



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**

**Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas**

Doctorado en Ciencias en Recursos Naturales y  
Medio Ambiente en Zonas Áridas

**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ECTOMICORRIZICOS Y SU POTENCIAL  
DE ASOCIACIÓN CON EL DESARROLLO DE *Carya illinoensis***

**TESIS**

Que como requisito parcial para obtener el grado  
de:

Doctor en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas

**Presenta:**

JUDITH ABIGAIL SÁNCHEZ LEDESMA

**Bajo la supervisión de:** JESÚS GUADALUPE ARREOLA ÁVILA, Dr.



**APROBADA**



Bermejillo, Durango, México.

Marzo 2022



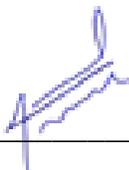
**iniqap**  
Instituto Nacional de Investigaciones  
Forestales, Agrícolas y Pecuarias

**CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ECTOMICORRIZICOS Y  
SU POTENCIAL DE ASOCIACIÓN CON EL DESARROLLO DE  
*Carya illinoensis***

Tesis realizada por JUDITH ABIGAIL SÁNCHEZ LEDESMA bajo la supervisión del Comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN RECURSOS NATURALES Y  
MEDIO AMBIENTE EN ZONAS ÁRIDAS**

DIRECTOR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jesús Guadalupe Arreola Ávila

CO DIRECTOR

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Verónica Ávila Rodríguez

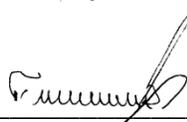
ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Violeta Hernández Carrasco

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Amparo Borja de la Rosa

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Fabián García González

LECTOR EXTERNO

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María Cristina de la Peña

## CONTENIDO

|   |           |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS USADAS.....  | viii      |
| DEDICATORIAS.....   | ix        |
| AGRADECIMIENTOS.....  | x         |
| DATOS BIOGRÁFICOS.....  | xi        |
| RESUMEN GENERAL.....  | xii       |
| ABSTRACT.....   | xiii      |
| <b>CAPÍTULO I.....</b>  | <b>1</b>  |
| 1 INTRODUCCION GENERAL.....   | 1         |
| 2 OBJETIVO.....   | 2         |
| 2.1 Objetivo General.....   | 2         |
| 2.1 Objetivos específicos.....  | 2         |
| 3 HIPÓTESIS.....  | 2         |
| 4 REVISIÓN DE LITERATURA.....   | 3         |
| 4.1 Cultivo de nogal pecanero.....  | 3         |
| 4.2 Diversidad de hongos ectomicorrizicos en nogal pecanero y árboles de<br>interés forestal..... | 5         |
| 4.3 Características de la asociación, raíz de nogal pecanero con<br>ectomicorrizas.....           | 8         |
| 4.4 Ectomicorrizas y su efecto en el estrés edáfico.....  | 9         |
| 4.5 Relación ectomicorrizica en la nutrición de árboles perenes.....                              | 10        |
| 4.6 Las ectomicorrizas mejoran la tolerancia al estrés hídrico.....                               | 11        |
| 4.7 Las ectomicorrizas ayudan a la adaptación de suelos salinos.....                              | 12        |
| 4.8 Literatura citada.....  | 13        |
| <b>CAPÍTULO II.....</b>   | <b>19</b> |
| MACROMICETOS ASOCIADOS CON <i>Carya illinoensis</i> EN LA COMARCA<br>LAGUNERA, MÉXICO.....        | 19        |
| RESUMEN.....  | 19        |
| ABSTRACT.....   | 20        |
| INTRODUCCIÓN.....   | 21        |

|  |           |
|--|-----------|
| MATERIALES Y METODOS.....  | 22        |
| Muestreo, caracterización e identificación morfológica.....  | 22        |
| Técnicas moleculares.....  | 23        |
| RESULTADOS.....  | 25        |
| <i>Descripción de las especies</i> .....   | 26        |
| DISCUSIÓN.....   | 27        |
| LITERATURA CITADA.....   | 31        |
| <b>CAPÍTULO III</b> .....  | <b>48</b> |
| RESPUESTA FISIOLÓGICA Y PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN PLÁNTULAS<br>DE NOGAL PECANERO [ <i>Carya illinoensis</i> (Wangenh) K. Koch]<br>INOCULADAS CON <i>Scleroderma</i> sp Y REGADAS CON SOLUCIÓN SALINA. | 48        |
| RESUMEN.....   | 48        |
| ABSTRACT.....  | 49        |
| INTRODUCCIÓN.....  | 50        |
| MATERIALES Y METODOS.....  | 51        |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 53        |
| CONCLUSIONES.....  | 59        |
| LITERATURA CITADA.....   | 59        |
| <b>CAPÍTULO IV</b> .....   | <b>63</b> |
| <i>Tuber caryophilum</i> , A NEW TRUFFLE SPECIES GROWING IN <i>Carya</i><br><i>illinoensis</i> ORCHARDS.....   | 63        |
| ABSTRACT.....  | 63        |
| RESUMEN.....   | 64        |
| INTRODUCTION.....  | 65        |
| MATERIALS AND METHODS.....   | 66        |
| RESULTS.....   | 68        |
| DISCUSSION.....  | 70        |
| REFERENCES.....  | 71        |

## ÍNDICE DE CUADROS

| CUADRO  | PÁGINA    |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO II</b> .....  | <b>19</b> |
| 1. Similitud nucleotídica de los ejemplares de macromicetos con código de barras de los registros de la base de datos del GenBank.....                                  | 37        |
| 2. Lista de secuencias de rDNA ITS utilizadas en los análisis filogenéticos .....   | 37        |
| <b>CAPÍTULO III</b> .....   | <b>48</b> |
| 3. Fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración en plántulas de nogal pecanero inoculadas con <i>Scleroderma</i> sp. bajo diferentes niveles de salinidad..... | 53        |
| <b>CAPÍTULO IV</b> .....  | <b>63</b> |
| 4. List of <i>Tuber</i> species and ITS and 28S sequences used in the phylogenetic analyses. The sequences of the new species are in bold.....                          | 75        |
| 5. <i>Tuber</i> species related to <i>Tuber caryophilum</i> or associated with <i>Carya illinoensis</i> .....   | 78        |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA  | PÁGINA    |
|---|-----------|
| <b>CAPÍTULO II</b> .....  | <b>19</b> |
| 1. Localización del sitio de estudio, huerta “Tierra blanca”, ubicada en el municipio de Viesca Coahuila México .....   | 42        |
| 2. a; <i>Candolleomyces</i> sp., b; vista superior de <i>Candolleomyces</i> sp. c; <i>Scleroderma cepa</i> s.l. d; Corte transversal de <i>Scleroderma cepa</i> s.l. mostrando la superficie peridial, e; <i>Agaricus deserticola</i> , f; vista frontal de <i>Agaricus deserticola</i> , g; <i>Tuber</i> sp., h; Ascoma de <i>Tuber</i> sp. en sección transversal mostrando la superficie peridial y la superficie glebal, i; <i>Candolleomyces luteopallidus</i> ..... | 43        |
| 3. Árbol filogenético del género <i>Candolleomyces</i> inferido bajo el modelo Bayesiano a partir de secuencias de ITS rDNA .....   | 44        |
| 4. Árbol filogenético del género <i>Tuber</i> sección <i>Rufum</i> inferido bajo el modelo Bayesiano a partir de secuencias de ITS rDNA. ....   | 45        |
| 5. Árbol filogenético de <i>Agaricus</i> sección <i>arvenses</i> y secuencias afines insertae sedis inferido bajo el modelo Bayesiano a partir de secuencias de ITS rDNA.....   | 46        |
| 6. Árbol filogenético del género <i>Scleroderma</i> inferido bajo el modelo Bayesiano a partir de secuencias de ITS rDNA. ....  | 47        |
| <b>CAPÍTULO III</b> .....   | <b>48</b> |
| 7. Concentración de sodio en raíz, tallo y hoja de nogal bajo diferentes niveles de salinidad. Barras verticales (n=5, ± error estándar) dentro de tratamientos con letras desiguales, son estadísticamente diferentes (DMS; p ≤ 0.05).....   | 54        |
| 8. Concentración de K en raíz, tallo y hojas de plántulas de nogal pecanero inoculadas con micorriza <i>Scleroderma</i> sp bajo diferentes concentraciones de   |           |

salinidad. Barras verticales (n=5, ± error estándar) dentro de tratamientos con letras desiguales, son estadísticamente diferentes (DMS;  $p \leq 0.05$ ).....55

9. Relación K/Na en raíz, tallo y hoja de nogal bajo diferentes niveles de salinidad. Barras verticales (n=5, ± error estándar) dentro de tratamientos con letras desiguales, son estadísticamente diferentes (DMS;  $p \leq 0.05$ ).....56

10. Peso seco de raíz, tallo y hojas en plántulas de nogal pecanero inoculadas con micorriza *Scleroderma* sp bajo diferentes concentraciones de salinidad. Barras verticales (n=5, ± error estándar) dentro de tratamientos con letras desiguales, son estadísticamente diferentes (DMS;  $p \leq 0.05$ ).....58

**CAPÍTULO IV .....63**

11. Phylogenetic placement of *Tuber caryophilum* sp. nov. based on an ITS and LSU rDNA concatenated alignment. The consensus tree represents 2 phylogenetic analyses; a Bayesian approximation with 1000 generations and a Maximum likelihood analysis with 1000 bootstrap replicates. Just support values higher than 0.70 and/or 70% are displayed.....79

12. *Tuber caryophilum* (holotype ITCV 1888). **a** Ascoma showing peridial surface (bar = 1 cm). **b** Ascoma in cross section showing glebal surface (bar = 1 cm). **c** Peridium cross section showing pseudoparenchyma (bar = 20µm). **d** Peridium in cross section. **e** Ascospores within asci showing alveoli (bar = 20 µm). **f** Ascospore with equinulate surface (bar = 20 µm).....80

## ABREVIATURAS USADAS

|              |   |
|--------------|---|
| <b>DNA</b>   | Ácido desoxirribonucleico                                 |
| <b>ECM</b>   | Ectomicorrizas  |
| <b>ITS</b>   | Región espaciadora interna transcrita                     |
| <b>ha</b>    | Hectárea  |
| <b>HM</b>    | Hongo micorrízico   |
| <b>HMA</b>   | Hongos micorrízicos arbusculares                          |
| <b>KOH</b>   | Hidróxido de potasio                                      |
| <b>PCR</b>   | Reacción en cadena de la polimerasa                       |
| <b>dNTPS</b> | Desoxirribonucleótido trifosfato                          |
| <b>EDTA</b>  | Ácido etilendiaminotetraacético                           |
| <b>BI</b>    | Análisis bayesiano  |
| <b>CTAB</b>  | Bromuro de cetiltrimetilamonio, sal de amonio cuaternario |
| <b>NaCl</b>  | Cloruro de sodio  |
| <b>PDA</b>   | Agar de papa y dextrosa                                   |
| <b>BAF</b>   | Aneurina-ácido fólico-agar.                               |
| <b>dS/m</b>  | Decisiemens por metro [dS/m]                              |
| <b>CE</b>    | Conductividad eléctrica                                   |

## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a:

**ROBERTO, ROBERTO DAMIÁN, JOSÉ DARIO**, mi fuerza para seguir adelante, mi inspiración para expresar lo más sublime que me producen, no existe un motor más poderoso que el amor que siento por ustedes.

A mis padres: **José Eligio e Irma**. Todo lo que hecho en esta vida ha sido para que se sientan orgullosos de mí. Los amaré siempre, hasta el último latido de mi corazón, tal vez más allá.

A mis suegros: **Adela y Roberto**, por ser unos buenos seres humanos, que dicha fue caer en esa casa, donde se sabe de amor, valores y principios.

A mis hermanos: **Irma Astrid y José Eligio**. Mis compañeros en este viaje que se llama vida. Por siempre estar, por las risas, los buenos momentos.

A mis Sobrinos: **María Gabriela, Constanza, Victoria, Arantza, José Eligio**. A quienes a través de sus detalles y atenciones me demuestran que no hay lazo más fuerte que el de la sangre, ni nudo más indisoluble que el amor sincero.

A toda mi familia, en especial a mis **abuelitos: Rito**, hombre trabajador de talento innato, ejemplo de vida y fortaleza. **Ausencia**, te envié un beso eterno

A mi abuelita **Lupe**, no sacaré jamás de mi mente, cuando te conté que pasé el examen que iba a estudiar para ser investigador, y tú me dijiste ¿que ya no eres química? Te he extrañado mucho.

A todos ustedes GRACIAS.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el financiamiento a través del Programa de Becas Nacionales, tanto en maestría como en el doctorado.

Al **Posgrado en Recurso Naturales y Medio ambiente en Zonas Áridas**, perteneciente a la Unidad Regional Universitaria de Zonas áridas, dependiente de la Universidad Autónoma Chapingo, por haberle dado la oportunidad a una mujer que llevaba dedicada al cuidado y protección de sus hijos por más de 3 años. Por haber creído en mi como estudiante.

A mi director de tesis, **Dr. Jesús G. Arreola Ávila**, por su dirección, apoyo, aportes y todas las enseñanzas que contribuyeron a la culminación exitosa de este proyecto.

Al comité Asesor, **Dra. Verónica Ávila Rodríguez, Dra. Violeta Carrasco Hernández, Dra. Amparo Borja de la Rosa, Dr. Fabián García González**, por las aportaciones tan acertadas, el tiempo y sus invaluable consejos y comentarios que enriquecieron este trabajo.

A las **Ing. Betty Rodríguez Rodallegas, Ing. Pamela Manzanares Nieto, Lic. Anay Armendáriz y Lic. Mary Miranda**: Por ayudarme una y otra vez en URUZA, las cosas fueron más fáciles con su apoyo.

A la **Dra. Cristina García de la Peña**: por tanto, por ser un ser humano único y un ejemplo de entrega y amor al trabajo.

**Dr. Roberto Garibay Orijel**: Gracias por haber contestado ese email. Ser su aprendiz es mi mayor orgullo académico, cambio mi vida científica.

**Dr. Gonzalo Guevara Guerrero**: autoridad en la Taxonomía clásica de hongos en México y el mundo.

**A los dos**: gracias por las respuestas a las más de 100 preguntas que realice.

A **Irene Pacheco y Alejandra López**: haberlas conocido en URUZA, y que sean mis amigas es y será un honor.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

### **Datos personales**

Nombre: Judith Abigail Sánchez Ledesma

Fecha de nacimiento: 25 de octubre de 1985

Lugar de nacimiento: Torreón Coahuila México.

CURP: SALJ851025MCLND001

Profesión: Químico Farmacéutico Biólogo



### **Desarrollo académico**

Bachillerato: IDEA. Torreón Coahuila México

Licenciatura: Químico Farmacéutico Biólogo en la Facultad de ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Cédula Profesional: 9123334.

Maestría: Maestro en Ciencias en Suelos, en el Tecnológico Nacional de México, sede Instituto Tecnológico de Torreón. Cédula profesional: 9353861

## RESUMEN GENERAL

Los agroecosistemas, como los cultivos de *Carya illinoensis* representan una actividad económica importante y de constante crecimiento en La Comarca Lagunera, México. Se tiene poco conocimiento de las asociaciones entre hongos ectomicorrizicos y si existe una relación simbiótica importante entre el árbol y estas especies. En el presente estudio se realizaron investigaciones, la primera una recolección de hongos ectomicorrizicos y saprobios a los cuales se les secuenció la región ITS del DNA ribosomal para corroborar su identificación taxonómica por medio de análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud y Bayesianos. Se encontraron cinco especies de hongos asociados al nogal pecanero: *Agaricus deserticola*, *Candolleomyces luteopallidus*, *Candolleomyces* sp., *Tuber* sp. y *Scleroderma cepa* s.l. De estos, *C. luteopallidus* se registra por primera vez en México. A su vez se realizó como segundo trabajo de investigación el reporte como nueva especie para la ciencia de *Tuber caryophilum*, misma que está respaldada por análisis de ADNr de ITS, LSU, y caracteres morfológicos y ecología, siendo la trufa número 14 en México y la segunda a nivel global asociada a los árboles de nogal pecanero. En el tercer trabajo de investigación se puso a prueba la eficacia de *Scleroderma cepa* s.l. como inoculante ectomicorrizico, donde se evaluó la tasa fotosintética y producción de biomasa, en plántulas de nogal, bajo condiciones con y sin estrés salino. Donde se demuestra que las plántulas *Carya illinoensis* inoculadas con *Scleroderma cepa* s.l. y regadas con agua sin NaCl, incrementaron las variables fisiológicas evaluadas, así como la biomasa. Sin embargo, la presencia de NaCl en cualquier concentración en el medio, causó un efecto adverso. Por consiguiente, *Scleroderma cepa* s.l. no mostró efectividad en el incremento de estas variables en plántula.

**Palabras clave:** diversidad de hongos, nogal pecanero, salinidad.

## ABSTRACT

Agroecosystems, such as the cultivation of *Carya illinoensis*, represent an important and constantly growing economic activity in La Comarca Lagunera, Mexico. Little is known about the associations between ectomycorrhizal fungi and whether there is an important symbiotic relationship between the tree and these species. In the present study, several studies were carried out, the first one was a collection of ectomycorrhizal and saprophytic fungi from which the ITS region of the ribosomal DNA was sequenced to corroborate their taxonomic identification by means of Maximum Likelihood and Bayesian phylogenetic analyses. Five species of fungi associated with pecan nut were found: *Agaricus deserticola*, *Candolleomyces luteopallidus*, *Candolleomyces* sp., *Tuber caryophilum*. and *Scleroderma cepa* s.l. Of these, *C. luteopallidus* is recorded for the first time in Mexico. At the same time, as a second research work, *Tuber Caryophilum* was reported as a new species for science, which is supported by rDNA analysis of ITS, LSU, morphological characters and ecology, being the 14th truffle in Mexico and the second globally associated with pecan nut trees. In the third research work, the efficacy of *Scleroderma* strain s.l. as an ectomycorrhizal inoculant was tested, where the photosynthetic rate and biomass production were evaluated in walnut seedlings, under conditions with and without salt stress. It was demonstrated that *Carya illinoensis* seedlings inoculated with *Scleroderma* s.l. strain and irrigated with water without NaCl, increased the physiological variables evaluated, as well as biomass. However, the presence of NaCl at any concentration in the medium caused an adverse effect. Therefore, *Scleroderma cepa* s.l. did not show effectiveness in increasing these variables in seedlings.

**Key words:** fungal diversity, pecan nut, salinity

## CAPITULO I

### 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El nogal pecanero es una especie cuyos ancestros nativos se desarrollaron espontáneamente cerca de ríos o arroyos donde los suelos son de origen aluvial, profundos y fértiles, con alta capacidad de retención de humedad y con buen drenaje (Wolstenholme,1979). Actualmente la mayoría de las huertas comerciales de nogal, establecidas en México, se encuentran en áreas distantes de esos nichos ecológicos, en las cuales las condiciones físicas y químicas de los suelos en los que crecen, no son del todo adecuadas. Se estima que 30 mil has aproximadamente, cultivadas con nogal en el norte de México, presentan problemas de salinidad, en diferentes grados. El árbol de nogal presenta asociaciones simbióticas con hongos ectomicorrizicos altamente especializados (Marx y Bryan et al., 1977; Tarango, 2004). En el norte de México, en diferentes huertas se han registrado varios géneros de hongos en su mayoría ectomicorrizicos como *Astraeus Gyrodon*, *Pisolithus*, *Russula*, *Tuber* y *Tylophilus* (Taber et al., 1982; Smith et al., 1988). A demás en huertas de América Latina también se han encontrado especies ectomicorrízicas como *Laccaria* sp. y *Scleroderma* sp. (Smith et al.,1988). Estos hongos ectomicorrizicos proporcionan diferentes beneficios en términos de sobrevivencia, nutrición y productividad al nogal. Así mismo, se han encontrado hongos saprobios que juegan un papel fundamental en el funcionamiento de este agroecosistema pues descomponen la materia orgánica y reciclan los nutrientes en el suelo, constituyendo así un recurso forestal integral (Yun et al., 2004). Los macromicetos en las huertas de nogal pecanero, están distribuidos en los horizontes superficiales del suelo y en la rizosfera de los árboles, manteniendo el funcionamiento, estructura y equilibrio (Córdoba - Chávez et al., 2014; Ávila Minga et al., 2019). Por lo tanto, es de suma importancia reconocer el valor ecológico de estos hongos, estudiar su diversidad, y distribución (Ramírez,2013). Este conocimiento se podría aprovechar para promover el crecimiento del nogal y favorecer su adaptación a los diferentes ambientes y condiciones climáticas (Tovar et al., 2004; Cantrell,2008). Actualmente la inoculación con hongos ectomicorrizicos conforma una

herramienta importante para mejorar el funcionamiento, y asegurar la producción de biomasa en especies forestales, bajo condiciones salinas (Lou *et al*, 2009) ya que disminuyen la entrada de Na y Cl (Bandou *et al.*, 2006; Nguyen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2010).

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo General**

Determinar la presencia de hongos ectomicorrizicos en nogal cultivado bajo las condiciones de La Comarca Lagunera.

### **2.2 Objetivos específicos**

- i. Caracterizar taxonómica y molecularmente los hongos ectomicorrizicos nativos del nogal pecanero.
- ii. Evaluar los parámetros de intercambio gaseoso de las hojas y el peso seco de las plántulas de *Carya illinoensis* bajo diferentes tratamientos de *Scleroderma* sp. y NaCl.

## **3. HIPÓTESIS**

- i. Existen ectomicorrizas nativas asociadas al nogal pecanero en La Comarca Lagunera.
- ii. La presencia de ectomicorrizas interactúa y potencializa el desarrollo del árbol en condiciones de salinidad

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Cultivo de nogal pecanero

El nogal pecanero (*Carya illinoensis Koch*) fue reportado por primera vez en 1533 por el Español López de Oviedo, los colonizadores españoles lo llamaron simplemente “*nogal*” debido a un término muy semejante escuchado a los nativos derivado del algoquin “*Pakan*” que, en términos generales, significa “*frutos tan duros que requieren una piedra para quebrarlos*” (Pérez,2014). En la actualidad el nogal es cultivado en la parte sur de los Estados Unidos y el norte de la República Mexicana (INIFAP,2002). Para el norte de México es de gran importancia debido a que la región norte es parte del centro de origen de la especie de este nogal. La producción nacional de nuez en México, en 2018 se concentró en los estados de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango y Sonora, que en total representan 92.36% de la producción nacional (Briseño et al., 2018). Destacan los estados de Chihuahua y Coahuila, con 60.3 y 16.87% de la producción nacional, respectivamente. El rendimiento medio a nivel nacional es de 1.5 t ha<sup>-1</sup>. El cual se considera bajo (SAGARPA,2016).

Actualmente, en el municipio de Coahuila de Zaragoza, el Instituto Nacional de Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) tiene un centro de investigación experimental en el que se encuentra el denominado “Banco Nacional de Germoplasma de Nogal Pecanero en México” donde existe el 72% del germoplasma de dicho árbol (SIAPSAGARPA, 2014). El nogal requiere climas con promedio de 27 °C; extremas en verano de 41 a 46°C y temperaturas mínimas en invierno, de 10 a 1 °C. Las precipitaciones deben ser entre 1 760 a 2,010 mm anuales: suelos francos, arcillosos arenosos bien drenados, con pH entre 6.5 a 7.5.

El nogal es un cultivo que se caracteriza por tener una excelente adaptación a las condiciones climáticas del norte de México, comprendidas entre las 50 a 600 unidades frío, y 3000 o más de unidades calor y baja humedad ambiental y de precipitación (Lagarda,2007).

Los ecosistemas semiáridos donde se encuentra establecido el árbol de nogal pecanero *Carya illinoensis* se caracterizan por una precipitación baja e irregular a lo largo del año con periodos de sequía recurrentes durante los que las comunidades vegetales se ven sometidas a situaciones de elevado estrés edafico (Lagarda, 2007; Arreola, 2011) Los organismos que habitan en estos ecosistemas han desarrollado estrategias para superar estas condiciones adversas. En muchos casos establecen interacciones entre plantas y especies de hongos micorrizicos (HM) de manera que consiguen un mayor aprovechamiento del agua y nutrientes disponibles. Por ejemplo, las especies de HM adaptados a suelos áridos captan de manera más eficaz los nutrientes y el agua en condiciones de sequía ayudando a las plantas a superar las condiciones adversas (Allen,2007).

