



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

# **T E S I S**

**“Estudio del Micelio Externo de hongos ectomicorrízicos (ECM) asociados a *Pinus montezumae* en suelos de distintas edades en microcosmos experimentales”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**LILIANA ALICIA GUERRERO PALOMARES**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. DEL PILAR ORTEGA LARROCEA  
ASESORA INTERNA: DRA. ROSALVA GARCÍA SÁNCHEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis se realizó bajo el financiamiento de los proyectos PAPIIT-IN119609 e IT-101812, Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA). Agradezco el apoyo del fondo de becas del Instituto de Geología de la UNAM, quienes me financiaron los periodos de abril a septiembre del 2011 y de abril a septiembre del 2012. Los experimentos y procedimientos técnicos se realizaron en el Laboratorio Microcosmos Bioedáfico, Laboratorio de Microscopía e Invernadero del Departamento de Edafología del Instituto de Geología.

Deseo agradecer a todas las personas que formaron parte de este trabajo:

A la Dra. Rosalva García Sánchez porque gracias a ella pude adentrarme en el maravilloso mundo de las micorrizas.

A la Dra. María del Pilar Ortega Larrocea por dejarme ser parte del equipo de trabajo del Laboratorio Microcosmos Bioedáfico del Departamento de Edafología del Instituto de Geología, UNAM.

A la Dra. Frédérique Reverchon por enseñarme los aspectos básicos de las ectomicorrizas desde mi servicio social hasta este trabajo de investigación.

A la M. en C. Mónica Rangel y a la M. en C. Iris Suárez Quijada por su gestión técnica durante el transcurso de mi tesis.

A los miembros del jurado, en especial al Dr. Castillejos-Cruz por su minuciosa revisión del manuscrito.

A mis compañeros de laboratorio: Jesús, Sandra, Karina, Frédérique, Iris, Mónica, Néstor y Mauricio, por siempre enseñarme algo nuevo y hacer más a menos los días de trabajo.

A mis amigos de la FES Zaragoza, Mireya, Berenice, Chuy, Chayo, por ser parte de mi vida universitaria y proporcionarme buenos recuerdos de ella. En especial a Guillermo, quien siempre me mantiene en la realidad y a Diana quien siempre está al pendiente de mí.

Pero aun estoy más agradecida con mis padres Rafael Guerrero y Gloria Palomares que con su guía nunca dejaron que me rindiera y llevar así a término este trabajo.

A mis hermanas Gloria, Fabiola y Mónica por apoyarme, cada una a su modo, en esta carrera.

A mis sobrinos Mauricio y Daniela por recordarme lo divertido de aprender y hacer lo que te apasiona.

<b>Contenido</b>	<b>PÁG.</b>
<b>I. Resumen</b>	<b>6</b>
<b>II. Introducción</b>	<b>7</b>
<b>III. Marco teórico</b>	
<b>3.1. Generalidades</b>	<b>8</b>
<b>3.2. Propiedades del suelo que influyen en las ECM</b>	<b>11</b>
<b>3.3. Micelio externo (ME) de ECM</b>	<b>12</b>
<b>3.4. Importancia de los microcosmos en el estudio del ME</b>	<b>18</b>
<b>IV. Antecedentes</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Micorrizas en <i>Pinus montezumae</i> Lamb.</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Justificación</b>	<b>23</b>
<b>V. Hipótesis y objetivos</b>	<b>24</b>
<b>VI. Materiales y Métodos</b>	
<b>6.1. Obtención de muestras para los microcosmos</b>	<b>25</b>
<b>6.2. Escalamiento de los microcosmos</b>	<b>26</b>
<b>6.3. Mantenimiento de los microcosmos</b>	<b>28</b>
<b>6.4. Caracterización del micelio externo</b>	<b>29</b>
<b>VII. Resultados</b>	
<b>7. 1. Tipo de exploración en función del suelo</b>	<b>30</b>
<b>7.1.1. Desarrollo y tipo de exploración micorrízico en el Leptosol-mólico (Chichinautzin)</b>	<b>30</b>

7.1.2. Desarrollo y tipo de exploración micorrízico en el Andosol Lepti-vítrico (Cuespalapa)	35
7.1.3. Desarrollo y tipo de exploración en el Andosol-éutrico (Pelado)	39
7.2. Área de expansión del micelio en los microcosmos	43
<b>VIII. Discusión</b>	
8.1. Tipo de exploración en función de suelo	47
8.2. Crecimiento radical y de ME en función del tipo de suelo	50
<b>IX. Conclusiones</b>	<b>53</b>
<b>X. Referencias</b>	<b>54</b>

