, H4320 y H98; ii) estimulación moderada (15-20 veces); H481, H4461, H2144, H570, M56 y H556; iii) buena estimulación (25-35 veces); H498, H4003, H495, H4334, H215, H1101 y H77; iv) estimulación superior (45 veces); H445. Los aislamientos procedentes de bosques de pino formaron pobre asociación con esta especie de *Eucalyptus* (H237 y H529), si bien, H529 formó manto in vitro en *E. grandis*, el micelio no se desarrolló y no colonizó las raíces *in vivo*. Aunque también se observó que algunos de los aislamientos de *Eucalyptus*, H98, H375, H506 y H481, fueron ineficientes en su capacidad para formar micorriza y promover el crecimiento de plantas de *E. grandis*. Por ejemplo, H98 y H481 colectado en el oeste de Australia no fueron compatibles con *E. grandis*, nativo de Queensland. Observaciones similares son reportadas por Marx y Bryan (1970) quienes encontraron que un aislamiento procedente de bosques de pino de *P. tinctorius* fue incompatible o formó pobre asociación con 15 de 21 hospederos de coníferas. Sin embargo, se observó que otros aislamientos del oeste de Australia (H1101, H2144, H77, H445, H215

y M56) mostraron desarrollo micorrízico y estimulación del crecimiento de *E. grandis* superando a los aislamientos colectados en Queensland (H4003, H4461 y H4334). Estos resultados mostraron variación en los niveles de colonización de las diferentes procedencias de *P. tinctorius* en su efecto sobre el crecimiento de *Eucalyptus grandis*.

Las especies fúngicas que presentaron mayor capacidad de colonización y efecto sobre el crecimiento de *P. greggi* fueron *S. pseudobrevipes* y *L. laccata*. Tal efecto podría explicarse en función de que el género *Suillus* tiene la capacidad para colonizar pinos jóvenes y maduros, caracterizándose por persistir a través de la vida de un bosque, denominándose como hongo de etapa múltiple (Danielson, 1991; Visser, 1995; Nara *et al.*, 2003) así como presentar excelente micorrización en diferentes especies forestales (Villeneuve *et al.*, 1990). *L. laccata* es un hongo ECM potencialmente compatible con un amplio número de hospederos y con alta capacidad de colonización (Sudhakara-Reddy y Natarajan, 1996).

Además de las características mencionadas anteriormente, *Laccaria laccata*, *Suillus pseudobrevipes* y *Boletus clavipes*, fueron utilizados en la presente investigación debido a su comestibilidad y a su amplia distribución en México (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989; García-Jiménez *et al.*, 1998). *Pisolithus tinctorius* es una especie fúngica que ha sido utilizada ampliamente en programas de reforestación en diversas partes del mundo (Burgess *et al.*, 1994).

Parladé *et al.* (1996) evaluaron el efecto de la inoculación de inóculo micelial de *Laccaria laccata* y *Pisolithus tinctorius* en la colonización de plantas de

Pseudotsuga menziesii en España. Sus valores fueron mayores que los encontrados en el presente trabajo, 76-100% y 51.75% de colonización, respectivamente. Estas diferencias respecto a la presente investigación pueden estar relacionadas con la procedencia de la especie fúngica ECM, en el caso de Parladé *et al.* colectaron especies fúngicas en masas puras de *Pseudotsuga menziesii*, lo cual incrementó las posibilidades de asociación. A diferencia de esta investigación, en el presente trabajo *P. tinctorius* fue colectado de una plantación tropical de *Pinus caribaea* y *L. laccata* de bosques de diferentes especies de pinos, a pesar de la procedencia se observó asociación con *P. greggii*, lo cual mostró la amplia compatibilidad de estos hongos ECM con esta especie forestal, independientemente del porcentaje de colonización observado. Rincón *et al.* (2001) evaluaron el efecto de inóculo vegetativo de *L. laccata* en la colonización de plantas de *P. pinea* L. Cinco meses después de la inoculación observaron que los porcentajes de colonización a las diferentes tasas de inóculo varió de 11-40%. El porcentaje de colonización a 1:16 (inóculo-substrato) fue significativamente mayor (40%) que las otras tasas de inoculación evaluadas (1:64, 1:32, 1:8 y 1:4). Estos valores fueron similares a los encontrados en esta investigación (55.07%). A pesar de que *L. laccata* se reporta como un excelente micobionte en diversos estudios, en el presente trabajo se encontró que esta especie fue superada por *S. pseudobrevipes* (65.92%).

Rincón *et al.* (1999) evaluaron la capacidad simbiótica de diferentes especies fúngicas ECM con *Pinus pinea* en la región de Cataluña, España. Cuatro meses después de la inoculación encontraron variación en los valores de colonización

entre especies y aislamientos de las mismas especies. Las plantas inoculadas con *Laccaria laccata* presentaron porcentajes de colonización de 24, 93, 72 y 71%. En el caso de *Pisolithus tinctorius* sus valores fueron de 58, 39 y 76 % de colonización para esta especie forestal.

5.3.2. Variables de crecimiento

Se realizó la comparación de las variables: altura, diámetro del tallo y número de ramillas secundarias. Lo anterior con la finalidad de identificar el posible efecto de los hongos ECM aplicados en las plantas encontrándose que existió efecto de la inoculación para la variable altura y diámetro del tallo excepto para el número de ramillas secundarias.

Cuadro 17. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables morfológicas evaluadas en *P. greggii*

F.V.	GL	Altura (mm)	Diámetro del tallo (mm)	Número de ramillas secundarias
Tratamiento	4	24880.40**	2.77**	1365.27NS
Error	19	2102.54	0.09	691.09
C.V.		12.55	10.88	43.51
Media general		365.21	2.90	60.42

FV= Fuente de variación; GL= grados de libertad; CV= coeficiente de variación; *Significativo $\alpha = 0.05$ **altamente significativo $\alpha = 0.01$ NS=no significativo

5.3.2.1. Altura

La variable altura exhibió diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, con $p < 0.0001$. Las medias entre todos los tratamientos tuvieron valores extremos de 415.4 mm y 366.2 mm.

Las plantas inoculadas, independientemente de la especie de hongo ECM utilizado tuvieron mayor altura que las plantas testigo, siendo esta una respuesta frecuentemente encontrada (Beckjord y McIntosh, 1983; Ford *et al.*,

1985). El primer valor correspondió a *Suillus pseudobrevipes* y el último a *Pisolithus tinctorius*.

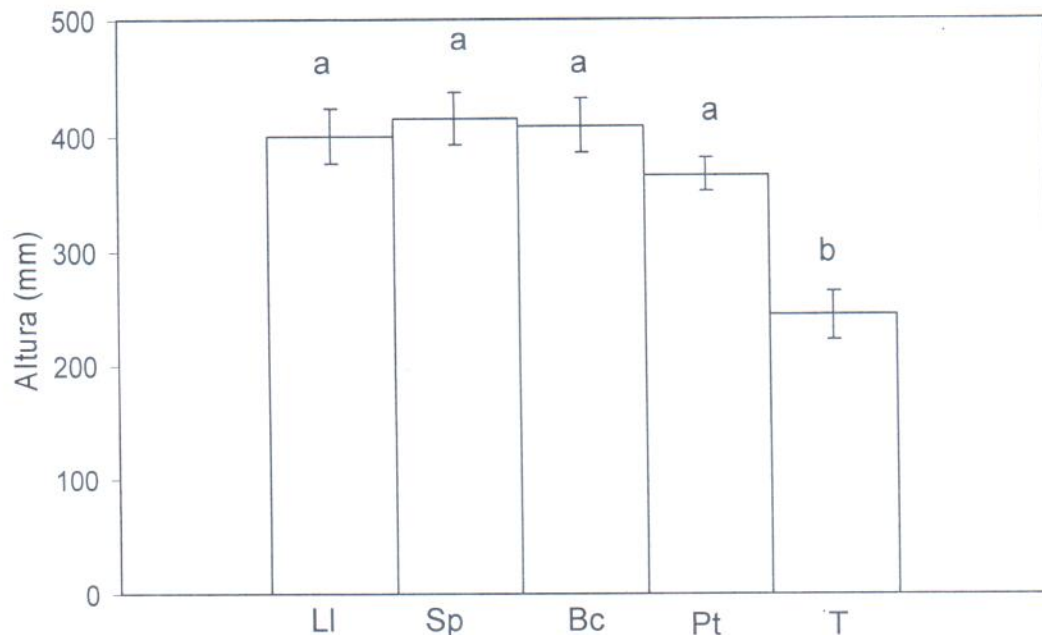


Figura 25. Altura de plantas de *Pinus greggii* inoculadas o no con distintas especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 20.

Rincón *et al.* (2001) evaluaron el efecto de la inoculación de inóculo micelial de *L. laccata* en el crecimiento de *P. pinea* en la región Mediterránea. Cinco meses después de la inoculación encontraron diferencias estadísticas en altura en los tratamientos inoculados en relación al testigo. A este estadio sus valores fueron menores a los encontrados en el presente trabajo 26.1 cm de altura. Dado que existieron diferencias significativas también en el caso de plantas sin inocular, valores menores en el caso de Rincón *et al.* (2001), con una altura de 22.1 cm. Estas diferencias respecto a la presente investigación pueden estar relacionadas con la especie de hospedero y el tiempo de su duración hasta la toma de datos, ya que algunas investigaciones han demostrado que *P. greggii*

es una especie que presenta buenos crecimientos bajo determinadas condiciones ambientales (Kietzka *et al.*, 1996; Dvorak *et al.*, 1996), lo cual demuestra su potencial en programas de inoculación.

En el presente estudio, se observó que la inoculación de diferentes especies fúngicas ECM promovieron las mayores alturas a diferencia del testigo. Diversos estudios han mostrado que la simbiosis ECM incrementa el desarrollo y crecimiento de plantas (Burgess *et al.*, 1994; Hatchell y Marx, 1987).

Resultados similares son los reportados por Beckjord y McIntosh (1983) para *Quercus rubra* y Ford *et al.* (1985) en *Pinus taeda*, quienes observaron incrementos de 31-51% en altura. Diversos autores (Smith y Read, 1997) han mencionado que esta respuesta se explica debido a que las ectomicorrizas favorecen que exista una mayor superficie de absorción de nutrimentos y de agua en la raíz, que aquellas plantas que tienen poca colonización o carecen de ella. Dentro de los nutrimentos se encuentran el nitrógeno y el fósforo, los cuales son utilizados por la planta en la fotosíntesis, produciendo azúcares que se almacenan en los sitios para tal fin, entre ellos el tallo de la planta, redundando en un incremento en el crecimiento.

5.3.2.2. Diámetro del tallo

La variable diámetro del tallo exhibió diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con $p < 0.0001$. Las medias entre todos los tratamientos tuvieron valores extremos de 3.82 y 1.74. Para esta variable existieron respuestas diferenciales de acuerdo a las especies de hongos ECM inoculados. El mayor valor observado fue cuando se inoculó con *B. clavipes*, siendo este valor no estadísticamente mayor que cuando se inoculó con *L. laccata*, pero

superior comparado con aquellas plantas inoculadas con *S. pseudobrevipes* y *P. tinctorius*. El diámetro observado cuando se inoculó con *B. clavipes* fue 2.1 veces mayor respecto al testigo.

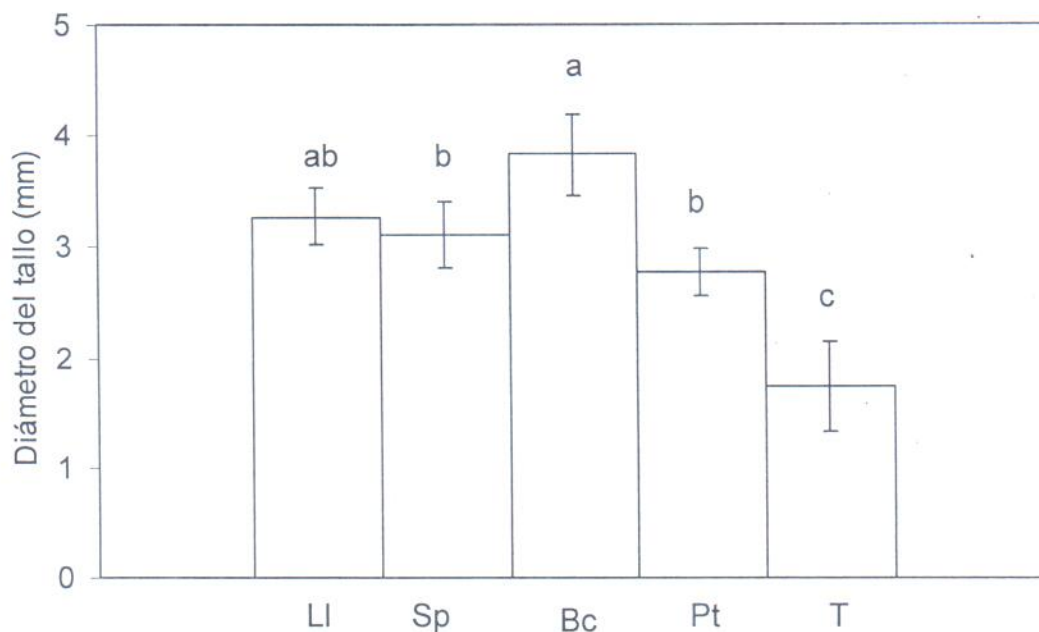


Figura 26. Diámetro del tallo de plantas de *Pinus greggii* inoculadas o no con distintas especies de hongos ectomicorrízicos.. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 20.

Parladé *et al.* (1996) evaluaron el efecto de la inoculación de esporas de tres especies de hongos ECM en el crecimiento de *Pseudotsuga menziesii* en el norte de España. Cinco meses después de la inoculación no encontraron diferencias significativas para la variable diámetro en las plantas inoculadas con *Rhizopogon subareolatus* y *Tuber maculatum*, a diferencia de los tratamientos inoculados con *Melanogaster ambiguus*, presentaron diferencias significativas en comparación al testigo. Los valores observados fueron menores para el caso de *T. maculatum* y *M. ambiguus*, y valores mayores para *R. subareolatus* que los encontrados en el presente trabajo, con 2.3 mm, 2.3 mm y 3.8 mm

respectivamente. Estos resultados probablemente se deban al tiempo que el experimento permaneció en el vivero hasta la toma de datos a diferencia de la presente investigación. Los mismos autores estudiaron el efecto de la inoculación para esta variable en plantas de *P. pinaster* con diferentes concentraciones esporales 10^5 y 10^6 esporas por planta de *Melanogaster ambiguus*, *Rhizopogon roseolus* y *Scleroderma citrinum*. Cinco meses después de la inoculación no encontraron diferencias estadísticas en los tratamientos inoculados con las diferentes concentraciones esporales evaluadas. Sus valores fueron menores que los encontrados en el presente trabajo con las mismas concentraciones inoculadas, 2.0 cm, 2.2 cm y 2.6 cm de diámetro a una concentración de 10^5 esporas respectivamente, en el caso de los tratamientos inoculados con una concentración de 10^6 se presentó el mismo comportamiento, 2.1 cm, 2.1 cm y 2.7 cm respectivamente. Estos resultados mostraron que las concentraciones esporales inoculadas a las plantas de *P. greggii* fueron las adecuadas para garantizar colonización y efecto sobre esta variable.

5.3.2.3. Número de ramillas secundarias

El número de ramillas secundarias se contabilizó a los 11 meses de desarrollo del experimento. Ningún tratamiento presentó diferencias significativas respecto al testigo.

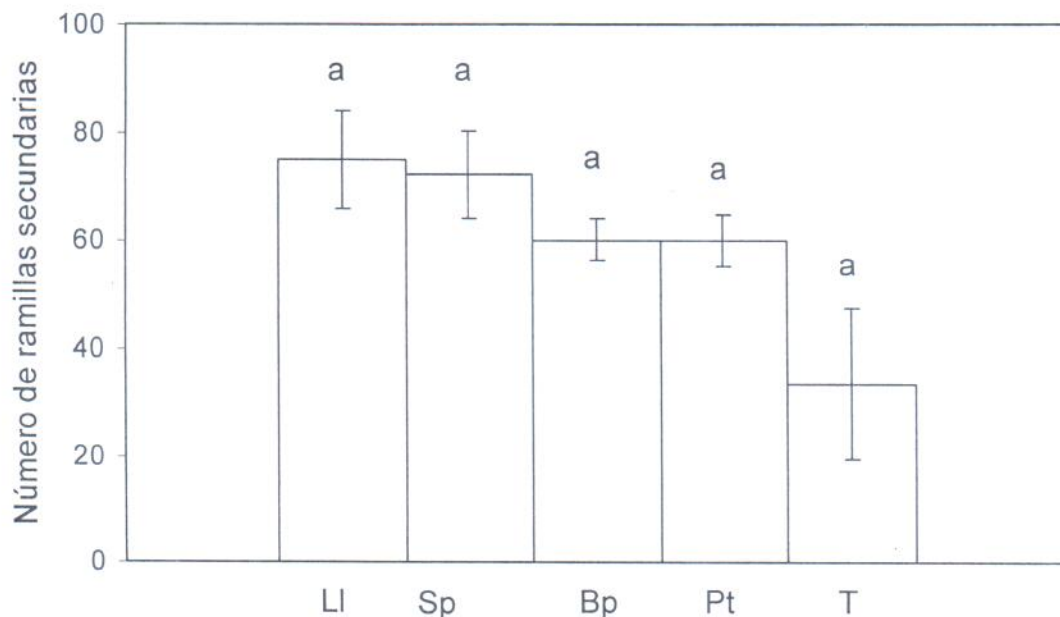


Figura 27. Número de ramillas secundarias de plantas de *Pinus greggii* inoculadas o no con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=6$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 20.

5.3.3. Peso anhidro

Los análisis de las variables peso anhidro total, parte aérea y radical mostraron diferencias estadísticas significativas ($p<0.0001$, $p<0.0001$ y $p=0.0004$) respectivamente del efecto de los tratamientos.