La microbiota del suelo juega un papel fundamental en la regulación de los ecosistemas terrestres, influyendo en la productividad, diversidad y estructura de las comunidades vegetales (Van der Heijden et al., 2008). La materia orgánica es descompuesta por la actividad de diferentes especies de bacterias y hongos que liberan los nutrientes al suelo, dejándolos disponibles para que sean nuevamente absorbidos por las plantas. Tal es el caso de la micorrización, proceso particularmente importante en la fertilización biológica de las plantas, necesario en el contexto de la agricultura sostenible y de la producción orgánica (González, 2009). Una micorriza es la simbiosis entre un HM y las raíces de una planta. Los hongos micorrizicos se encuentran ampliamente extendidos por toda la superficie terrestre y establecen simbiosis con, al menos, el 90% de las plantas vasculares (Trappe,1987; Pérez-Moreno,2016). El objeto de estudio de esta investigación está relacionado con ectomicorrizas (ECM), asociaciones caracterizadas por hifas de hongos que no penetran en el interior de las células de la raíz es una forma de simbiosis que se establece entre hongos principalmente *Basidiomycete* y *Ascomycete* (Carrasco et al.,2011). Esta simbiosis tiene una enorme relevancia ecológica debido a su importancia en la estructura y funcionamiento de ecosistemas boreales, templados y tropicales

(Pérez-Moreno et al., 2004). Consecuencia de la ancestral coevolución entre los hongos y las plantas involucradas (Peay K.G et al., 2010).

Las funciones más importantes de las ectomicorrizas son:

- Aumento de la estabilidad del suelo.
- Aumento de la retención de agua en el suelo.
- Protección de las plantas contra enfermedades producidas por hongos y microorganismos del suelo.
- Aumento del contenido nutricional de las plantas (Faggioli, 2008).

#### **4.2 Diversidad de hongos ectomicorrizicos en nogal pecanero y árboles de interés forestal**

*Carya illinoensis* (nuez pecanera), pertenece a familia de las nueces llamada *Juglandaceae* y es un importante cultivo de nueces en el sur de los Estados Unidos (USDA, 2011). Dentro de esta familia existen unas especies de hongos que generalmente se consideran ectomicorrizas (Harley, 1987; Wang y Qiu, 2006). Los primeros estudios de ectomicorrizas que se realizaron en la familia de los *Juglandaceae*, dentro del cual se encuentra el nogal pecanero fue debido a la aparición de la enfermedad “Rossette Rose” que posteriormente se determinó que era causada por deficiencia de Zinc (Woodroof, 1933; Harley, 1987, Qiu, 2006).

En nogal pecanero podemos coleccionar nueces en su parte aérea y también se han encontrado que producen en sus raíces trufas de forma abundante. En la actualidad se han identificado morfológicamente, molecularmente, mediante métodos basados en secuencias de ITS y LSU rDNA niveles de colonización entre las raíces de nogal pecanero y esporas de *Tuber borchii*, *Tuber aestivium*, *Tuber lyonii* y *Scleroderma*. Donde los niveles de colonización fueron aproximadamente 62% y 42% y las secuencias más abundantes pertenecieron a *T. lyonii* y una especie de *Tuber* no descrita (Benucci et al.,2012; Bonito et al., 2012).

Estos estudios demuestran que en las raíces de los nogales se pueden producir especies de trufas que pueden ser una fuente de ingreso adicional y muy rentable para los productores de nogal pecanero, donde el costo de la trufa varía entre 455-582 US el Kg (Bonito et al., 2012).

Es ampliamente conocido que los niveles altos de colonización se relacionan con un buen estado de salud de la planta (Marx y Bryan 1970, Marx 1979). Como es el caso de *Carya illinoensis* con *Scleroderma bovista* y *Pisolithus tinctorius*, donde dichos hongos mejoraron la salud de la planta (Talbot et al., 2008).

Actualmente se han distinguido 7 morfotipos diferentes (Bonito et al., 2012), entre estos son *Boletus* y *Russula*. Estadísticas de diversidad de comunidades ectomicorrízicas para huertos de *Carya Illinoensis* muestreados por (Baciarelli-Falini et al., 2006; Bonito et al., 2012) demuestran que las especies de hongo ectomicorrizicos más abundantes asociados con nogal pecanero, pertenecen al género *Tuber*, éstas fueron secuenciadas de todos los sitios. En particular, *T. lyonii* se ubicó como el segundo taxón más abundante recuperado e incluso se detectó en huertos donde no se han recolectado trufas (Bonito et al., 2012).

Las trufas se forman mediante cruzamiento obligatorio de tipos de apareamiento opuestos, aunque los detalles relacionados con los eventos de fertilización no están completamente resueltos en este momento (Benucci et al., 2012). Algunas trufas, especialmente las europeas, son valoradas económicamente debido a su exclusivo organoléptico aroma. En consecuencia, se comercializan en todo el mundo. Entre estas especies apreciadas, la especie fructífera de invierno *Tuber magnatum vittad.* (trufa blanca) y *T. melanosporum vittad.* (trufa negra) se limitan naturalmente a las áreas limitadas del sur de Europa (Wedén et al., 2005). El cultivo de trufa comienza inoculando axénicamente plántulas con esporas de trufa y después de ectomicorrizadas se planta la trufa infectada en los campos que lograron cumplir con los requisitos ecológicos tanto del hongo de la trufa como de la planta anfitrión. Esta técnica y sus variaciones, se considera rutina en todo el mundo (Benucci et al., 2012).

Los hongos ectomicorrizógenos, producen cuerpos fructíferos llamados "carpóforos" los cuales pueden verse en los suelos de las huertas después de la

época de lluvia, dichas estructuras liberan y producen esporas con las cuales el hongo se propaga (INIFAP,2014). Dichas estructuras pertenecen al grupo de los ascomicetos formadores de trufas y a los basidiomicetos formadores de setas y bejines (Ortíz-Pérez, 2012). La mayoría de las plantas que forman ectomicorriza, son especies dominantes en los bosques templados boreales y australes del globo. En dichas áreas la ECM es simbiosis dominante en biomasa donde dominan suelos tipo “moder” o “mull”, con altos contenidos orgánicos, lo que ha promovido cierta capacidad saprofítica en ellos (Pérez-Moreno, 2004). En zonas más cercanas al Ecuador se encuentran *Cedrus*, *Juniperus* y *Quercus*. Algunas angiospermas de estas zonas, como *Alnus*, *Betula*, *Carpinus*, ***Carya***, *Castanea*, *Fagus*, *Ostrya*, *Populus*, *Quercus*, *Tylia* y *Salix*, también son ECM (Harley-Smith,1983; Smith y Read,1997). Hasta finales de 1970 el interés de la aplicación práctica de los hongos micorrízicos, en general, se concentró principalmente en la utilización de los hongos ECM en la producción forestal. Las fuentes principales de inóculo ECM que han sido utilizadas, estuvieron constituidas en un inicio, por las esporas o los carpóforos ECM molidos, frescos o secos, y después por cultivos miceliares (Marx, 1980; Brundrett et al., 1996). En el caso de los inoculantes basados en esporas, se han utilizado principalmente *Gasteromyces*, debido al gran número de esporas que pueden llegar a producir, el cual pueden ser del orden de 10<sup>6</sup> a 10<sup>9</sup> esporas por gramo de cuerpos fructíferos molidos (Marx y Bryan,1975; INIFAP,2014). Actualmente, en la preparación de inoculantes comerciales basados en hongos ECM, se continúan utilizando diversas especies de hongos *Gasteromyces*, dentro de los géneros *Pisolithus*, *Scleroderma* y *Rhizopogon* (Pérez-Moreno et al.,2004).

El hongo ECM que ha sido utilizado con mayor frecuencia en la preparación de dichos inoculantes comerciales, es *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch (sinónimo *P. arhizus* (Scop: Pers) Rauschert). Este tiene una amplia distribución a nivel mundial, y forma simbiosis ECM con una gran cantidad de géneros de angiospermas y gimnospermas (Cairney,2007).

En México, en el Colegio de Postgraduados, se han efectuado diversas investigaciones tendientes a la utilización de cepas nativas de hongos ECM

tendientes a su utilización en plantaciones comerciales, principalmente de pinos y eucaliptos, en programas de reforestación. Los hongos que han sido estudiados han incluido principalmente: *Amanita caesarea*, *Amanita rubescens*, *Boletus edulis*, *Laccaria laccata*, *Lactarius deliciosus*, *Lactarius salmonicolor*, *Hebeloma fastibile*, *Suillus* (Perez-Moreno et al., 2004). En México, se conocen más de 220 especies de hongos comestibles silvestres (Villareal et al., 1989). Si se desarrollara un programa de inoculación con especies de hongos comestibles en las especies de árboles utilizadas en plantaciones o reforestaciones, se podría tener, previo a los aprovechamientos forestales, un producto forestal no maderable de alto valor como alimento. A pesar de las limitaciones que pudiera tener la producción de inoculantes basados en micelio o esporas de hongos ECM, las ventajas que presentan, originan que esta biotecnología tiene un gran potencial de aplicación en México (Pérez-Moreno et al., 2004).

Adicionalmente investigaciones realizadas por (Carrasco et al., 2010), afirman que *Laccaria*, es usada para su aplicación en la micorrización controlada de planta de vivero, debido a que se han registrado efectos benéficos en las plantas inoculadas, en comparación con las plantas no inoculadas. Y en términos de crecimiento aéreo, radical y contenido nutrimental; por ejemplo, se han utilizado *Laccaria laccata* con *Pinus pinaster*, *Laccaria bicolor* con *Pseudotsuga menziesii* siendo también estas especies de pino nativas de México y de gran importancia forestal. (Parladé y Álvarez, 1993; Pera y Parladé, 2005). En el caso de *Pinus patula*, aunque es una especie nativa de México en donde posee una distribución natural restringida, ha tenido mucho éxito en plantaciones a nivel internacional, tanto en áreas tropicales como en zonas templadas desde la década de 1940, incluyendo el sur de África, el subcontinente de la India, América del Sur y Australia (Gillespie, 1992).

#### **4.3 Características de la asociación, raíz de nogal pecanero con ectomicorrizas.**

La simbiosis ECM se establece en unas 3000 especies de plantas y alrededor de 5000 especies de hongos, principalmente basidiomicetos y ascomicetos (García et al., 2006). Diversas especies de árboles, incluyendo pinos, no se desarrollarían

sin esa simbiosis. Es importante la inoculación, en vivero con hongos ectomicorrizicos seleccionados para mejorar el establecimiento de plantas en campo, en sitios rutinarios o adversos (Tarango, 2004). El nogal pecanero tiene raíz pivotante y la parte superior de su sistema radical es fibrosa. En dichas raíces fibrosas crecen las raicillas alimentadoras, que son pequeñas y delgadas y no cuentan con pelos absorbentes (González, 2009). Específicamente, los hongos que han sido reportados asociados con el nogal pecanero pertenecen a los géneros *Astraeus*, *Gyrodon*, *Pisolithus*, *Russula*, *Scleroderma*, *Tuber* y *Tylopilus*, en viveros se ha observado que las raíces del nogal son micorrizadas por *Scleroderma bovista*, cuyas macroformas son de color blanco y multiramificadas (González, 2009). Un género nuevo llamado *Pacispora* fue propuesto por Oehl y Sieverding, 2004. La formación de esporas en este género es similar a la de *Glomus* pero éste diferencia paredes germinales internas (Bagyaraj et al., 2012) Este género es incluido en el orden Diversisporales en la filogenia molecular propuesta por (Schüßler et al., 2001). Aunque se han aplicado técnicas moleculares para aclarar la clasificación filogenética entre las especies de HMA, la identificación de especies está basada principalmente en las características morfológicas de las esporas (Bagyaraj et al., 2012). En viveros de regiones semiáridas son más comunes raíces ectomicorrizadas con macroformas de color café o café rojizo (Tarango et al., 2004).

#### **4.4 Ectomicorrizas y su efecto en el estrés edáfico**

Las raíces que son ectomicorrizadas viven por más tiempo y son menos sensibles a enfermedades, el mecanismo básico por el cual el hongo micorrízico protege a una raíz de los patógenos es: a) al mejorar la nutrición de la planta, particularmente del P; b) al ocupar los sitios de infección en la superficie radical y al actuar el manto fúngico como barrera; y c) al producir antibióticos y otras sustancias de defensa (Mukerji et al., 1999). Los hongos ectomicorrizicos también producen reguladores del crecimiento que estimulan la elongación y ramificación de las raicillas alimentadoras (Tarango et al., 2001). En suelo natural virgen la ectomicorriza se desarrolla cuando las raíces de una planta en

crecimiento encuentran esporas o micelio de hongos micorrizicos (González, 2009). Se ha observado una asociación de eucalipto (*Eucalyptus globules* y *Eucalyptus urophylla*) ambos son reportados en asociación de endo y ectomicorrización (Chen et al., 2000). En un estudio efectuado en Delicias, Chihuahua, México, en nogal inoculado con hongos ectomicorrizicos mostró efectos positivos sobre concentración de Zn foliar, correlación entre longitud y diámetro de tallo con la colonización, que alcanzó hasta el 83%, además de encontrarse hifas ornamentadas de *Pisolithus tinctorius*, Se observó también una relación positiva relativa entre el porcentaje de colonización y el grosor y la altura del tallo, con un coeficiente  $r^2$ , que varió de 0.64 a 0.74, favoreciendo así la concentración foliar de zinc con la ectomicorrización (Tarango et al., 2006).

#### **4.5 Relación ectomicorrízica en la nutrición de árboles perenes**

Las hifas ectomicorrízicas del hongo crecen extensivamente desde la raíz hacia el suelo, donde desarrollan una red tridimensional de micelio especializado en colonizar y explorar muy eficazmente los micro hábitats del mismo, para captar elementos minerales y agua.

Las hifas externas del hongo actúan realmente como “puentes”, que superan la zona de “agotamiento” en nutrientes que rodea la raíz y llega a distancias de varios centímetros de la superficie de la misma. Se considera que la función del micelio externo es particularmente crítica para la captación de nutrientes poco móviles, como son fósforo, nitrógeno y algunos micronutrientes (Molina, 2005).

Las ectomicorrizas aumentan la capacidad de resistencia de las plantas a situaciones de estrés debidas a diferentes causas como falta de agua, falta de nutrientes, presencia de sal en el suelo, etc. Estas situaciones de estrés son especialmente comunes en suelos de zonas áridas y semi-áridas donde solemos encontrar cultivos extensivos de secano (Tarango,2004; Figueroa, 2011). Las ectomicorrizas incrementan la superficie radical para la absorción de agua y elementos esenciales como: N, P, K, Ca, Mg, Cu, Mn y Zn (Marx,1971; Brison,1976). Los translocan a las raíces hospedantes, además, inducen a la longevidad de las raíces (Brison,1976).

#### 4.6 Las ectomicorrizas mejoran la tolerancia al estrés hídrico

En un estudio por (Fitter,2000; Bolan,2003), consideran que las ectomicorrizas benefician la adaptación y capacidad de absorción de agua, aumentando la tolerancia de la planta al estrés por sequía, traduciéndose en un mejor crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta tolerancia es debida al incremento de la conductividad hídrica de la planta o a la disminución de la resistencia al flujo de agua a través de ella (Molina,2005). De igual forma, se ha encontrado que, en suelos arenosos, con poca capacidad de retención de humedad, la presencia de ectomicorrizas ha ocasionado retención de agua cinco veces mayor que en ausencia de micorrizas en los mismos (Raddatz, 2002). En España se han llevado a cabo diferentes estudios que demuestran estos beneficios. Por ejemplo, una cepa resistente a la sequía de la micorriza *Glomus intraradices* asociada a una bacteria nativa redujo un 42% las necesidades de agua en un cultivo de *Retama sphaerocarpa* (Marulanda et al., 2006). Fueron puestos a prueba *Rhizopogon luteolus* y *Suillus luteus*, importantes hongos ectomicorrizicos donde produjo efectos significativos y en parámetros morfo fisiológicos, dependiendo de las combinaciones entre especies de micobiontes, fitobiontes y niveles de disponibilidad hídrica del suelo. El potencial hídrico disminuyó de acuerdo a la disponibilidad hídrica del suelo impuesta provocando el ajuste osmótico en las plantas. *Phoenix canariensis* micorrizada con *S. luteolus* y disponibilidad hídrica baja tiende a incrementar el porcentaje de micorrización. Mientras que, ante una disponibilidad hídrica media la micorrización con *R. luteolus* le indujo mayor altura (ALT), peso seco de la planta área (PSA), índice de robustez (IR) y masa foliar por área (LMA). Al incrementar el déficit hídrico, se registró mayores promedios en PSA (García-Rodríguez et al., 2018). La micorrización de *S. luteolus* sin deficit hídrico favoreció un mayor (PSA) y (ALT). Estos resultados aportan evidencia de que *S. luteolus* bajo condiciones de déficit hídrico parece influir positivamente más que *R. luteolus* en el comportamiento de algunas variables morfo fisiológicas en dos especies de pino. La ectomicorrización controlada con *R. luteolus* y *S. luteolus* tiene un efecto positivo dependiendo de las combinaciones de micobiontes y fitobiontes propuestas (Fonseca et al., 2018; García et al., 2018).

#### 4.7 Las ectomicorrizas ayudan a la adaptación a suelos salinos

La acumulación de sales en el suelo es un problema común en áreas de riego con clima árido y semiárido. Entre las causas que propician el problema por salinidad, se encuentra el uso de agua de riego de mala calidad y/o suelos de baja infiltración (Pérez-Moreno et al., 2010). Se consideran como suelos salinos aquellos que tienen una conductividad eléctrica (CE) mayor de 4 dS/m y suelos con (CE) menor de 4 dS/m, son considerados no salinos. El nogal es muy susceptible a la salinidad, una CE mayor de 3 dS/m reduce el rendimiento del fruto (Tarango, 2004). La salinidad es un factor limitante de la producción agrícola, los estudios sobre micorrizas y tolerancia de las plantas a este estrés es relativamente reciente. Resultados reportados por (Molina, 2005), demuestran el efecto inducido por la micorrización en la disminución de la deficiencia nutritiva provocada por antagonismos iónicos, efecto secundario del estrés salino, lo que permite crecimiento mayor de las plantas micorrizadas.

Adicionalmente, (Rivero et al., 2012) sugieren otros mecanismos para justificar el papel de las micorrizas en relación con la tolerancia a salinidad, tales como la inducción de cambios hormonales o la mejora en la capacidad de agua. Diferentes estudios realizados *in vitro* han dado como resultado que los hongos ectomicorrizicos y plantas suele disminuir con el incremento de la salinidad en el suelo o en el medio de crecimiento (Dixon, 1993). No obstante, se ha observado que generos como *Pisolithus*, *Laccaria* son más tolerantes a las sales de sodio que *Thelephora* o *Cenococcum* (Chen et al., 2010). Estos trabajos sobre *Pisolithus* se observó en (18 aislados) una alta resistencia al NaCl en suelos salinos. Lo cual confirma un eficiente proceso de osmorregulación en el citoplasma, manteniendo una alta actividad metabólica además los potenciales de agua para evitar el marchitamiento de la planta. Recientemente, en los programas de reforestación de sitios salinos ha cobrado interés el uso de los hongos ectomicorrizicos (HEM), lo cual ha motivado investigaciones enfocadas a identificar y aislar cepas de HEM tolerantes a salinidad. Actualmente existe la aplicación de herramientas bioquímicas y moleculares en el estudio de la

tolerancia a la salinidad en los HEM se ha observado que está constituida de una red de diferentes mecanismos altamente especializados que son regulados por grupos de genes que inducen la síntesis de proteínas con funciones específicas. Autores como (Liang et al., 2007) han evaluado a *Boletus* en condiciones de estrés salino mediante el uso de técnicas bioquímicas, identificaron diversas proteínas con funciones de protección. La importante utilización de estas herramientas, sirve para evaluar con detalle los diferentes mecanismos de tolerancia que los hongos ectomicorrizíco han desarrollado para sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de sales.

#### 4.8 LITERATURA CITADA

- Allen, M.F., 2007. Mycorrhizal fungi: Highways for water and nutrients in arid soils. *Vadose Zone Journal* 6:291-297.
- Arreola A. J.G., Lagarda M.A., Medina M.M.A, Figueroa V.U. 2002. Tecnología de Producción en Nogal Pecanero. INIFAP. México. 224 pp.
- Ávila Minga, J. D., & Quito Arias, D. N. (2019). Identificación de la biodiversidad fúngica a través del análisis metagenómico del suelo en el área de la concesión minera Loma Larga Azuay-Ecuador (Bachelor's thesis).
- Baciarelli-Falini, L., Rubini, A., Riccioni, C., Paolocci, F. (2006). Morphological and molecular analyses of ectomycorrhizal diversity in a man-made *T. melanosporum* plantation: description of novel truffle-like morphotypes. *Mycorrhiza*, 16(7), 475-484.
- Bagyaraj, J., Stürmer, S. (2012). Hongos micorrizógenos arbusculares (HMA). *Manual de Biología de Suelos Tropicales. Instituto Nacional de Ecología. México DF México*, 217-241.
- Benucci, G. M. N., Bonito, G., Falini, L. B., Bencivenga, M. (2012). Mycorrhization of Pecan trees (*Carya illinoensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad. and *Tuber borchii* Vittad. *Mycorrhiza*, 22(5), 383-392.

- Bloodnick, E. (2009). 680 Use of Mycorrhiza for Selected Horticultural Crops. *HortScience*, 34(3), 565-565.
- Bonito, G., Brenneman, T., Vilgalys, R. (2012). Ectomycorrhizal fungal diversity in orchards of cultivated pecan (*Carya illinoensis*; *Juglandaceae*). *Mycorrhiza*, 21(7), 601-612.
- Brisson, F. R. 1976. Cultivo del nogal pecanero. CONAFRUT (Comisión Nacional de Fruticultura). México, D. F.
- Briceño Contreras, E. A., Valenzuela Núñez, L. M., Espino Castillo, D. A., García de la Peña, C., Esparza-Rivera, J. R., & Borja de la Rosa, A. (2018). Contenido de almidón en órganos de nogal (*Carya illinoensis* Koch) en dos etapas fenológicas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(SPE20), 4161-4173.
- Brundett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove and N. Malajczuk. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Center for International Agricultural Research. Canberra, Australia.
- Cairney, J.W.G. and S.M. Chambers. 2007. Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge. *Mycorrhiza* 7: 117-131.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J. J., Quintero-Lizaola, R., Torres-Aquino, M. (2010). Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 1(4), 567-577.
- Celaya-Michel, H., y Castellanos-Villegas, A. E. (2011). Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas áridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana*, 29(3), 343-356.
- CHEN, Y.L.; Brundertt, M. C. and Dell, B. 2000. Effects of ectomycorrhizas and vesicular-arbuscular mycorrhizas, alone or in competition, on root

colonization and growth of *Eucalyptus globules* and *E. urophylla*. *New Phytol.* 146:545-556.

Corredor, G. Micorrizas arbusculares: Aplicación para el manejo sostenible de los agroecosistemas. Programa Nacional De Recursos Biofísicos, Corpoica, Bogotá, 2003, pp. 12 – 17.

Faggioli V, Freytes G y Galarza C (2008). Las micorrizas en trigo y su relación con la absorción de fósforo del suelo. INTA Marcos Juárez.

FIGUEROA V., U. 2001. Evaluación de las variedades de pistachero *Pistacia vera* L. *Kerman* y *Pegers* en el Valle de Juárez, Chihuahua, cultivadas en condiciones de salinidad. In: La investigación en pistachero en Chihuahua, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Universidad Autónoma de Chihuahua. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Fundación Produce Chihuahua. Chihuahua. Chih., México. p. 11-15.

FIRA, 2002. Nuez, análisis de su rentabilidad, Estudios de Apoyo y Servicios a la Comercialización Agropecuaria.

Fitter AH, Garbaye J. Interactions between mycorrhizal fungi and other soil organisms. *Plant and soil* 2000; 159: 123 – 133.

Fonseca Silva, P., González Abalde, C., Silva Bea, S., Touza Soage, P., Trigo Viéitez, A. (2018). REVBIGO: Revista da Faculdade de Biología. *Revista da Faculdade de Biología. Universidade de Vigo REVBIGO*, 10, 42-47.

García Rodríguez, J. L., Pérez Moreno, J., Aldrete, A., Cetina Alcalá, V. M., Vaquera Huerta, H. (2006). Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia*, 40(5).

García Rodríguez, J. L. (2018). Micorrización controlada de plántulas del género *Pinus* en vivero y su incidencia sobre atributos del material y del comportamiento.