## I. RESUMEN

Se estudió el crecimiento del micelio externo (ME) de hongos ectomicorrízicos (HECM) en microcosmos experimentales en tres suelos de una cronosecuencia volcánica de la Sierra del Chichinautzin, en los que previamente se caracterizaron sus propiedades edáficas pertenecientes a un Leptosol mólico de 1835 años, un Andosol leptivítrico de aproximadamente 2835 años y un Andosol eutríco de aproximadamente 9620 años. Se reconocieron las comunidades de hongos ectomicorrízicos *in situ*. Plántulas de *Pinus montezumae* Lamb. se micorrizaron con propágulos nativos de estos suelos y el desarrollo del ME se documentó en unidades experimentales que fueron escaladas durante varios meses hasta obtener una micorrización evidente. Se encontró que el crecimiento radical y del ME fue diferente en los tres tipos de suelo lo que pudo ser resultado del tipo de propágulos y especies que colonizaron las raíces adaptados a las propiedades intrínsecas de los suelos.

## II. INTRODUCCIÓN

Actualmente se reconoce al micelio externo (ME) de los simbioses ectomicorrízicos como una de las estructuras más importantes relacionadas con la dinámica de nutrientes en los ecosistemas. Bajo sistemas experimentales denominados microcosmos, ha sido posible entender su papel en la transferencia de nutrientes en la interfase suelo-hongo-planta. En los microcosmos como modelos de estudio, se ha descubierto que el crecimiento micelial en algunas especies de hongos ectomicorrízicos puede verse estimulado por la disponibilidad heterogénea de minerales en el suelo. El crecimiento del ME también puede variar a lo largo del tiempo en función de la relación establecida con las plántulas. Sin embargo, dadas las limitaciones de estos sistemas relacionadas con el volumen de suelo que puede mantener el crecimiento vegetal durante meses e incluso años, el estudio de los patrones de exploración a largo plazo no ha sido documentado en los mismos. La expresión de la comunidad de hongos puede estar influenciada por las propiedades de los suelos y por la edad de las plántulas. Uno de los objetivos de este trabajo fue montar un sistema de escalamiento de la simbiosis ectomicorrízica en los microcosmos a un periodo mayor de doce meses que se describe en la literatura. Esto permitirá demostrar que son sistemas que se pueden mantener en un periodo de estudio mayor en los que se puedan analizar patrones de sucesión de hongos o ciclos de crecimiento de ME en la colonización de la matriz edáfica.



### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Generalidades

En México existe una gran diversidad vegetal, entre la que destaca la vegetación de los bosques de coníferas, bosques de pino-encino, bosques mesófilos de montaña, selvas caducifolias, así como manglares y vegetación alpina. México es uno de los centros de diversidad de especies de pinos con más de 45 taxa, siendo el segundo lugar en número de especies con el 42% de las especies existentes, equivalente a 99 especies (Perry *et al.*, 1998).