Cuadro 18. Cuadrados medios y niveles de significancia para las variables de peso anhidro evaluadas en *P. greggii*.

F.V	GL	Peso anhidro total	Peso anhidro parte aérea	Peso anhidro radical
Tratamiento	4	5568723.45**	2506782.77**	751138.61*
Error	19	495191.87	342924.88	196067.86
C.V.		17.90	22.20	34.23
Media general		3930.83	2637.42	1293.42

FV= Fuente de variación; GL= grados de libertad; CV= coeficiente de variación; *Significativo $\alpha=0.01$ **altamente significativo NS=no significativo

Las plantas inoculadas, independientemente de la especie de hongo ECM utilizado, tuvieron mayor peso anhidro total que las plantas no inoculadas, a las cuales se les consideró como plantas testigo. Para esta variable (Fig. 28) no existieron diferencias estadísticas entre las plantas inoculadas con cualquiera de las cuatro especies de hongos ECM. La existencia de diferencias significativas en el peso anhidro total obtenido por las plantas de los distintos tratamientos respecto al control, induce a pensar que la existencia de micorrizas en el sistema radical afectó de manera significativa esta variable.

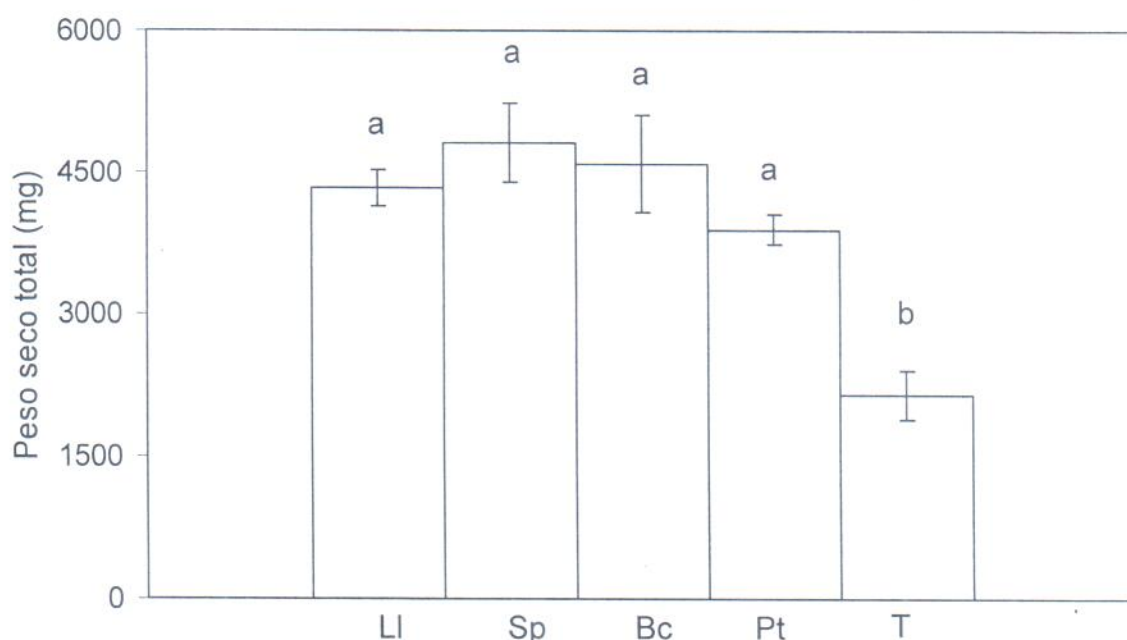


Figura 28. Peso anhidro total de plantas de *Pinus greggii* inoculadas o no con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 20.

Resultados similares fueron obtenidos por Parladé *et al.* (1996) evaluaron el efecto de la inoculación de esporas de tres especies de hongos ECM en el crecimiento de *Pseudotsuga menziesii* en el norte de España. Cinco meses después de la inoculación encontraron diferencias significativas para la variable

peso anhidro total en las plantas inoculadas con *Rhizopogon subareolatus*, *Tuber maculatum* y *Melanogaster ambiguus* en comparación al testigo. Sus valores observados fueron menores que los encontrados en el presente trabajo, 3,500, 1,500 y 1,600 mg respectivamente. Estos resultados mostraron que esta especie fúngica estimula una mayor biomasa cuando se inocula a las plantas, existiendo por lo tanto una respuesta positiva en *P. greggii*.

Rincón *et al.* (2001) evaluaron el efecto de la inoculación de inóculo micelial de *Laccaria laccata* y esporas de *Pisolithus tinctorius* en el peso anhidro total de plantas de *Pinus pinea* L. Cinco meses después de la inoculación no encontraron diferencias estadísticas en las plantas inoculadas con *L. laccata*. Sus valores fueron menores que los encontrados en el presente trabajo, 3,600 mg para el tratamiento inoculado y el testigo. En el caso de plantas inoculadas con *P. tinctorius*, estos autores encontraron diferencias estadísticas para esta variable. Esta especie fúngica presentó un efecto negativo, observándose una disminución del peso anhidro total en relación al testigo. A este estadio sus valores fueron menores en el caso de plantas inoculadas a diferencia del testigo, el cual presentó valores mayores que los observados en el presente trabajo, 3,400 y 4,200 mg respectivamente.

En el caso del peso anhidro parte aérea (Fig. 29) existieron respuestas diferenciales de acuerdo a las especies de hongos inoculados, el mayor valor observado fue cuando se inoculó con *B. clavipes*, *S. pseudobrevipes* y *L. laccata* siendo este valor no estadísticamente mayor que cuando se inoculó con *P. tinctorius*, pero superior comparado con el testigo. El peso anhidro observado cuando se inoculó con *B. clavipes* fue 2.2 veces mayor respecto al testigo.

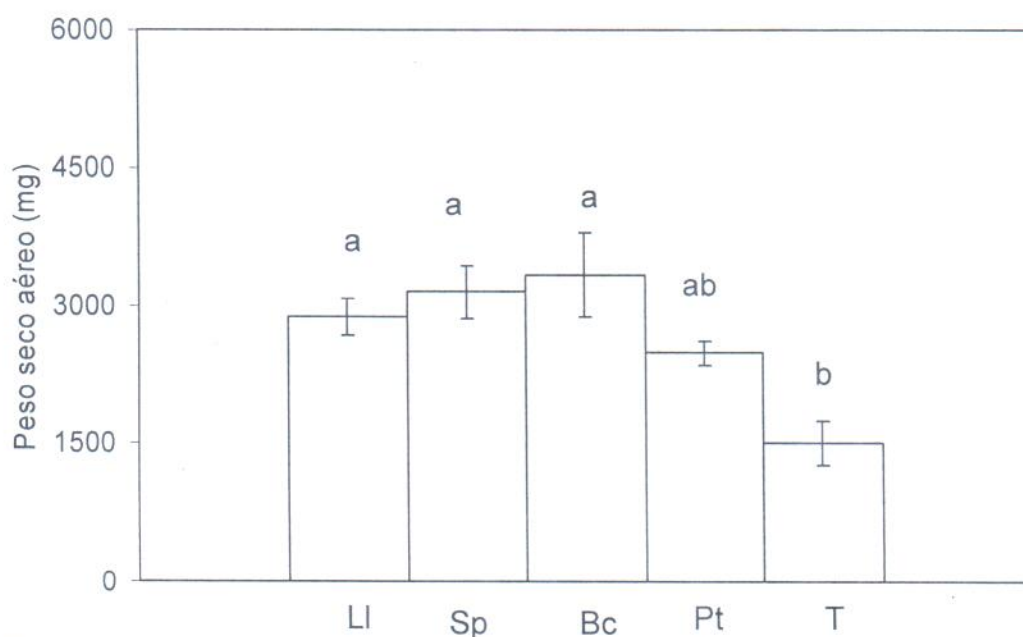


Figura 29. Peso anhidro parte aérea de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son las medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p<0.05$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 20.

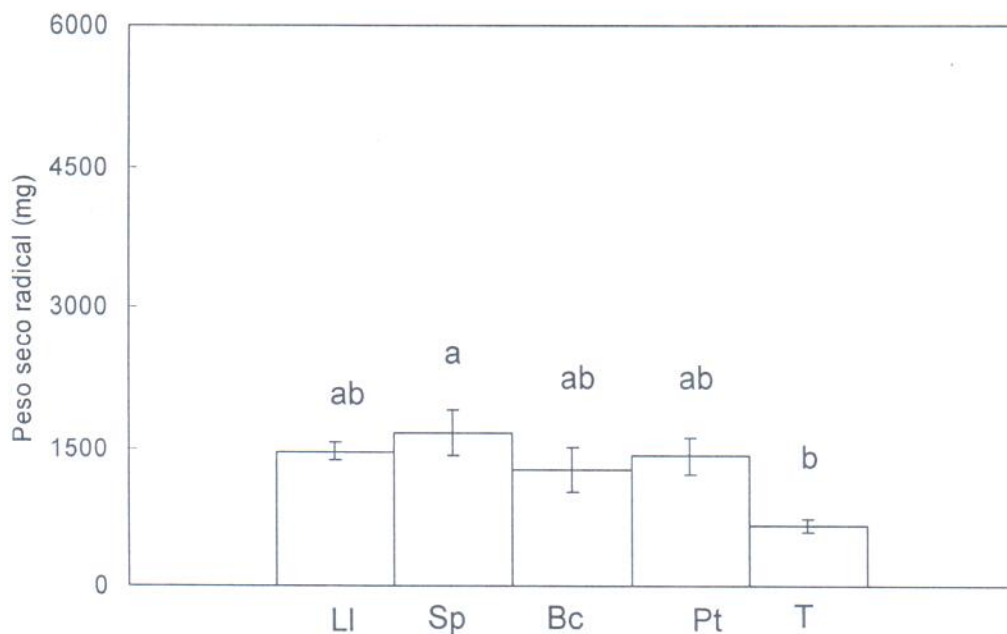


Figura 30. Peso anhidro radical de plantas de *Pinus greggii* inoculadas o no con diferentes especies de hongos ECM. Los valores son medias $\pm$ error estándar de la media, $n=5$. Barras con la misma letra no presentaron diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p=0.0003$). Abreviaturas iguales a las de la Figura 20.

Para la variable peso anhidro radical (Fig. 30), el mayor valor observado fue cuando se inoculó con *S. pseudobrevipes*, valor estadísticamente similar al observado para *L. laccata*, *B. clavipes* y *P. tinctorius* pero superior en relación al testigo. El peso anhidro radical fue 2.5 veces mayor cuando se inoculó con *S. pseudobrevipes* en relación al testigo.

Dixon y Hiohliol (1992) observaron que las plantas de *Pinus caribaea* inoculadas con *P. tinctorius* presentaron mayor peso anhidro parte aérea que el control. Resultados similares son los reportados por Browning y Whitney (1991) en *Picea mariana*.

5.3.3.1. Relación peso anhidro parte aérea:raíz

Las relaciones de peso anhidro de la parte aérea:raíz variaron de 2.01, en el caso de plantas inoculadas con *L. laccata* y *S. pseudobrevipes* a 3.22 en el caso de aquellas plantas inoculadas con *B. clavipes*. Para el testigo dicho valor fue intermedio entre estos, siendo de 2.38. A pesar de estas variaciones no existieron diferencias estadísticas significativas (Prueba de Tukey, $p < 0.05$) entre dicha relación de peso anhidro de la parte aérea y la raíz entre las plantas inoculadas y el testigo. Esto muestra que si bien es cierto que la inoculación originó un mayor peso anhidro total en las plantas de *P. greggii* independientemente de la especie empleada, no originó cambios en la relación del peso anhidro de la parte aérea y la raíz en plantas inoculadas en relación con el testigo. En la presente investigación no se observaron diferencias estadísticas significativas para la relación peso anhidro de la parte aérea:raíz entre las distintas especies fúngicas ECM inoculadas respecto al testigo. Los resultados obtenidos indujo a pensar que si bien, la inoculación tendió a disminuir la relación peso anhidro de la parte aérea:raíz no siempre es una respuesta observada, dependiendo tal respuesta de las distintas especies hospedero y fúngicas ECM utilizadas.

5.3.4. Correlación de variables de crecimiento y colonización ECM

Se encontró una correlación positiva entre la colonización y micelio externo, raíces ECM, peso anhidro radical, número total de raíces cortas, excepto para la variable raíces no ECM, la cual fue negativa (Cuadro 19). La correlación

positiva entre variables indicó que al aumentar la colonización también se incrementó el peso anhidro radical, micelio externo, número total de raíces cortas y raíces ECM. La correlación negativa indicó que conforme disminuyó la colonización el número de raíces no ECM se incrementó. El micelio externo y las raíces con ECM tuvieron el valor de correlación más alto y el número total de raíces cortas el menor valor.

Cuadro 19. Coeficientes de correlación entre la colonización y variables de crecimiento de *Pinus greggii*.

Variables a correlacionar	Coeficiente de correlación
Colonización vs Micelio externo	0.993* *
Colonización vs raíces ECM	0.968* *
Colonización vs raíces sin ECM	-0.955 *
Colonización vs peso anhidro radical	0.762 *
Colonización vs número total de raíces	0.743*

Nota: $p < 0.05$, * significativo, ** altamente significativo.

El incremento en el peso anhidro radical implicó una mayor colonización del sistema radical, esto se explica por el hecho de que al existir la colonización se promueve una mayor cantidad de tejido fúngicos incrementando por ende el peso radical. Diversos autores (Smith y Read, 1997) mencionan que esta respuesta obedece a que existe una mayor superficie de absorción de nutrimentos y de agua en la raíz, que aquellas plantas que tienen poca colonización o carecen de ella. Dentro de los nutrimentos se encuentra el nitrógeno y el fósforo, los cuales son utilizados por la planta para la fotosíntesis, produciendo azúcares que se almacenan en los sitios para tal fin, entre ellos el

tallo de la planta, redundando en un incremento en el crecimiento (Sudhakara-Reddy y Natarajan, 1997).

La correlación positiva de la colonización y el número total de raíces cortas, mostró que los hongos que colonizan de manera extensiva el sistema radical probablemente inducen la producción de nuevas raíces. Asimismo, una mayor colonización implica que existió una mayor infección de área superficial del suelo por lo que se incrementó el número de raíces ECM.

5.3.5. Caracterización morfológica de ectomicorrizas de *Pinus greggii* y *Suillus pseudobrevipes*, *Pinus greggii* y *Boletus clavipes*, *Pinus greggii* y *Laccaria Laccata*, *Pinus greggii* y *Pisolithus tinctorius*

Actualmente, existe escasa investigación relacionada con aspectos micromorfológicos sobre *P. greggii*. La importancia de realizar estos estudios, de acuerdo con Agerer (2001), es la necesidad de cuantificar y calificar la capacidad de las ectomicorrizas de acuerdo a su morfología en el mejoramiento del crecimiento del árbol y la nutrición, en particular, para definir criterios de clasificación con respecto a características ecológicas. Al proporcionar información útil relacionada con el desarrollo y diferenciación de las estructuras como el micelio extramatricial, red de Hartig, profundidad del manto, información que puede representar características predictivas relevantes para una clasificación ecológica de EM.

El objetivo de esta sección fue describir anatómicamente las EM de diferentes especies fúngicas con *P. greggii*, bajo la hipótesis de que existen diferencias entre las especies en la estructura anatómica de la raíz.

Las EM producidas por *Suillus pseudobrevipes* presentaron una ramificación de la raíz tipo tuberculada (Fig. 31a), la superficie del manto fue algodonosa, las micorrizas estaban rodeadas por hifas emergentes delgadas, con una bien desarrollada red de Hartig. Las hifas desarrollaron paredes gruesas, con 25µm de grosor, con inclusiones de cristales (Fig. 31b). La profundidad del manto fue de 125-150 µm. El manto fue clasificado como prosenquimatoso (Fig. 31c).

Danielson (1991) caracterizó las micorrizas de *Suillus* sp. en plantas de *Pinus banksiana* desarrollándose en suelos de desechos de mina. Las micorrizas fueron de tipo dicotómicas a subtuberculadas, con abundante micelio extramatricial blanquecino, cordones miceliales conspicuos, el micelio estuvo cubierto con material cristalino y/o depósitos resinosos. Otro estudios realizados con especies de *Suillus* es el de Rincón *et al.* (1999) quienes estudiaron las características morfológicas de *Suillus bellini* en plantas de *P. pinea* después de 4 meses. Las EM producidas presentaron un crecimiento micelial muy abundante, la red de Hartig penetró dos capas de células corticales, y abundantes rizomorfos o cordones miceliales, el color del manto fue blanco rosáceo.