- Gianinazzi S, Gollotte A, Binet M, van Tuinen D, Redecker D, Wipf D (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza* 20:519–530.
- González-Chávez, P., Ojeda-Barrios, G., Hernández-Rodríguez, A., Martínez-Téllez, J. A. I. M. E., Núñez-Barrios, Abelardo, (2009). Ectomicorrizas en nogal pecanero. *TECNOCIENCIA Chihuahua*, 3(3), 138-146.
- Harley, J. L., Harley, E. L. (1987). A check-list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist*, 105, 1-102.
- Hernández, M. I., Chailloux, M. (2004). Las micorrizas arbusculares y las bacterias rizosfericas como alternativa a la nutrición mineral del tomate. *Cultivos Tropicales*, 25(2).
- Marx, D. H. 1971. Root inhabiting mycorrhizal fungi benefit growth of trees. 5ht Ann. West. Irri. Pecan Grow. Assoc. Conf. New Mexico State University. Las Cruces, NM, USA.
- Marx, D. H., Bryan, W. C. (1970). Pure culture synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and P Benucci, G. M. N., Bonito, G., Falini, L. B., Bencivenga, M. (2012). Mycorrhization of Pecan trees (*Carya illinoensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum vittad.* and *Tuber borchii vittad.* *Mycorrhiza*, 22(5), 383-392. *Pisolithus tinctorius* on different conifer hosts. *Canadian Journal of Botany*, 48(3), 639-643.
- Marx, D.H. 1980. Ectomycorrhizal fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. In: Mikola, P. (ed.) Tropical mycorrhizal research. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. pp. 13-71.
- Molina, L., Mahecha, L., Medina, S. (2005). Importancia del manejo de hongos micorrizógenos en el establecimiento de árboles en sistemas silvopastoriles. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(2), 162-175.
- MUKERJI, K.G., R. Jalpal, M. Bali y R. Rani. 1999. The Importance of Micorrhizae for Roots and Plant Roots and Their Environment. Proceeding

- of an ISRR, Upsala Symposium. August 21st-26th Sweden. H. Pearson Amsterdam Elsevier 249 p.
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., Davies, S. J., Tan, S., Bruns, T. D. (2010). Potential link between plant and fungal distributions in a dipterocarp rainforest: community and phylogenetic structure of tropical ectomycorrhizal fungi across a plant and soil ecotone. *New phytologist*, 185(2), 529-542.
- Pera, J. y Parladé, J. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales*. 14(3):419-433.
- Pérez Pérez, g. i. l. d. a. r. d. o. (2014). Manejo y producción del nogal pecanero (*Carya illinoensis*) en México.
- Raddatz E. Micorriza: el abono vivo Campo & Agro. Zamorano, España, 2002, 15 p.
- Rivero, m. s. h. t. micorrizas y nutrición en nogal pecanero. in *xiii Simposio internacional de nogal pecanero* (p. 51).
- SIAP-SAGARPA. (2014). Cierre de la producción agrícola por cultivo 2013. SAGARPA. Fecha de consulta: 10 de septiembre de 2015.
- Smith, S.E., D.J. Read. 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd edition. Academic Press. London
- Soto Parra, J. M., Piña Ramírez, F. J., Sánchez Chávez, E., Pérez Leal, R., Basurto Sotelo, M. (2016). Alternativas orgánicas para disminuir la aplicación de nitrógeno en nogal pecanero. *Nova scientia*, 8(16), 140-161.
- Talbot, J. M., Allison, S. D., Treseder, K. K. (2008). Decomposers in disguise: mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change. *Functional ecology*, 22(6), 955-963.
- Tarango Rivero, S. H. (2006). Fenología y botánica de genotipos de pistachero (*pistacia spp.*) seleccionados para la formación de portainjertos resistentes

al hongo *phymatotrichopsis omnivora* (duggar) *hennebert*. revista *Chapingo serie zonas áridas*, (1).

Tarango, H. 2004. Manejo del nogal pecanero con base en su fenología. Centro de Investigación Norte-Centro. Campo Experimental Delicias. Folleto Técnico no. 17. México.

Trappe, J.M., 1987. Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. En: Safir, J.R. (Ed.), *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*, pp. 5-25.C, CRC Press, Boca Raton, USA.

Van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., Sanders, I.R., 2008b. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396:69-72.

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

Wang, B., & Qiu, Y. L. (2006). Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza*, 16(5), 299-363.

Wedén, C., Danell, E., & Tibell, L. (2005). Species recognition in the truffle genus *Tuber*—the synonyms *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*. *Environmental Microbiology*, 7(10), 1535-1546.

Woodroof, N. C. (1933). Pecan mycorrhizas.

## CAPÍTULO II

### MACROMICETOS ASOCIADOS CON *Carya illinoensis* EN LA COMARCA LAGUNERA, MÉXICO

#### RESUMEN

Los agroecosistemas, como los cultivos de *Carya illinoensis* (nogal pecanero), representan una actividad económica importante y de constante crecimiento en La Comarca Lagunera, México. La mayor parte de los macromicetos que se asocian con el nogal pecanero se distribuyen en los primeros horizontes del suelo y en la rizosfera de las plantas. Para recolectar los macromicetos asociados al nogal, se realizaron recorridos dos veces por semana de mayo a octubre de 2018 cubriendo 25 ha de una huerta en La Comarca Lagunera México. A los hongos recolectados se les secuenció la región ITS del DNA ribosomal para corroborar su identificación taxonómica por medio de análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud y Bayesianos. Se encontraron cinco especies de hongos asociados al nogal pecanero: *Agaricus deserticola*, *Candolleomyces luteopallidus*, *Candolleomyces* sp., *Tuber* sp. y *Scleroderma cepa* s.l. De estos, *C. luteopallidus* se registra por primera vez en México. Se discute la importancia de la diversidad de los hongos en este sistema agroforestal pues los saprobios descomponen la materia orgánica y los ectomicorrizógenos transfieren macro y micronutrientes al nogal esenciales para su crecimiento y productividad.

**Palabras clave** : Agroecosistemas, diversidad de hongos, *Carya illinoensis*, nogal pecanero

## ***Carya illinoensis* macrofungi in La Comarca Lagunera, Mexico**

### **ABSTRACT**

Agroecosystems, such as *Carya illinoensis* (pecan tree) orchards, represent an important and constantly growing economic activity in La Comarca Lagunera, Mexico. Most of the macromycetes associated with pecan tree are distributed in

---

Tesis de Doctorado en Ciencias, Posgrado en Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas, Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo  
Autor: Judith Abigail Sánchez Ledesma  
Director de Tesis: Jesús G. Arreola Ávila

the soil first horizons and in the plants rhizosphere. To collect the macromycetes associated with pecan trees, we conducted twice a week surveys from may to october 2018 covering 25 heactares of an orchard in La Comarca Lagunera Mexico. To corroborate their taxonomic identification, we sequenced the DNA ITS region from collected fungi with the aim of Maximum Likelihood and Bayesian phylogenetic analyses. We found five species of macrofungi associated with pecan trees: *Agaricus deserticola*, *Candolleomyces luteopallidus*, *Candolleomyces* sp., *Tuber* sp. y *Scleroderma cepa* s.l. Of these, *C. luteopallidus* is recorded for the first time in Mexico. The importance of fungal diversity in this agroforestry system is discussed because saprobe fungi decompose organic matter and ectomycorrhizal fungi transfer macro and micronutrients to the pecan tree essential for its growth and productivity.

**KeywordS:** Agroecosystems, fungal diversity, *Carya illinoensis*, pecan tree

## INTRODUCCIÓN

*Carya illinoensis* (nogal pecanero) es económicamente la especie más importante del género *Carya* (Casales et al., 2018). De este árbol frutícola se cultivan más de 92 000 ha en México, siendo Chihuahua el estado con el mayor territorio

---

Doctoral Thesis, Posgraduate in Recursos Naturales y Medio Ambiente en Zonas Áridas  
Unidad Regional Unioversitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo  
Author: Judith Abigail Sánchez Ledesma  
Advisor: Jesús Guadalupe Arreola Ávila

cultivado de 9179 ha, seguido de La Comarca Lagunera con 3173 ha (SIAP, 2018). Esta especie es cultivada principalmente por su nuez que es una fuente de aceites, proteínas y exquisito sabor, siendo pocos los alimentos que superan su riqueza y digestibilidad (Villasante et al., 2019). La distribución de las especies de *Carya* al norte de México es el resultado de una buena adaptación ambiental. Los árboles de estas especies que se desarrollan en zonas áridas tienen una mayor densidad estomatal en las hojas como un mecanismo adaptativo para reducir las pérdidas de agua por evapotranspiración (Sagaram et al., 2011). El nogal pecanero presenta asociaciones simbióticas con hongos ectomicorrizicos altamente especializados (Marx y Bryan et al., 1977; Tarango, 2004). En el norte de México, en huertas de nogal pecanero, se han registrado distintos géneros de hongos en su mayoría ectomicorrizicos como *Astraeus Gyrodon*, *Pisolithus*, *Russula*, *Tuber* y *Tylopilus* (Taber et al., 1982; Smith et al., 1988). En las huertas de *Carya illinoensis* de América Latina también se han encontrado especies ectomicorrízicas como *Laccaria* sp. y *Scleroderma* sp. (Smith et al., 1988). Estos hongos ectomicorrizicos proporcionan diferentes beneficios en términos de sobrevivencia, nutrición y productividad al nogal. Así mismo, en huertas de nogal pecanero se han encontrado hongos saprobios que juegan un papel fundamental en el funcionamiento de este agroecosistema pues descomponen la materia orgánica y reciclan los nutrientes en el suelo, constituyendo así un recurso forestal integral (Yun et al., 2004). Los macromicetos en las huertas de nogal pecanero, están distribuidos en los horizontes superficiales del suelo y en la rizosfera de los árboles, manteniendo el funcionamiento, estructura y equilibrio en las huertas (Córdoba- Chávez et al., 2014; Ávila Minga et al., 2019). Por lo tanto, es de suma importancia reconocer el valor de ecológico de estos hongos, estudiar su diversidad, y distribución (Ramírez, 2013). Este conocimiento se podría aprovechar para promover el crecimiento del nogal y favorecer su adaptación a los diferentes ambientes y condiciones climáticas (Tovar et al., 2004; Cantrell, 2008).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **Muestreo, caracterización e identificación morfológica**

Para la realización de esta investigación se trabajó en un huerto de *Carya illinoensis* de La Comarca Lagunera, situada en Viesca municipio de Matamoros Coahuila, cuyas coordenadas geográficas son 2.5° 25' N, 108° 18' O, con una elevación de 1200 metros sobre el nivel del mar. El huerto se maneja de acuerdo al paquete tecnológico de producción de nogal pecanero (INIFAP, 2002) incluyendo el control de malezas por la técnica de “chapoleo” con licuadora mecánica, excluyendo así las prácticas de rastreo y movimiento de suelo. El huerto cuenta con un sistema de plantación marco real 12 x 12, un sistema de riego por goteo subsuperficial y un suelo de textura franco – arcillosa, con una capacidad de campo de 0.35 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup> y un punto de marchitez permanente de 0.19 m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>. En esta localidad se realizaron recorridos en bloques de 5 km<sup>2</sup> en 5 sitios, se realizó la búsqueda y recolección de ejemplares de hongos que crecen espontáneamente, durante 9 meses, comprendidos entre mayo y noviembre de 2018. Los cuerpos fructíferos de los hongos se recolectaron haciendo una revisión de ramas, arbustos, hojarasca y suelo. Cada espécimen se depositó en papel encerado marcado con sus datos de colecta. Para cada recolecta se realizó registro fotográfico y observaciones como tamaño, color, forma, etc. Los colores de los hongos se registraron usando la guía de colores de Munsell (1975). Para identificar las estructuras microscópicas se analizaron preparaciones temporales con KOH al 5% y reactivo de Melzer en microscopios Velab VE–B3 y ZEISS Scope A1. Se identificaron los especímenes de acuerdo a las claves taxonómicas de Guzmán (1989), Pacioni (2008) y Largent et al., (2000). Para el arreglo taxonómico, se siguió la clasificación del catálogo de autoridades taxonómicas de los hongos en México (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2008) y la clasificación de Index Fungorum (CABI, 2012). Para complementar las identificaciones taxonómicas con análisis filogenéticos, de uno o dos ejemplares por cada morfoespecie se secuenció su DNA.

## **Técnicas moleculares**

Actualmente el uso de códigos de barras genéticos es una herramienta en la identificación rápida de especies que tiene como propósito, el uso sustentable, la conservación y el conocimiento de la biodiversidad (Bickford et al., 2007; Paz et al., 2011; Yahr et al., 2016). En este trabajo, además de generar los códigos de barras genéticos, usamos las secuencias de DNA para complementar las identificaciones taxonómicas con análisis filogenéticos para cada uno de los géneros encontrados.

*Extracción de DNA.* El DNA fue amplificado por PCR en reacciones de 25 µl de acuerdo al procedimiento de Sambrook et al. (1989). Las reacciones consistieron en 2.5 µl de buffer de PCR 10X, 2.0 µl de MgCl 2.5 Mm concentración final, 2.0 µl de dNTPs (CA, USA) 2.0 µl de cada primer de 10 picomoles/µl concentración final, 0.2 µl, (1.5 U) de Taq polimersa (GoTaq®, Flexi DNA Polymerase, Promega, WI), 11.3 µl de agua de grado MiliQ, y 3 µl de DNA. La región de los interespaciadores ribosomales (ITS) se amplificó con los oligonucleótidos ITS4 e ITS5 (Vrain et al. 1992 y Ratcliffe et al. 2002). El programa de PCR consistió en un ciclo inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos de las temperaturas 94 °C, 51 °C y 72 °C durante 1 minuto y una extensión final a 72°C durante 8 minutos (Taylor et al. 2006). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador MiniAmp Plus Thermal Cyclcr.

*Visualización de los productos de PCR.* El DNA, así como los productos de PCR fueron revisados en geles de agarosa al 0.8% y 1.5%, respectivamente. Se utilizó como amortiguador TBE al 0.5% (tris base, ácido bórico, EDTA al 0.5M, pH 8.0). Las muestras fueron teñidas con Gel Red® y se empleó un marcador de peso molecular de 100 pb (Axygen) como referencia. Los geles fueron fotografiados en un fotodocumentador Multidoc-IT (UVP®, Analytik Jena Company, CA).

*Secuenciación y análisis filogenéticos.* Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar en ambos sentidos a la compañía Macrogen Corp. (Rockville, MD), con los mismos primers de la PCR. Las secuencias nucleotídicas fueron editadas y alineadas en Geneious Prime® versión 2021 0.3, con el algoritmo de MUSCLE (Maddison y Maddison 2015; Edgar, 2004).

Los alineamientos fueron revisados de forma manual y las regiones ambiguas fueron excluidas. Para los análisis filogenéticos se usaron las secuencias de DNA más cercanas obtenidas de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica NCBI por medio de algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990). También se incluyeron secuencias de referencia incluidas en análisis filogenéticos recientes de los géneros. El análisis de inferencia Bayesiana (BI) se realizó en Mr.Bayes 3.2.5 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). El análisis de máxima verosimilitud (ML), se realizó con RAxML.7.2.6 (Stamatakis,2006). De manera particular, para el género *Candelleomyces* el análisis Bayesiano se realizó con un modelo sustitución de nucleótidos JC69, radio de variación gamma, 4 cadenas de Montecarlo, 2 millones de generaciones, muestreando cada 200 y descartando el primer 20%. El análisis de Máxima Verosimilitud usó el modelo de sustitución de nucleótidos JC69, con mil réplicas de Bootstrap y el árbol se enraizó con *Candelleomyces typhae* DQ389721. Para el género *Agaricus* el análisis Bayesiano se realizó con un modelo sustitución de nucleótidos JC69, radio de variación gamma, 4 cadenas de Montecarlo, 2 millones de generaciones, muestreando cada 200 y descartando el primer 20%. El análisis de Máxima Verosimilitud usó el modelo de sustitución de nucleótidos JC69, con mil réplicas de Bootstrap y el árbol se enraizó con la secuencia KY366488 de *Agaricus* sp. Para el género *Tuber* sp. el análisis Bayesiano usó un modelo sustitución de nucleotídicos JC69, radio de variación gamma, 4 cadenas de Montecarlo, 2 millones de generaciones, muestreando cada 200 y descartando el primer 20%. El análisis de Máxima Verosimilitud usó el modelo de sustitución de nucleótidos JC69, con mil réplicas de Bootstrap, el árbol se enraizó con la secuencia JQ925649 de *Tuber* sp. Para el género *Scleroderma* sp. el análisis Bayesiano usó un modelo sustitución de nucleótidos JC69, radio de variación gamma, 4 cadenas de Montecarlo, 2 millones de generaciones, muestreando cada 200 y descartando el primer 20%. El análisis de Máxima Verosimilitud usó el modelo de sustitución de nucleótidos JC69, con mil réplicas de Bootstrap, el árbol se enraizó con *Scleroderma polyrhizum* FM213349. En todos los géneros se consideró informativo cuando el valor de botstrap fue  $\geq 70\%$  y la probabilidad posterior fue

≥ 0.9. Las secuencias, generadas en este estudio, están disponibles en GenBank bajo los números de acceso MZ092918, MZ092919, MZ092920, MZ092921, MZ092922, MZ092923 (Tabla 1).

## RESULTADOS

Basados tanto en caracteres morfológicos como análisis filogenéticos se identificaron cinco especies de hongos en la huerta de nogal pecanero: *Candolleomyces luteopallidus*, *Candolleomyces* sp., *Tuber* sp., *Agaricus deserticola* y *Scleroderma cepa* s.l.

Los análisis filogenéticos demuestran que las muestras st2, st27 y st28 pertenecen al género *Candolleomyces* (Figura 3). La muestra st2 se ubicó dentro del clado de *Candolleomyces luteopallidus* con un buen soporte (PPB = 1, MLB = 77). Esta especie es el grupo hermano de *C. halophilus* y *C. littoralis* (PPB = 0.99, MLB = 73). Por su parte, las muestras st27 y st28 forman un clado independiente relacionado con poco soporte con *C. efflorescens* (PPB = 0.8, MLB = 40) y con un conjunto de muestras identificadas como *Candolleomyces* sp. (PPB = 0.86, MLB = 42). La muestra st3 se ubicó en el género *Tuber* (Figura 4) junto con la secuencia del voucher FLAS:MES-646 identificada como *Tuber* sp. en un clado con poco soporte (PPB= 0.69, MLB=51). Este clado es el grupo hermano de *Tuber texense* (PPB=1, MLB=95). En el caso de la muestra st4, esta se ubicó en género *Agaricus* (Figura 5) dentro del clado de *A. deserticola* con un buen soporte (PPB=0.97, MLB=90). Esta especie es el grupo hermano de *Agaricus evertens* (PPB=1, MLB=95). La muestra st26 se ubicó en el género *Scleroderma* (Figura 6) en un clado con numerosas secuencias identificadas como *Scleroderma* sp. (FM213343, MG212207), *S. malcapinei* (EU218122), *S. laeve* (EU718117) o *S. cepa* (MT005950) con un buen soporte de (PPB=1, MLB=92). Estas secuencias junto con FM213354 y FM213343 son el grupo hermano de *S. aerolatum* (PPB=1, MLB=78).

### **Descripción de las especies**

*Candolleomyces luteopallidus*. Carpóforo con píleo acampanado de 10 a 20 mm de ancho, café que se decolora a blanco, cutícula lisa, estriado. Los cuerpos fructíferos jóvenes tienen colores más vívidos que los viejos. Láminas agrietadas, al principio blancas luego purpuras. Carne frágil, inodora, muy escasa, Pie delicado, de 1-3 cm, aterciopelado, café-marrón. Esporas (3-6) x (4-5)  $\mu\text{m}$ , lisas, rojizas en agua y marrón oscuro en KOH al 5%, elipsoides, cilíndricas ocasionalmente subovoides, con poro germinativo central muy pequeño. Se encontró abundantemente a inicios de otoño, crecen adheridas a la corteza de árbol, se considera un hongo saprofita que se alimenta de la corteza muerta.

*Candolleomyces sp.* Carpóforo con píleo más o menos acampanado, que oscila entre 4 y 8 cm de ancho, para después hacerse convexo, al madurar su borde se vuelve inrolado, cutícula lisa, estriado en la parte superior con el centro café, higrófono que se convierte en gris a salmón. Láminas marrones a crema, en ocasiones blancas. Pie delicado, aterciopelado blanco a crema de 1-8 cm. Carne frágil, inodora y muy escasa. Saprófito encontrado de mayo a agosto, en la maleza de los primeros horizontes de la huerta. Esporas alargadas negruzcas (6-8) x (4-5)  $\mu\text{m}$ , lisas, de color marrón en agua y marrón oscuro en KOH, con poro germinativo central.

*Tuber sp.* Ascoma hipogeo, globoso a subgloboso, irregular, café-marrón, sin cambio de color al tacto, venas blancas finas, cerradas y numerosas, con 4-6 verrugas en 1 mm, sólido, superficie seca separable con dermatocistidios y surcos blancos. Peridio de 120  $\mu\text{m}$  de grosor, epicutis pseudoparenquimatoso 92  $\mu\text{m}$  de ancho, células isodiamétricas 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho. Esporas (8-3) x (4-6)  $\mu\text{m}$ , hialinas marrón en KOH, paredes 2  $\mu\text{m}$  de grosor, subcutis 27  $\mu\text{m}$  de grosor delimitado por el epicutis, entretejido por hifas postradas o entrelazadas de 4-5  $\mu\text{m}$  amplio en el septo. Se encontró en el mes de septiembre, en solitario en ocasiones gregario a 3 cm de profundidad.

*Agaricus deserticola*. Carpóforo secotioide, píleo subgloboso a ovoide, blanco a pardo a veces escamoso, margen que se fusiona con el estípite durante el desarrollo. No forma láminas, las esporas se encuentran dentro de la gleba.

Grácil, de 5 a 20 cm de altura y los píleos de 2 a 6 cm de ancho, estípite de 10-13 cm de ancho. Carne blanca y con la desecación y edad adquiere tonos amarillos. Esporas violetas ovales de (7-9) x (4-6)  $\mu\text{m}$ . Se encontró en junio-julio, en zonas de la huerta donde hay escasez de agua y riego por goteo subsuperficial, abundante luz y árboles de poco follaje.

*Scleroderma cepa* s.l. Carpóforos globosos con grietas irregulares, un poco escachados con un exoperidio marcado con escamas poligonales. La gleba cuando es inmaduro es blanca con tonos verdes con una pequeña retícula blanca, después se vuelve gris y al final es negra a violeta. Entonces, el hongo se rompe por la zona apical y expulsa esporas pulverulentas grisáceas. Gleba con olor desagradable. Con pseudo estípite radicante con abundante micelio blanquecino-amarillento. En el himenio hay basidios esféricos, hifas emergentes, esporas esféricas con espinas aisladas, sin crestas de conexión de (8-9) x (12-14)  $\mu\text{m}$ . Fructifica desde julio a noviembre, siendo más abundante en septiembre y octubre.

## DISCUSIÓN

Nuestro ejemplar de *C. luteopallida* presenta una similitud nucleotídica de 99.5% con el ejemplar tipo de *C. luteopallida* (Tabla 1). Secuencias de DNA de muestras ambientales de esta especie se han encontrado en suelo de matorral xerófilo y raíces de pastos de zonas semidesérticas en el norte de México y sur de EUA. Nuestros ejemplares identificados como *Candolleomyces* sp. presentan una similitud nucleotídica de 99.1% con múltiples muestras de vouchers identificados como *Psathyrella* sp. de la India. Todos estos ejemplares a su vez se ubican filogenéticamente en el complejo de *Candolleomyces candolleanus* (Figura 3) por lo que en realidad se trata de una especie no descrita de *Candolleomyces*. Nuestro ejemplar de *Tuber* sp. presentó un valor de 97% de similitud nucleotídica con el ejemplar FLAS:MES-646 identificado como *Tuber* sp. procedente de Texas, EUA. Sin embargo, su secuencia es 100% idéntica a las secuencias de muestras de micorrizas de nogal pecanero en Chihuahua (datos no publicados). Por lo tanto, se trata de una especie no descrita micorrízica de *C. illinoensis* distribuida

en el norte de México y sur de EUA. Nuestro ejemplar de *Agaricus deserticola* tienen una similitud nucleotídica entre 100% y 99.4% con secuencias de ejemplares de esta especie provenientes del suroeste de EUA. La secuencia de nuestro ejemplar de *Scleroderma* es muy similar (100-99.7%) con decenas de secuencias de ejemplares identificados mayoritariamente como *S. cepa* o como *S. laeve* o *S. malcapinei*. Debido a que las especies de este clado son muy plásticas morfológicamente y no existen secuencias de los ejemplares tipo, conservadoramente identificamos nuestra muestra como *S. cepa* s.l.

*Candolleomyces* es un género agarical recientemente segregado de *Psathyrella*. Este último género se subdivide en 13 subclados monofiléticos con numerosas especies no descritas y complejos de especies con alta variación morfológica Wächter y Melzer (2020). *Candolleomyces luteopallidus* es una especie rara, con pocos registros a nivel mundial, aunque se ha reportado en ecosistemas de árboles de interés forestal como una plantación joven de olivos en Europa (Muñoz et al., 2014). Este constituye el primer registro de la especie para México y su primer reporte en huertas de nogal pecanero.

Morfológicamente *Candolleomyces* sp. es muy similar a *Candolleomyces candolleanus*. Este último taxón es un complejo de especies (antes conocido como *Psathyrella candolleana*) con una gran variación morfológica y amplia distribución geográfica Wächter y Melzer (2020). Esta especie es común en América del Norte y América del Sur (Guzmán 1970; Guzmán et al., 1988). En México se encuentra registrada en el trópico mexicano en bosques mesolíticos (Guzmán et al., 1988) y bosques de pino en el cerro del Perote en Veracruz (Smith, 1972).

*Tuber* es un género de hongos hipógeos ascomicetes que presenta relaciones simbióticas micorrízicas con árboles de interés forestal como castaños, robles, nogales (Bonito et al., 2011; Benucci et al., 2012). El género tiene una distribución geográfica amplia, se sabe que se encuentran reportadas más de 30 especies en Europa, particularmente Portugal, España, Francia e Italia (Benucci, 2012). Para México se tienen reportadas 13 especies, distribuidas desde el norte, hacia

el centro y sur de México, siendo los principales estados Nuevo León y Tamaulipas (Bonito et al., 2010; Guevara et al., 2013). *Tuber* sp., reportada en este estudio, es una especie no descrita para la ciencia que pertenece al complejo de *Tuber lyonii* (sensu Healy et al., 2016) junto con *T. texense*. Esto es interesante ya que estas tres se desarrollan en huertas de nogal pecanero; *T. texense* y *T. lyonni* reportadas al sur de EUA y *Tuber* sp. reportada anteriormente en huertas de *Carya illinoensis* en México especialmente en el estado de Chihuahua (González et al 2009; Tarango et al., 2011). Este es el primer reporte para La Comarca Lagunera de Coahuila.

*Agaricus* es un género de hongos agaricales con aproximadamente 500 especies en el mundo (Bass, 1991; Kirk et al., 2008) (Palestina-Villa et al., 2020). Su distribución geográfica es amplia en Norteamérica, donde ha sido reportado al oeste y suroeste de EUA (Zeller, 1941). En México se han reportado 53 nombres válidos distribuidos en 28 estados (Palestina-Villa et al., 2020). Para *Agaricus deserticola* se tienen reportes para los estados de Baja California, Chihuahua y Sonora. Se ha encontrado principalmente en hábitats secos o semi áridos, tales como desierto, pradera, matorrales de salvia costera, campos, cespedes y zonas urbanas, así como en bosques de *Quercus*, y bosques de espinas (Harding, 1957; Quiñones et al., 1999; Moreno et al., 2010; Palestina-Villa et al., 2020). Esta es la primera vez que *Agaricus deserticola*, se reporta en plantaciones de *Carya illinoensis* y en Coahuila.

*Scleroderma* es un género de hongos gasteroides en la familia *Sclerodermateaceae* cosmopolita y simbiote ectomicorrízico de distintos hospederos como *Castanea*, *Quercus*, *Fagus*, *Nothofagus* *Pinus*, *Prunus* y Orquídeas, desde zonas tropicales hasta zonas áridas (Phosri et al., 2009; Cruz et al., 2017; Gonzalez-Chávez et al 2018). Se ha registrado en Europa y Norteamérica, destacan reportes en Chile, Argentina, Brasil y Tailandia (Guzmán et al., 1983; Gurgel et al., 2008; Nouhra et al., 2012; Kumla, J et al., 2013; Cruz et al., 2017;). En México, se tienen registros de 21 especies de *Scleroderma*, siendo la más común *S. nitidum* (Guzmán et al., 2013). Se tienen reportes de

esporomas en la Costa del Pacífico, Puebla, Veracruz y en Chihuahua (Rivero et al., 1999; Gúzman et al., 2004; Tarango et al., 2004; González -Chávez et al., 2018). Además, en este último estado, se tienen registros de ectomicorrizas en huertas de nogal pecanero (Rivero et al., 1999; Tarango et al., 2004). Nuestros datos corroboran que se trata de un simbionte ectomicorrízico del nogal pecanero en La Comarca Lagunera de manera abundante y natural (Kumla, J et al., 2013). Sobre *Scleroderma cepa* s.l. se tienen registros de cuerpos fructíferos en *Quercus pubescens* y *Fagus sylvatica* (Mrak, et al., 2017). Por la amplia y abundante distribución de *Scleroderma*, se propone muestrear más cantidad de cuerpos fructíferos en las huertas de nogal pecanero, tanto al sur de Estados Unidos como al norte de México, con el fin de aumentar conocimiento a la micorrización en *Carya illinoensis* con *Scleroderma* sp.

En general las plantaciones de *Carya illinoensis* tienen poca diversidad de hongos, pero es importante señalar que durante las recolectas observamos que las especies identificadas fructifican abundantemente en la huerta cubriendo amplias superficies. En huertas de nogal pecanero se tienen registros de hongos ectomicorrizógenos tal es el caso de *Tuber* sp. (Bonito et al 2013; Guevara et al., 2013) y *Scleroderma* sp. (González et al., 2009; Bonito et al., 2011). Sin embargo, no se tenían registros de hongos saprobios como *Candelleomyces luteopallida*, *Candelleomyces* sp. y *Agaricus deserticola*. Con este trabajo contribuimos al conocimiento de los macromicetos en plantaciones de *Carya illinoensis* con nuevos registros para La Comarca Lagunera de Coahuila.

Por lo anterior concluimos que, dada a la escasez de trabajos de identificación taxonómica y molecular de hongos asociados a nogal pecanero (*Carya illinoensis*), la diversidad de macromicetos encontrada es un avance importante para entender la diversidad y función de las huertas de nogal pecanero. Señalamos la importancia de incrementar los inventarios de hongos en agroecosistemas que también presentan una importante riqueza micológica. Es importante fomentar el uso de caracteres ecológicos, moleculares y morfológicos en los estudios de diversidad fúngica.

## LITERATURA CITADA

- Al-Habib, M. N., Holliday, J., Tura, D. (2014). The pale brittle stem mushroom, *Psathyrella candolleana* (higher Basidiomycetes): an indigenous medicinal mushroom new to Iraq. *International journal of medicinal mushrooms*, 16(6).
- Ávila Minga, J. D., Quito Arias, D. N. (2019). Identificación de la biodiversidad fúngica a través del análisis metagenómico del suelo en el área de la concesión minera Loma Larga Azuay-Ecuador (Bachelor's thesis).
- Benucci, G. M. N., Bonito, G., Falini, L. B., Bencivenga, M. (2012). Mycorrhization of Pecan trees (*Carya illinoensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad. and *Tuber borchii* Vittad. *Mycorrhiza*, 22(5), 383-392.
- Benucci, G. M. N., Csorbai, A. G., Falini, L. B., Bencivenga, M., Di Massimo, G., Donnini, D. (2012). Mycorrhization of *Quercus robur* L., *Quercus cerris* L. and *Corylus avellana* L. seedlings with *Tuber macrosporium* Vittad. *Mycorrhiza*, 22(8), 639-646.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology evolution*, 22(3), 148-155.
- Bonito, G., Brenneman, T., Vilgalys, R. (2011). Ectomycorrhizal fungal diversity in orchards of cultivated pecan (*Carya illinoensis*; Juglandaceae). *Mycorrhiza*, 21(7), 601-612.
- Bonito, G., Smith, M. E., Nowak, M., Healy, R. A., Guevara, G., Cázares, E., Murat, C. (2013). Historical biogeography and diversification of truffles in the Tuberales and their newly identified southern hemisphere sister lineage. *PloS one*, 8(1).
- Büttner, E., Karich, A., Do huu, N. G., Lange, M., Liers, C., Kellner, H., Hofrichter, M. *Candolleomyces eurysporus*, a new Psathyrellaceae (Agaricales) species from the tropical Cúc Phương National Park, Vietnam.
- Candia-Sánchez, L. F., Álvarez-Cervantes, J., Díaz, R., Díaz-Godínez, G., Tlaxcala, I. Potential use of bioreactors for laccases production of basidiomycete fungi. *Usos potenciales de biorreactores para la producción de lacasas de hongos basidiomicetos*.
- Cantrell, S. A., Lodge, D. J. (2008). Capítulo 4: Hongos. In: Joglar, Rafael L., ed. *Biodiversity of Puerto Rico: Agustin Stahl, Flora, Fungi*. La Editorial, Universidad de Puerto Rico: 247-295.
- Casales, F. G., Van der Watt, E., Coetzer, G. M. (2018). Propagation of pecan (*Carya illinoensis*): a review. *African Journal of Biotechnology*, 17(18), 586-605.

- Córdova-Chávez, O., Medel, R., Mata, G., Castillo, R., Vázquez-Ramírez, J. (2014). Evaluación de hongos ectomicorrícicos del grupo de los basidiomicetos en la zona del Cofre de Perote, Veracruz. *Madera y bosques*, 20(1), 97-106.
- Córdova-Chávez, Octavio, Medel, Rosario, Mata, Gerardo, Castillo, Ranulfo, Vázquez-Ramírez, Jerónimo. (2014). Evaluación de hongos ectomicorrícicos del grupo de los basidiomicetos en la zona del Cofre de Perote, Veracruz. *Madera y bosques*, 20(1), 97-106. Recuperado en 11 de enero de 2021, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-04712014000100009&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-04712014000100009&lng=es&tlng=es).
- Cruz, R., Carvajal, L., Pérez, S. (2017). Identificación de *Scleroderma citrinum* Pers en una plantación de almendros de la ciudad de Villa Alemana, Chile. *Boletín Micológico*, 32(2), 34-38.
- Domínguez, E. R., Fernández, A. S., Álvarez, M. A. M., Menéndez, J. L. (2006). Catálogo provisional de macromicetos (setas) de Asturias. Real Instituto de Estudios Asturianos.
- Frutis, I., Guzmán, G. (1983). Contribución al conocimiento de los hongos del estado de Hidalgo. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 18, 219-265.
- Fungorum, I. (2019). Index Fungorum base de datos. Disponible en: Disponible en: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> [consultado 7. X. 2018].
- Gómez, V (2013). Basidiomicetos: características, nutrición, hábitat y reproducción.
- González-Chávez, B. P., Ojeda-Barríos, D. L., Hernández-Rodríguez, O. A., Martínez-Téllez, J., Núñez-Barríos, A. (2009). Ectomicorrizas en nogal pecanero. *Tecnociencia Chihuahua*, 3(3), 138-146.
- González-Chávez, M. D., Torres-Cruz, T. J., Sánchez, S. A., Carrillo-González, R., Carrillo-López, L. M., Porras-Alfaro, A. (2018). Microscopic characterization of orchid mycorrhizal fungi: *Scleroderma* as a putative novel orchid mycorrhizal fungus of Vanilla in different crop systems. *Mycorrhiza*, 28(2), 147-157.
- Guevara, G., Bonito, G., Cázares, E. (2013). Revisión del género *Tuber* (*Tuberaceae: Pezizales*) de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84, S39-S49.
- Gurgel, F. E., Silva, B., Baseia, I. G. (2008). New records of *Scleroderma* from northeastern Brazil. *Mycotaxon*.
- Guzmán, G. (1970). Nuevas claves para identificar algunos Macromicetos para identificar algunos Macromicetos mexicanos

- Guzmán, G., Montoya-Bello, L. Bandala-Muñoz, V.M. A new species of *Psathyrella* (*Agaricales, Coprinaceae*) from Mexico with discussions on the known species. *Brittonia* 40, 229–234 (1988). <https://doi.org/10.2307/2807012>
- Guzmán, G., Ramírez-Guillén, F., Miller Jr, O. K., Lodge, D. J., Baroni, T. J. (2004). *Scleroderma stellatum* versus *Scleroderma bermudense*: the status of *Scleroderma echinatum* and the first record of *Veligaster nitidum* from the Virgin Islands. *Mycologia*, 96(6), 1370-1379.
- Guzmán, G., Cortés-Pérez, A., Guzmán-Dávalos, L., Ramírez-Guillén, F., Del Refugio Sánchez-Jácome, M. (2013). An emendation of *Scleroderma*, new records, and review of the known species in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, S173-S191
- Harding Jr, P. R. (1957). Notes on *longula texensis* var. major. *Mycologia*, 49(2), 273-276.
- Hernández-Crespo, J. C. (2006). SIMIL, Sistema de Información Micológica Ibérica en Línea. Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC Proyecto Flora Micológica Ibérica I-VI (1990-2008). Ministerio de Educación y Ciencia, España. Ministerio de Educación y Ciencia, España.
- Jeandroz, S., Murat, C., Wang, Y., Bonfante, P., Tacon, F. L. (2008). Molecular phylogeny and historical biogeography of the genus *Tuber*, the ‘true truffles’. *Journal of Biogeography*, 35(5), 815-829.
- Keirle, M. R., Hemmes, D. E., Desjardin, D. E. (2004). Agaricales of the Hawaiian Islands. 8. Agaricaceae: *Coprinus* and *Podaxis*; Psathyrellaceae: *Coprinopsis*, *Coprinellus* and *Parasola*. *Fungal Diversity*, 15(3), 33-124.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Cannon, D.W., Minter, J.A., Stalpers, J.A. (2008). *Dictionary of the Fungi*, 10th edition. CABI, Wallingford. 771 pp.
- Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F., Bahram, M., Larsson, K. H. (2013). Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi.
- Kumla, J., Suwannarach, N., Bussaban, B., Lumyong, S. (2013). *Scleroderma suthepense*, a new ectomycorrhizal fungus from Thailand. *Mycotaxon*, 123(1), 1-7.
- Marx, D. H., & Bryan, W. C. (1969). *Scleroderma bovista*, an ectotrophic mycorrhizal fungus of pecan. *Phytopathology*.
- Mrak, T., Kühdorf, K., Grebenc, T., Štraus, I., Münzenberger, B., Kraigher, H. (2017). *Scleroderma areolatum* ectomycorrhiza on *Fagus sylvatica* L. *Mycorrhiza*, 27(3), 283-293.
- Moreno, G., Lizárraga, M., Esqueda, M., Coronado, M. L. (2010). Contribution to the study of gasteroid and secotoid fungi of Chihuahua, Mexico. *Mycotaxon*, 112(1), 291-315.

- Muñoz, G., Caballero, A. (2012). Contribución al conocimiento del género *Psathyrella* en la Península Ibérica (I). Bol Micol FAMCAL, 7, 37-74.
- Nouhra, E. R., Hernández Caffot, M. L., Pastor, N., Crespo, E. M. (2012). The species of *Scleroderma* from Argentina, including a new species from the Nothofagus forest. Mycologia, 104(2), 488-495.
- Örstadius, L., Ryberg, M., Larsson, E. (2015). Molecular phylogenetics and taxonomy in Psathyrellaceae (Agaricales) with focus on psathyrelloid species: introduction of three new genera and 18 new species. Mycological Progress, 14(5), 1-42.
- Palestina-Villa, E. N., Parra-Sánchez, L. A., Villegas, M., Garibay-Orijel, R., Medel-Ortiz, R. The known species of *Agaricus* (Agaricales, Agaricaceae) in Mexico, an updated and nomenclatural review.
- Paz, A., Gonzalez, M., Crawford, A. J. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. Acta biológica colombiana, 16(3), 161-175.
- Pedro, C. R., & del Consuelo, M. M. M. (2002). Tecnología de producción de nogal pecanero
- Pegler, D. N. (1977). A preliminary agaric flora of East Africa. Her Majesty's Stationery Office.
- Phosri, C., Martín, M. P., Watling, R., Jeppson, M., Sihanonth, P. (2009). Molecular phylogeny and re-assessment of some *Scleroderma* sp. (Gasteromycetes). In Anales del Jardín Botánico de Madrid (Vol. 66, No. 1, pp. 83-91). Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Quiñónez, M., Garza, F., Mendoza, J. R., García, J., Sáenz, J., Bolaños, H. (1999). Guía de Hongos de la región de Bosque Modelo Chihuahua. Universidad Autónoma de Chihuahua, Universidad Autónoma de Nuevo León, Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria y Bosque Modelo Chihuahua, AC, Chihuahua.
- Ramírez, L. R. (2013). Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisoría con impacto en la agricultura. Fitosanidad, 17(1), 49-55.
- Ramírez-López, I., Villegas-Ríos, M., Salas-Lizana, R., Garibay-Orijel, R., Alvarez-Manjarrez, J. (2015). *Thelephora versatilis* and *Thelephora pseudoversatilis*: two new cryptic species with polymorphic basidiomes inhabiting tropical deciduous and sub-perennial forests of the Mexican Pacific coast. Mycologia, 107(2), 346-358.
- Rev. M.J. Berkeley M.A. Rev. M.A. Curtis D.D. (1853) XLI. Centuries of North American Fungi, Annals and Magazine of Natural History, 12:72, 417-435, DOI: [10.1080/03745485709495068](https://doi.org/10.1080/03745485709495068)
- Rivero, S. T., Moorillón, V. N., Borunda, E. O. (2009). Growth, yield, and nutrient status of pecans fertilized with biosolids and inoculated with rizosphere fungi. Bioresource technology, 100(6), 1992-1998.

- Sagaram, M., Lombardini, L., Grauke, L. J. (2011). Variation in anatomical characteristics in leaves of pecan seedstocks from Mexico and the United States. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136(2), 103-108.
- Seifert, K. A. (2008). Integrating DNA barcoding into the mycological sciences. *Persoonia*, 21, 162-166.
- Sierra, E. M., López, E. L., Pérez, S. P. (2007). Agroclimatología del pecán (*Carya illinoensis*) en la Argentina. RS Lavado y EA Frusso. Producción de pecán en Argentina. Capítulo IV.
- Smith, A. H. (1972). North American species of *Psathyrella*.
- Smith, S. E., Gianinazzi-Pearson, V. (1988). Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 39(1), 221-244.
- Taber, R. A., Trappe, J. M. (1982). Vesicular-arbuscular mycorrhiza in rhizomes, scale-like leaves, roots, and xylem of ginger. *Mycologia*, 74(1), 156-161.
- Tarango, R. S. 2004. Micorrizas en nogal pecanero y pistachero. Folleto Técnico No. 16 del INIFAP-Delicias. Centro de investigaciones regionales norte-centro campo experimental Delicias, agosto del 2004. Chihuahua, México. 39 p
- Tarango, R. S. (2004). Micorrizas en nogal pecanero y pistachero. Folleto Técnico, (16).
- Tovar, A. R., Cásarez, B. X., Valdés, M. (2004). Ecología molecular de los hongos ectomicorrizicos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 27(3), 267-278.
- Villasante, J., Pérez-Carrillo, E., Heredia-Olea, E., Metón, I., Almajano, M. P. (2019). In Vitro Antioxidant Activity Optimization of Nut Shell (*Carya illinoensis*) by Extrusion Using Response Surface Methods. *Biomolecules*, 9(12), 883.
- Wächter, D., Melzer, A. (2020). Proposal for a subdivision of the family *Psathyrellaceae* based on a taxon-rich phylogenetic analysis with iterative multigene guide tree. *Mycological Progress*, 19(11), 1151-1265.
- Yan, J. Q., Ge, Y. P., Hu, D. M., Zou, J. P., Huo, G. H. (2019). *Psathyrella tintinnabula* sp. nov. (Psathyrellaceae, Agaricales), a new species from southwest China. *Phytotaxa*, 400(2), 64-70.
- Yun, W., Hall, I. R. (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1063-1073.
- Zeller, SM (1941). Notas adicionales sobre hongos. *Mycologia* 33: 196-214.
- Zuluaga, C. M., Céspedes, P. B., Marín-Montoya, (2009). Generalidades de los Uredinales (Fungi: Basidiomycota) y de sus relaciones filogenéticas. *Acta Biológica Colombiana*, 14(1), 41

Tabla 1. Similitud nucleotídica de los ejemplares de macromicetos con código de barras de los registros de la base de datos del GenBank. ID: número de muestra, CGB: código de GenBank; ID-TAX: identificación taxonómica; Blast: resultado de Blast más cercano; %: porcentaje de similitud nucleotídica; CGBC: código de la secuencia en GenBank más cercana. En todos los casos la probabilidad de error "e-value" fue igual a cero.

| ID | CGB | ID TAX | BC | % | VE | CGBC |
|----|-----|--------|----|---|----|------|
|----|-----|--------|----|---|----|------|

|      |          |                                    |                                    |      |   |          |
|------|----------|------------------------------------|------------------------------------|------|---|----------|
| st2  | MZ092918 | <i>Candolleomyces luteopallida</i> | <i>Candolleomyces luteopallida</i> | 99.5 | 0 | KC992884 |
| st3  | MZ092919 | <i>Tuber sp.</i>                   | <i>Tuber sp</i>                    | 97   | 0 | MT156470 |
| st4  | MZ092920 | <i>Agaricus deserticola</i>        | <i>Agaricus deserticola</i>        | 100  | 0 | HM488747 |
| st26 | MZ092921 | <i>Scleroderma sp</i>              | <i>Scleroderma</i>                 | 100  | 0 | FM213343 |
| st27 | MZ092922 | <i>Candolleomyces sp</i>           | <i>Candolleomyces sp</i>           | 99.1 | 0 | KY563654 |
| st28 | MZ092923 | <i>Candolleomyces sp</i>           | <i>Candolleomyces sp</i>           | 99.1 | 0 | KY563655 |

Tabla 2. Lista de secuencias de rDNA ITS utilizadas en los análisis filogenéticos. Las secuencias generadas en este trabajo están en negritas.

| <b>Taxón</b>                                   | <b>GenBank</b>  | <b>Referencia</b>                   |
|--|-----------------|-------------------------------------|
| <i>Candelleomyces typhae</i>                   | DQ389721        | Larsson E., Orstadius, L. 2019      |
| <i>Candelleomyces sulcatotuberculosis</i>      | KJ138422        | Larsson E. 2014                     |
| <i>Candelleomyces subsingeri</i>               | NR_160505       | Yan J., BaU, T. 2018                |
| <i>Candelleomyces subsingeri</i>               | MG734725        | Yan J., Bau T. 2018                 |
| <i>Candelleomyces leucotephrus</i>             | KC992885        | Larsson E., Orstadius, L. 2013      |
| <i>Candelleomyces tuberculatus</i>             | KC992886        | Larsson E., Orstadius, L. 2013      |
| <i>Candelleomyces cacao</i><br>Tipo            | NR_148106       | Desjardin D., Perry, B. 2017        |
| <i>Candelleomyces halophilus</i>               | MG825900        | Broussal M., Mir, G. 2018           |
| <i>Candelleomyces littoralis</i>               | MG825901        | Broussal M., Mir, G. 2018           |
| <i>Candelleomyces luteopallidus</i>            | MG734736        | Yan J., Bau, T. 2018                |
| <b><i>Candelleomyces luteopallidus st2</i></b> | <b>MZ092918</b> | <b>Sánchez-L., Garibay, O. 2021</b> |
| <i>Candelleomyces luteopallidus</i> Tipo       | KC992884        | Larsson E., Orstadius, L. 2013      |
| <i>Candelleomyces efflorescens</i>             | KC992941        | Larsson E., Orstadius, L. 2013      |
| <b><i>Candelleomyces sp. st27</i></b>          | <b>MZ092922</b> | <b>Sánchez-L., Garibay, O. 2021</b> |

|  |                 |  |
|--|-----------------|--|
| <b><i>Candelleomyces</i> sp.<br/>st28</b>  | <b>MZ092923</b> | <b>Sánchez-L., Garibay, O.<br/>2021</b>    |
| <i>Candelleomyces</i> sp.<br>BAB-4828      | KU571537        | Joshi N., Bhatt, M. 2016                   |
| <i>Candelleomyces</i> sp.<br>BAB-4913      | KR155010        | Patel M., Bhatt, M. 2015                   |
| <i>Candelleomyces</i> sp.<br>BAB-4964      | KR155054        | Patel M., Bhatt, M. 2015                   |
| <i>Candelleomyces trinitatensis</i>        | KC992882        | Larsson E., Orstadius, L.<br>2013          |
| <i>Candelleomyces rogueianus</i>           | MW412407        | Gordon M. 2020                             |
| <i>Candelleomyces bivelatus</i>            | MF325962        | Garbelotto M., Dovana,<br>F. 2017          |
| <i>Candelleomyces badiophylus</i>          | FN430699        | Nagy L. 2011                               |
| <i>Candelleomyces cladii-marisci</i>       | MK080112        | Sicoli G., Passalacqua<br>N. 2019          |
| <i>Candelleomyces candolleanus</i> Tipo    | KM030175        | Larsson E. 2014                            |
| <i>Candelleomyces badhyzensis</i> Tipo     | KC992883        | Larsson E., Orstadius, L.<br>2013          |
| <i>Candelleomyces hymenocephalus</i>       | FJ168609        | Paiva de Carvalho H.,<br>Mesquita, N. 2018 |
| <i>Candelleomyces pseudocandolleanus</i>   | KY120973        | Bau T., Yan, J. 2016                       |
| <i>Agaricus fiardii</i>                    | HM862464        | Kerrigan R. 2010                           |
| <i>Agaricus</i> sp.                        | KM349614        | Kerrigan R. 2014                           |
| <i>Agaricus evertens</i>                   | MK550894        | Clements T. 2020                           |
| <i>Agaricus evertens</i>                   | MT303143        | Clements T. 2020                           |
| <i>Agaricus deserticola</i>                | KM349613        | Kerrigan R. 2014                           |
| <i>Agaricus deserticola</i>                | JF896228        | Kerrigan R., Callac, P.<br>2011            |
| <i>Agaricus deserticola</i>                | HM488747        | Vellinga E.,<br>Sysouphanthong, P.<br>2011 |
| <b><i>Agaricus deserticola</i><br/>st4</b> | <b>MZ092920</b> | <b>Sánchez-L., Garibay, O.<br/>2021</b>    |
| <i>Agaricus bellanniae</i>                 | NR144990        |  |
| <i>Agaricus arvensis</i>                   | AJ887993        | Didukh M., Vilgalys R.<br>2005             |
| <i>Agaricus lanipes</i>                    | JF97190         | Didukh M., Vilgalys R.<br>2005             |
| <i>Agaricus sandianus</i>                  | NR144995        |  |
| <i>Agaricus didymus</i>                    | NR144990        |  |
| <i>Agaricus gemellatus</i>                 | KJ859081        | Kerrigan R. 2014                           |
| <i>Agaricus gemellatus</i>                 | KJ859082        | Kerrigan R. 2014                           |