Cristales de *Suillus pseudobrevipes*. Los cristales adheridos a la superficie de las hifas de *S. pseudobrevipes* observadas en *P. patula* y *P. greggii* es un fenómeno que ha sido reportado previamente en el micelio de *S. bovinus* (Sun *et al.*, 1999) y *S. granulatus* (Wallander *et al.*, 2003). Este fenómeno se presenta cuando las condiciones de supersaturación de agua permiten la precipitación de sales de oxalato, de las cuales la más comúnmente observada en hongos ECM son los oxalatos de calcio (Ahonen-Jonnarth *et al.*,

2000), los cuales son ácidos orgánicos cuya función es incrementar la disponibilidad biológica de fósforo y potasio por detoxificación del aluminio (Connolly y Jellison, 1995) así como por unir elementos tales como metales pesados (Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000) al permitir la formación de complejos extracelulares o cristales con iones metálicos (Caesar-Tonthat *et al.*, 1995). Diversas investigaciones han demostrado que algunas especies de *Suillus* pueden reducir la transferencia de algunos metales a través de el incremento en la densidad micelial, al disminuir el grado de exposición así como la producción de ácidos orgánicos capaces de quelatar e inactivar los cationes de los metales (Colpaert y Van Assche, 1992; Colpaert *et al.*, 2000; Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000) a plantas de pinos producidos en sustratos contaminados. En *Suillus pseudobrevipes* la presencia de cristales probablemente pudieran estar relacionados con la capacidad potencial de tolerancia de crecimiento de esta especie en sitios contaminados por metales. Danielson (1991) reportó que esta especie fructifica asociada con árboles de *Pinus banksiana* de 6-10 años de edad en suelos contaminados por petróleo. Wallander *et al.* (2003) evaluaron el potencial de diferentes especies fúngicas ECM para liberar elementos de apatita y ceniza y su acumulación en el micelio. De las especies evaluadas observaron que *Suillus granulatus* presentó 3-15 veces más de K (3 mg K por g⁻¹) de sustrato en comparación con *Paxillus involutus*, *Thelephora terrestris* y *Tylospora fibillosa*, observándose la presencia de cristales ricos en Ca sobre la superficie de los rizomorfos cuando crecía en contacto con apatita. En este caso, posiblemente la producción de ácido oxálico benefició el crecimiento vegetal al quelatar e inactivar Al³⁺ inorgánico tóxico (Ahonen-Jonnarth *et al.*,

2000). La producción de oxalatos de Ca tiene un importante papel en la solubilización de fósforo (Cannon *et al.*, 1995). Los oxalatos retenidos en las hifas de algunas especies micorrízicas incrementan la disponibilidad de SO_4 y se ha considerado que los cristales de oxalatos de Ca pueden funcionar como un reservorio de Ca en los ecosistemas (Dutton y Evans, 1996). En algunas investigaciones se ha observado que uno de los factores que incrementan la producción de ácido oxálico en el sistema radical de *Pinus sylvestris* por *Suillus variegatus* y *Rhizopogon roseolus* es la exposición a Al y Cu (Ahonen-Jonnarth *et al.*, 2000). Los efectos negativos del aluminio sobre el crecimiento de la planta han sido relacionados con la disminución de la asimilación de Mg y Ca (Schier y McQuattie, 1996), por lo que la precipitación de oxalatos permite traslocar Ca a la planta en suelos contaminados por este metal. A pesar de estos conocimientos iniciales es importante señalar que el posible papel del ácido oxálico en disminuir la toxicidad de estos metales todavía requiere mayor investigación.

Las EM producidas por *B. clavipes* se ilustran en las Figs. 32a-c. La profundidad del manto fue de 40–70 μm , las hifas fueron hialinas de paredes gruesas, se observó una bien desarrollada Red de Hartig (Fig. 32a) la cual penetró 2-3 capas de células corticales. Las células corticales fueron subglobosas, midiendo aproximadamente 40-60 x 20-30 μm . El manto fue clasificado como prosenquimatoso (Fig. 32b).

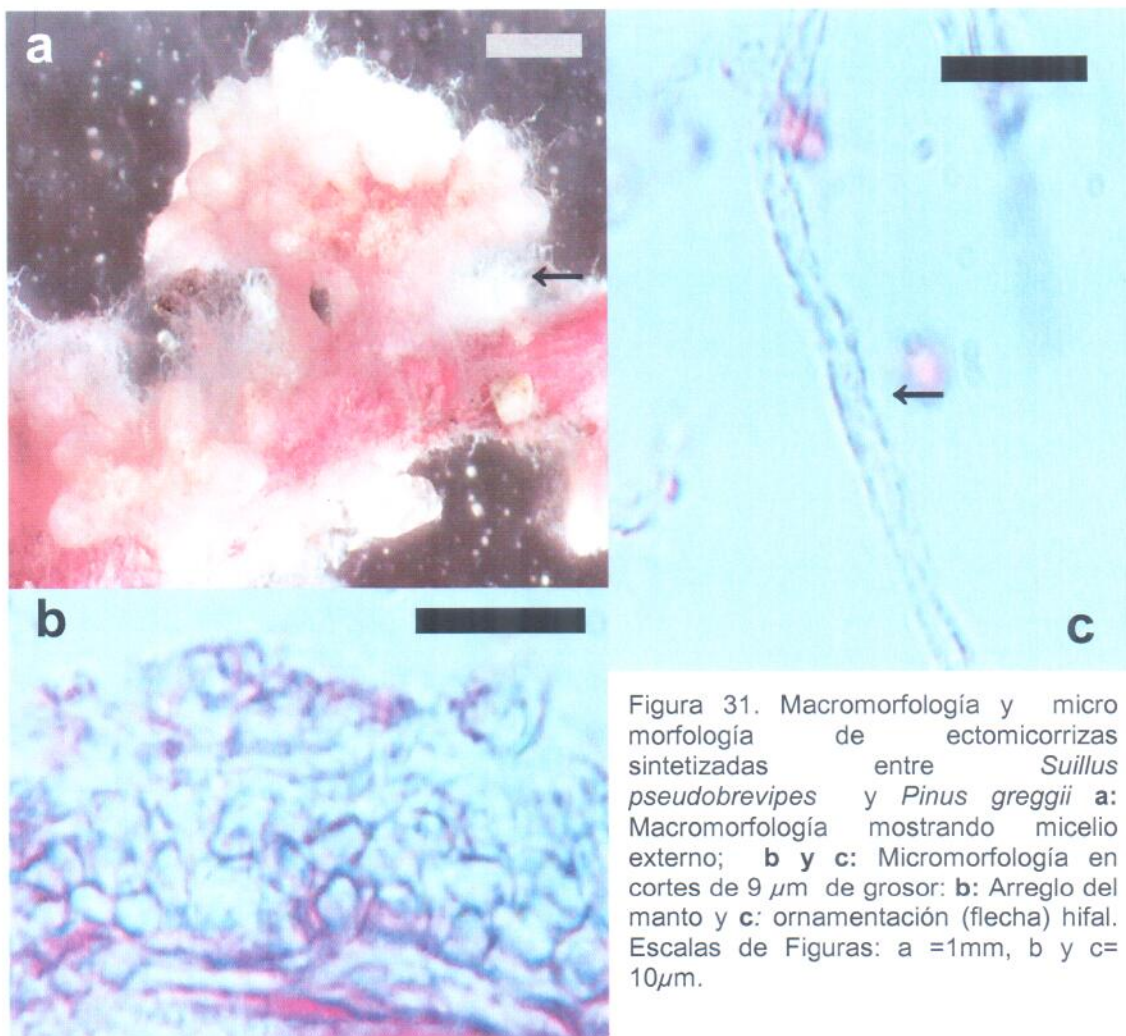


Figura 31. Macromorfología y micro morfología de ectomicorizas sintetizadas entre *Suillus pseudobrevipes* y *Pinus greggii* **a**: Macromorfología mostrando micelio externo; **b y c**: Micromorfología en cortes de $9\ \mu\text{m}$ de grosor: **b**: Arreglo del manto y **c**: ornamentación (flecha) hifal. Escalas de Figuras: a $\approx 1\text{mm}$, b y c $= 10\ \mu\text{m}$.

La presencia de un manto externo e interno prosenquimatoso y sinenquimatoso respectivamente, así como la presencia de cadenas hifales bien desarrolladas y cordones miceliales ya se habían descritos para micorizas de *Quercus glauca* y *Boletus edulis* (Hu Hung, 1996).

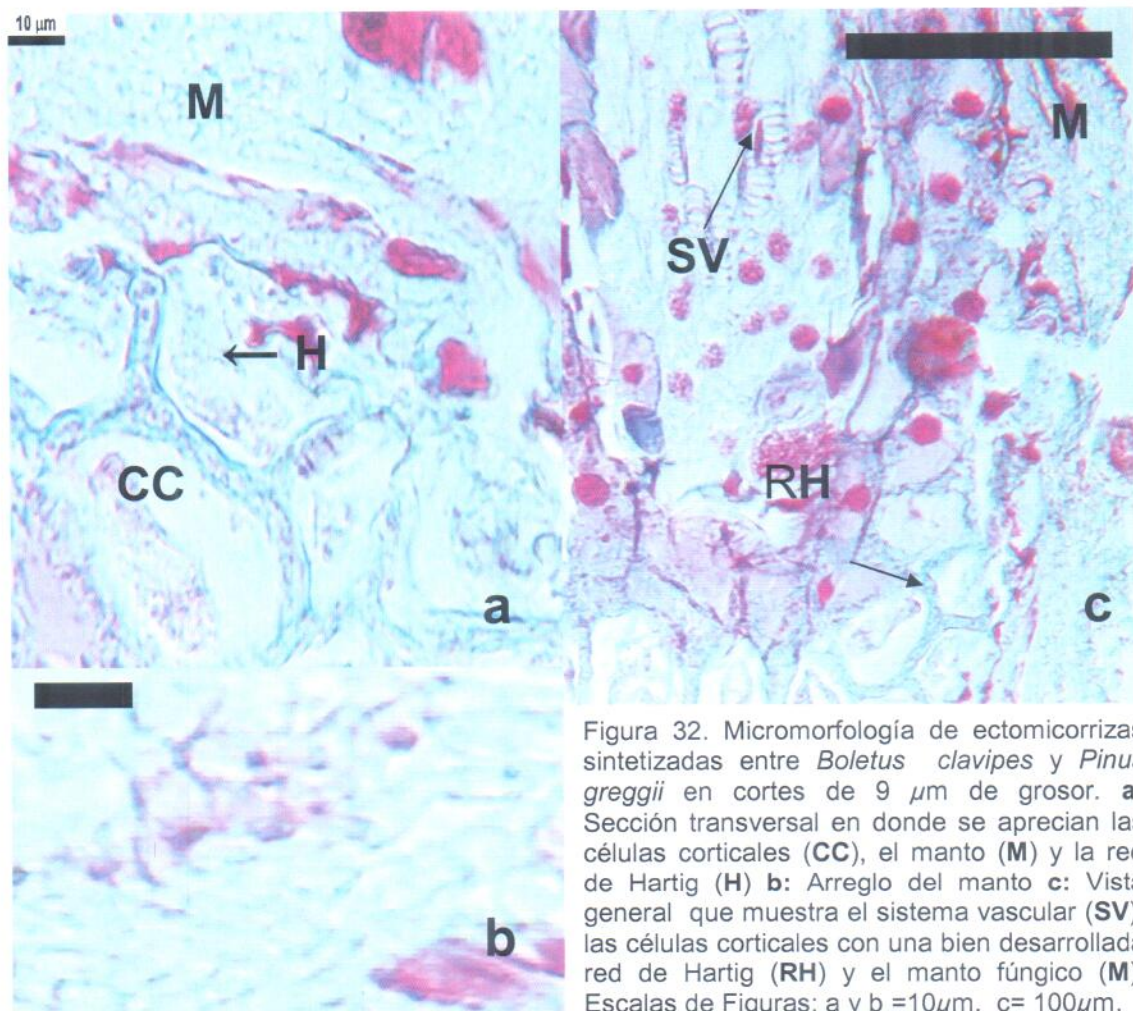


Figura 32. Micromorfología de ectomicorizas sintetizadas entre *Boletus clavipes* y *Pinus greggii* en cortes de 9 μm de grosor. a: Sección transversal en donde se aprecian las células corticales (CC), el manto (M) y la red de Hartig (H) b: Arreglo del manto c: Vista general que muestra el sistema vascular (SV), las células corticales con una bien desarrollada red de Hartig (RH) y el manto fúngico (M). Escalas de Figuras: a y b = 10 μm , c = 100 μm .

Las ectomicorizas producidas por *L. laccata* se presentan en las Figs. 33a-c. Las hifas midieron de 2 a 4 μm de diámetro. Las EM producidas por *L. laccata* y *P. greggii* presentaron raíces cortas bifurcadas clasificadas como EM dicotómicas (Fig. 33d), la superficie del manto fue lanosa, las micorizas estaban rodeadas por hifas emergentes gruesas. La profundidad del manto fue de 30-60 μm y estuvo constituido por dos capas: la capa externa consistió de un tejido prosenquimatoso y la capa interna consistió de un tejido

sinenquimatoso. Las células corticales fueron elípticas midiendo 60 x 20 µm. La red de Hartig (Fig. 33a) penetró 3 a 4 capas de células corticales. La región de las células corticales externas mostró un manto fúngico compacto y una bien desarrollada red de Hartig.

Thomas y Jackson (1979) realizaron estudios morfológicos de siete tipos de micorrizas en *Picea sitchensis* (Bong.) Carr., entre ellas *Laccaria laccata* y *Thelephora terrestris*. Estos autores observaron que las micorrizas de *L. laccata* fueron principalmente dicotómicas, de color café claro y cilíndricas. El manto tuvo una profundidad de 25 µm y consistió de un tejido simple prosenquimatoso, conformado por hifas septadas de 2-3 µm de diámetro. Las células epidérmicas fueron pigmentadas, distorsionadas y contuvieron hifas intracelulares. La red de Hartig penetró hasta la endodermis y varió de 4 µm de diámetro entre las células epidérmicas a 2 µm de diámetro entre las células corticales. Hifas de 2-3 µm de diámetro radiaron de manera dispersa en la superficie del manto.

De acuerdo a lo observado por estos investigadores, en el caso de la presente investigación la profundidad del manto fue mayor. Las células corticales y la superficie del manto presentaron una conformación diferente. Los resultados obtenidos inducen a pensar que la inoculación con *L. laccata* modificó de manera diferencial el tamaño de la célula vegetal, dependiendo tal respuesta de las distintas especies hospedero y fúngicas ECM utilizadas.

Santiago-Martínez *et al.* (2003) describieron las estructuras formadas en plantas inoculadas de *Pinus montezumae* con *Laccaria bicolor*. Quince meses después de la inoculación extrajeron el sistema radical para su caracterización. La

micorriza presentó un tipo de ramificación de simple a dicotómica, ocasionalmente irregular. La superficie del manto fue granulosa con abundantes hifas emanantes, con brillo metálico distribuido irregularmente. La micorriza presentó abundantes rizomorfos e hifas emanantes hialinas. El manto tuvo una profundidad de 23.4-31.4 μm , plectenquimatoso, con las hifas dispuestas en forma de red y con abundantes hifas emergentes fibuladas. La red de Hartig penetró de dos a tres capas de células corticales. A diferencia de lo reportado por estos autores, Rincón *et al.* (1999) observaron que las micorrizas producidas en plantas inoculadas con *L. laccata* en *P. pinea*, después de 4 meses, el color del manto fue beige-naranja, la red de Hartig penetró 1-2 capas de células corticales, observaron escaso crecimiento micelial y ausencia de rizomorfos o cordones miceliales.

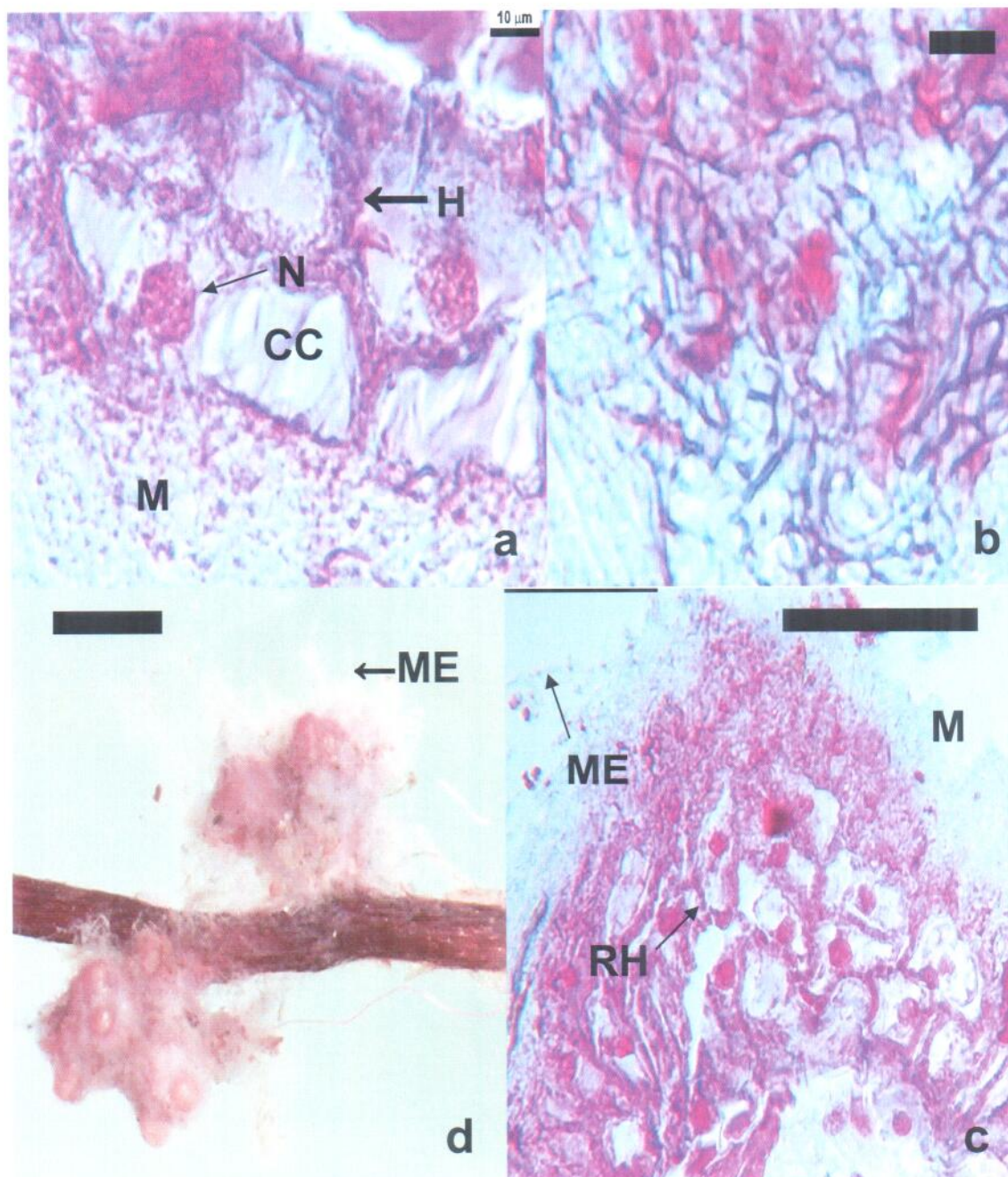


Figura 33. Micromorfología de ectomicorizas sintetizadas entre *Laccaria laccata* y *Pinus greggii* en cortes de 9 μm de grosor. **a**: Sección transversal en donde se aprecian **CC**: células corticales; **H**: Red de Hartig; **M**: Manto; **N**: Núcleo de células vegetales. Se observa el desarrollo de hifas entre las células del hospedero **b**: Arreglo del manto **c**: Vista general mostrando red de Hartig (**RH**), micelio externo (**ME**) y manto (**M**) **d**: Macromorfología mostrando micelio externo (**ME**). Escalas de Figuras: a y b = 10 μm , c = 100 μm , d=1mm.