---

|                                 |          |                                       |
|---------------------------------|----------|---------------------------------------|
| <i>Agaricus julius</i>          | NR144991 |                                       |
| <i>Agaricus longistipes</i>     | NR151748 |                                       |
| <i>Agaricus augustus</i>        | JF797193 | Vu D., Groenewald M.<br>2017          |
| <i>Agaricus augustus</i>        | MH854667 | Vu D., Groenewald M.<br>2017          |
| <i>Agaricus augustus</i>        | MH859051 | Vu D., Groenewald M.<br>2017          |
| <i>Agaricus augustus</i>        | KJ847461 | Vu D., Groenewald M.<br>2017          |
| <i>Agaricus parvibrunneus</i>   | MG137001 | He M., Hyde, K. 2017                  |
| <i>Agaricus purpulesquameus</i> | NR157484 | Bellchambers J.,<br>Alvarado, P. 2018 |
| <i>Agaricus megalosporus</i>    | NR119951 |                                       |
| <i>Agaricus purpurellus</i>     | MH620768 | Bellchambers J.,<br>Alvarado, P. 2018 |
| <i>Agaricus</i> sp.             | KX657047 | He M., Chen, J. 2017                  |
| <i>Agaricus</i> sp.             | JF691540 | Zhao R., Karunarathna,<br>S. 2011     |
| <i>Agaricus wariatodes</i>      | JF495054 | Zhao R., Karunarathna,<br>S. 2011     |
| <i>Agaricus aridicola</i>       | KT951331 | Zhao R., Zhou, J. 2015                |
| <i>Agaricus aridicola</i>       | JF797195 | Zhao R., Zhou, J. 2015                |
| <i>Agaricus arrillagarum</i>    | NR158301 |                                       |
| <i>Agaricus dulcidulus</i>      | KF447894 | Parra L. 2013                         |
| <i>Agaricus marisae</i>         | JF797182 | Callac P., Parra, L. 2011             |
| <i>Agaricus jacobi</i>          | NR119951 |                                       |
| <i>Agaricus purpurellus</i>     | KU975076 | Callac P., Parra, L. 2011             |
| <i>Agaricus purpurellus</i>     | KF447903 | Parra L. 2013                         |
| <i>Agaricus friesianus</i>      | KT951316 | Zhao R., Zhou, J. 2015                |
| <i>Agaricus friesianus</i>      | KJ877787 | Kerrigan R. 2014                      |
| <i>Agaricus matrum</i>          | KT951310 | Zhao R., Zhou, J 2015                 |
| <i>Agaricus edmondoi</i>        | KF447902 | Parra L. 2013                         |
| <i>Agaricus edmondoi</i>        | KT951326 | Zhao R., Zhou, J. 2015                |
| <i>Agaricus diminutivus</i>     | AY484681 | Geml J., Geiser, D. 2004              |
| <i>Agaricus kerriganii</i>      | KT951333 | Zhao R., Zhou, J. 2015                |
| <i>Agaricus kerriganii</i>      | MN992293 | Landry J., Berube, J.<br>2020         |
| <i>Agaricus kerriganii</i>      | MF954612 | Berbee M., Bazzicalupo<br>A. 2017     |
| <i>Agaricus kerriganii</i>      | KT951306 | Zhao R., Zhou, J 2015                 |
| <i>Agaricus diminutivus</i>     | KM248905 | Berube J., Maaref, C.<br>2014         |
| <i>Agaricus comtulus</i>        | KM248904 | Berube J., Maaref, C.<br>2014         |

---

|  |                 |   |
|--|-----------------|---|
| <i>Tuber</i> sp. 79                      | JQ925649        | Bonito G., Smith, M.<br>2013            |
| <i>Tuber</i> sp. 11 GB-2010              | GQ221453        | Murat C., Jeandroz, S.<br>2009          |
| <i>Tuber</i> sp. scr709                  | DQ974798        | Smith E., Douhan, G.<br>2007            |
| <i>Tuber</i> sp. SOC1404                 | JN022530        | Frank J., Southworth, D.<br>2011        |
| <i>Tuber umbilucatum</i>                 | FJ797879        | Frank J., Southworth, D.<br>2011        |
| <i>Tuber</i> sp. GB-2009e                | FJ809887        | Bonito G., Trappe, J.<br>2009           |
| <i>Tuber</i> sp. 66 GB-2010              | HM485427        | Bonito G., Gryganskyi, A.<br>2010       |
| <i>Tuber</i> sp. 64 GB-2010              | HM485425        | Bonito G., Gryganskyi, A.<br>2010       |
| <i>Tuber</i> sp. 65 GB-2010              | HM455426        | Bonito G., Gryganskyi, A.<br>2010       |
| <i>Tuber</i> sp. 65                      | JQ925648        | Bonito G., Gryganskyi, A.<br>2012       |
| <i>Tuber texense</i>                     | HM485391        | Bonito G., Gryganskyi, A.<br>2010       |
| <i>Tuber</i> sp. voucher<br>FLAS:MES-646 | MT156470        | Smith, M., Healy, R.<br>2020            |
| <b><i>Tuber</i> sp., st3</b>             | <b>MZ092919</b> | <b>Sánchez-L., Garibay, O.<br/>2021</b> |
| <i>Tuber lyonii</i>                      | EU268568        | Bruhn J., Pruett, G.<br>2007            |
| <i>Tuber lyonii</i>                      | FJ748911        | Bonito G., Vilgalys, R.<br>2009         |
| Muestra ambiental de<br>ectomicorriza    | GU907784        | Karpati A., Handel, S.<br>2011          |
| <i>Tuber lyonii</i>                      | MT156465        | Smith M., Healy, R 2020                 |
| <i>Tuber lyonii</i>                      | MT156509        | Smith M., Healy, R 2020                 |
| <i>Tuber lyonii</i>                      | EF202594        | Bruhn J., Pruett, G.<br>2006            |
| <i>Tuber lyonii</i>                      | EU268567        | Bruhn J., Pruett, G.<br>2006            |
| <i>Scleroderma polyrhizum</i>            | FM213349        | Martin, M. 2009                         |
| <i>Scleroderma polyrhizum</i>            | FM213350        | Phosri C., Martin, M.<br>2009           |
| <i>Scleroderma dictyosporum</i>          | FJ840443        | Sanon K., Ba, A. 2009                   |
| <i>Scleroderma dictyosporum</i>          | FJ840449        | Sanon K., Ba, A. 2009                   |

---

|                                       |           |   |
|---------------------------------------|-----------|---|
| <i>Scleroderma<br/>sinnamariense</i>  | FM213356  | Phosri C., Martin, M.<br>2009           |
| <i>Scleroderma</i> sp.<br>JZBHM008    | KM048204  | Xu F., Li, F. 2014                      |
| <i>Scleroderma citrinum</i>           | EU784414  | Brock P., Doring, H.<br>2009            |
| <i>Scleroderma citrinum</i>           | GQ166907  | Avis P., Leacock, P.<br>2009            |
| <i>Scleroderma<br/>michiganese</i>    | EU819441  | Palmer J., Lindner, D.<br>2008          |
| <i>Scleroderma<br/>michiganese</i>    | FM213347  | Phosri C., Martin, M.<br>2009           |
| <i>Scleroderma meridionale</i>        | EU718121  | Wilson A., Binder, M.<br>2008           |
| <i>Scleroderma suthepense</i>         | NR_132871 | Kumla J., Suwannarach,<br>N. 2012       |
| <i>Scleroderma bovista</i>            | EU819517  | Palmer J., Lindner, D.<br>2008          |
| <i>Scleroderma bovista</i>            | AB211267  | Nara K. 2005                            |
| <i>Scleroderma bovista</i>            | GQ267487  | Walbert K., Ramsfield,<br>T. 2010       |
| <i>Scleroderma<br/>septentrionale</i> | FM213336  | Phosri C., Martin, M.<br>2009           |
| <i>Scleroderma<br/>patagonicum</i>    | HQ688788  | Nouhra E., Hernandez<br>Caffot, L. 2012 |
| <i>Scleroderma<br/>patagonicum</i>    | HQ688789  | Nouhra E., Hernandez<br>Caffot, L. 2012 |
| <i>Scleroderma<br/>verrucosum</i>     | FJ840461  | Sanon K., Ba, A. 2009                   |
| <i>Scleroderma areolatum</i>          | EU819438  | Palmer J., Lindner, D.<br>2008          |
| <i>Scleroderma areolatum</i>          | EU819518  | Palmer J., Lindner, D.<br>2008          |
| <i>Scleroderma areolatum</i>          | FM213351  | Phosri C., Martin, M.<br>2009           |
| <i>Scleroderma areolatum</i>          | FM213352  | Phosri C., Martin, M.<br>2009           |
| <i>Scleroderma areolatum</i>          | FM213353  | Phosri C., Martin, M.<br>2009           |
| <i>Scleroderma<br/>verrucosum</i>     | AJ629886  | Phosri C., Martin, M.<br>2007           |
| <i>Scleroderma cepa</i>               | FM213354  | Phosri C., Martin, M.<br>2009           |
| <i>Scleroderma laeve</i>              | EU718117  | Wilson A., Binder, M.<br>2008           |
| <i>Scleroderma</i> sp.                | MG211107  | Yuan Z., Jin, W. 2017                   |
| <i>Scleroderma cepa</i>               | MT005950  | Scholler M. 2020                        |

---

|   |                 |   |
|---|-----------------|---|
| <i>Scleroderma macalpinei</i>               | EU718122        | Wilson A., Binder, M.<br>2008           |
| <i>Scleroderma</i> sp.<br>UNSCL7            | FM213343        | Phosri C., Martin, M.<br>2009           |
| <b>st6 <i>Scleroderma cepa</i><br/>s.l.</b> | <b>MZ092921</b> | <b>Sánchez-L., Garibay,<br/>O. 2021</b> |

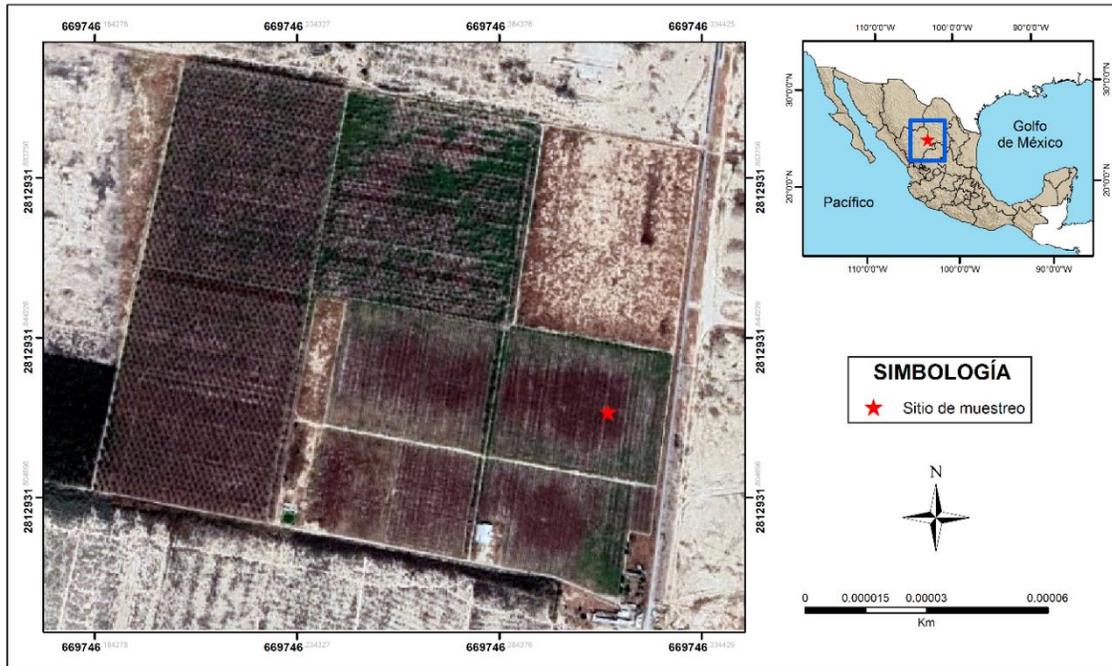


Figura 1. Localización del sitio de estudio, huerta “Tierra blanca”, ubicada en el municipio de Viesca Coahuila México.



Figura 2. a; *Candolleomyces* sp., b; vista superior de *Candolleomyces* sp. c; *Scleroderma cepa* s.l. d; Corte transversal de *Scleroderma cepa* s.l. mostrando la superficie peridial, e; *Agaricus deserticola*, f; vista frontal de *Agaricus deserticola*, g; *Tuber* sp., h; Ascoma de *Tuber* sp. en sección transversal mostrando la superficie peridial y la superficie glebal, i; *Candolleomyces luteopallidus*.

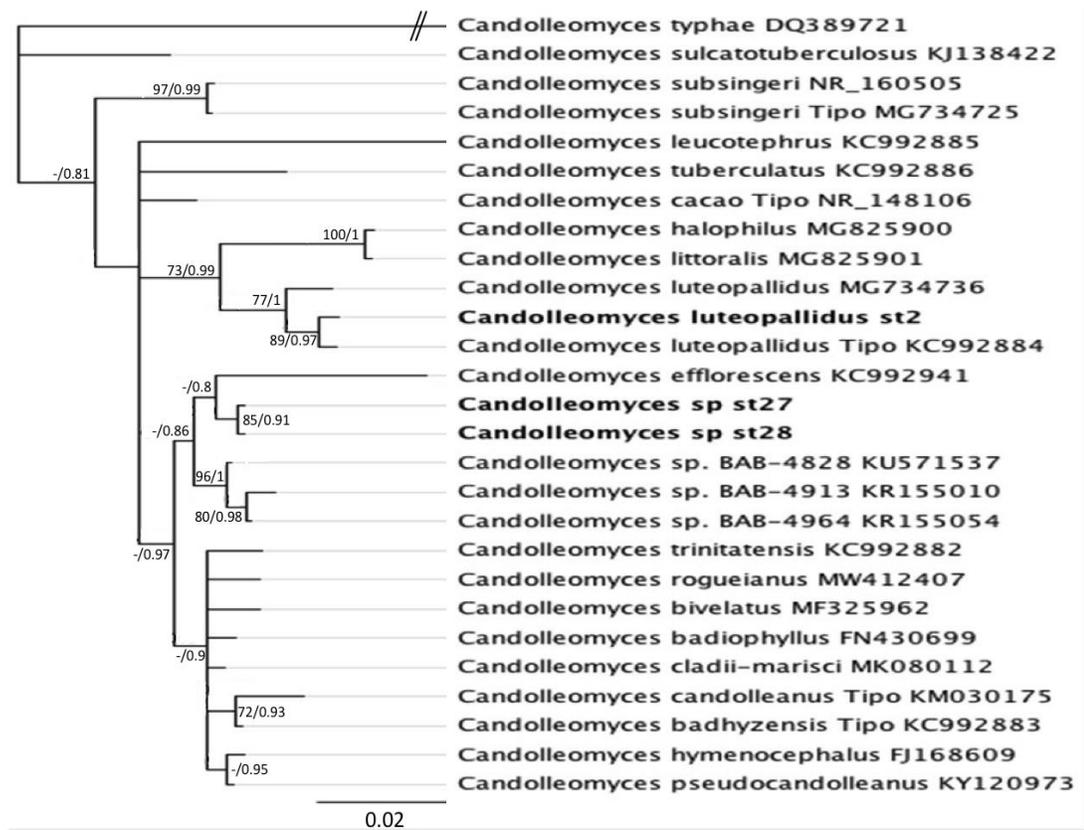


Figura 3. Árbol filogenético del género *Candolleomyces* inferido bajo el modelo Bayesiano a partir de secuencias de ITS rDNA.

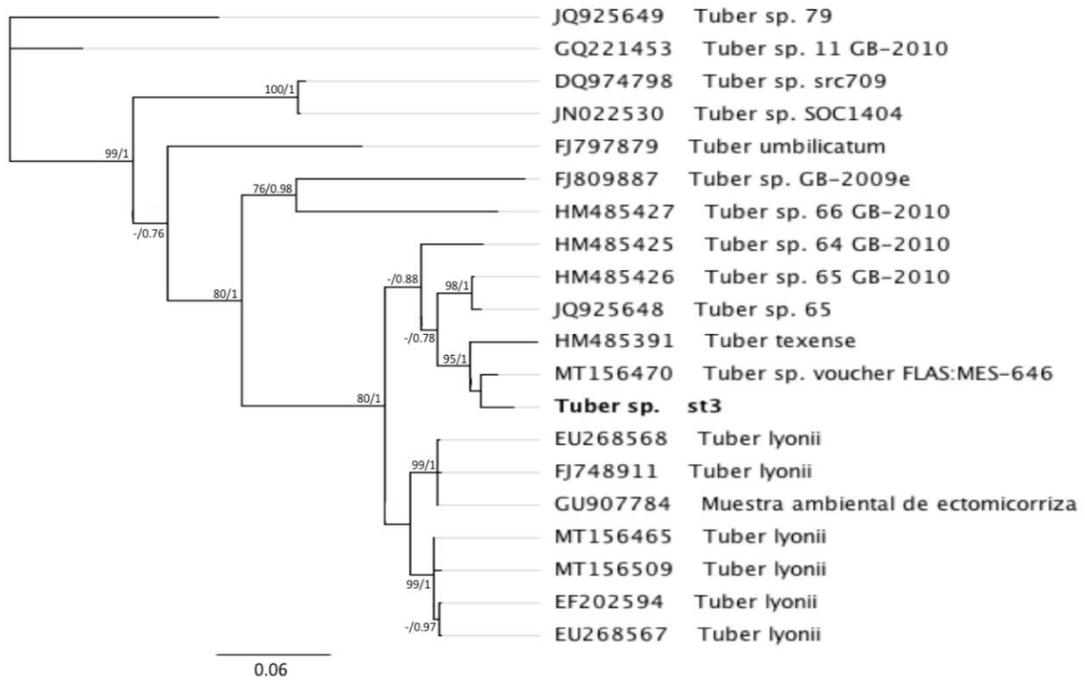


Figura 4. Árbol filogenético del género *Tuber* sección *Rufum* inferido bajo el modelo Bayesiano a partir de secuencias de ITS rDNA.

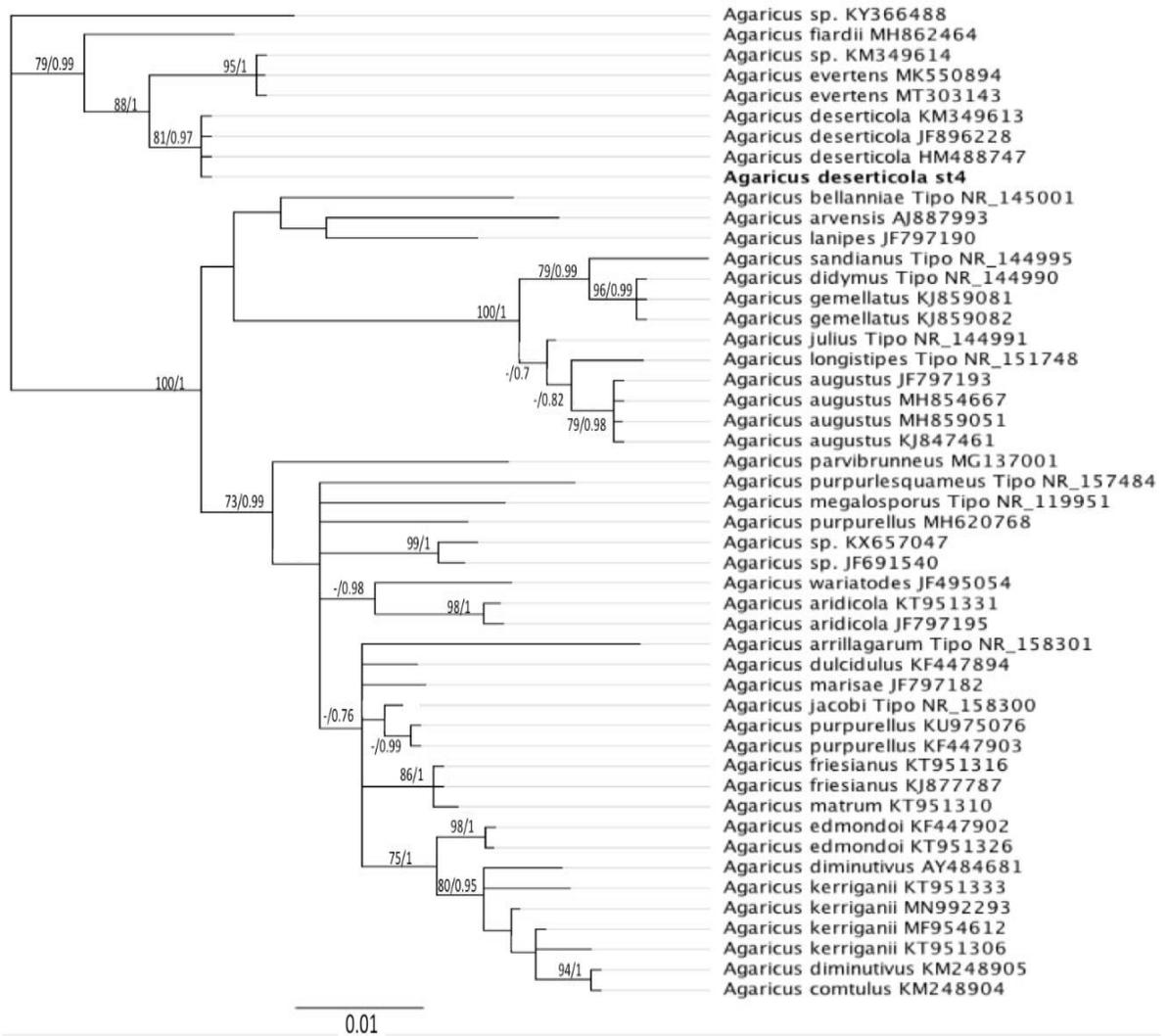


Figura 5. Árbol filogenético de *Agaricus* sección *arvenses* y secuencias afines insertae sedis inferido bajo el modelo Bayesiano a partir de secuencias de ITS rDNA.

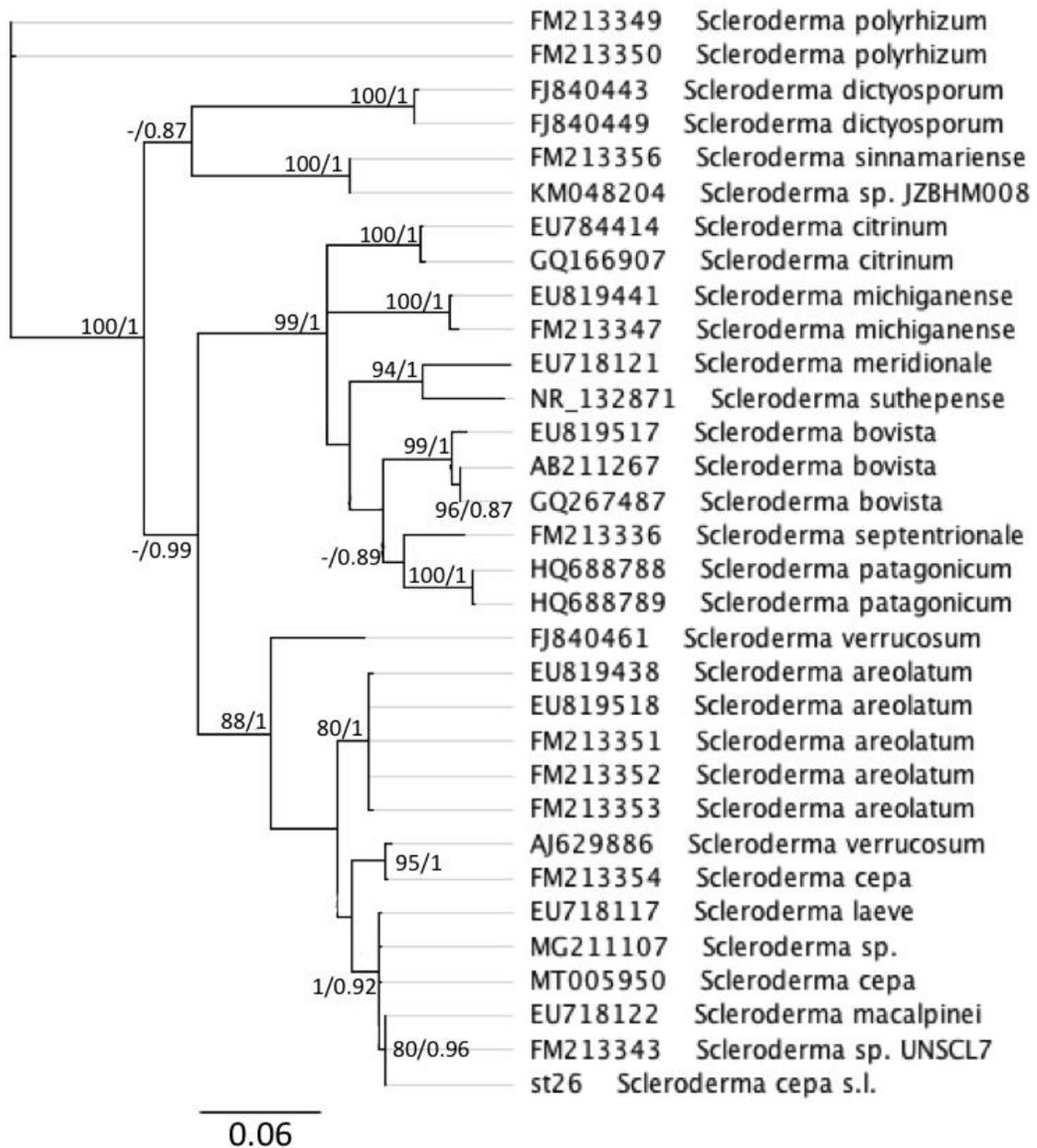


Figura 6. Árbol filogenético del género *Scleroderma* inferido bajo el modelo Bayesiano a partir de secuencias de ITS rDNA.

## CAPÍTULO III

### RESPUESTA FISIOLÓGICA Y PRODUCCIÓN DE BIOMASA EN PLÁNTULAS DE NOGAL PECANERO [*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] INOCULADAS CON *Scleroderma* sp Y REGADAS CON SOLUCIÓN SALINA

#### RESUMEN

El nogal pecanero es una planta sensible a la salinidad. Se avaluó el efecto de niveles de salinidad en plántulas de esta especie inoculadas con *Scleroderma* sp. a una concentración de  $2.5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia por mililitro, bajo condiciones de invernadero en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas en Bermejillo, Durango, México. Las plántulas fueron regadas dos veces por semana, durante cuatro meses del verano del 2018, con solución conteniendo 0, 20, 25,30 y 35 mM de NaCl. La fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración fueron reducidas en 42, 37 y 42% respectivamente en plántulas desarrolladas en el medio salino más elevado. La concentración de K en raíz fue similar en condición salina y no salina. Similar resultado se observó en el tallo, no así en las hojas. La relación K/Na disminuyó en las plántulas creciendo en condición salina. El peso seco en raíz tallo y hoja fue reducido en 70, 34 y 51% en las plantas desarrolladas bajo condición salina de 35mM. Mientras que el de peso seco de la plántula redujo en 60%, bajo la misma condición. La asociación de las micorrizas con *Carya illinoensis*, no inhibió los efectos negativos del estrés salino, bajo la concentración probada del hongo, se recomienda aumentar la concentración del hongo e incrementar el número de aplicaciones, bajo condiciones de invernadero.

**Palabras clave:** Salinidad, fotosíntesis y biomasa en nogal pecanero

**PHYSIOLOGICAL RESPONSE AND BIOMASS PRODUCTION IN PECAN  
[*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch] SEEDLINGS INOCULATED WITH  
*Scleroderma* sp AND IRRIGATED WITH SALINE SOLUTION**

**ABSTRACT**

The pecan is a species sensible to salinity. It was evaluated the effect of salinity levels in pecan seedlings inoculated with *Scleroderma* sp. at  $2.5 \times 10^8$  concentration per milliliter in greenhouse conditions, in the Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Bermejillo, Durango, Mexico. Seedlings were irrigated two times weekly along four months in summer 2018. Solution containing 0, 20, 25, 30 y 35 mM NaCl was used. Photosynthesis, stomatal conductance and transpiration were reduced in 42, 37 and 42% respectively in seedlings growing in the highest saline level. K concentration in root was similar in saline and non-saline condition. Similar results were observed in shoot, but different in leaves. K/Na ratio decreased in seedlings growing in saline condition. Dry weight in root, shoot and leave was reduced in 70, 34 and 5% in seedlings growth in saline conditions whit 35 mM. While dry weight in seedlings growing in similar saline condition was reduced in 69%. The mycorrhiza *Carya illinoensis* association in this study did not inhibit the negative effects of saline stress at this fungus testing concentration. Therefore, is recommended to increase the fungus concentration and the application times in greenhouse conditions.

**Keywords:** Salinity, mycorrhiza, photosynthesis and biomass in pecan walnut

## INTRODUCCIÓN

El nogal pecanero es una especie cuyos ancestros nativos se desarrollaron espontáneamente cerca de ríos o arroyos donde los suelos son de origen aluvial, profundos y fértiles, con alta capacidad de retención de humedad y con buen drenaje (Campos et al., 2017). Actualmente la mayoría de las huertas comerciales de nogal, establecidas en México, se encuentran en áreas distantes de esos nichos ecológicos, en las cuales las condiciones físicas y químicas de los suelos en los que crecen, no son del todo adecuadas. Se estima que 30 mil has aproximadamente, cultivadas con nogal en el norte de México, presentan problemas de salinidad, en diferentes grados. Esta condición limita la productividad de esta especie, la cual es considerada como susceptible a salinidad (Miyamoto et al., 1985) ya que el umbral de tolerancia, determinado en huertas adultas irrigadas es de 2 a 3 dS·m<sup>-1</sup>, cuando el Na es el catión dominante (Miyamoto y Nesbitt, 2011). La presencia de sales disminuye la biomasa en nogal la fotosíntesis y conductancia estomática (Campos et al., 2017). La retención iónica en raíz o tallo es uno de los mecanismos que presentan algunas plantas para tolerar la salinidad (Munns y Tester, 2008). Sin embargo, en esta especie, esta característica no se ha observado.

El género *Carya*, como en la mayoría de los árboles forestales, ha establecido una relación mutua con hongos ectomicorrizicos nativos, necesaria para su desarrollo y sobrevivencia (Bonito et al., 2011). El hongo tiene como función incrementar el acceso a nutrientes de su anfitrión (Nguyen et al., 2006; Bonito et al., 2011) aumentar la capacidad para absorción de agua, debido al incremento del potencial exploratorio de la raíz en el suelo, por la red hifal (Babuín, et al., 2016). Destaca también, la importancia de los hongos ectomicorrizicos para adaptarse y desarrollarse bajo condiciones de estrés salino (Estrada et al., 2013). Aunque su desarrollo y funcionamiento bajo condiciones salinas es variable (Bandow, 2006; Parven et al., 2020).

La inoculación con hongos ectomicorrizicos conforma una herramienta importante para mejorar el funcionamiento, y asegurar la producción de biomasa en especies forestales, bajo condiciones salinas (Lou et al., 2009), ya que

disminuyen la entrada de Na y Cl (Bandou et al., 2006, Smith et al., 2010). Aunque en otras especies como álamo temblón y abedul, esto no sucede (Yi et al., 2008). En *Carya illinoensis* la información sobre la respuesta de la planta inoculada con ectomicorrizas, bajo condiciones de salinidad es limitada. La presencia de Na en huertas plantadas con nogal, y la ausencia de portainjertos tolerantes a salinidad, para las nuevas plantaciones, conduce a la búsqueda de opciones para contrarrestar este problema, sin afectar negativamente el ecosistema del suelo. El objetivo del presente estudio fue el evaluar la tasa fotosintética y producción de biomasa, en plántulas de nogal, inoculadas con *Scleroderma* sp. bajo condiciones de estrés salino.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Obtención de *Scleroderma* sp. Los ejemplares de cuerpos fructíferos de *Scleroderma* sp. fueron colectados de una huerta de nogal pecanero ubicada en el municipio de Viesca, Coahuila, México. Fueron colocados en papel encerado e introducidos y transportados en hielera portátil al laboratorio de ecología microbiana de la facultad de ciencias biológicas, de la Universidad Juárez del estado de Durango, México.

Aislamiento de la cepa de *Scleroderma* sp.

Fragmentos del hongo fueron obtenidos de la parte central de la gleba bajo condiciones asépticas en una campana de flujo laminar, desinfectada con alcohol al 70% y cloro al 10%. Los fragmentos se transfirieron a cajas Petri, con medio nutritivo y se incubaron a una temperatura de 25° C, hasta inicios del crecimiento del micelio.

Preparación del inóculo fúngico

Las cepas se resembraron en papa agar dextrosa (PDA). Posteriormente las colonias se fragmentaron en pequeños cuadros de 5 x 5 y se transfirieron a matraces de 250 ml, que contenían 100 ml de biotina aneurina y ácido fólico (BAF) (Moser, 1960) y 15 g de dextrosa. Los matraces se mantuvieron en agitación mecánica a 150 rpm y 25°C durante dos semanas. Se eliminó el medio nutritivo usando agua destilada. Se efectuaron diluciones en serie del micelio

activo para obtener una concentración de  $2.5 \times 10^8$  unidades formadoras de colonia por mililitro.

#### Diseño de tratamientos

Las semillas fueron colectadas en noviembre 2018 y estratificadas durante un mes a temperatura de 5 °C. Posteriormente se sumergieron en agua por 48h como tratamiento pregerminativo y se sembraron en una caja de madera para semillero, bajo condiciones de invernadero a 30°C en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Bermejillo, Durango, México. Se utilizó arena como sustrato y se aplicaron riegos con agua destilada cada tercer día. Una vez que las plantas alcanzaron un tamaño de ~15 cm se traspasaron a macetas de 9 kg que contenían sustrato compuesto por arena, peat most y suelo en proporción 40:20:40, el cual se esterilizó con bromuro de metilo. La inoculación con ectomicorrizas se llevó a cabo en la base del tallo de las plántulas utilizando una pipeta de 10 ml. Los tratamientos salinos se prepararon usando NaCl (0, 20, 25.30 y 35 mM). Las plántulas se regaron cada tercer día, utilizando 300 ml de agua destilada o salina.

#### Variables evaluadas

Se, evaluó la conductancia estomática, la fotosíntesis y la transpiración, utilizando un analizador de gas infra rojo (LI-COR 6400®, Lincoln, NE, EEUU) una vez por semana. Al final del experimento se colectaron las plántulas y se fraccionaron en raíz, tallo y hoja y se introdujeron en estufa de secado a 65°C hasta peso constante y se determinó el peso seco de estos tejidos. El contenido de Na y K se determinó mediante digestión, efectuada por vía húmeda, con una mezcla nítrico-perclórica. Posteriormente las lecturas se realizaron utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica (ANALYST 200, Perkin Elmer®, USA).

#### Análisis estadísticos

Se aplicaron pruebas de Normalidad de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianza a las variables en estudio. Se efectuó un análisis de varianza mediante el sistema SAS, 2002, versión 9. Se realizaron pruebas de comparación múltiple de medias, DMS ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fotosíntesis

La mayor fotosíntesis se observó en plántulas inoculadas con *Scleroderma* sp. desarrolladas en medio no salino. (Cuadro 1). Esta disminuyó 27% en plántulas tratadas con 25 mM, aunque fue estadísticamente similar. Al incrementar a 30 y 35 mM de NaCl, en el medio, se observó una reducción fotosintética significativa de un 31 y 42% respectivamente en las plántulas comparadas con el testigo.

### Conductancia estomática

La conductancia estomática en plántulas inoculadas tratadas con NaCl fue afectada significativamente. Los tratamientos con 0, 20 y 25 mM de NaCl que fueron estadísticamente similares, mostraron los valores más elevados. (Cuadro 1). Las plántulas tratadas con 30 y 35 mM mostraron una disminución de 37%, respecto al testigo

### Transpiración

La mayor transpiración se observó en las plántulas micorrizadas y cultivadas en condición no salina, bajo condición salina equivalente a 20 y 25 mM, la transpiración disminuyó en 23 y 21 %. Al incrementar la concentración salina a 30 y 35 mM se observó una reducción significativa del 44%.

Cuadro 1. Fotosíntesis conductancia estomática y transpiración en plántulas de nogal pecanero inoculadas con *Scleroderma* sp. bajo diferentes niveles de salinidad.

| NaCl (mM) | Fotosíntesis<br>( $\mu\text{mol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ) | Conductancia<br>estomática ( $\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ ) | Transpiración<br>( $\text{mmol m}^{-2}\text{seg}^{-1}$ ) |
|-----------|---|--|--|
| 0         | 7.0 $\pm$ 0.57a <sup>z</sup>                              | 0.08 $\pm$ 0.007a  | 2.18 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>                             |
| 20        | 6.0 $\pm$ 0.18a   | 0.08 $\pm$ 0.009a  | 1.68 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>                             |
| 25        | 5.1 $\pm$ 0.08ab  | 0.07 $\pm$ 0.010a  | 1.69 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>                             |
| 30        | 4.8 $\pm$ 0.30b   | 0.05 $\pm$ 0.003b  | 1.22 $\pm$ 0.08b   |
| 35        | 4.0 $\pm$ 0.63b   | 0.05 $\pm$ 0.003b  | 1.20 $\pm$ 0.15b   |

<sup>z</sup>Medias (n=5,  $\pm$  error estándar) con letras desiguales dentro de cada columna, son estadísticamente diferentes (DMS;  $p \leq 0.05$ ).

Los efectos de las micorrizas sobre el incremento de la tolerancia de plántulas al estrés salino, ha sido comúnmente estudiado bajo condiciones controladas (Nguyen et al., 2006; García 2013 et al., Babuin, 2016 et al., Fadaei, et al., 2020). Por otro lado, se ha documentado el efecto inhibitorio del estrés salino sobre la absorción del agua y el balance osmótico en plántulas con micorrizas (Lee et al., 2010; Zwiazek, 2019). Además, se agrega una disminución en la fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración (Fadaei et al., 2020). Estos resultados concuerdan con los encontrados en nuestro estudio, ya que las plántulas de nogal inoculadas con *Scleroderma* sp. y creciendo en medio salino, mostraron una reducida tasa fotosintética, conductancia estomática y transpiración, las cuales se observaron a partir de 20 mM de NaCl en la solución. Concentración de Na en tejido.

Las plántulas testigo, mostraron la menor concentración de Na en los tejidos (Figura 1). Sin embargo, en las tratadas, la concentración de Na en raíz, tallo y hoja, mostró una tendencia hacia el incremento, el aumento de salinidad en el medio. La raíz mostró la menor cantidad de Na respecto con el tallo y la hoja. Esta fue aproximadamente tres veces menor en las plantas tratadas con 20 o 25 mM de NaCl y dos veces en las tratadas con 30 y 35mM.

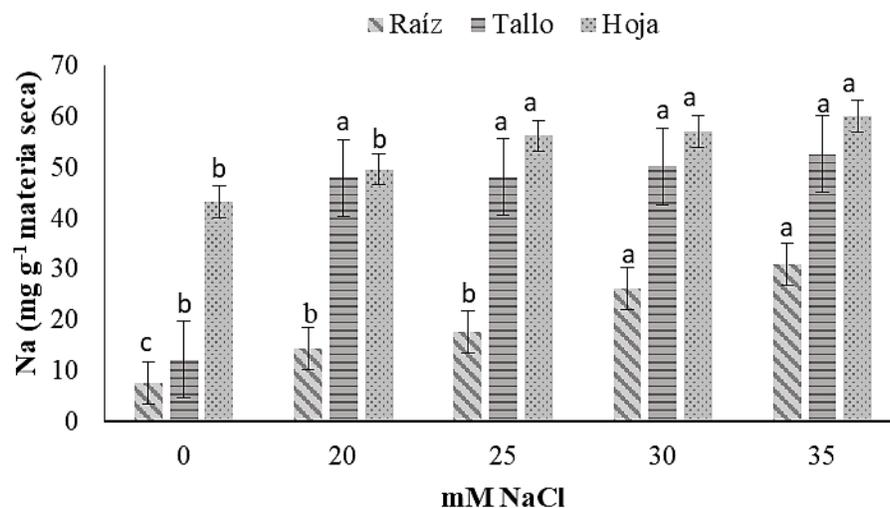


Figura 1. Concentración de sodio en raíz, tallo y hoja de nogal bajo diferentes niveles de salinidad. Barras verticales (n=5, ± error estándar) dentro de tratamientos con letras desiguales, son estadísticamente diferentes (DMS; p ≤ 0.05).

### Concentración de K en tejido

La concentración de K en la raíz de plántulas micorrizadas fue similar en condición salina y no salina (Figura 2). Similar situación se observó para el tallo. Sin embargo, en las hojas, los tratamientos tuvieron un efecto significativo. En las plántulas tratadas con 35 mM, la concentración de K fue 40% mayor que en el testigo y hasta dos veces mayor, que en las plántulas tratadas con 20 mM. En este tejido la concentración de K aumentó con el incremento del nivel salino de los tratamientos.

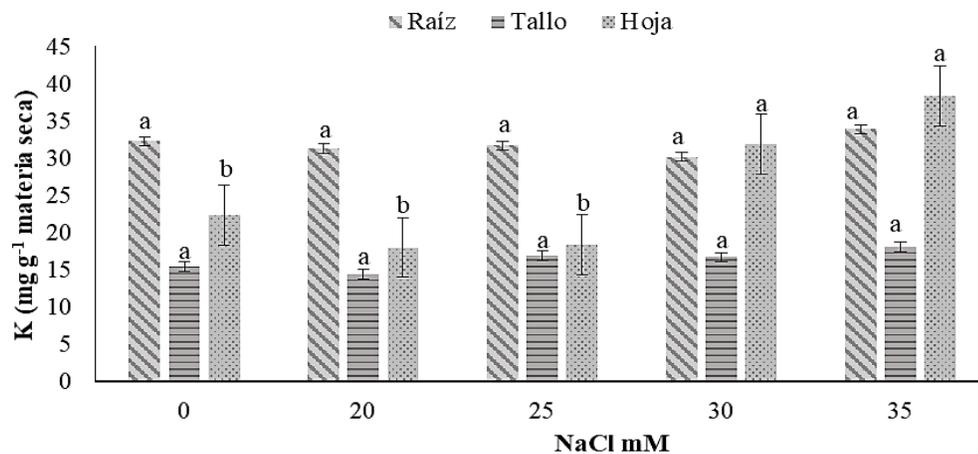


Figura 2. Concentración de K en raíz, tallo y hojas de plántulas de nogal pecanero inoculadas con micorriza *Scleroderma* sp bajo diferentes concentraciones de salinidad. Barras verticales (n=5,  $\pm$  error estándar) dentro de tratamientos con letras desiguales, son estadísticamente diferentes (DMS;  $p \leq 0.05$ ).

### Relación K/Na en tejido

La relación K/Na en raíz, tallo y hoja fue significativamente afectada por los tratamientos (Figura 3). En la raíz de las plántulas tratadas con 20 y 25 mM de NaCl, esta relación disminuyó 43 y 51% respectivamente, en comparación con las plántulas desarrolladas en el medio no salino. El incremento del nivel de salinidad a 30 mM redujo esta relación en un 70%, siendo estadísticamente similar al tratamiento inmediato superior. En el tallo se observó una disminución significativa de esta variable en todos los tratamientos con salinidad, respecto con el testigo. Esta disminución fue del orden de 70 a 80%. El efecto negativo de

los tratamientos, también se observó en las hojas, en las cuales la relación K/Na fue 50% menor que en las plántulas sin estrés salino.

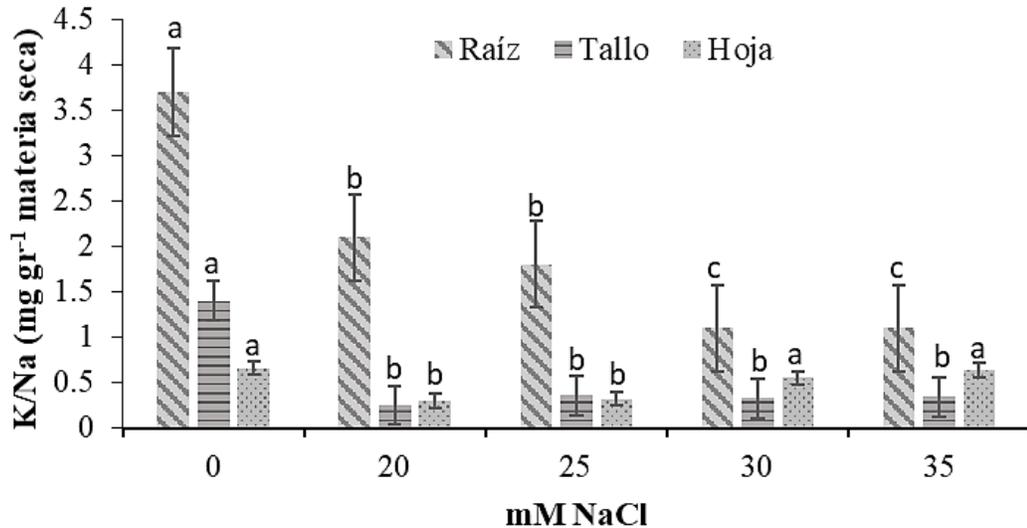


Figura 3. Relación K/Na en raíz, tallo y hoja de nogal bajo diferentes niveles de salinidad. Barras verticales (n=5,  $\pm$  error estándar) dentro de tratamientos con letras desiguales, son estadísticamente diferentes (DMS;  $p \leq 0.05$ ).

En este estudio la concentración de Na en raíz, tallo y hoja incrementó en las plantas desarrolladas bajo condición salina. Por consiguiente, las micorrizas no tuvieron efecto sobre la retención de Na en raíz, como ha sucedido en otras especies (Parvin et al., 2020). Las diferencias considerables en concentración de sodio entre plantas con micorrizas y sin ellas, sugieren que los mecanismos para mejorar la tolerancia al estrés salino en plantas con micorrizas, está relacionada con la exclusión de Na en éstas (Feng et al., 2002). Por lo tanto, las diferentes respuestas de las plantas al estrés salino, dependerán de capacidad planta-microrganismo, para tolerar el efecto inhibitorio causado por la salinidad (Bandou, 2006). La concentración de K en raíz, tallo y hoja disminuyó significativamente en los tratamientos con salinidad. Por otro lado, la relación de K/Na disminuyó considerablemente en las plantas bajo condiciones salinas. En plantas estresadas por salinidad, el Na compite con el potasio, lo que resulta en una acumulación de Na una la deficiencia de K (Chen, 2007; Porcel et al., 2016).

Bajo condiciones fisiológicas normales las plantas contienen entre 1 y 10 mM de Na en el citosol y entre 60 y 100 mM de K (Bassil et al., 2012).

De ahí la baja relación de K/Na encontrada, en este estudio debido a la alta sensibilidad de la especie a la salinidad (Campos et al., 2017; Miyamoto et al., 1985). Aunque se señala que algunas micorrizas pueden absorber selectivamente elementos como K, Ca y Mg y evitar la asimilación de Na bajo condiciones de salinidad (Hammer et al., 2011).

#### Peso seco raíz

Los tratamientos con NaCl afectaron significativamente el peso seco de la raíz. Las plántulas inoculadas y regadas con agua libre de sales expresaron el mayor peso seco en comparación con las tratadas con NaCl (Figura 4). Esta variable disminuyó conforme la concentración de NaCl en el medio incrementó. El peso seco de la raíz en las plántulas cultivadas en el medio salino con 20 mM disminuyó en un 40%, siendo del 60% para las cultivadas con 25 y 30 mM. Mientras que las tratadas con 35 mM manifestaron una disminución en el peso seco del 70%.

#### Peso seco de tallo

Los tratamientos de Na Cl afectaron significativamente el peso seco del tallo (Figura 4). Este se redujo en 13, 21, 26 y 34% cuando las concentraciones de salinidad fueron de 20, 25, 30 y 35 aunque estadísticamente fueron similares.

#### Peso seco de hojas

El peso seco de hojas en plántulas tratadas con 20 mM de NaCl, fue estadísticamente similar al testigo (Figura 4). Esta variable disminuyó significativamente en plántulas tratadas con 25, 30 y 35 mM, la cual fue reducida en 40, 45 y 51% respectivamente- i

#### Peso seco de plántula

El peso seco de las plántulas fue significativamente afectado por los tratamientos con NaCl (Figura 4). Las plántulas bajo condición no salina, mostraron el mayor peso seco. Este se redujo en una tercera parte en plántulas tratadas con 20 mM

Disminuyó a la mitad en plántulas tratadas con 25 y 30 mM respectivamente. Sin embargo, esta variable redujo en dos tercios en las plántulas con mayor estrés por salinidad, el cual fue de 35 mM.