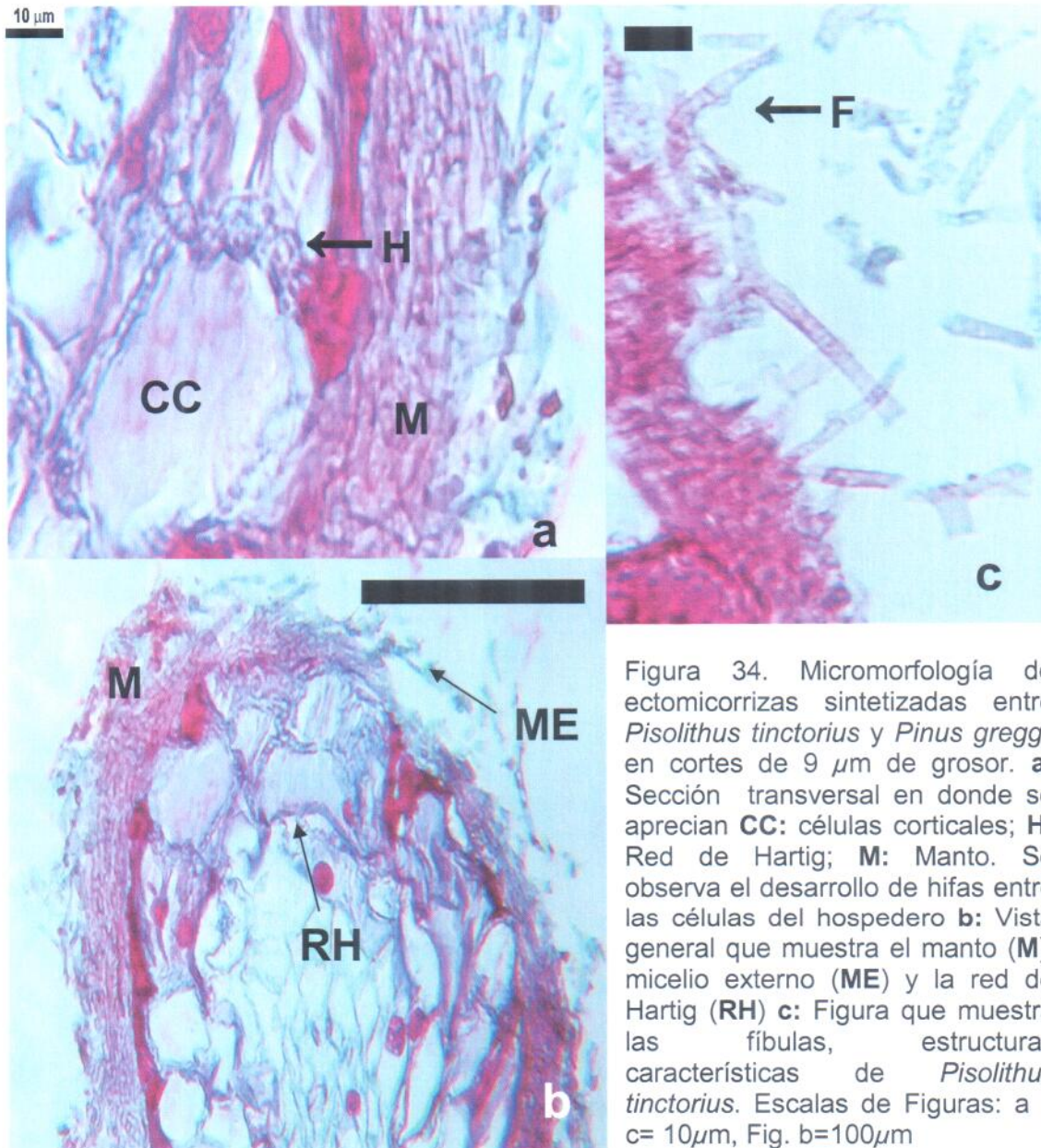


Figura 34. Micromorfología de ectomicorrizas sintetizadas entre *Pisolithus tinctorius* y *Pinus greggii* en cortes de 9 μm de grosor. **a**: Sección transversal en donde se aprecian **CC**: células corticales; **H**: Red de Hartig; **M**: Manto. Se observa el desarrollo de hifas entre las células del hospedero **b**: Vista general que muestra el manto (**M**), micelio externo (**ME**) y la red de Hartig (**RH**) **c**: Figura que muestra las fibulas, estructuras características de *Pisolithus tinctorius*. Escalas de Figuras: a y c= 10 μm , Fig. b=100 μm

Las EM producidas por *P. tinctorius* presentaron una bien desarrollada red de Hartig (Fig. 34a) la cual penetró 2-3 capas de células corticales. Las células corticales fueron subglobosas, midiendo aproximadamente 40-50 x 20-30 μm . Las hifas fueron de paredes delgadas, con 3-4 μm de grosor. La profundidad del manto fue de 20-30 μm . El manto estuvo constituido por un tejido

prosenquimatoso, las hifas fueron semitransparentes con conexiones. Estas EM presentaron rizomorfos, con un color del manto amarillo y raíces modificadas grandes, presentaron un tipo de ramificación dicotómica. La superficie del manto fue fibrosa con hifas hialinas perceptibles.

Burgess *et al.* (1994) caracterizaron las micorrizas de *P. tinctorius* y *E. grandis* W. Hill ex Maiden como micorrizas brillantes ocre, generalmente asociadas con un micelio extramatricial extensivo y cordones miceliales abundantes extendiéndose en el suelo. Otro estudio realizado con esta especie fúngica es el de Rincón *et al.* (1999) quienes realizaron la caracterización morfológica de ectomicorrizas producidas por plantas de *P. pinea* inoculadas con *P. tinctorius*. 4 meses después de la inoculación realizaron la caracterización. El manto presentó un color amarillo, la red de Hartig penetró 1-3 capas de células corticales, el crecimiento micelial fue muy abundante, las micorrizas presentaron abundantes cordones miceliales y rizomorfos. Las características morfológicas fueron muy similares a las reportadas en el presente estudio para esta especie fúngica.

VI. CONCLUSIONES

- a) La observación de colonización radical para las especies fúngicas ectomicorrízicas evaluadas confirma, la compatibilidad de las mismas para la formación de ectomicorrizas con *Pinus greggii* y *Pinus patula*, así como la efectividad de la técnica aplicada.
- b) La variabilidad en las tasas de colonización obtenidas para las plantas de *Pinus greggii* como de *Pinus patula* ponen de manifiesto la importancia de la selección de especies fúngicas para inocular distintas especies arbóreas.
- c) La existencia de diferencias de las variables evaluadas obtenidas por las plantas de los distintos tratamientos respecto al control induce a pensar que la existencia de micorrizas en el sistema radical afectó de manera significativa el crecimiento de las plantas.
- d) Se encontró que los hongos ECM inoculados que presentaron el mayor valor de crecimiento de micelio extramatricial y colonización en plantas de *P. patula* fueron *Suillus pseudobrevipes* y *Laccaria laccata*. Las especies fúngicas que presentaron el mayor efecto en la altura, diámetro del tallo y peso anhidro total, parte aérea y radical fueron *Laccaria laccata*, *Suillus pseudobrevipes* y *Boletus clavipes*, las cuales no mostraron diferencias entre sí.

- e) La relación peso anhidro parte aérea:raíz no presentó diferencias entre las plantas inoculadas con los diferentes hongos ECM inoculados y el testigo. En el caso de plantas inoculadas con *Hebeloma aff. mesophaeum* la inoculación originó cambios en la relación del peso anhidro de la parte aérea y la raíz.
- f) En plantas de *P. greggii* se observó que el tratamiento que presentó el mayor valor de micelio extramatricial y colonización correspondió al tratamiento *S. pseudobrevipes* y *L. laccata*. Independientemente de la especie fúngica ECM inoculada en plantas de *P. greggii*, se observó un efecto similar en la altura y peso anhidro total. En el caso del diámetro del tallo existieron respuestas diferenciales de acuerdo a las especies de hongos inoculados. El mayor valor observado fue cuando se inoculó con *Boletus clavipes* y *Laccaria laccata*. El diámetro observado cuando se inoculó con *B. clavipes* fue 2.1 veces mayor respecto al testigo. Para las variables peso anhidro parte aérea independientemente de la especie fungica inoculada se observó un efecto similar. El mayor valor observado fue cuando se inoculó con *B. clavipes*, *S. pseudobrevipes* y *L. laccata*. El peso anhidro de la parte aérea observado cuando se inoculó con *B. clavipes* fue 2.2 veces mayor respecto al testigo. Las relaciones de peso anhidro de la parte aérea:raíz independientemente de la especie empleada, no originó cambios en plantas inoculadas en relación con el testigo.
- g) Las interacciones de los diferentes hongos ECM inoculados en *P. pařula* y *P. greggii* presentaron todas las características de una asociación ECM compatible. Se observó un manto fúngico que rodeó las raíces cortas de plantas

inoculadas, y las paredes externas de las células corticales. Asimismo, se observó el desarrollo de una red de Hartig con penetración intercelular de hifas en las células corticales, lo cual es la característica distintiva de la EM.

h) La importancia comercial de los hongos ECM evaluados por su interés culinario supone un valor añadido en la repoblación de áreas forestales con estas especies.

i) Dada la influencia de los hongos ECM evaluados en el crecimiento de *P. patula* y *P. greggii*, se considera de importancia hacer más estudios en relación a especies forestales de interés en asociación con un mayor número de hongos ECM, así como realizar estudios que aborden aspectos micromorfológicos y de tolerancia a suelos contaminados, que hasta ahora no han sido investigados en especies mexicanas.

VII. LITERATURA CITADA

- Abbott L.; Robson A. 1991. The effect of mycorrhiza on plant growth. In: Powell C.; Bagyarí D., (eds.) *Mycorrhizae*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. pp. 113-130.
- Abbott L.K.; Robson A.D. 1984. The effect of VA mycorrhizae on plant growth. Pp 113-130. In: C.L. Powell; D.J. Bagyarí, (eds). *Mycorrhizae*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Agerer R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae: a proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11:107-114.
- Agerer R. 1991. Characterization of ectomycorrhiza. In *Techniques for the study of mycorrhiza*. Edited by J.R. Norris, D.J. Read, and A.K. Varma. Academic Press. London. pp. 25-73.
- Aguirre-Acosta E.; Pérez-Silva E. 1978. Descripción de algunas especies del género *Laccaria* (Agaricales) de México. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 12:33-58.
- Ahonen-Jonnarh U.; Van Hees A.W.; Lundström U.S.; Finlay R.D. 2000. Organic acids produced by mycorrhizal *Pinus sylvestris* exposed to elevated aluminium and heavy metal concentrations. *New Phytol* 146:557-567.
- Ahonen-Jonnarh U.; Goransson A.; Finlay R.D. 2003. Growth and nutrient uptake of ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings in a natural substrate treated with elevated Al concentrations. *Tree Physiology* 23:157-167.
- Ainsworth G.C. 1973. *The fungi, an advanced treatise*. Edited by G.C. Ainsworth; F.K. Sparrow and A.S. Sussman. Vol IVB. A taxonomic review with keys: Basidiomycetes and lower fungi. Academic Press Inc. Orlando, Florida. 487 p.
- Alexopoulos C.J. 1977. *Introducción a la micología*. Ed. Universitaria de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 579 p.
- Allen E.; Allen M. 1984. Competition between plants of different successional stages: mycorrhizae as regulators. *Can J Bot* 62: 2625-2629.
- Allen M. 1991. *The ecology of mycorrhiza*. Cambridge University Press. Cambridge, U.K. pp. 78-95.

- Allen M.; Allen E. 1992. Mycorrhizae and plant community development: mechanism and patterns. In: Carroll G.; Wicklow D. (eds). The mycorrhizal fungal community: its role in the ecosystem. New York. pp. 455-479.
- Allen M.; Smith W.; Moore T.; Christensen M. 1981. Comparative water relations and photosynthesis of mycorrhizal and nonmycorrhizal *Bouteloua gracilis* (HBK) lag ex Steud. New Phytol. 88: 683-693.
- Amaranthus M.; Perry D. 1989. Interaction effects of vegetation type and Pacific madrone soil inocula on survival, growth and mycorrhizae formation of Douglas-fir. Can. J. For. Res. 19: 550-555.
- Antibus R.; Bower D.; Dighton J. 1997. Root surface phosphatase activities and uptake of ^{32}P -labelled inositol phosphate in field-collected gray birch and red maple roots. Mycorrhiza 7:39-46.
- Arteaga M. B. 1985. Índice de sitio para *Pinus patula* Schl et Cham., en la región Chignahuapan-Zacatlan, Puebla. Tesis de Maestro en Ciencias. Programa Forestal C.P. Chapingo, México. 181 p.
- Ashford A.E.; Allaway W.G. 2002. The role of the motile tubular vacuole system in mycorrhizal fungi. Plant and Soil 244:177-187.
- Aver G.; Grigoletti J. 1997. The occurrence of *Sphaeropsis sapinea* on *Pinus* in the states of Parana in Santa Catarina, Brazil. Consultado en <http://www.link.springer.de/link/service/journals/oo572/bibs/4004006/40040255.htm> el 10 de febrero de 2003.
- Azcón F.; Barea J. 1980. Micorrizas. Investigación y Ciencia 47: 7-76.
- Baar J.; Comini B.; Elferink M.O.; Kuyper T.W. 1997. Performance of four ectomycorrhizal fungi on organic and inorganic nitrogen sources. Mycological Research 101:523-529.
- Barea J. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. In: Stewart B. (ed) Advances in soil science 15. Springer-Verlag. New York. pp. 1-40.
- Barea J. 1998. Biología de la rizósfera. Investigación y Ciencia 14: 74-80.
- Barker S.; Tagu D.; Delp G. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. Consultado el 5 de marzo de 2003 en <http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/120/2/587>.

- Barnes R.; Styles B. 1983. The closed-cone pines of México and Central America. Nepal-Forestry Technical Information Bulletin 8:2-5.
- Barret W. 1972. Variación de caracteres morfológicos en poblaciones naturales de *Pinus patula* Schl et Cham en México. IDIA-Suplemento Forestal No. 7: 9-35.
- Bauer T.; Blechschmidt S.; Eschrich W. 1991. Regulation of photoassimilate allocation in *Pinus sylvestris* by the nutritional status of the mycorrhizal fungus *Suillus variegatus*. Trees 5: 36-43.
- Beckjord P.; McIntosh M. 1983. Growth and fungal retention by field-planted *Quercus rubra* seedlings inoculated with several ectomycorrhizal fungus. Bull. Torrey Bot. Club. 110:353-359.
- Bellgard S.; Whelan R.; Muston R. 1994. The impact of wildfire on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their potential to influence the re-establishment of postfire plant communities. Mycorrhiza 4:139-146.
- Bending G.; Read D. 1995. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. VI. Activities of nutrient mobilizing enzymes in birch litter colonized by *Paxillus involutus* (Fr) Fr. New Phytol. 130:411-417.
- Benjamin P.K.; Allen E.B. 1987. The influence of VA mycorrhizal fungi on competition between plants of different successional stages in sagebrush-grassland. In: Mycorrhizae in the next decade, practical applications and research priorities. Edited by D.M. Sylvia; L.L. Hung and J.H. Graham. Institute of Food and Agricultural Sciences, Gainesville, FL. P. 144.
- Beristáin B.J. 1992. Variación morfológica y anatómica de acículas de *Pinus greggii* Engelm. Tesis Lic. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. Mexico. 93 p.
- Bethlenfalvay G.; Brown M.; Ames R.; Thomas R. 1988. Effects of drought on host and endophyte development in mycorrhizal soybeans in relation to water use and phosphate uptake. Physiologia Plantarum 72:565-571.
- Bidartondo M.I.; Bruns T.D. 2002. Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. Molecular Ecology 11:557-569.

- Boller T. 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. Consultado en <http://www.elsevier.com/inca/publications/store/5/0/3/3/1/0/> el 10 de junio de 2003.
- Bolton H.; Fredrickson J.; Elliott L. 1993. Microbial ecology of the rhizosphere. In: Metting B., ed. Soil microbial ecology. New York, Marcel Dekker. Pp. 27-64.
- Bowen G. 1994. The ecology of ectomycorrhiza formation and functioning. Plant and Soil 15: 61-67.
- Bowen G.; Theodorou C. 1973. Growth of ectomycorrhizal fungi around seeds and roots In: Marks G.; Kozlowski (eds.) Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology. Academic Press. Nueva York.
- Boyle C.D.; Robertson W.S.; Salenius P.O. 1988. Use of mycelial slurries of ectomycorrhizal fungi on inoculum for commercial tree nurseries. Can. J. For Res 17:1480-1486.
- Bradley R.; Burt A.; Read D. 1982. The biology of mycorrhizae in the Ericaceae. VIII. The role of mycorrhizal infection in heavy metal resistance. New Phytol. 91:197-209.
- Brandes B.; Godbold D.L.; Kuhn A.J.; Jentschke G. 1998. Nitrogen and phosphorus acquisition by the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* and its effect on host nutrients. New Phytol. 140:735-744.
- Brockwell J.; Bottomly P. 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. Soil Biol and Biochem. 27:683-697.
- Browning M.H.R.; Whitney R.D. 1991. Responses of jack pine and black spruce seedlings to inoculation with selected species of ectomycorrhizal fungi. Can J. For Res 21: 701-706.
- Brundrett M. 1991. Mycorrhizae in natural ecosystems. In: Advances in Ecological Research 21: 171-313.
- Brundrett M.; Bougher B.; Dell T.; Grove T.; Malajczuk N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. ACIAR Monograph. 373 p.
- Brundrett M.C.; Piché Y.; Peterson R.L. 1984. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. Can. J. Bot. 62:2128-2134.