El incremento en biomasa y tolerancia a salinidad en plantas inoculadas con micorrizas, en comparación con las no inoculadas, ha sido observado en varios estudios (Ruiz et al., 2012; Estrada et al., 2013; Babuin et al., 2016), también ha sido documentado el efecto de micorrizas sobre la estimulación del crecimiento en especies desarrollando bajo estrés salino como *Populus tomentosa* (Lu et al., 2014) y *Robinia pseudocacia* (Chen et al., 2003). Sin embargo, también se ha observado el efecto negativo del estrés salino, en otras especies de plantas (Chen, et al., 2003; Babuin, et al., 2016; Swiazek, et al., 2019) Esta respuesta puede estar relacionada con el efecto osmótico de la sal, que limita la absorción de agua y nutrientes, o con la toxicidad directa del ion (Evelin et al., 2009).

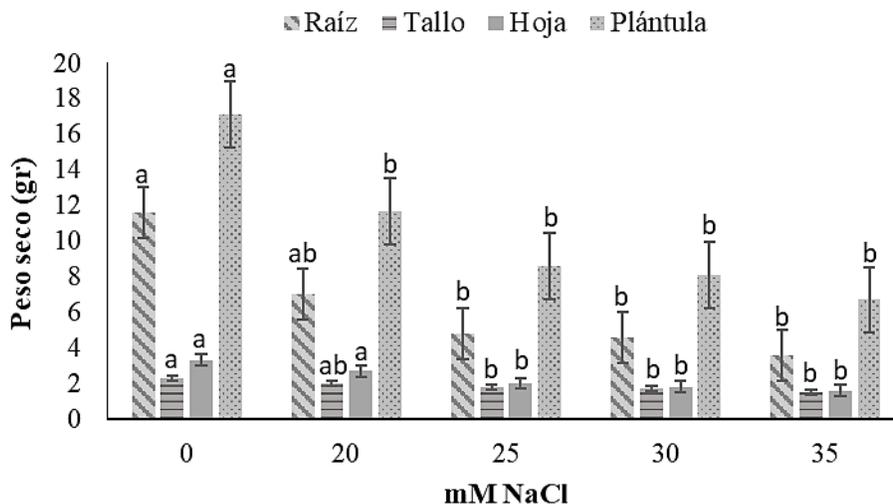


Figura 4. Peso seco de raíz, tallo y hojas en plántulas de nogal pecanero inoculadas con micorriza *Sclerotium* sp bajo diferentes concentraciones de salinidad. Barras verticales (n=5,  $\pm$  error estándar) dentro de tratamientos con letras desiguales, son estadísticamente diferentes (DMS;  $p \leq 0.05$ ).

## CONCLUSIONES

Bajo condiciones no salinas, las plántulas de nogal inoculadas con *Scleroderma* sp y regadas con agua sin NaCl, mostraron la mayor fotosíntesis, conductancia estomática, transpiración, y biomasa. Sin embargo, la presencia de NaCl en cualquier concentración en el medio, causó un efecto adverso, sobre las variables aquí estudiadas. Se recomienda en futuros estudios, aumentar la concentración del hongo e incrementar el número de aplicaciones, bajo condiciones controladas.

## LITERATURA CITADA

- Bandou, E.; Lebailly, F.; Muller, F.; Dulormne, M.; Toribio, A.; Chabrol, J.; Courtecuisse R.; Plenchette, C.; Prin, Y.; Duponnois, R.; Thiao, M.; Sylla, S.; Dreyfus, and Ba, A. 2006. The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt stress in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. *Mycorrhiza*. 16:559–565.
- Babuín, M.; Echeverría, M.; Menéndez, A. and Maiale, S. 2016. Arbuscular mycorrhizal pecan seedlings alleviate effect of restricted water supply. *HortScience* 51(3):212–215.
- Bassil E.; Coku A. and Blumwald, E. 2012. Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> antiporters in plant growth and development. *J Exp Bot* 63:5727–5740.
- Bonito, G.; Brneman, T. and Vilgalys, R. 2011. Ectomycorrhizal fungal diversity in orchards of cultivated pecan (*Carya illinoensis*; Juglandaceae). *Mycorrhiza* 21:601–612.
- Campos, V. A.; Arreola, A. J.; Trejo, C. R.; Borja, A.; López, S. y Hernández, R. 2017. Respuesta fisiológica, acumulación iónica y peso seco en portainjertos de nogal pecanero (*Carya illinoensis* (Wangenh) K. Koch) desarrollados bajo condiciones de estrés salino. *Interciencia*. 42(11): 744-749.
- Carvajal, M.; Cerda, A. and Martínez, ¿V. 2000 Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity? *The New Phytologist* 145, 439–447.

- Chen, D.; Khalili, K. and Cairney, J. W. 2003 Influence of water stress on biomass production by isolates of an ericoid mycorrhizal endophyte of *Woolfsia pungens* and *Epacris microphylla* (Ericaceae). *Mycorrhiza* 13:173–176.
- Chen, Z.; Zhou, M. X.; Newman, I.A; Mendham, N.J.; Zhang, G.P. and Shabala, S. 2007. Potassium and sodium relations in salinised barley as a basis of differential salt tolerance. *Funct Plant Biol* 34:150–162.
- Estrada, B.; Aroca, R.; Barea, J. and Ruíz, L. J.M. 2013. Native arbuscular mycorrhizal fungi isolated from a saline habitat improved maize antioxidant systems and plant tolerance to salinity. *Plant Sci* 201:42–51.
- Evelin, H.; Kapoor, R. and Giri, B. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Ann Bot* 104(7):1263–1280.
- Fadaei, S.; Varziri, M.; Young, M.; Sherr, I. and Zwiaseek., J J. 2020. Ericoid mycorrhizal fungi enhance salt tolerance in ericaceous plants. *Mycorrhiza*. 30:419-429.
- Feng, G.; Suo, F.; Xiao, L.; Changyan, T.; Tanq, C. and Rengel, Z. 2002. Uptake of nitrogen from indigenous soil pool by cotton plant inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Communications in Soil Science and Plant Analyzes*. 33:3825-3823.
- Garcia, K.; Delteil, A.; Conejero, G.; Becquer, A.; Plassard, C.; Sentenac, H. and Sabine Zimmermann, S. 2014. Potassium nutrition of ectomycorrhizal *Pinus pinaster*: overexpression of the *Hebeloma cylindrosporum* HcTrk1 transporter affects the translocation of both K<sup>+</sup> and phosphorus in the host plant. *New Phytologist*. 201: 951–960.
- Hammer, E. C.; Nasr, H.; Pallon, J.; Olsson, P. A. and Wallander, H. (2011) Elemental composition of arbuscular mycorrhizal fungi at high salinity. *Mycorrhiza* 21:117–129.
- Lee, S. H.; Calvo, P. M.; Chung, G.C. and Zwiazek, J. J. 2010. Role of aquaporins in root water transport of ectomycorrhizal jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings exposed to NaCl and fluoride. *Plant Cell Environ* 33:769–780.

- Low Z.; Janz, D.; Jiang, X.; Göbel, C.; Wildhagen, H.; Tan, Y.; Rennenberg, H.; Feussner, I. and Polle, A. 2009. Upgrading root physiology for stress tolerance by 11 ectomycorrhizas: insights from metabolite and transcriptional profiling into 12 reprogramming for stress anticipation. *Plant Physiol* 151: 1902–1917.
- Lu, Y.W.; Wang; G.Q.; Meng, Q. J.; Zhang W.H. and, Duan BL 2014. Growth and physiological responses to arbuscular mycorrhizal fungi and salt stress in dioecious plant *Populus tomentosa*. *Can J For Res* 44: 1020–1031.
- Miyamoto; S.; Gobran, C.R. and Piela, K 1985 Salt effects on seedling growth and ion uptake of tree pecan rootstock cultivar. *Agron. J.* 77: 383-388.
- Miyamoto, S. and Nesbitt, M. 2011 Effectiveness of soil salinity management practices in basic irrigated pecan orchards. *Hort. Technol.* 21: 569-576.
- Munns, R. and Tester, M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681. Muralitharan MS, Chandler S, Steveninck RF (1992) Effects of NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on Growth and solute composition of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*). *Aust. J. Plant Physiol.* 19: 155-164.
- Nguyen, M.; Calvo, P. M. and Zwiazek,. J. 2006. Gas Exchange and Growth Responses of Ectomycorrhizal *Picea mariana*, *Picea glauca*, and *Pinus banksiana* Seedlings to NaCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. *Plant Biol.* 8: 646–652.
- Parvin, S.; Van, G.M.; Yeasmin, T.; Verbruggen, E. and Honnay, O. 2020 Effects of single and multiple species inocula of arbuscular mycorrhizal fungi on the salinity tolerance of a Bangladeshi rice (*Oryza sativa* L.) cultivar. *Mycorrhiza.* 30:441-444.
- Porcel, R.; Aroca, R.; Azcon, R. and Ruiz, L. J. M. 2016. Regulation of cation transporter genes by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in rice plants subjected to salinity suggests improved salt tolerance due to reduced Na<sup>+</sup> root-to-shoot distribution. *Mycorrhiza.* 26:673-684.
- Ruiz. L. J. M.; Porcel R.; Azcon, C. and Aroca, R. 2012. Regulation of arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants:

new challenges in physiological and molecular studies. *J Exp Bot* 63:4033–4044.

Shabala, S. and Cuin, T.A. 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol Plant* 133:651–66.

Smith, S. E.; Facelli, E.; Pope, S. and Smith, F.A. 2010. Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the roles of arbuscular mycorrhizas. *Plant Soil* 326:3–20.

Yi, H.; Calvo, P. M.; Mac Kinnon, M. D. and Zwiazek, J. J. 2008. Responses of ectomycorrhizal *Populus tremuloides* and *Betula papyrifera* seedlings to salinity. *Environ Exp Bot* 62:357–363.

Zwiazek, J. J., M. A. Equiza, J. Karst, J. Senorans, M. Wartenbe, and M. Calvo-Polanco. 2019. Role of urban ectomycorrhizal fungi in improving the tolerance of lodgepole pine (*Pinus contorta*) seedlings to salt stress. *Mycorrhiza* 29:303-312.

## CAPITULO IV

### ***Tuber caryophilum*, A NEW TRUFFLE SPECIES GROWING IN *Carya illinoensis* ORCHARDS**

#### ABSTRACT

*Tuber* is a genus of ectomycorrhizal fungi with an important diversity of species associated with hosts in Juglandaceae. *Tuber caryophilum* is proposed as a new species based on ecological, morphological and phylogenetic characters of two ribosomal markers (ITS and LSU). This species is characterized by forming ectomycorrhizae on the roots of *Carya illinoensis* in La Comarca Lagunera and Chihuahua, Mexico and by exhibiting 18–48 × 10–27 µm echinulate ascospores. *Tuber caryophilum* belongs to the *Rufum* clade and is the sister species of *Tuber theleascum*, a species reported in northern Mexico associated with *Quercus canbyi* and *Q. polymorpha*. These two truffles belong to a clade from the southern United States and northern Mexico with taxa associated with *Quercus* and *Carya*, such as *Tuber lyonii*.

**Keywords:** Diversity, ectomycorrhizal fungi, hypogeous fungi, pecan.

## RESUMEN

*Tuber* es un género de hongos ectomicorrizicos con una importante diversidad de especies asociada a hospederos en Juglandaceae. *Tuber caryophilum* es propuesta como una nueva especie basada en caracteres ecológicos, morfológicos y filogenéticos de dos marcadores ribosomales (ITS y LSU). Esta especie se caracteriza por formar ectomicorrizas en las raíces de *Carya illinoensis* (nogal pecanero) en La Comarca Lagunera y en Chihuahua, México y por presentar ascosporas equinuladas de 18–48 × 10–27 µm. *Tuber caryophilum* pertenece al clado Rufum y es la especie hermana de *Tuber theleascum* una especie descrita del norte de México, asociada con *Quercus canbyi* y *Q. polymorpha*. Estas dos especies de trufas pertenecen a un clado del sur de Estados Unidos y norte de México con taxones asociados a *Quercus* y *Carya* como *Tuber lyonii*.

**Palabras clave:** Diversidad, hongos ectomicorrizógenos, hongos hipogeos, nogal pecanero

## INTRODUCTION

Species of the genus *Tuber* belong to the family Tuberaceae (Pezizales) and form ectomycorrhizae with many forest tree species (Li et al., 2004; 2007; Bonito et al., 2011). These species are ecologically and economically important (Neri-Luna et al., 2012, Guevara et al., 2013). Around the world, 86 species of the genus *Tuber* are known (Kirk et al., 2008; Trappe et al., 2009; Guevara et al., 2013). They grow in mycorrhizal symbiotic association with gymnosperm and angiosperm trees. Thirty-eight species of *Tuber* have been described in North America (Guevara et al., 2013). The diversity of the genus in Mexico is expected to be greater because this region is a center of diversification of *Quercus* and *Pinus*, two of the main ectomycorrhizal hosts of *Tuber*. Knowledge of *Tuber* in Mexico has recently expanded. For example, new species belonging to the *Maculatum* clade, such as *Tuber mexiusanum* (Guevara et al., 2018), *T. guevarai*, *T. castilloi*, and *T. theleascum*, associated with *Quercus* spp., have been described in northeastern Mexico. *Tuber incognitum* and *T. anniae* belonging to the *Puberulum* clade have also been recorded in association with *Quercus* spp and *Pinus montezumae* in central Mexico (Guevara et al., 2018; Páez et al., 2018). In association with trees of forest interest in Mexican ecosystems, *T. guzmanii*, *T. separans*, and *T. pseudoseparans* have also been found (Guevara et al., 2015; Gómez-Reyes et al., 2018; Paez et al., 2018).

*Carya illinoensis* (pecan) is an agronomically important ectomycorrhizal nut tree in whose plantations in the southern United States truffle species such as *Tuber lyonii* have been reported (Benucci et al., 2012; Bonito et al., 2012; Rodríguez et al., 2018). Ascomata and ectomycorrhizae of *Tuber brennemanii* and *T. floridanum* have also been found in these orchards (Grupe et al., 2018). In Mexico, *Tuber* diversity has not been explored in pecan plantations, although due to their particular soil and climatic conditions it is to be expected that there are species not yet described in them. In this paper, *Tuber caryophilum* sp. nov., a species in the *Rufum* clade, whose distribution includes Chihuahua and La Comarca

Lagunera of Coahuila, Mexico, is described based on morphological, ecological and molecular characters.

## MATERIALS AND METHODS

*Sampling and morphological characterization.* Ascomata were collected from a *Carya illinoensis* orchard in the Comarca Lagunera of Coahuila and characterized following the recommendations of Castellano et al. (1989) and Pegler et al. (1993). Duplicates of the specimens were deposited in the José Castillo Tovar herbarium (ITCV) and MEXU. Characters examined included ascoma size and color, asci shape, asci wall thickness, and number of spores per ascus. Sections were cut by hand and then mounted in 5% KOH and Melzer's reagent for light microscopy. Thirty measurements of different structures such as spores and asci were made in 5% KOH. Microscopic structures were measured and photographed on a Velab VE-B3 microscope and a ZEISS Scope A1 optical stereoscope.

*Molecular protocols.* DNA was extracted by the CTAB method and amplified by PCR in 25  $\mu$ l reactions according to Sambrook et al. (1989). The reactions consisted of 2.5  $\mu$ l of 10X PCR buffer, 2.0  $\mu$ l of 2.5 Mm MgCl final concentration, 2.0  $\mu$ l of dNTPs, 2.0  $\mu$ l of each primer 10 picomoles/ $\mu$ l final concentration, 1.5 units of Taq polymerase (GoTaq®, Promega, WI), 11.3  $\mu$ l of MiliQ grade water and 3  $\mu$ l of DNA. The ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region was amplified with the ITS4 and ITS5 oligonucleotides. The PCR program consisted of an initial denaturation at 94 °C for 3 minutes, followed by 34 cycles of 94 °C, 51 °C and 72 °C for one minute each and a final extension at 72 °C for 8 minutes (Taylor et al., 2006). Amplification was carried out on a MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA). A section of the large ribosome subunit (LSU) was amplified with the LR0R and LR5 oligonucleotides (Vilgalys and Hester 1990) and the enzyme Taq & Load (Avantor, PA, USA). The 25  $\mu$ l reactions consisted of 5  $\mu$ l of the master mix, 0.25  $\mu$ l of each oligonucleotide at a concentration of 50 mM, water, and 1  $\mu$ l of DNA. The PCR program began with denaturation at 94 °C for 4 minutes, followed by 35 cycles at 94 °C, 54 °C and 72 °C for 1 minute each

and final extension at 72 °C for 10 minutes. PCR products were cleaned with ExoSAP-IT (ThermoFisher, USA) with some modifications (Ángeles-Argáiz et al., 2016). DNA and PCR products were reviewed on 0.8% and 1.5% agarose gels, respectively. TBE at 0.5% was used as buffer. Samples were stained with Gel Red (Bioitium, CA, USA) and a 100 bp molecular weight marker was used as reference. Gels were photographed on a Multidoc-IT photodocumenter (Analytik Jena Company, CA, USA). ITS PCR products were sequenced in both directions at Macrogen (Rockville, MD, USA), with PCR primers. LSU sequences were obtained at the Biodiversity and Health Sequencing Laboratory of the Institute of Biology, UNAM, using BigDye Terminator (ThermoFisher) chemistry, also in both directions.

*Phylogenetic analyses.* Nucleotide sequences were edited and aligned in Geneious Prime version 2021 with the MUSCLE algorithm (Maddison and Maddison 2015). Sequences of *T. caryophilum* voucher materials were deposited in GenBank under accession numbers MZ092919 and OK642388 for ITS, OK642397 and OK642398 for LSU and OK642406 for the ITS of ectomycorrhizae. The alignment for phylogenetic analyses included the sequences generated in this study, those previously included in analyses of the *Rufum* clade (Leonardi et al., 2019; Eberhart et al., 2020) and sequences of high nucleotide similarity obtained from the GenBank database by means of the BLAST algorithm (Altschul et al., 1990) (Table 1). A total of 72 samples from 26 taxa of the *Rufum* clade and one outgroup were aligned (Table 1). The concatenated alignment had 1076 bp where bases 1-556 corresponded with the ITS and bases 557-1076 with the LSU. The alignments were reviewed manually, excluding ambiguous regions.

Phylogenetic analyses and evolutionary model selection were performed using IQ-TREE (v2.1.4, Minh et al., 2020) from the concatenated and partitioned alignment (IQ-TREE execution line: `iqtree -s ../data/concat.fasta -p Partition.nex -m MFP --runs 100 --abayes -B 1000 -T AUTO -ntmax 28`). The best evolutionary models were selected with ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017). The best

evolutionary model for the ITS marker was TIM2+F+I+G4 and for LSU it was TIM3e+I+G4. The resulting tree is the consensus of one hundred replicates of two phylogenetic analyses; an ultra-fast Maximum Likelihood analysis (Hoang et al., 2018) with one thousand bootstrap replicates (MVB), complemented with an aBayes branch support analysis by Bayesian approximation (BPP (BPP) (Anisimova et al., 2011). To show the ectomycorrhizal status and distribution of *T. caryophilum*, the ITS sequence of the holotype was contrasted by means of nucleotide similarity against ectomycorrhizal sequences of *Carya illinoensis* obtained from an orchard in Chihuahua, Mexico.

## RESULTS

The consensus tree of Bayesian approximation and Maximum likelihood shows the *Rufum* clade as monophyletic and with high support (BPP=1, MV=100). Within this clade, *T. caryophilum* is an independent, monophyletic and well-supported clade (BPP=1, MVB=100). This species appears as the sister clade of *T. theleascum* (BPP=0.99, MVB=98). In turn, these two species are grouped with the *T. lyonii* complex in a well-supported clade (BPP=1, MVB=100) made up of species from the southern USA and northern Mexico. Moreover, we found that the ITS sequence of the *T. caryophilum* holotype had a nucleotide similarity of 99.3% (4 substitutions/549 bp) with mycorrhizal sequences from a pecan orchard in Chihuahua. This indicates that, like *T. lyonii*, *T. caryophilum* is an ectomycorrhizal symbiont of *C. illinoensis*. Consequently, *Tuber caryophilum* is designated as a new species supported by ITS and LSU phylogenetic analyses of rDNA, morphological characters, and ecology.

**Type:** Mexico, Coahuila, Municipality of Viesca, Tierra Blanca Orchard, September 4, 2019, Sánchez st3 (ITCV 1888, “José Castillo Tovar” herbarium).

**Diagnosis:** Cream peridium with translucent veins towards the epicutis; pseudoparenchymatous epicutis mainly although in some areas it is prosenchymatous, isodiametric hyphae of 3-17 µm; echinulate ascospores of 18-48 × 10-27 µm; it grows in pecan (*Carya illinoensis*) orchards.

**Ascoma:** Subglobose to irregular, 19 × 10 × 18 mm, translucent veins on the light brown to dark brown peridium when dry, with a white to cream furrow and an irregular linear or “V”-shaped margin continuing into the gleba as veins, some areas dark brown with cherry tints and with dark brown to reddish insect caverns; peridium smooth, some areas rough, separable from the gleba, without cystidia. White, cream gleba that is gray to dark when dried, marbled with white to gray, dark brown to reddish brown veins that continue towards the peridium (furrows). Strong, very pleasant and distinctive odor, unrecorded taste.

**Peridium:** 110-220 µm thick, epicutis 50-75 µm, pseudoparenchymatous in its outermost part, although in some parts it is prosenchymatous with hyphae 3-17 µm wide, versiform to angular or isodiametric, wall 1-4 µm thick, yellow to orange-reddish in KOH; subcutis 70-150 µm wide, pseudoparenchymatous strongly interwoven, hyaline hyphae in KOH, septate 2-4 µm wide. Gleba, intertwined vein hyphae, 2-4 µm at widest part. **Asci:** 47-105 × 32-50 µm (Q=1.07-2.63), average 67.1 × 40.6 µm (Q=1.7) including pedicel, subglobose to broadly ellipsoid, hyaline in KOH, 1-2 µm double wall may have a short to very long pedicel or in some it is absent, 1-5 ascospores per ascus. **Ascospores:** 18-48 × 10-27 µm (Q=1-2.40), average 30.1 × 17.2 (Q=1.76) subglobose to broadly ellipsoid or spindle-shaped excluding ornamentation, echinulate, echinulae 1-4 µm high. Asci with 1 ascospore 35-48 × 18-27 µm (Q=1.30-2.33), average 42.1 × 22.4 (Q=1.91); 2 ascospores 20-38 × 15-21µm (Q=1-2.4), average 31.3 × 17.7 µm (Q=1.79); 3 ascospores 18-33 × 14-18 µm (Q=1.06-2), average 27.1 × 16.6 (Q=1.63); 4 ascospores 21-33 × 12-18 µm (Q=1.44-2.13), average 26.4 × 15.1 (Q=1.76); 5 ascospores 19-33 × 10-17 µm (Q=1.19-2.36), average 24 × 14.4 (Q=1.69).

**Etymology:** Refers to the ectomycorrhizal association between *T. caryophilum* and *Carya illinoensis*

**Distribution and ecology:** In northern Mexico in La Comarca Lagunera of Coahuila and Chihuahua, ectomycorrhizal symbiont of *Carya illinoensis*. To date it has only been found in pecan orchards, not in natural habitats.

**Habitat:** Hypogeous, sometimes solitary, other times gregarious under pecan trees (*Carya illinoensis*).

**Collections examined in Mexico:** Coahuila, Tierra Blanca Orchard, Municipality of Viesca, September 4, 2019, Sánchez st3\_N2, MEXU 30227.

## DISCUSSION

Phylogenetic analyses show that *Tuber caryophilum* belongs to the *Rufum* clade and, together with *T. theleascum*, is related to the *T. lyonii* complex, which is also an ectomycorrhizal species of *Carya illinoensis*. *Tuber caryophilum* differs from *T. theleascum* because the latter has ascomata without translucent areas on the peridium, a pseudoparenchymatous epicutis with elongated prostrate or intertwined hyphae 4-7  $\mu\text{m}$  wide and smooth, while the former species has translucent areas on the peridium and a pseudoparenchymatous epicutis with isodiametric hyphae 13-17  $\mu\text{m}$  wide. Furthermore, they differ in ascospore size; *T. caryophilum* has 18-48  $\times$  10-27  $\mu\text{m}$  ascospores, whereas in *T. theleascum* they are 18-44  $\times$  13-25  $\mu\text{m}$ . *Tuber caryophilum* is also similar to *T. lyonii*, an edible truffle species native to the southeastern USA (Sharma et al., 2012; Bonito et al., 2013). However, they differ macro- and microscopically; in *T. lyonii*, peridium width is larger (300-500  $\mu\text{m}$ ), ascospores are ellipsoid 30-37  $\times$  22-24  $\mu\text{m}$  and epicutis width is 20-40  $\mu\text{m}$ , with hyphae 6-10  $\mu\text{m}$  wide (Sharma et al., 2012; Healy et al., 2016). In contrast, in *T. caryophilum* the peridium width is 110-220  $\mu\text{m}$ , its ascospores measure 18-48  $\times$  10-27  $\mu\text{m}$  and epicutis width is 50-75  $\mu\text{m}$ , with 3-17  $\mu\text{m}$  hyphae. These three species share important microscopic features such as the pseudoparenchymatous peridium surface and most of their spores are subglobose to ellipsoid. Other common features are that all three are closely related in the same clade of the *Rufum* section and that they develop in pecan orchards (Trappe et al., 1996; Sharma et al., 2012 Grupe et al., 2018).