- Brunner I. 2001. Ectomycorrhizas: their role in forest ecosystems under the impact of acidifying pollutants. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* 4:13-27.
- Brunner I.; Brodbeck S. 2001. Response of mycorrhizal Norway spruce seedlings to various nitrogen loads and sources. Consultado en http://www.findarticles.com/cf_0/pl/name/html el 12 de marzo de 2003.
- Bruns T.D. 1995. Thoughts on the processes that maintain local species-diversity of ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 170:63-73.
- Bruns T.D.; Bidartondo M.I.; Taylor D.L. 2002. Host specificity in ectomycorrhizal communities: What do the exceptions tell us? *Integrative and Comparative Biology* 42:353-359.
- Burgess T.; Dell B.; Malajczuk N. 1994. Variation in mycorrhizal development and growth stimulation by 20 *Pisolithus* isolates inoculated on to *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden. *New Phytol.* 127:731-739.
- Burgess T.; Malajczuk N.; Grove T. 1993. The ability of 16 ectomycorrhizal fungi to increase growth and phosphorus uptake by *Eucalyptus globulus* Labill and *Eucalyptus diversicolor* F. Muell. *Plant and Soil.* 153:155-164.
- Caesar-Tonthat T.; Van Ommen Kloeke F.; Geesey G.G.; Henson J.M. 1995. Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfide by sulfide-silver staining. *Applied and Environmental Microbiology* 61:1968-1975.
- Cairney J. 1992. Translocation of solutes in ectomycorrhizal and saprotrophic rhizomorphs. *Mycol. Res.* 96: 135-141.
- Cairney J. 1999. Intraspecific physiological variation: implications for understanding functional diversity in ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 9:125-135.
- Cairney J.W. 2000. Evolution of mycorrhiza systems. *Naturwissenschaften* 87:467-475.
- Cairney J.; Burke R. 1994. Fungal enzymes degrading plant cell walls: their possible significance in the ectomycorrhizal symbiosis. *Mycol. Res.* 98:1345-1356.

- Cannon J.P.; Allen E.B.; Allen M.F.; Dudley L.M.; Jurinak J.J. 1995. The effects of oxalates produced by *Salsola tragus* on the phosphorus nutrition of *Stipa pulchra*. *Oecologia* 102:265-272.
- Cannon G. 1984. Ectomicorrizas para plantaciones forestales en Colombia, In: Sieverding E.; Sánchez M.; Bravo N. (eds.) Investigaciones sobre micorrizas en Colombia. Memorias del Primer Curso sobre Micorrizas. Universidad Nacional de Colombia. pp. 108-124.
- Castellano M. 1994. Current status of outplanting studies using ectomycorrhiza inoculated forest trees In: Pfleger F.; Linderman R. (eds.) Mycorrhizae and plant health. The American Phytopathological Society Press, St. Paul Minnesota. pp 261-281.
- Castellano M.; Trappe J. 1991. *Pisolithus tinctorius* fails to improve plantation performance of inoculated conifers in southwestern Oregon. *New For.* 5:349-358.
- Cázares E.; Trappe J. 1983. Vesicular endophytes in roots of the *Pinaceae*. *Mycorrhiza* 2: 153-156.
- Chakravarty P.; Unestam T. 1987. Differential influence of ectomycorrhizae on plant growth and disease resistance in *Pinus sylvestris* seedlings. *J. Phytopathol* 120:104-120.
- Chalot M.; Javelle A.; Blaudez D.; Lambilliotte R.; Cooke R.; Sentenac H. ; Wipf D. ; Botton B. 2002. An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant and Soil* 244:165-175.
- Chen M.; Bastian A.; Taylor F.S.; Cairney W.G. 2003. Identification of laccase-like genes in ectomycorrhizal basidiomycetes and transcriptional regulation by nitrogen in *Piloderma byssinum*. *New Phytol* 157:547-554.
- Chu-Chou M. 1979. Mycorrhizal fungi of *Pinus radiata* in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* 11:557-562.
- Colpaert J.; Van Assche J.; Lijstens K. 1992. The growth of the extramatrical mycelium of ectomycorrhizal fungi and the growth response of *Pinus sylvestris* L. *New Phytol.* 120: 127-135.
- Colpaert J.V.; van Assche J.A. 1992. The effects of cadmium and the cadmium-zinc interaction on the axenic growth of ectomycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 145:237-243.

- Colpaert J.V.; van Assche J.A. 1987. Heavy metal tolerance in some ectomycorrhizal fungi. *Functional Ecology* 1:415-421.
- Colpaert J.V.; van Tichelen K.K.; van Assche J.A.; Van Laere A. 1999. Short-term phosphorus uptake rates in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots of intact *Pinus sylvestris* seedlings. *New Phytol.* 143:589-597.
- Colpaert J.V.; Vandenkoornhuyse P.; Adriaensen K.; Vangronsveld J. 2000. Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. *New Phytol* 147:367-379.
- Conell J.; Lowman M. 1989. Low diversity tropical rain forests: some possible mechanisms for their existence. *American Naturalist* 134:88-119.
- Cordell C.; Owen J.; Marx D.; Farley M. 1987. Ectomycorrhizal fungi: beneficial for mine land reclamation. In *Proceedings of the National Symposium on Mining, Hidrology, Sedimentology and Reclamation*, 7-11 Dec. 1987, Lexington, Ky. Office of Engineering Services, University of Kentucky, Lexington. pp. 217-224.
- Cullings K.W. 1996. Single phylogenetic origin of ericoid mycorrhizae within the Ericaceae. *Canadian Journal of Botany* 74:1896-1909.
- Curtis P.J. 1986. *Microtecnica vegetal*. Trillas. México D.F. 106 p.
- Danell E. 1999. *Cantharellus*. In: Cairney J.W.; Chamber S.M. (eds) *Ectomycorrhizal fungi.-Key genera and profile*. Springer, New York, pp 253-268.
- Danielsdon R. 1991. Temporal changes and effects of amendments on the occurrence of sheating (ecto-) mycorrhizal fungi of conifers growing in oil sands tailings and coal spoil. *Agricultural Ecosystems and Environment* 35: 261-281.
- Deacon J.; Donaldson S.; Last F. 1983. Sequences and interactions of mycorrhizal fungi on birch. *Plant and Soil* 71:257-262.
- Deacon J.; Fleming L. 1992. Interactions of ectomycorrhizal fungi. In: *Mycorrhizal Functioning. An Integrative Plant Fungal Process*. Allen M.; (ed.) Chapman and Hall, New York, N.Y. pp. 249-300.
- Deacon J.W.; Fox F.M. 1988. Delivery of microbial inoculants into the root zone of transplant crops. In: *Proc. Brighton Crop Protection Conference*, November 1988, Vol 2. pp 645-653. British Crop Protection Council, United Kingdom.

- Debaud C.D.; Gay G. 1987. *In vitro* fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. New Phytol 105:429-435.
- Dell B.; Malajzuk N.; Bougher N.L.; Thomson G. 1994. Development and function of *Pisolithus* and *Scleroderma* ectomycorrhizas formed in vivo with *Allocasuarina*, *Casuarina* and *Eucalyptus*. Mycorrhiza 5:129-138.
- Dickie I.A.; Koide R.T.; Steiner K.C. 2002. Influences of established trees on mycorrhizas, nutrition and growth of *Quercus rubrus* seedlings. Ecological Monographs 72(4):505-521.
- Dixon R. K.; Garrett H. E.; Stelzer H.E. 1987. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine progenies inoculated with three isolates of *Pisolithus tinctorius*. Consultado el 7 de abril de 2003 en <http://www.elsevier.com/inca/publications/store/>.
- Dixon R.; Garrett H.; Cox G.; Marx D.; Sander I. 1984. Inoculation of three *Quercus* species with eleven isolates of ectomycorrhizal fungi. I. Inoculation success and seedling growth relationships. For. Sci. 30: 364-372.
- Dixon R.; Pallardy S.; Garrett H.; Cox G.; Sander I. 1983. Comparative water relations of container-grown and bare-root ectomycorrhizal and non-mycorrhizal *Quercus vellutina* seedlings. Can. J. For. Res. 61: 1559-1565.
- Dixon R.K.; Hielhol F. 1992. Mineral nutrition of *Pinus caribaea* and *Eucalyptus camaldulensis* seedlings inoculated with *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris*. Communications in Soil Science and Plant Analysis 23:1387-1396.
- Dixon R.K.; Marx D.H. 1984. The role of mycorrhizae in forest biotechnology. In: Hanover J.; Kornosky D.; Keathley D. Proceedings in advances in Forest Biotechnology. Traverse, Mich. Pp. 126-138.
- Donahue J.; Lopez-Upton J. 1996. Geographic variation in leaf, cone and seed morphology of *Pinus greggii* in native forests. Forest Ecology and Management 82:145-157.
- Dosskey M.; Linderman R.; Boersma L. 1990. Carbon-sink stimulation of photosynthesis in Douglas fir seedlings by some ectomycorrhizas. New Phytol. 115:269-274.

- Dosskey M.G.; Boersma L.; Linderman R.G. 1991. Role for the photosynthate demand of ectomycorrhizas in the response of Douglas-fir seedlings to drying soil. *New Phytol.* 117:327-334.
- Duchesne L.; Campbell S.; Koehler H.; Peterson R.; Ellis B. 1989. Pine species influence suppression of *Fusarium* root rot by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Symbiosis* 7: 139-148.
- Duddridge J. 1989. Specificity and recognition in mycorrhizal associations. In: Pegg C.; Ayres P. *Fungal infection of plants*. University Press, Cambridge. pp. 25-44.
- Duddridge J.A; Malibari A.; Read D.J. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287:834-836.
- Duddridge J.A. 1985. Compatible and incompatible ectomycorrhizal hosts of *Suillus grevillei*. In: R. Molina (ed.), *Proc. 6th N. Amer. Conf. Myc.*, Oregon State University y U.S.D.A., Corvallis, Oregon.
- Duryea M.L. 1985. Evaluating seedling quality: principles, procedures and predictive abilities of major tests. Oregon State University, Corvallis: Forest Research Lab.
- Dutton M.V.; Evans C.S. 1996. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology* 42:881-895.
- Dvorak W.S. 2002. *Pinus greggii* Engelm ex Part. Tropical tree seed Manual. United States. Department of Agriculture. Forest Service. Pp 615-618.
- Dvorak W.; Kietzka J.; Donahue J. 1996. Three year survival and growth of provenances of *Pinus greggii* in the tropics and subtropics. *Forest Ecology and Management* 83: 123-131.
- Egerton-Warburton L.; Griffen B. 1995. Differential responses of *Pisolithus tinctorius* isolates to aluminium in vitro. *Can. J. Bot.* 73: 1229-1233.
- Endo M. 1994. CAMCORE: twelve years of contribution to reforestation in the Andean region of Colombia. *Forest Ecology and Management* 63: 219-233.
- Entry J.A.; Rygielwicz P.T.; Emmingham W.H. 1994. SR-90 uptake by *Pinus ponderosa* and *Pinus radiata* seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Environmental pollution* 86:201-206.

- Espigol R.; de Aragon J.; Fischer C. 1999. Commercial inoculation of *Pinus sylvestris* seedlings with *Hygrophorus latitabundus* Britz for reforestation. Universidad de Lleida, Lleida, Spain. Consultado en http://www.findarticles.com/cf_0/pl/name.html el 2 de mayo de 2003.
- Farjon A.; Styles B. 1997. *Pinus* (Pinaceae. Flora Neotropical Monograph 75. New York, N.Y.: The New York Botanical Garden.
- Farquhar M.; Peterson R. 1990. Early effects of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* on the root rot organism *Fusarium* associated with *Pinus resinosa*. Can. J. Bot. 68: 1589-1596.
- Feugey L.; Strullu D.G.; Poupard P.; Simoneau P. 1999. Induced defense responses limit Hartig net formation in ectomycorrhizal birch roots. New Phytol 144:541-547.
- Finlay R.; Read D. 1986. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. II. The uptake and distribution of phosphorus by mycelial strands interconnecting host plants. New Phytol. 103:157-185.
- Fitter A. 1977. Influence of mycorrhizal infection on competition for phosphorus and potassium by two grasses. New Phytol 103: 767-776.
- Fleming L. 1985. Experimental study of sequences of ectomycorrhizal fungi on birch (*Betula* spp.) seedling root systems. Soil Biol. Biochem. 17: 591-600.
- Florencio-Cruz O.; García-Martínez H. 1998. Contribución a la etnomicología de los hongos comestibles en Santa Catarina del Monte, Texcoco, Estado de México. Tesis Lic. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. 90 p.
- Fonseca F.; Louzada J. 1986. Variation in the density and differentiation of the wood of 14 spp of pine, eight years old, grown in Angola. Universidade de Tras-os-Montes e Alto Douro. Consultado en http://www.findarticles.com/cf_0/pl/name.html el 2 de mayo de 2003.
- Ford V.L.; Torbert J.L.; Burger J.A.; Millar O.K. 1985. Comparative effects of four ectomycorrhizal fungi on loblolly pine seedlings growing in a greenhouse in a Piedmont soil. Plant and Soil 83:215-222.
- French E.; Hebert T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. Serie de Libros y Materiales Educativos. No. 43. 277 p.

- Gagnon J.; Langlois C.G.; Fortin J.A. 1988. Growth and ectomycorrhiza formation of containerized black spruce seedlings as affected by nitrogen fertilization, inoculum type, and symbiont. *Can J. For Res* 18:922-929.
- Galli U.; Schüepp H.; Brunold C. 1994. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* 92:364-368.
- Garbaye J. 1994. Helper bacteria: A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128:197-210.
- García J.; Castillo J. 1981. Las especies de boletáceos y gomfidiáceos conocidos en Nuevo León. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 15:121-197.
- García-Jiménez J.; Pedraza-Kamino D.; Silva-Barron C.; Andrade-Melchor R.; Castillo-Tovar J. 1998. Hongos del Estado de Querétaro. Universidad de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales. Querétaro, Qro. 263 p.
- Garza O.F.; Arias M. R. 2001. Diversity of ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizae in forests of *Pinus culminicola* Andersen & Beaman in the state of Nuevo León, México. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Forestales. Nuevo León, México. Consultado en http://www.ohld.ag.utk.edu/mie/latest/icom3/icom3/ICOM3_garza.htm el 10 de febrero de 2003.
- Gibson F.; Deacon J. 1988. Experimental study of establishment of ectomycorrhizas in different regions of birch root systems. *Trans Br Myc Soc* 91: 239-251.
- Gea L.; Normand L.; Vian B.; Gay G. 1994. Structural aspects of ectomycorrhiza of *Pinus pinaster* (Ait.) Sol. Formed by an IAA-overproducer mutant of *Hebeloma cylindrosporum* Romagnési. *New Phytol* 128:659-670.
- Godbout C.; Fortin J.A. 1992. Effects of nitrogen fertilization and photoperiod on basidiome formation of *Laccaria bicolor* associated with container-grown jack pine seedlings. *Can J. Bot* 70:181-185.
- Gómez-Sánchez E.; González-Ochoa A.; Torres P.; De las Heras J.; Simarro E. 2002. Micorrización de plantas de *Pinus halepensis*, *Pinus pinaster* y *Quercus ilex* Subs. *ballota* para repoblación de zonas incendiadas de escasa regeneración natural. Publ. Departamento de Biología Vegetal, Universidad Miguel Hernández. Facultad de Ciencias Ambientales. Alicante, España. Consultado en <http://www.mycorrhiza.ag.utk.edu/> el 2 de mayo de 2003.

- González C.J. 1997. Diversidad de hongos silvestres comestibles en un bosque de coníferas (*Abies religiosa*), en el Oriente del Valle de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Agroecología. Chapingo, México. 120 p.
- González R. 1981. Ecología humana y etnobotánica de un pueblo campesino de la Sierra Nevada, Mex. Santa Catarina del Monte. Tesis Lic. UNAM. Fac. de Ciencias. México, D.F. 250 p.
- Goodman D.; Trofymow J. 1998. Comparison of communities of ectomycorrhizal fungi in old-growth and mature stands of Douglas fir at two sites on southern Vancouver Island. *Can J For Res* 28: 574-581.
- Grand L.F.; Harvey A.E. 1984. Quantitative measurement of ectomycorrhizae on plant roots pp 157-164. In: Schenk N.C. (ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research* 2nd ed. The American Phytopathological Society. St Paul Minnesota.
- Griffioen W.A.J.; Letswaart J.H.; Ernst W.H.O. 1994. Mycorrhizal infection of an *Agrostis capillaries* population on a copper contaminated soil. *Plant and Soil* 158:83-89.
- Grove T.S. ; Le Tacon F. 1993. Mycorrhiza in plantation forestry. *Advances in Plant Pathology* 9:191-227.
- Gutierrez G.B. 1998. Efecto de la asociación de *Pinus patula* con *Alnus firmifolia*. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados, Montecillo, México.
- Guzman G.; Villarreal L. 1984. Estudio sobre los hongos, líquenes y mixomicetos del Cofre de Perote, Veracruz, I.: Introducción a la micoflora de la región. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 19: 107-124.
- Hall I.R.; Wang Y. 1998. Commercial production of *Tuber melanosporum* in New Zealand. Abstracts of the Second International Conference on Mycorrhiza. Uppsala, Sweden, 5-10 July, pp 77-78. Consultado en <http://www.ohld.ag.utk.edu/mie/latest/icom2/icom2/ICOM2> el 12 de febrero de 2003.
- Hampp R.; Wiese J.; Mikolajewski S.; Nehls U. 1999. Biochemical and molecular aspects of C/N interaction in ectomycorrhizal plants: an update. *Plant and Soil* 215:103-113.
- Harley J. 1989. The fourth Benefactor's. The significance of mycorrhiza. *Mycol* 92:129-139.