Other *Tuber* species associated with pecan plantations have been described but these do not belong to the *Rufum* section. One of these species is *Tuber brennemanii*, which belongs to the *Maculatum* clade and therefore differs morphologically and molecularly from species belonging to the *Rufum* clade. For

example, *T. brennemanii* presents anamorphic spores and a periclinal subperidium (Grupe et al., 2018). Likewise, *Tuber floridanum*, also on the *Maculatum* clade, has been found in pecan orchards. This species is distinguished by the presence of dermatocystidia and commonly has 2-4 spores and reticulate ornamentation as present in the *Maculatum* (Grupe et al., 2018). Regarding *T. floridanum*, it is known to have been unintentionally introduced into southern Brazil on the roots of pecan tree seedlings.

Given the phylogenetic closeness of *T. caryophilum* to *T. lyonii*, its discovery in pecan orchards opens the door to its use in northern Mexico. To develop this, it will be necessary to carry out mycorrhization experiments in nurseries and to know its organoleptic properties. This could promote a system of co-cultivation between *T. caryophilum* and *C. illinoensis* as occurs in orchards in southeastern Florida and Europe where various species of truffles are harvested alongside nut production (Trappe et al., 1996; Bonito et al., 2013; Lefevre et al., 2012).

## REFERENCES

- Anisimova, M., Gil, M., Dufayard, J. F., Dessimoz, C. and Gascuel, O. (2011). Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic biology*, 60(5), 685–699. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr041>
- Benucci, G. M. N., Csorbai, A. G., Falini, L. B., Bencivenga, M., Di Massimo, G. and Donnini, D. (2012). Mycorrhization of *Quercus robur* L., *Quercus cerris* L. and *Corylus avellana* L. seedlings with *Tuber macrosporum* Vittad. *Mycorrhiza*, 22(8), 639–646. <https://doi.org/10.1007/s00572-012-0441-3>
- Benucci, G. M. N., Bonito, G., Falini, L. B. and Bencivenga, M. (2012). Mycorrhization of Pecan trees (*Carya illinoensis*) with commercial truffle species: *Tuber aestivum* Vittad. and *Tuber borchii* Vittad. *Mycorrhiza*, 22(5), 383–392. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0413-z>
- Bonito, G., Brenneman, T. and Vilgalys, R. (2011). Ectomycorrhizal fungal diversity in orchards of cultivated pecan (*Carya illinoensis*; Juglandaceae). *Mycorrhiza*, 21(7), 601–612. <https://doi.org/10.1007/s00572-011-0368-0>
- Bonito, G, Smith, M. E., Nowak, M., Healy, R. A., Guevara, G., Cázares, E. and Murat, C. (2013). Historical biogeography and diversification of truffles in the Tuberaceae and their newly identified southern hemisphere sister

lineage. *PloS one*, 8(1), e52765.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052765>

- Eberhart, J., Trappe, J., Páez, C. P. and Bonito, G. (2020). *Tuber luomae*, a new spiny-spored truffle species from the Pacific Northwest, USA. *Fungal Systematics and Evolution*, 6, 299. doi:10.3114/fuse.2020.06.15
- Fan, L., Han, L., Zhang, P. R. and Yan, X. Y. (2016). Molecular analysis of Chinese truffles resembling *Tuber californicum* in morphology reveals a rich pattern of species diversity with emphasis on four new species. *Mycologia*, 108(2), 344–353. <https://doi.org/10.3852/14-343>
- Gómez-Reyes, V. M., Vázquez-Marrufo, G., Ortega Gómez, A. M. and Guevara Guerrero, G. (2018). Ascomicetos hipogeos de la región occidental del Sistema Volcánico Transversal, México. *Acta botánica mexicana*, 125, 37–48. <https://doi.org/10.21829/abm125.2018.1327>
- Guevara, G., Bonito, G., Cázares, E., Rodríguez, J., Vilgalys, R. and Trappe, J. M. (2008). *Tuber regimontanum*, new species of truffle from Mexico. *Revista mexicana de micología*, 26, 17–20.
- Guevara, G., Bonito, G. and Cázares, E. (2013). Revisión del género *Tuber* (Tuberaceae: Pezizales) de México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84, S39–S49.
- Guevara, G., Bonito, G., Trappe, J. M., Cázares, E., Williams, G., Healy, R. A. and Vilgalys, R. (2013). New North American truffles (*Tuber* spp.) and their ectomycorrhizal associations. *Mycologia*, 105(1), 194–209. <https://doi.org/10.3852/12-087>
- Grupe, A. C., Sulzbacher, M. A., Grebenc, T., Healy, R., Bonito, G. and Smith, M. E. (2018). *Tuber brennemanii* and *Tuber floridanum*: Two new *Tuber* species are among the most commonly detected ectomycorrhizal taxa within commercial pecan (*Carya illinoensis*) orchards. *Mycologia*, 110(4), 780–790. <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1490121>
- Healy, R., Bonito, G. M. and Smith, M. E. (2016). A brief overview of the systematics, taxonomy, and ecology of the *Tuber rufum* clade. In Zambonelli, A., Iotti, M. and Murat, C. (Eds.), True Truffle (*Tuber* spp.) in the World (pp. 125–136). Berlin: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31436-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31436-5_8)
- Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. and Stalpers, J. A. (2008). Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. Wallingford: CABI.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Lancellotti, E., Iotti, M., Zambonelli, A. and Franceschini, A. (2016). The *Puberulum* group sensu lato (whitish truffles). In Zambonelli, A., Iotti, M.

- and Murat, C. (Eds.), True Truffle (*Tuber* spp.) in the World (pp. 105–124). Berlin: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-31436-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-31436-5_7)
- Lefevre, C. (2012). Native and cultivated truffles of North America. In Zambonelli, A. and Bonito, G. (Eds.), Edible Ectomycorrhizal Mushrooms (pp. 209–226). Berlin: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-33823-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-33823-6_12)
- Leonardi, M., Paz-Conde, A., Guevara, G., Salvi, D. and Pacioni, G. (2019). Two new species of *Tuber* previously reported as *Tuber malacodermum*. *Mycologia*, 111(4), 676–689. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1603777>
- Marozzi, G., Sánchez, S., Benucci, G. M. N., Bonito, G., Falini, L. B., Albertini, E. and Donnini, D. (2017). Mycorrhization of pecan (*Carya illinoensis*) with black truffles: *Tuber melanosporum* and *Tuber brumale*. *Mycorrhiza*, 27(3), 303–309. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0743-y>
- Nei, M. and Kumar, S. (2000). Molecular evolution and phylogenetics. Oxford: Oxford University Press.
- Neri-Luna, C. and Villarreal-Ruiz, L. (2012). Simbiosis micorrícica: un análisis de su relevante función ecosistémica y en la provisión de servicios ambientales. In Huerta, M. and Castro, F. (Comps.), Interacciones ecológicas (pp. 37–61). Guadalajara: Universidad de Guadalajara. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0743-y>
- Páez, C. P., Bonito, G. M., Guevara-Guerrero, G., Castellano, M. A., Garibay-Orijel, R., Trappe, J. M. and Ramírez, R. P. (2018). Description and distribution of *Tuber incognitum* sp. nov. and *Tuber anniae* in the Transmexican Volcanic Belt. *MycKeys*, 41, 17–27. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.41.28130>
- Rincón, A., Alvarez, I. F. and Pera, J. (2001). Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 11(6), 265–271. <https://doi.org/10.1007/s005720100127>
- Rodríguez, R. A., Valdés, M. P. and Ortiz, S. (2018). Características agronómicas y calidad nutricional de los frutos y semillas de zapallo *Cucurbita* sp. *Revista colombiana de ciencia animal recia*, 10(1), 86–97. <https://doi.org/10.24188/recia.v10.n1.2018.636>
- Sharma, J., Trela, B., Wang, S., Smith, M. and Bonito, G. (2012). Pecan truffle (*Tuber lyonii*) in Texas. *Pecan South, December 2012*, 16–24.
- Trappe, J. M. (1979). The orders, families, and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives). *Mycotaxon*, 9, 297–340. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=PASCAL8010020736>

Trappe, J. M., Jumpponen, A. M. J. and Cazares, E. (1996). NATS truffle and truffle-like fungi. 5. *Tuber lyonii* (= *T. texense*), with a key to the spiny-spored *Tuber* species groups. *Mycotaxon*, 60, 365–372.

**Figure 1.** Phylogenetic placement of *Tuber caryophilum* sp. nov. based on an ITS and LSU rDNA concatenated alignment. The consensus tree represents 2 phylogenetic analyses; a Bayesian approximation with 1000 generations and a Maximum likelihood analysis with 1000 bootstrap replicates. Just support values higher than 0.70 and/or 70% are displayed.

**Figure 2.** *Tuber caryophilum* (holotype ITCV 1888). **a** Ascomata showing peridial surface (bar = 1 cm). **b** Ascoma in cross section showing glebal surface (bar = 1 cm). **c** Peridium cross section showing pseudoparenchyma (bar = 20µm). **d** Peridium in cross section. **e** Ascospores within asci showing alveoli (bar = 20 µm). **f** Ascospore with equinulate surface (bar = 20 µm).

**Table 1.** List of *Tuber* species and ITS and 28S sequences used in the phylogenetic analyses. The sequences of the new species are in bold.

| Voucher/ Isolate | Species                         | ITS             | 28S             | Country       |
|------------------|---------------------------------|-----------------|-----------------|---------------|
| GB32             | <i>Tuber borchii</i>            | FJ809799        | FJ809799        | Italy         |
| MUB_Fung-0974    | <i>Tuber buendiae</i>           | MT006095        | NG_073829       | Spain         |
| SOC_727          | <i>Tuber candidum</i>           | AY830856        | -               |               |
| <b>st3</b>       | <b><i>Tuber caryophilum</i></b> | <b>MZ092919</b> | <b>OK642388</b> | <b>Mexico</b> |
| <b>st3_N2</b>    | <b><i>Tuber caryophilum</i></b> | <b>OK642397</b> | <b>OK642398</b> | <b>Mexico</b> |
| MA2721           | <i>Tuber cf. ferrugineum</i>    | -               | FJ809809        |               |
| BJTC_FAN465      | <i>Tuber crassitunicatum</i>    | MH115295        | -               |               |
| MUB_Fung-0972    | <i>Tuber ferrugineum</i>        | MN962719        | -               | Spain         |
| ZB3363           | <i>Tuber ferrugineum</i>        | -               | MT270600        | Hungary       |
| BJTC_FAN103      | <i>Tuber huidongense</i>        | MH115294        | MH115301        | China         |
| SDBR-CMU-MTUF007 | <i>Tuber huidongense</i>        | KT758731        | KU207733        | Thailand      |
| T107             | <i>Tuber huidongense</i>        | -               | GU979099        | China         |
| T110             | <i>Tuber huidongense</i>        | FJ797882        | GU979093        | China         |
| BJTC_FAN550      | <i>Tuber liaotongense</i>       | MH115302        | -               | China         |
| OSC87602         | <i>Tuber liaotongense</i>       | -               | FJ809813        | China         |

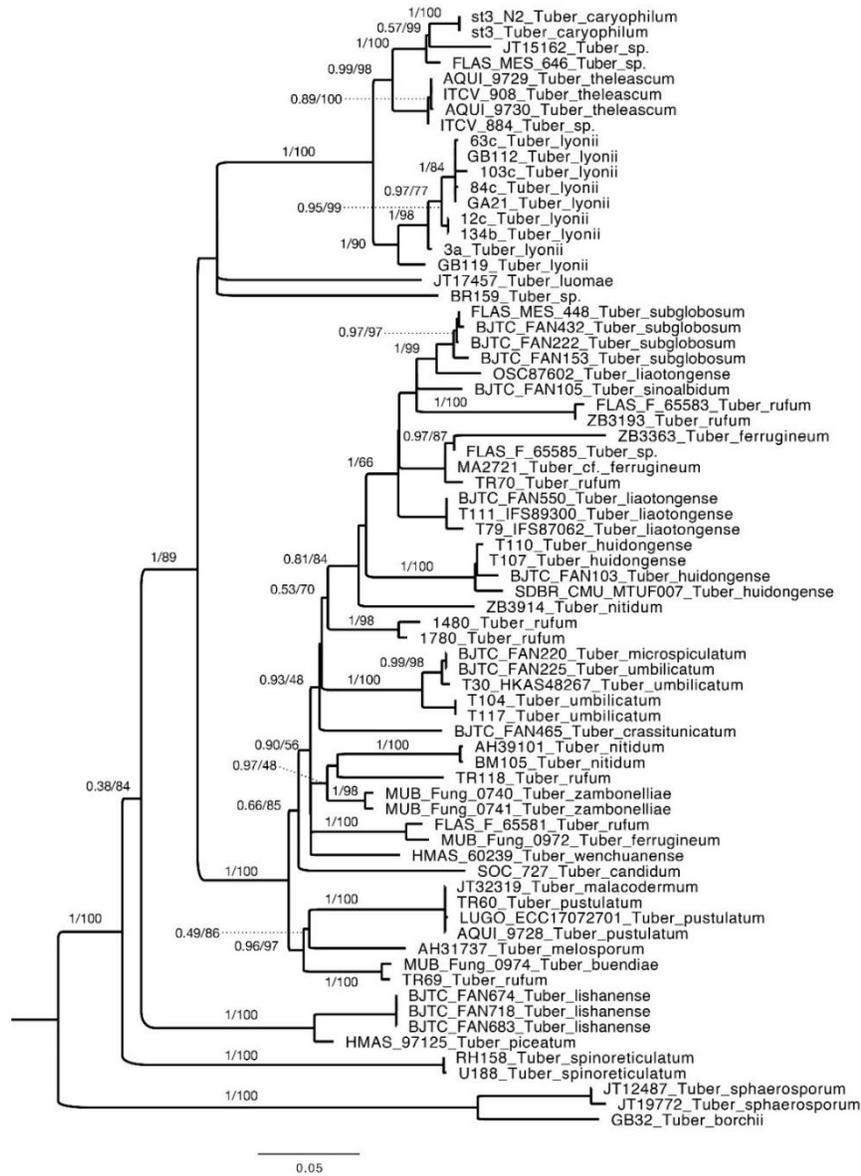
|                |                              |          |           |          |
|----------------|------------------------------|----------|-----------|----------|
| T111_IFS89300  | <i>Tuber liaotongense</i>    | GU979037 | -         |          |
| T79_IFS87062   | <i>Tuber liaotongense</i>    | GU979036 | -         |          |
| BJTC_FAN674    | <i>Tuber lishanense</i>      | MH115307 | -         | China    |
| BJTC_FAN683    | <i>Tuber lishanense</i>      | MH115305 | -         | China    |
| BJTC_FAN718    | <i>Tuber lishanense</i>      | NR_16061 | NG_064527 | China    |
|                |                              | 9        |           |          |
| JT17457        | <i>Tuber luomae</i>          | MH142474 | FJ809812  | USA      |
| 103c           | <i>Tuber lyonii</i>          | GQ379726 | GQ379726  | USA      |
| 12c            | <i>Tuber lyonii</i>          | GQ379723 | GQ379723  | USA      |
| 134b           | <i>Tuber lyonii</i>          | GQ379724 | GQ379724  | USA      |
| 3 <sup>a</sup> | <i>Tuber lyonii</i>          | GQ379725 | GQ379725  | USA      |
| 63c            | <i>Tuber lyonii</i>          | GQ379722 | GQ379722  | USA      |
| 84c            | <i>Tuber lyonii</i>          | GQ379721 | GQ379721  | USA      |
| GA21           | <i>Tuber lyonii</i>          | -        | JQ925698  | USA      |
| GB112          | <i>Tuber lyonii</i>          | EU394704 | EU394704  | USA      |
| GB119          | <i>Tuber lyonii</i>          | FJ748911 | FJ809808  | USA      |
| JT32319        | <i>Tuber malacodermum</i>    | FJ809889 | JQ925702  | Spain    |
| AH31737        | <i>Tuber melosporum</i>      | JN392144 | JN392202  | Spain    |
| BJTC_FAN220    | <i>Tuber microspiculatum</i> | MH115315 | MH115316  | China    |
| AH39101        | <i>Tuber nitidum</i>         | JX402092 | JN392331  |          |
| BM105          | <i>Tuber nitidum</i>         | FJ809885 | FJ809807  | Spain    |
| ZB3914         | <i>Tuber nitidum</i>         | -        | MT270604  | Hungary  |
| HMAS_97125     | <i>Tuber piceatum</i>        | NR_16062 | NG_064528 | China    |
|                |                              | 0        |           |          |
| AQUÍ_9728      | <i>Tuber pustulatum</i>      | -        | MK211311  | France   |
| LUGO_ECC1707   | <i>Tuber pustulatum</i>      | MW376716 | -         | Spain    |
| 2701           |                              |          |           |          |
| TR60           | <i>Tuber pustulatum</i>      | MW077451 | MW076943  |          |
| 1480           | <i>Tuber rufum</i>           | EF362476 | -         | Italy    |
| 1780           | <i>Tuber rufum</i>           | EF362474 | -         | France   |
| FLAS_F-65581   | <i>Tuber rufum</i>           | MT374048 | -         | France   |
| FLAS_F-65581   | <i>Tuber rufum</i>           | -        | MT350486  | France   |
| TR118          | <i>Tuber rufum</i>           | -        | MT270605  | Italy    |
| TR69           | <i>Tuber rufum</i>           | -        | MT270608  | Spain    |
| TR70           | <i>Tuber rufum</i>           | -        | MT270602  | Spain    |
| ZB3193         | <i>Tuber rufum</i>           | -        | MT270603  | Slovakia |
| BJTC_FAN105    | <i>Tuber sinoalbidum</i>     | MH115298 | MH115299  | China    |
| FLAS_MES-646   | <i>Tuber sp.</i>             | MT156470 | -         | USA      |
| FLAS-F-65585   | <i>Tuber sp.</i>             | -        | MT350482  | France   |
| JT15162        | <i>Tuber sp.</i>             | HM485391 | -         | USA      |

|                   |                               |               |           |        |
|-------------------|-------------------------------|---------------|-----------|--------|
| BR159             | <i>Tuber sp. BR-2020a</i>     | -             | MW579345  | USA    |
| JT12487           | <i>Tuber sphaerosporum</i>    | FJ809853      | FJ809853  | USA    |
| JT19772           | <i>Tuber sphaerosporum</i>    | FJ809854      | FJ809854  | USA    |
| RH158             | <i>Tuber spinoreticulatum</i> | GQ221454      | FJ809814  | USA    |
| U188              | <i>Tuber spinoreticulatum</i> | FJ809884      | NG_059919 | USA    |
| BJTC_FAN153       | <i>Tuber subglobosum</i>      | -             | MH115322  | China  |
| BJTC_FAN222       | <i>Tuber subglobosum</i>      | KF002728      | MH115324  | China  |
| BJTC_FAN432       | <i>Tuber subglobosum</i>      | MH115323      | -         | China  |
| FLAS_MES-448      | <i>Tuber subglobosum</i>      | MT156449      | MT156449  | China  |
| AQUI_9729         | <i>Tuber theleascum</i>       | MK211283      | MK211312  | Mexico |
| AQUI_9730         | <i>Tuber theleascum</i>       | MK211284      | MK211313  | Mexico |
| ITCV_884          | <i>Tuber theleascum</i>       | HM485426      | -         | Mexico |
| ITCV_908          | <i>Tuber theleascum</i>       | NR_16459<br>2 | -         | Mexico |
| BJTC_FAN225       | <i>Tuber umbilicatum</i>      | MH115325      | MH115326  | China  |
| T104              | <i>Tuber umbilicatum</i>      | FJ797879      | -         |        |
| T117              | <i>Tuber umbilicatum</i>      | FJ797880      | -         |        |
| T30_HKAS4826<br>7 | <i>Tuber umbilicatum</i>      | GU979032      | GU979088  | China  |
| HMAS_60239        | <i>Tuber wenchuanense</i>     | JX267044      | MH115327  | Italy  |
| MUB_Fung-0740     | <i>Tuber zambonelliae</i>     | MW632952      | -         | Spain  |
| Mub_Fung-0741     | <i>Tuber zambonelliae</i>     | MW632953      | -         | Spain  |

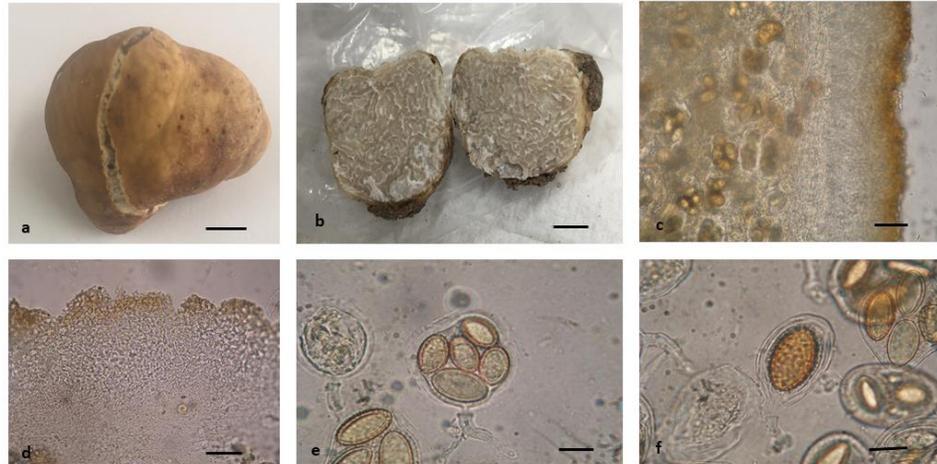
**Table 2.** *Tuber* species related to *Tuber caryophilum* or associated with *Carya illinoensis*.

| Species                  | Peridium Surface                          | Peridium color and thickness       | Epicutis / Subcutis and cell size    | Ascospore size without spines | Spore shape                        | Spores by asci | Geography and host   |
|--------------------------|---|------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|----------------|--|
| <i>Tuber caryophilum</i> | Smooth, separable without dermatosictidia | Yellow to reddish orange 110-220µm | Ps. 50-75 µm, 3-17 µm / Pr. 70-150µm | 18-48 × 10-27 µm              | Subglobose to broadly ellipsoid    | 1-5            | Comarca Lagunera, Mexico. <i>Carya illinoensis</i>   |
| <i>Tuber lyonii</i>      | Smooth and slightly pruinose              | Yellowish brown 300-500 µm         | Ps. 20-40 µm, 6-10 µm                | 30-37 × 22-24 µm              | Ellipsoid                          | 1-4            | Northeastern Mexico; Florida, USA. <i>Quercus</i> , <i>C. illinoensis</i>                                      |
| <i>Tuber theleascum</i>  | Smooth                                    | Yellow to reddish brown 160-250 µm | Ps. 45-150 µm, 4-7 µm / Pr. 150 µm   | 18-44 × 13-25 µm              | Claviform to subglobose            | 1-4            | Nuevo Leon, Mexico. <i>Quercus canbyi</i> , <i>Q. polymorpha</i> , <i>Q. laeta</i> , <i>Arbutus</i>            |
| <i>Tuber brennemanii</i> | Smooth                                    | Yellow to reddish brown 80-600 µm  | Ps. 50-200 µm, 2.5-25 µm             | 28-61 × 20-36 µm              | Isodiametric globose to subglobose | 1-4            | Nuevo Leon, Mexico; Massachusetts and Georgia, USA. <i>C. illinoensis</i> , <i>Quercus</i> , and other Fagales |
| <i>Tuber floridanum</i>  | Smooth                                    | Reddish brown 300-1120 µm          | Ps. 140-800 µm, 5-35 µm              | 36-51 × 26-38 µm              | Isodiametric globose to subglobose | 2-4            | Florida, Georgia, and Mississippi, USA. <i>C. illinoensis</i> and other Fagales                                |

Ps: Pseudoparenchymatous; Pr: Prosenchymatous.



**Figure 1.** Phylogenetic placement of *Tuber caryophilum* sp. nov. based on an ITS and LSU rDNA concatenated alignment. The consensus tree represents 2 phylogenetic analyses; a Bayesian approximation with 1000 generations and a Maximum likelihood analysis with 1000 bootstrap replicates. Just support values higher than 0.70 and/or 70% are displayed.



**Figure 2.** *Tuber caryophilum* (holotype ITCV 1888). **a** Ascoma showing peridial surface (bar = 1 cm). **b** Ascoma in cross section showing glebal surface (bar = 1 cm). **c** Peridium cross section showing pseudoparenchyma (bar = 20 $\mu$ m). **d** Peridium in cross section. **e** Ascospores within asci showing alveoli (bar = 20  $\mu$ m). **f** Ascospore with equinulate surface (bar = 20  $\mu$ m).