- Harley J.; Smith S. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. London, UK. pp. 66-72.
- Harris D.; Pacovski R.; Paul E. 1985. Carbon economy of soybean-*Rhizobium*-*Glomus* associations. *New Phytol.* 101: 427-440.
- Harrison M. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 50:361-389.
- Hartnett D. 1999. Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tallgrass prairie. *Journal of Ecology* 81: 787-795.
- Harvey A.; Larsen M.; Jorgensen M. 1976. Distribution of ectomycorrhizae in a mature Douglas-fir/Larch forest soil in Western Montana. *For. Sci.* 22: 393-397.
- Hatchell G.; Marx D. 1987. Response of longleaf, sand, and loblolly pines to *Pisolithus* ectomycorrhizae and fertilizer on a sandhills site in South Carolina. *For. Sci.* 33:301-315.
- Herrera T.; Guzmán G. 1961. Taxonomía y ecología de los principales hongos comestibles de diversos lugares de México. Universidad Autónoma de México. *An. Inst. Biol.* 32:33-135.
- Hibbett D.S.; Gilbert L.B.; Donoghue M.J. 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* 407:506-508.
- Honrubia T. 1994. Inoculation of containerized *Pinus halepensis* (Miller) seedlings with basidiospores of *Pisolithus arrhizus* (Pers.) Rauschert, *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th M Fr and *Suillus collinitus* (Fr) O Kuntze. *Annales des Sciences Forestieres* 51:521-528.
- Honrubia M.; Díaz G.; Gutierrez A. 1997. Micorrización controlada de *Pinus halepensis* en vivero en función de la dosis de inóculo y técnica de cultivo. *Actas II Congreso Forestal Español. I Congreso Forestal Hispano-Luso. IRATI 97. Mesa 3.*
- Honrubia M.; Torres P.; Díaz G.; Cano A. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. ICONA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. LUDECME VIII. Monografías 54.
- Hua X.M.; Cordell C.E.; Stambaugh W.J. 1991. Sinthesis of *Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizae and growth responses on some commercially important Chinese tree species. *Forest Ecology and Management* 42:283-292.

- Hu-Hung T. 1996. Pure culture synthesis of *Cyclobanopsis glauca* (Thunb.) Oerst and *Boletus edulis* Bull. Ex Fr. and effects on seedlings growth after symbiosis. Consultado en el 21 de agosto de 2003 <http://www.20023.134.7:8590.nextform=print.htm&sp.usernumber.p=249917&sp.search> .
- Hung L.L.; Sylvia D.M.; O'keefe D.M. 1990. Isolate selection and phosphorus interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in biomass crops. Soil Sci. Soc. Am. J. 54:762-768.
- Hutchison L.J.; Piche U. 1995. Effects of exogenous glucose on mycorrhizal colonization in vitro early-stage and late-stage ectomycorrhizal fungi. Can J Bot 73:898-904.
- Imo M.; Timmer V.R. 1998. Vector competition analysis: a new approach to evaluate vegetation control methods in young black spruce plantations. Can. J. Soil Sci. 78:3-15.
- Isaac S. 1992. Fungal-plant interactions. Chapman & Hall, Cambridge, UK.
- Jakobsen I.; Abbott L.K.; Robson A.D. 1992. The spread of external hyphae of VA mycorrhizas through root-free soil. In: North American Conference on mycorrhizae, 8., 1990, Laramie, Abstracts of the eight North American Conference on mycorrhizae, edited by M.F. Allen y S.E. Williams. Laramie, University of Wyoming, p. 152.
- Janos D. 1980. Mycorrhizae influence tropical succession. Biotropica 12:56-64.
- Jarstfer A.G.; Sylvia D.M. 1992. Inoculum production and inoculation strategies for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Metting B., ed. Soil microbial ecology: applications in agriculture and environmental management. New York, Marcel Dekker, p. 349-377.
- Jeffries P. 1987. Use of mycorrhizae in agriculture. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 5:319-357.
- Jentschke G.; Goldbold D.L. 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. Physiologia Plantarum 109:107-116.
- Johnson N.C.; Graham J.H.; Smith F.A. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. New Phytol 135:575-586.
- Jonasson S.; Shaver G.R. 1999. Within-stand nutrient cycling in arctic and boreal wetlands. Ecology 80:2139-2150.

- Jongmans A.G. ; van Breemen N. ; Lundström U.; Finlay R.D.; van Hees P.A.; Giesler R.; Melkerud P.A. ; Olsson M.; Srinivasan M. ; Unestam T. 1887. Rock-eating fungi. *Nature* 389:683-684.
- Kariuki J. 1998. Provenance and family within provenance variation in *P. patula*, *P. patula* subspecies *tecunumanii* and *P. oocarpa* planted at Turbu, Kenya. *Forest Ecology and Management* 107: 127-133.
- Khalil S.; Labuschagne N.; Wingfield M.J. 1999. *Pinus patula* establishment problem associated with poor ectomycorrhizal development in previously cultivated soils. Consultado en <http://www.elsevier.com.inca/publications/> CAB Abstracts el 10 de febrero de 2003.
- Khan A.G.; Kuek C.; Chaudhry T.M.; Khoo C.S.; Hayes W.J. 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41:197-207.
- Kietzka J.; Denison N.; Dvorak W.; Dieters M.; Matheson A.; Nikles D.; Walker S. 1996. Tree improvement for sustainable tropical forestry. QFRI-IUFRO Conference, Caloundra, Queensland, Australia, 27 October -1 November 1996. 1:42-45.
- Klironomos J.N.; McCune J.; Hart M.; Neville J. 2000. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. *Ecology Letters* 3:137-141.
- Kope H.; Warcup J. 1986. Synthesized ectomycorrhizal associations of some Australian herbs and shrubs. *New Phytol.* 104: 591-599.
- Kope H.H.; Tsantrizos Y.S.; Fortin J.A.; Ogilvie K.K. 1991. Para-hydroxybenzoylformic acid and (R)-(-)-para-hydroxymandelic acid, 2 antifungal compounds isolated from the liquid culture of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arrhizus*. *Canadian Journal of Microbiology* 37:258-264.
- Kothe E.; Muller D.; Krause K. 2002. Different high affinity phosphate uptake systems of ectomycorrhizal *Tricholoma* species in relation to substrate specificity. *Journal of Applied Botany* 76:127-132.
- Kottke I.; Oberwinkler F. 1986. Mycorrhiza of forest trees – structure and function. *Trees* 1:1-24.

- Kranabetter M.; Friesen J. 2004. Morphotype descriptions of common ectomycorrhizae fungi. Consultado el 2 de marzo del 2004 en http://www.for.gov.bc.ca/rni/research/Date_Creek/Mycorrhizae_table/Mycorrhizae.htm).
- Kretzer A.M.; Bidartondo M.I.; Grubisha L.C.; Spatafora J.W.; Szaro T.M.; Bruns T.D. 2000. Regional specialization of *Sarcodes sanguinea* (Ericaceae) on a single fungal symbiont from the *Rhizopogon ellena* (Rhizopogonaceae) species complex. American Journal of Botany 87:1778-1782.
- Kropp B.R.; Langlois C.G. 1990. Ectomycorrhizae in reforestation. Can. J. For. Res. 20:438-451.
- Le Tacon F.; Garbaye J.; Bouchard J. 1988. Canadian workshop and Mycorrhizae in Forestry In: Lalone M. ; Piche Y. eds. CRBF. Faculté de Foresterie et de Géodésie. Université Laval, Ste-Foy, Quebec, pp. 51-74.
- Le Tacon F.; Jung G. ; Mugnier J. ; Michelot P. ; Mauperin C. 1985. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produce in a fermentor and entrapped in polymeric gels. Can.J.Bot. 63:1664-1668.
- Leake J.; Shaw G.; Read D. 1989. The role of ericoid mycorrhizas in the ecology of ericaceous plants. Agriculture, Ecosystems and Environment 29:237-250.
- León G.; Guzmán G. 1980. Las especies de hongos micorrízicos conocidas en la Región de Uxpanapa-Coatzacoalcos-Los Tuxtlas-Papaloapan-Xalapa. Bol. Soc. Mex. Mic. 14:27-38.
- Leyval C.; Turnau K.; Haselwandter K. 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. Mycorrhiza 7:139-153.
- Lincoff G. H. 1984. The Audubon Society Field Guide to North American Mushrooms. Knopf Inc. New York. 126 p.
- Lupwayi N.; Olsen P.; Sande E.; Keyser H.; Collins M.; Singleton P.; Rice W. 2000. Inoculant quality and its evaluation. Field Crops Research 65:259-270.
- Lu-Quan; Lei-ZengPu; Lu-Q. ; Lei-ZP. 2000. A study of the effect of ectomycorrhizae on promoting *Castanea mollissima* resistance to drought an its mechanism. Consultado en línea el 21 de agosto de 2003 en

- Malajczuk N.; Lapeyrie F.; Garbaye J. 1990. Infectivity of pine and eucalypt isolates of *Pisolithus tinctorius* on roots of *Eucalyptus urophylla* in vitro. New Phytol. 114:627-631.
- Marks G.; Foster R. 1973. Structure, morphogenesis and ultrastructure of ectomycorrhizae. In: Marks G.; Koslowski T. eds. Ectomycorrhizae London and New York. Academic Press pp. 1-41.
- Martin F.; Rubini P.; Côte R.; Kottke I. 1994. Aluminium polyphosphate complexes in the mycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*: A ^{27}Al nuclear magnetic resonance study. Planta 194:241-246.
- Martino E.; Franco B.; Piccoli G.; Stocchi G.; Perotto S. 2002. Influence of zinc ions on protein secretion in a heavy metal tolerant strain of the ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius*. Molecular and Cellular Biochemistry 231:179-185.
- Martino E.; Perotto S.; Parsons R.; Gadd G.M. 2003. Solubilization of insoluble inorganic zinc compounds by ericoid mycorrhizal fungi derived from heavy metal polluted sites. Soil Biology and Biochemistry 35:133-141.
- Marx D.H.; Cordell C.E. 1989. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In: Whipps J.; Lumsen P. Biotechnology of fungi to improve plant growth. University press. Cambridge pp. 1-21.
- Marx D.H.; Cordell C.E.; Kenney D.S.; Mexal J.G.; Artman J.D.; Riffle J.W.; Molina R.J. 1984. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on bare-root tree seedlings. Forest Sc. Monograph 25:1-101.
- Marx D.H.; Kenney D.S. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Ed. N.C. Schenk. Pp 131-146. American Society of Pathology, St. Paul.
- Marx D.H.; Ruehle J.L.; Cordell C.E. 1991. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. Methods in Microbiology 23:383-411.

- Mason P.; Wilson J.; Last F.; Walker C. 1983. The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soils. *Plant and Soil* 71: 247-256.
- Mauperin Ch.; Mortier F.; Garbaniye J.; Le Tacon F.; Carr G. 1987. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. *Can. J. Bot.* 65:2326-2329.
- McAfee B.J.; Fortin J.A. 1986. Competitive interactions of ectomycorrhizal mycobionts under field conditions. *Can. J. Bot.* 64:848-852.
- McLaughlin D.J. 1970. Environmental control of fruit-body development in *Boletus rubinelus* in axenic culture. *Mycologia* 63:307-311.
- Meyer F. 1973. Distribution of ectomycorrhizae in native and man made forest. In: Marks G.; Kozlowski T. (eds.) *Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology*. Academic Press. New York.
- Mikola P. 1988. Ectendomycorrhiza of conifers. *Silva Fennica* 22:19-27.
- Miller O. 1984. Taxonomy of ecto and ectendomycorrhizal fungi. In: N.C. Schenk (ed) *Methods and principles of mycorrhizal research*. 2a. ed. The American Phytopathological Society, Saint Paul, Minnesota, U.S.A. pp. 91-102.
- Miller R.; Jastrow J. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure, pp 3-18. In: *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Eds. Kapulnichick Y.; Douds D. Kluwer Academic Press.
- Miller S.; Allen E. 1992. Mycorrhizae, nutrient translocation and interactions between plants. In: Allen M. (ed). *Mycorrhizal functioning*. Chapman and Hall Inc. New York pp. 301-322.
- Miller S.L.; Durall D.M.; Rygiewicz P.T. 1989. Temporal allocation of ¹⁴C to extramycelial hyphae of ectomycorrhizal ponderosa pine seedlings. *Tree Physiol* 5:239-249.
- Miller S.L.; McClean M.; Stanton L.N.; Williams S. 1998. Mycorrhization physiognomy and first-year survivability of conifer seedlings following natural fire in Grand Teton National Park. *Can. J. For. Res.* 28:115-122.
- Mishra M.; Mahapatra D.; Nisanka S. 1997. Comparative dimensional analysis of plantations of five pinus at Katinga Hills of Orissa. Consultado el 23 de mayo de 2003 en http://www.findarticles.com/cf_0/name.html.

- Mohan V. 1991. Studies on ectomycorrhizal association in *Pinus patula* Schlecht & Cham. plantations in the Nilgiri Hills, Tamilnadu. PhD thesis, University of Madras.
- Mohan V.; Natarajan K.; Ingleby K. 1993. Anatomical studies on ectomycorrhizas. I. The ectomycorrhizas produced by *Telephora terrestris* on *Pinus patula*. *Mycorrhiza* 3:39-42.
- Mohan V.; Natarajan K.; Ingleby K. 1993b. Anatomical studies on ectomycorrhizas. I. The ectomycorrhizas produced by *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata* and *Suillus brevipes* on *Pinus patula*. *Mycorrhiza* 3:43-49.
- Mohan V.; Natarajan K.; Ingleby K. 1993c. Anatomical studies on ectomycorrhizas. I. The ectomycorrhizas produced by *Rhizopogon luteolus* and *Scleroderma citrinum* on *Pinus patula*. *Mycorrhiza* 3:43-49.
- Molina R. 1979. Pure culture synthesis and host specificity of red alder mycorrhizae. *Can. J. Bot.* 57: 1223-1228.
- Molina R.; Massicotte H.; Trappe J. 1991. Ecological role of specificity phenomena in ectomycorrhizal plant communities: Potentials for interplant linkages and guild development. In: Read D.J.; Lewis D.H.; Fitter A.H.; Alexander I.J. (eds) *Mycorrhizas in Ecosystems*. CAB International, Oxford, pp. 106-112.
- Molina R.; Massicotte H.; Trappe J. 1992. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In *Mycorrhizal functioning, an integrative plant-fungal process*. Edited by M.F. Allen. Chapman & Hall, New York. Pp. 301-332.
- Molina R.; Palmer J. 1991. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi In: Schenk N. (ed.) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. APS Press. University of Florida. pp. 115-130.
- Molina R.; Trappe J. 1982. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potencial among Pacific Northwest conifers and fungi. *For. Sci.* 28: 423-458.
- Molina R.; Trappe J. 1984. Mycorrhiza management in bareroot nurseries. In: Duryea M.; Landis T., eds. *Forest Nursery Manual: Production of bareroot seedlings*. Junk The Hague, pp. 35-67.

- Molina R.; Trappe J.M. 1994. Biology of the ectomycorrhizal genus *Rhizopogon*. I. Host associations, specificity and pure culture syntheses. *New Phytol* 126:653-675.
- Moreno-Zarate C. 1990. Los hongos comestibles: Un componente de la productividad del bosque de Santa Catarina del Monte, Méx. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 133 p.
- Morton J.B.; 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature and identification. *Mycotaxon* 32:267-324.
- Morton J.B.; Redecker D.J. 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new general *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93:181-195.
- Moyersoen B.; Becker P.; Alexander I.J. 2001. Are ectomycorrhizas more abundant than arbuscular mycorrhizas in tropical heath forests? *New Phytol.* 150:591-599.
- Mutarelli F. 1988. Mensurational development of the forest plantations of Misiones province. *Forest Ecology and Management* 62: 260-263.
- Nara K.; Nakaya H.; Hogetsu T. 2003. Ectomycorrhizal sporocarp succession and production during early primary succession on Mount Fuji. *New Phytol.* 158:193-206.
- Natarajan K.; Mohan V.; Ingleby K. 1992. Correlation between basidiomata production and ectomycorrhizal formation in *Pinus patula* plantations. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 279-280.
- Nehls U.; Hampp R. 2000. Carbon allocation in ectomycorrhizas. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57:95-100.
- Neil P. 1991. A role for *Pinus maximinoi* and *P. greggii* in Nepal's afforestation efforts. *Commonwealth Forestry Review* 70:191-200.
- Nelsen C. 1987. The water relations of vesicular-arbuscular mycorrhizal systems. In: "Ecophysiology of VA mycorrhizal plants" (ed. Safir G.) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, pp. 71-91.
- Nelsen C.; Safir G. 1982. Increased drought tolerance of mycorrhizal plants caused by improved phosphorus nutrition. *Planta* 154:407-413.

- Nylund J.; Wallander H. 1989. Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in semi-hydroponic cultivation system. *New Phytol* 112:389-398.
- O'Keefe D.; Sylvia D. 1991. Mechanism of the vesicular-arbuscular mycorrhizal plant growth response. In: Arora D.; Rai B.; Mukerji K.; Knudsen G. eds. *Handbook of applied mycology*. New York, Marcel Dekker. P. 35-53.
- O'Neill J.; Mitchell D. 2000. Effects of benomyl and captan on growth and mycorrhizal colonization of Sitka-Spruce (*Picea sitchensis*) and ash (*Fraxinus excelsior*) in Irish nursery soil. *Forest Pathology* 30:165-174.
- Ohta A. 1994. Production of fruit-bodies of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*, in pure culture. *Mycoscience* 39:15-19.
- Ohta A. 1998. Fruit-body production of two ectomycorrhizal fungi in the genus *Hebeloma* in pure culture. *Mycoscience* 39:15-19.
- Olsen P.; Rice W.; Bordeleau L.; Biederbeck V. 1994. Analysis and regulation of legume inoculant in Canada: The need for and increase in standards. *Plant and Soil* 161:127-134.
- Palfner G. 2001. Taxonomische studien an Ektomycorrhizen aus den Nothofagus-Wäldern Mittelsüdchiles. *Bibliotheca Mycologica Band 190*. Berlin-Stuttgart. 245 p.
- Parladé J.; Alvarez I. 1993. Coinoculation of aseptically grown Douglas-fir with pairs of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 3:93-96.
- Parladé J.; Cohen M.; Doltra J.; Luque J.; Pera J. 2001. Continuous measurement of stem-diameter growth response of *Pinus pinea* seedlings mycorrhizal with *Rhizopogon roseolus* and submitted to two water regimes. *Mycorrhiza* 11:129-136.
- Parladé J.; Pera J.; Álvarez I. 1996. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6:237-245.
- Perez-Moreno J. 1995. La simbiosis ectomicorrízica y su importancia ecológica. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. Pp. 20-34.
- Pérez-Moreno J. 1992. Aspectos ecológicos; aislamiento de cepas, síntesis de micorriza y pruebas "in vitro" contra patógenos de diversos hongos ectomicorrízicos del Parque Nacional Zoquiapan, Edo. De México. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.

- Pérez-Moreno J.; Ferrera-Cerrato R.; Pérez-Silva E.; García-Espinoza R. 1993. Ecología de diversos macromicetos ectomicorrízicos del Parque Nacional Zoquiapan, Estado de México. *Agrociencia Serie Recursos Naturales Renovables* vol. 3, No. 3. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- Pérez-Moreno J.; Read D. 2000. Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytol.* 145:301-309.
- Pérez-Silva E.; Herrera-Suárez T. 1991. Iconografía de Macromicetos de México. I. Amanita. Publicación especial No. 6. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 136 p.
- Perotto S.; Girlanda M.; Martino E. 2002. Ericoid mycorrhizal fungi: some new perspectives on old acquaintances. *Plant and Soil* 244:41-53.
- Perotto S.; Peretto R.; Faccio A.; Schubert A.; Varma A.; Bonfante P. 1995. Ericoid mycorrhizal fungi- cellular and molecular bases of their interactions with the host plant. *Can J Bot* 73:557-568.
- Perry D.; Amaranthus M.; Borchers J.; Borchers S.; Brainerd R. 1989. Bootstrapping in ecosystems. *Bioscience* 39:230-237.
- Perry D.; Margolis H.; Choquette C.; Molina R.; Trappe J. 1992. Mycorrhizal fungi in mixed-species forests and other tales of positive feedback, redundancy and stability. In: *The ecology of mixed species stands of trees*. Edited by M.G.R. Cannell; D.C. Malcom, and P.A. Robertson. Br. Ecol. Soc. Spec. Publ. 11 University Press, Cambridge. Pp. 151-179.
- Perry J. 1991. *The pines of México and Central América*. Portland, Oregon. Timber Press. Pp. 166-168.
- Peterson R.; Farquhar M. 1994. Mycorrhizas integrated development between roots and fungi. *Mycologia* 86: 311-326.
- Phillips P. 2003. An economic assesment of the global inoculant industry. University of Saskatchewan. In: *Great Plains Inoculant Forum*, March 27-28, Saskatoon, Saskatchewan, Norteamérica-Australia. Consultado el 16 de abril de 2003 en http://www.inoculants.com/encyclopedia_1.html.
- Pirozynski K. 1981. Interactions between fungi and plants through the ages. *Can J Bot* 59: 1824-1827.

- Plancarte B. 1988. Seed yield from two provenances of natural stands of *Pinus greggii*. Nota Técnica – Centro de Genética Forestal A.C. No. 2.
- Plancarte B. 1990. Variation in cone length and seed weight in *Pinus greggii* from three provenances in Hidalgo and Querétaro. Nota Técnica – Centro de Genética Forestal A.C. No. 4.
- Quoreshi A.M.; Timmer V.R. 2001. Early outplanting performance of nutrient-loaded containerized black spruce seedlings inoculated with *Laccaria bicolor*: a bioassay study. Can. J. For. Res. 30:744-752.
- Rasmussen H.N. 2002. Recent developments in the study of orchid mycorrhiza. Plant and Soil 244:149-163.
- Read D. J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. Experientia 47:376-391.
- Read D.; Leake J.; Langdale A. 1989. The nitrogen nutrition of mycorrhizal fungi and their host plants. P. 181-204. In: L. Boddy; R. Marchant; D. Read (ed) Nitrogen, phosphorus and sulfur utilization by fungi. Cambridge University Press, New York.
- Read D.J. 1992. The mycorrhizal mycelium. In Mycorrhizal Mycelium: an Integrative Plant Fungal Process (Ed. M.J. Allen). pp. 102-133. Chapman & Hall, New York.
- Read D.J.; Perez-Moreno J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? New Phytol. 157:475-492.
- Rice W.; Lupwayi N.; Clayton G. 2003. Maintaining Inoculant Quality Standards. Lacombe Research Centre, Alberta, Canada. Consultado el 16 de abril de 2003 en http://www.inoculants.com/encyclopedia_1.html.
- Rincón A.; Alvarez I.; Pera J. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 11:265-271.
- Rincón A.; Alvarez I.F.; Pera J. 1999. Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinea* L. in northeastern Spain. Mycorrhiza 8:271-276.
- Rosado S.C.; Kropp B.R.; Piché Y. 1993. Genetics of ectomycorrhizal symbiosis: 2. Fungal variability and heritability of ectomycorrhizal characteristics. New Phytol. 126:105-110.

- Ross E.; Marx D. 1972. Susceptibility of sand pine to *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 62: 1197-1200.
- Rossi M.J.; Souza J.A.; Oliveira V.L. 2002. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift biorreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:175-181.
- Rousseau J.; Sylvia D.; Fox J. 1994. Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytol.* 128:639-644.
- Ruehle J.; Marx d. 1979. Fiber, food, fuel and fungal symbionts. *Science* 206: 419-422.
- Ruiz-Lozano J.; Azcón R.; Gómez M. 1995. Effects of arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerant: Physiological and nutritional plant responses. *Applied and Environmental Microbiology* 61:456-461.
- Salzer P.; Hager A. 1993. Effect of auxins and ectomycorrhizal elicitors on wall bound proteins and enzymes of spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) cells. *Trees* 8:49-55.
- Salzer P.; Reith A.; Zitterell-Haid B.; Stransky H.; Gaschler K.; Hager A. 1996. Rapid reactions of spruce cells to elicitors released from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*, and inactivation of these elicitors by extracellular spruce enzymes. *Planta* 198:118-126.
- Salzer P.; Hebe G.; Hager A. 1997. Cleavage of chitinous elicitors from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme* by host chitinases prevents induction of K^+ and Cl^- reselase, extracellular alkalinization and synthesis of *Picea abies* cells. *Planta* 203:470-479.
- Santiago-Martínez G.; Estrada-Torres A.; Varela L.; Herrera T. 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia* 37:575-584.
- Santillan P.J. 1991. Silvicultura de las coníferas de la región central. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
- Scagel C.F.; Linderman R.G. 1998. Relationships between differential *in vitro* indole-acetic acid or ethylene production capacity by ectomycorrhizal fungi and conifer seedling responses in symbiosis. *Symbiosis* 24:13-34.
- Scales P.F.; Peterson R.L. 1991. Structure and development of *Pinus banksiana*-*Wilcoxina* ectendomycorrhizae. *Can J Bot* 69:2135-2148.

- Schier G.A.; McQuattie C.J. 1996. Response of ectomycorrhizal and nonmycorrhizal pitch pine (*Pinus rigida*) seedlings to nutrient supply and aluminium : growth and mineral nutrition. Can. J. For. Res. 26:2145-2152.
- Schüßler A.; Schwarzott D.; Walker C. 2001. A new fungal phylum, the Glomeromycota phylogeny and evolution. Mycological Research 105:1413-1421.
- Selosse M.; Bouchard D.; Martin F.; Le Tacon F. 1999. Effect of *Laccaria bicolor* strains inoculated on Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) several years after nursery inoculation. Can. J. For. Res. 30: 360-371.
- Shirkot P.; Bhardwaj S.; Sharma D.; Shirkot C. 2001. Effect of *Pisolithus tinctorius* on seed germination and growth of *Pinus roxburghii* Sargent seedlings. Consultado el 12 de marzo de 2003 en <http://www.cabdirectsearch.org/cabdin/bwframesaction/193.63.84.11/>.
- Simard W.; Molina R.; Smith E.; Perry D.; Jones M. 1997. Shared compatibility of ectomycorrhizae on *Pseudotsuga menziesii* and *Betula papyrifera* seedlings grown in mixture in soils from southern British Columbia. Can. J. For. Res. 27: 331-342.
- Simon L.; Bousquet J.; Levesque R.; Lalonde M. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. Nature 363:67-69.
- Sinclair W.; Sylvia D.; Larsen A. 1982. Disease suppression and growth promotion in Douglas-fir seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata*. For. Sci. 28: 191-201.
- Smith S. 2003. Look Back and Forward. In: Great Plains Inoculant Forum. Consultado en http://www.inoculants.com/encyclopedia_1.html el 16 de abril de 2003.
- Smith S.; Read D. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd Edition. Academic Press, San Diego.
- Smith H.; Coutinho T.; Wolfaardt F.; Wingfield M. 2002. Relative susceptibility of northern and southern provenances of *Pinus greggii* to infection by *Sphaeropsis sapinea*. Forest Ecology and Management 166: 331-336.
- Stahl P.; Willians S.; Christensen M. 1988. Efficacy of native vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after severe soil disturbance. New Phytol. 110: 347-354.

- Stahl P.; Smith W. 1984. Effects of different geographic isolates of *Glomus* on the water relations of *Agropyron smithii*. *Mycologia* 76: 261-267.
- Sudhakara-Reddy; Natarajan K. 1997. Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza* 7: 133-138.
- Sudhakara-Reddy M.; Natarajan K. 1996. In vitro ectomycorrhizal formation of *Pinus patula*, *P. pseudostrobus*, *P. oocarpa* and *P. elliotii* grown in southern India. *New Forests* 11:149-153.
- Sun Y.P.; Unestam T.; Lucas S.D.; Johansson K.J.; Kenne K.J.; Finaly R. 1999. Exudation-reabsorption in a mycorrhizal fungus, the dynamic interface for interaction with soil and other microorganisms. *Mycorrhiza* 9:137-144.
- Sundaran S.; Kim S.J.; Suzuki H.; Mcquattie C.J.; Hiremath S.T.; Podila G.K. 2001. Isolation and characterization of a symbiosis-regulated ras from the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:618-628.
- Sylvia D. 1990. Inoculation of native woody plants with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for phosphate mine soil. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 31:252-261.
- Sylvia D. 1994. Vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. In: Weaver R. et al. eds. *Methods of soil analysis Part 2. Microbiological and biochemical properties*. Soil Science Society of America, Madison, pp. 351-378.
- Sylvia D.; Wilson D.; Graham J.; Maddox J.; Millner P.; Morton J.; Skipper H.; Wright S.; Jarstfer A. 1993. Evaluation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in diverse plants and soils. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 705-713.
- Sylvia D; Fuhrmann J.; Hartel P.; Zuberer D. 1998. *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall. Upper Saddle River.
- Tam P.C. 1994. Mycorrhizal associations in *Pinus massoniana* Lamb. and *Pinus elliotii* Engel. inoculated with *Pisolithus tinctorius*. Consultado el 16 de abril de 2003 en <http://www.elsevier.com/inca/publications/>.
- Tarkka M. 2000. Developmentally regulated proteins in *Pinus sylvestris* roots and ectomycorrhiza. Academic dissertation. University of Helsinki. Pp. 1-15. Consultado el 26 de marzo de 2003 en <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/mat/bioti/vk/tarkka/ch1.html>.

- Thomson B.D.; Grove T.S.; Malajczuk N.; Hardy G. 1994. The effectiveness of ectomycorrhizal fungi in increasing the growth of *Eucalyptus globulus* Labill in relation to root colonization and hyphal development in soil. *New Phytol* 126:517-524.
- Thomas G.W.; Jackson R.M. 1979. Sheathing mycorrhizae of nursery grown *Picea sitchensis*. *Trans Br Mycol Soc* 73:117-125.
- Torres P.; Honrubia M. 1994. Inoculation of containerized *Pinus halepensis* (Miller) seedlings with basidiospores of *Pisolithus arrhizus* (Pers) Rauschert, *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th M Fr and *Suillus collinitus* (Fr) O Kuntze. *Annales Des Sciences Forestieres* 51:521-528.
- Trappe J. 1962. Fungus associates of ecotrophic mycorrhizae. *Bot. Rev.* 28:528-606.
- Trappe J. 1964. Mycorrhizal hosts and distribution of *Cenococcum graniforme*. *Lloydia* 27:100-106.
- Trappe J. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15: 203-222.
- Trappe J.M.; Luoma D. 1992. The ties that bind: fungi in ecosystems. In: *The mycorrhizal fungal community: its role in the ecosystem*. Edited by G.C. Carroll; D.T. Wicklow. 2nd ed. Marcel Dekker, New York. Pp. 17-27.
- Turnau K.; Mleczko P.; Blaudez D.; Chalot M.; Botton B. 2002. Heavy metal binding properties of *Pinus sylvestris* mycorrhizas from industrial wastes. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 71:253-261.
- Turnau K.; Przybylowicz W.J.; Mesjasz-Przybyowicz J. 2001. Heavy metal distribution in *Suillus luteus* mycorrhizas –as revealed by micro-PIXE analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* 181:649-658.
- Unestam T.; Sun Y.P. 1995. Extramatrical structures of hydrophobic and hydrophilic ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 5:301-311.
- van der Heijden E.; Kuyper T. 2001. Does origin of mycorrhizal fungus or mycorrhizal plant influence effectiveness of the mycorrhizal symbiosis?. *Plant and Soil* 230:161-174.

- Van der Heijden M.; Klironomos J.; Ursic M.; Moutoglis P.; Streitwolf-Engel R.; Boller T.; Wiemken A.; Sanders I. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69-72.
- Varela L.; Estrada T. 1997. Diversity and potential use of mycorrhizae for sustainable development in México. In: Palm M.E.; Chapela Y.P. (eds). *Mycology in sustainable development. Expanding concepts, vanishing borders*. Parkway Publishers Inc. North Carolina.
- Vela G.L. 1980. Contribución a la ecología de *Pinus patula* Schl et Cham. Pub. Esp. No. 19. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, México, D.F.
- Villarreal L.; Pérez-Moreno J. 1989. Wild edible fungi from México, an integral approach. *Micol. Neotrop. Appl.* 2:77-114.
- Villarreal R.L. 1996. Los hongos silvestres: Componente de la biodiversidad y alternativas para la sustentabilidad de los bosques templados de México. Proyecto: Informe final. Colegio de Postgraduados. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Montecillos, México. 130 p.
- Villeneuve N.; Le Tacon F.; Bouchard D. 1990. Ectomycorrhizal colonization and comparative effects of inoculated *Laccaria bicolor* and naturally occurring fungi on growth of out planted Douglas fir seedlings In: Allen M.; Williams S. (comp.) 8th North American Conference on Mycorrhizae. University of Wyoming. 294 p.
- Vincenti O. 1989. An example of forest management: pine plantations at Dalaba in Guinea. *Lettre du Reseau Arbres Tropicaux* 12: 14-17.
- Visser S. 1995. Ectomycorrhizal fungal succession in jack pine stands following wildfire. *New Phytol.* 129: 389-401.
- Walker R.; West D.; Mclaughlin S.; Amundsen C. 1989. Growth, xylem pressure potential, and nutrient absorption of loblolly pine on a reclaimed surface mine as affected by an induced *Pisolithus tinctorius* infection. *For. Sci.* 35:569-581.
- Walker R.F. 2001. Growth and nutritional responses of containerized sugar and Jeffrey pine seedlings to controlled release fertilization and induced mycorrhization. *Forest Ecology and Management* 149:163-179.
- Wallander H.; Mahmood S.; Hagerberg D.; Johansson L.; Pallon J. 2003. Elemental composition of ectomycorrhizal mycelia identified by PCR-

- RFLP analysis and grown in contact with apatite or wood ash in forest soil. *Fems Microbiology Ecology* 44:57-65.
- Wallenda T.; Read D. 1999. Kinetics of amino acid uptake by ectomycorrhizal roots. *Plant Cell Environ.* 22:179-187.
- Warcup J. 1980. Ectomycorrhizal associations of Australian indigenous plants. *New Phytol.* 85: 531-535.
- Wilcox H. 1996. Mycorrhizae. In: *Plant roots –the hidden half*, 2nd edn. Marcel Dekker, New York, pp. 149-174.
- Yamada A.; Ogura T.; Ohmasa M. 2001. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot cultural. *Mycorrhiza* 11:59-66.
- Yanai R.; Fahey T.; Miller S. 1995. Efficiency of nutrient acquisition by fine roots and mycorrhizae. In: *Resource physiology of conifers: acquisition, allocation and utilization*. (eds) Smith W.; Hinckley T. Academic Press, New York pp. 75-103.
- Yao Q.; Xiaolin L.; Feng G.; Christie P. 2001. Mobilization of sparingly soluble inorganic phosphates by the external mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant and Soil* 230:279-285.
- Yocum D. 1983. The costs and benefits to plants forming mycorrhizal associations. Ph D. dissertation. State University of New York at Stony Brook. New York.
- Young B.W.; Massicotte H.B.; Tackaberry L.E.; Baldwin Q.F.; Egger K.N. 2002. *Monotropa uniflora*: morphological and molecular assessment of mycorrhizae retrieved from sites in the Sub-Boreal Spruce biogeoclimatic zone in central British Columbia. *Mycorrhiza* 12:75-82.
- Yu T.E.; Egger K.N.; Peterson R.L. 2001. Ectendomycorrhizal associations – characteristics and functions. *Mycorrhiza* 11:167-177.

VIII. APÉNDICE

Apéndice I. Comparación de la media general de las variables evaluadas entre plantas de *Pinus patula* inoculadas con seis distintas especies de hongos ectomicorrízicos y plantas no inoculadas.

Variables	Unidades	Media general en plantas inoculadas con seis especies de hongos ECM			Plantas no inoculadas		
Micelio externo	%	21.17	± 0.77	a	0.16	± 0.12	b
Número total de raíces cortas	su	2803.2	± 164.61	a	2228.4	± 180.74	a
Número de raíces cortas ECM	su	1160	± 95.31	a	89.6	± 28.21	b
Número de raíces cortas no ECM	su	1369.2	± 125.44	b	2943.6	± 476.57	a
Colonización micorrízica	%	42.82	± 0.15	a	6.45	± 0.08	b
Altura	mm	171.36	± 6.46	a	109.17	± 8.42	b
Diámetro	mm	1.79	± 0.06	a	0.99	± 0.01	b
Número de ramillas secundarias	su	9.89	± 1.71	a	0.17	± 0.15	b
Peso anhidro total	mg	1239.8	± 68.21	a	728	± 55.35	b
Peso anhidro radical	mg	474.27	± 31.93	a	276	± 34.04	b
Peso anhidro parte aérea	mg	784.17	± 48.49	a	479.4	± 70.62	b

Su= sin unidad. Los valores son las medias ± error estándar de la media, n=5. Una misma letra entre plantas inoculadas y no inoculadas significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con t-Student (P<0.05).

Apéndice II. Cobertura de micelio externo de distintos hongos ectomicorrízicos inoculados, en la superficie del cepellón de plantas de *Pinus patula*.

Tratamientos	Micelio externo
<i>Laccaria laccata</i>	40.22 ± 4.99 ab
<i>Suillus pseudobrevipes</i>	59.28 ± 10.82 a
<i>Amantia fulva</i>	3.34 ± 0.87 de
<i>Amanita caesarea</i>	13.92 ± 6.46 cd
<i>Suillus granulatus</i>	27.16 ± 3.28 bc
<i>Boletus clavipes</i>	3.53 ± 2.14 de
Testigo	0.16 ± 0.12 e
Media general	16.27
Tukey	8.18

Los valores son las medias ± error estándar de la media. n=5. Una misma letra significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (p< 0.05).

Apéndice III. Número total de raíces cortas, ECM y no ECM en plantas de *Pinus patula* inoculadas o no inoculadas con distintas especies de hongos ectomicorrízicos.

Tratamiento	Numero total de raíces cortas	Número de raíces ECM	Número de raíces no ECM
Li	3463.6 ± 345.34 a	1546.4 ± 122.27 a	1086.4 ± 154.27 b
Sp	2531.6 ± 207.56 a	1660.8 ± 146 a	866.8 ± 104.22 b
Af	3031.2 ± 401.11 a	944.4 ± 263.68 ab	2086.8 ± 204.24 ab
Ac	3066.8 ± 633.73 a	535.2 ± 157.56 bc	1961.3 ± 556.05 ab
Sg	2564.0 ± 340.33 a	1144.2 ± 12.36 ab	1217.6 ± 238.40 b
Bc	2162.0 ± 251.16 a	1128.8 ± 234.14 ab	1233.2 ± 179.35 b
T	2228.4 ± 180.74 a	89.6 ± 28.21 c	2943.6 ± 476.57 a
Media general	2721.08	1007.06	1607.76
Tukey	1640.80	732.03	1369.80

Los valores son las medias ± error estándar de la media. n=5. En cada columna, una misma letra significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (p< 0.05). Li= *Laccaria laccata*; Sp=*Suillus pseudobrevipes*; Af=*Amanita fulva*; Ac=*Amanita caesarea*; Sg=*Suillus granulatus*; Bc=*Boletus clavipes*; T=Testigo.

Apéndice IV. Porcentaje de colonización de distintos hongos ectomicorrízicos inoculados en plantas de *Pinus patula*.

Tratamientos	Colonización micorrízica
LI	55.07 ± 0.25 ab
Sp	65.92 ± 0.08 a
Af	28.96 ± 0.40 cd
Ac	15.86 ± 0.45 de
Sg	53.38 ± 0.23 ab
Bc	41.39 ± 0.56 bc
T	6.45 ± 0.08 e
Media general	36.44
Tukey	5.77

Los valores son las medias ± error estándar de la media. n=5. Una misma letra significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Abreviaturas iguales a las del Apéndice III.

Apéndice V. Cuadro de comparación de las variables altura y diámetro entre tratamientos para *Pinus patula*.

Tratamiento	Altura (mm)	Diámetro del tallo (mm)
LI	193.33 ± 17.18 a	2.17 ± 0.19 a
Sp	189.17 ± 19.15 a	1.70 ± 0.08 ab
Af	163 ± 12.61 ab	1.77 ± 0.07 ab
Ac	156.67 ± 10.72 ab	1.37 ± 0.11 bc
Sg	136.67 ± 8.51 ab	1.53 ± 0.13 bc
Bc	189.33 ± 15.03 a	1.70 ± 0.10 ab
T	109.17 ± 8.42 b	0.99 ± 0.01 c
Media general	162.47	1.60
Tukey	60.36	0.55

Los valores son las medias ± error estándar de la media. n=6. En cada columna, una misma letra significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Abreviaturas iguales a las del Apéndice III.

Apéndice VI. Numero de ramillas secundarias en plantas de *Pinus patula* inoculadas con distintos hongos ectomicorrízicos.

Tratamiento	Número de ramillas secundarias
LI	16.50 ± 3.95 a
Sp	12.50 ± 4.88 ab
Af	12.83 ± 3.84 ab
Ac	5.67 ± 2.39 ab
Sg	0.33 ± 0.22 b
Bc	11.50 ± 5.21 ab
T	0.17 ± 0.17 b
Media general	8.50
Tukey	15.71

Cifras seguidas de letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey. n=6. ($p \leq 0.05$). Abreviaturas iguales a las del Apéndice III.

Apéndice VII. Peso anhidro total, radical y parte aérea en plantas de *Pinus patula* inoculadas con distintos hongos ectomicorrízicos.

Tratamiento	Peso anhidro (mg)		
	Total	Raíz	Parte aérea
LI	1638 ± 131.11 a	702.4 ± 106.20 a	1000.8 ± 101.18 a
Sp	1428.2 ± 131.86 ab	572.4 ± 56.89 ab	890.2 ± 77.88 ab
Af	1031.2 ± 95.90 bc	400.2 ± 37.38 bc	631.0 ± 73.08 ab
Ac	929.6 ± 179.94 bc	367.6 ± 52.19 bc	562 ± 131.23 ab
Sg	1147.8 ± 89.35 abc	407.8 ± 32.01 bc	740 ± 77.60 ab
Bc	1264.2 ± 180.31 abc	395.2 ± 48.84 bc	881 ± 147.78 ab
T	728.0 ± 55.35 c	276 ± 34.04 c	479.4 ± 70.62 b
Media general	1166.71	445.94	740.63
Tukey	586.67	258.29	454.06

En cada columna, una misma letra significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey. n=5. (p ≤ 0.05). Abreviaturas iguales a las del Apéndice III.

Apéndice VIII. Relación peso anhidro de la parte aérea:raíz de plantas de *Pinus patula* inoculadas con distintos hongos ectomicorrízicos.

Tratamientos	Relación
<i>Laccaria laccata</i>	1.52 ± 0.21 a
<i>Suillus pseudobrevipes</i>	1.60 ± 0.18 a
<i>Amanita fulva</i>	1.69 ± 0.35 a
<i>Amanita caesarea</i>	1.42 ± 0.23 a
<i>Suillus granulatus</i>	1.85 ± 0.22 a
<i>Boletus clavipes</i>	2.29 ± 0.38 a
Testigo	1.88 ± 0.37 a
Tukey	1.31
Media general	1.75

Los valores son las medias ± error estándar de la media. n=5. Una misma letra significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (p < 0.05).

Apéndice IX. Comparación de la media general de las variables evaluadas entre plantas de *Pinus greggii* inoculadas con seis distintas especies de hongos ectomicorrízicos y plantas no inoculadas.

Variables	Unidades	Media general en plantas inoculadas con seis especies de hongos ECM	Plantas no inoculadas
Micelio externo	%	29.21 ± 0.37 a	0.02 ± 0.002 b
Número total de raíces cortas	su	4558.4 ± 236.36 a	4117 ± 445.19 a
Número de raíces cortas ECM	su	1240.8 ± 255.55 a	177.6 ± 44.75 b
Número de raíces cortas no ECM	su	3317.6 ± 235.62 a	3939.6 ± 460.64 a
Colonización micorrízica	%	20.19 ± 0.32 a	4.32 ± 0.09 b
Altura	mm	397.05 ± 10.58 a	244.2 ± 20.85 b
Diámetro del tallo	mm	3.21 ± 0.10 a	1.74 ± 0.19 b
Número de ramillas secundarias	su	67.53 ± 5.43 a	33.4 ± 13.97 b
Peso anhidro total	mg	4399.1 ± 174.36 a	2151.6 ± 254.21 b
Peso anhidro radical	mg	1462.9 ± 108.46 a	649.2 ± 65.46 b
Peso anhidro parte aérea	mg	2936.1 ± 145.45 a	1502.4 ± 241.96 b

Su= sin unidad. Los valores son las medias ± error estándar de la media, n=5. Una misma letra entre plantas inoculadas y no inoculadas significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con t-Student (P<0.05).

Apéndice X. Cobertura de micelio externo de distintos hongos ectomicorrízicos inoculados, en la superficie del cepellón de plantas de *Pinus greggii*.

Tratamientos	Micelio externo
<i>Laccaria laccata</i>	42.72 ± 0.14 ab
<i>Suillus pseudobrevipes</i>	53.61 ± 0.14 a
<i>Boletus clavipes</i>	16.33 ± 1.25 bc
<i>Pisolithus tinctorius</i>	12.54 ± 1.49 c
Testigo	0.02 ± 0.002 d
Media general	20.27
Tukey	9.29

Los valores son las medias ± error estándar de la media, n=5. Una misma letra significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey (p< 0.05).

Apéndice XI. Número total de raíces cortas, ECM y no ECM en plantas de *greggii* inoculadas o no inoculadas con distintas especies de hongos ectomicorrízicos.

Tratamiento	Número total de raíces cortas	Número de raíces ECM	Número de raíces no ECM
LI	5250.4 ± 404.45 a	2078.8 ± 382.78 a	3171.6 ± 429 a
Sp	4543.2 ± 342.02 a	1748.8 ± 290.08 ab	2794.4 ± 283 a
Bc	4003 ± 869.69 a	538.5 ± 299.85 ab	3464.5 ± 436.61 a
Pt	4326 ± 161.2 a	456.8 ± 141.45 b	3869.2 ± 61.01 a
T	4117 ± 445.18 a	177.6 ± 44.74 b	3939.6 ± 460.63 a
Media general	4466.46	1019.33	3447.17
Tukey	1957.7	1582.4	2006.8

Los valores son las medias ± error estándar de la media. n=5. En cada columna, una misma letra significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). LI=*Laccaria laccata*; Sp=*Suillus pseudobrevipes*; Bc=*Boletus clavipes*; Pt=*Pisolithus tinctorius*; T=Testigo.

Apéndice XII. Porcentaje de colonización de distintos hongos ectomicorrízicos inoculados en plantas de *Pinus greggii*.

Tratamientos	Colonización micorrízica
LI	32.94 ± 1.34 ab
Sp	37.62 ± 0.36 a
Bc	12.29 ± 1.19 ab
Pt	9.07 ± 0.32 bc
T	4.32 ± 0.09 c
Media general	17.38
Tukey	10.50

Los valores son las medias ± error estándar de la media. n=5. Una misma letra significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Abreviaturas iguales a las del Apéndice XI.

Apéndice XIII. Cuadro de comparación de las variables altura y diámetro entre tratamientos para *Pinus greggii*.

Tratamiento	Altura (mm)	Diámetro del tallo (mm)
LI	400.2 ± 23.64 a	3.26 ± 0.11 ab
Sp	415.4 ± 22.21 a	3.10 ± 0.13 b
Bc	408.7 ± 22.91 a	3.82 ± 0.18 a
Pt	366.2 ± 13.97 a	2.78 ± 0.09 b
T	244.2 ± 20.85 b	1.74 ± 0.18 c
Media general	365.21	2.90
Tukey	89.36	0.62

Los valores son las medias ± error estándar de la media. n=6. En cada columna, una misma letra significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). Abreviaturas iguales a las del Apéndice XI.

Apéndice XIV. Numero de ramillas secundarias en plantas de *Pinus greggii* inoculadas con distintos hongos ectomicorrízicos.

Tratamiento	Número de ramillas secundarias
LI	75.2 ± 8.93 a
Sp	72.4 ± 8.2 a
Bc	60.2 ± 3.94 a
Pt	60.2 ± 4.93 a
T	33.4 ± 13.97 a
Media general	60.42
Tukey	51.23

Cifras seguidas de letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey. n=6. (p ≤0.05). Abreviaturas iguales a las del Apéndice XI.

Apéndice XV. Peso anhidro total, radical y parte aérea en plantas de *Pinus greggii* inoculadas con distintos hongos ectomicorrízicos.

Tratamiento	Peso anhidro (mg)		
	Total	Raíz	Parte aérea
LI	4332.6 ± 197.81 a	1458 ± 95.4 a	2874.6 ± 204.9 ab
Sp	4811.6 ± 418.87 a	1670.8 ± 244.6 a	3140.8 ± 290.9 a
Bc	4593.3 ± 522.53 a	1264.5 ± 246.1 a	3328.8 ± 457 ab
Pt	3897.6 ± 165.51 a	1418.8 ± 202.8 ab	2478.8 ± 123.6 ab
T	2151.6 ± 254.21 b	649.2 ± 65.5 b	1502.4 ± 241.9 b
Media general	3930.83	1293.42	2637.42
Tukey	1371.4	862.96	1141.3

En cada columna, una misma letra significa que los tratamientos no mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de Tukey. n=5. (p ≤0.05). Abreviaturas iguales a las del Apéndice XI.

Apéndice XVI. Relación peso anhidro de la parte aérea:raíz de plantas de *Pinus greggii* inoculadas con distintos hongos ectomicorrízicos.

Tratamiento	Relación
LI	2.0 ± 0.21 a
Sp	2.2 ± 0.29 a
Bp	3.2 ± 0.96 a
Pt	1.8 ± 0.26 a
T	2.3 ± 0.47 a
Media general	2.262
Tukey	1.98

Cifras seguidas de letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey. n=6. (p ≤0.05). Abreviaturas iguales a las del Apéndice XI.

IX. GLOSARIO

Basado en Alexopoulos (1977) y Agerer (1991)

Basidio: Estructura que lleva sobre su superficie un determinado número de basidiosporas (típicamente cuatro), las cuales generalmente se forman como resultado de cariogamia y meiosis.

Basidiocarpo: Cuerpo fructífero que lleva basidios.

Basidiospora: Espora resultante de cariogamia y meiosis llevada sobre el exterior de un basidio.

Espora: Pequeña unidad de propagación que funciona como semilla, pero se diferencia de ella porque una espora no tiene el embrión preformado.

Felt prosenquimatoso: Arreglo del manto caracterizado por presentar hifas dispuestas en forma irregular sobre la superficie de la raíz, abundantes espacios interhifales; las hifas son similares a las hifas emanantes.

Fíbula: Una conexión hifal a manera de puente, característica del micelio secundario de muchos Basidiomycetes.

Hifa: La unidad estructural de los hongos; un filamento tubular.

Himenio: Un estrato fértil de ascos o basidios.

Laminilla: Estructura en forma de delgada lámina sobre la cual producen sus basidios algunos basidiomycetes.

Micelio: Masa de hifas que constituye el cuerpo de un hongo.

Net prosenquimatoso: Arreglo del manto caracterizado por presentar grupos de hifas dispuestas en forma de red, poco organizado; espacios interhifales; células distintamente alargadas, las hifas son más anchas y ramificadas que las hifas emanantes.

Net sinenquimatoso: Arreglo del manto caracterizado por presentar hifas compactas, sin obvios espacios interhifales, células alargadas.

Píleo: Porción superior o sombrero de ciertos tipos de ascocarpos y basidiocarpos.

Primordio: El primer esbozo de una estructura.

Rizomorfo: Cordón grueso, de hifas somáticas, en el cual las hifas han perdido su individualidad y toda la masa se comporta como una unidad orgánica. La estructura del extremo que crece de la rizomorfa se parece algo al extremo de la raíz, de aquí su nombre.

Velo interno: La membrana hifal que cubre las laminillas de una seta joven.

IMPRESA POR:


MULTIGRAF
—
imprensa

HNOS. SERDAN No. 5
FRACC. SAN MATEO II
TEXCOCO, EDO. DE MEXICO
TEL. 01(595) 95-5-19-52