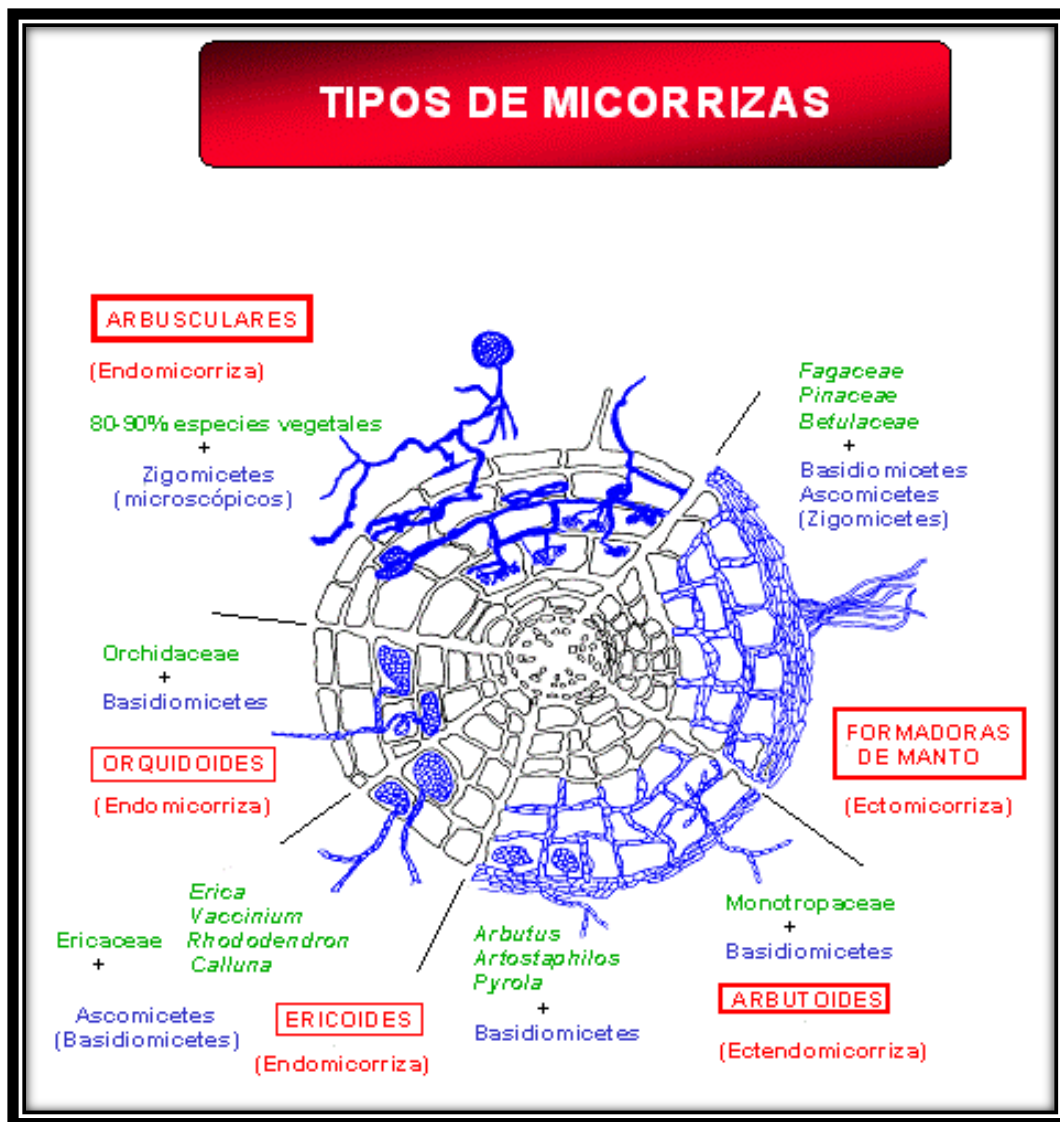
Actualmente se reconoce que cada tipo de de vegetación tiene una diversidad asociada de especies de hongos saprobios, parásitos, patógenos y micorrízicos (García, 1999; Guzmán, 1998). En el caso de los hongos micorrízicos, se asocian con las raíces de diferentes especies de plantas formando uno o varios tipos de micorrizas (Guzmán y Guzmán, 1979). Las micorrizas son asociaciones mutualistas altamente evolucionadas que se presentan entre las raíces de casi todas las plantas y algunos hongos del suelo (Smith *et al.*, 1997; Smith y Read, 2008). En esta simbiosis, la planta hospedera recibe nutrientes minerales por parte del hongo y éste obtiene compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis (Read y Pérez-Moreno, 2003). La formación de micorrizas es importante para el funcionamiento de los ecosistemas ya que modifica los recursos básicos de algunos organismos y los convierte en recursos fácilmente adquiribles para otros. Esto favorece el establecimiento de diferentes especies de plantas e influye en la estructura de las comunidades vegetales. (Brundrett, 2009).

Otros de los beneficios que el hongo brinda a las plantas al establecer esta simbiosis, además del aumento en la traslocación de nutrientes como N, P, y K y la protección

de las raíces de parásitos, patógenos y nemátodos (Duchesne *et al.*, 1989; Grandmaison *et al.*, 1993; Little y Maun, 1996) es el papel de los hongos en:

- La disminución de la competencia entre las plantas (Cordier *et al.*, 1998; Morin *et al.*, 1999).
- El mantenimiento de los ciclos de los nutrientes mediante la mineralización parcial de la materia orgánica (Lindahl *et al.*, 1999).
- La estabilidad de los suelos a través del favorecimiento de la agregación de partículas minerales mediante la formación de hifas (Wright y Upadhyaya, 1998).

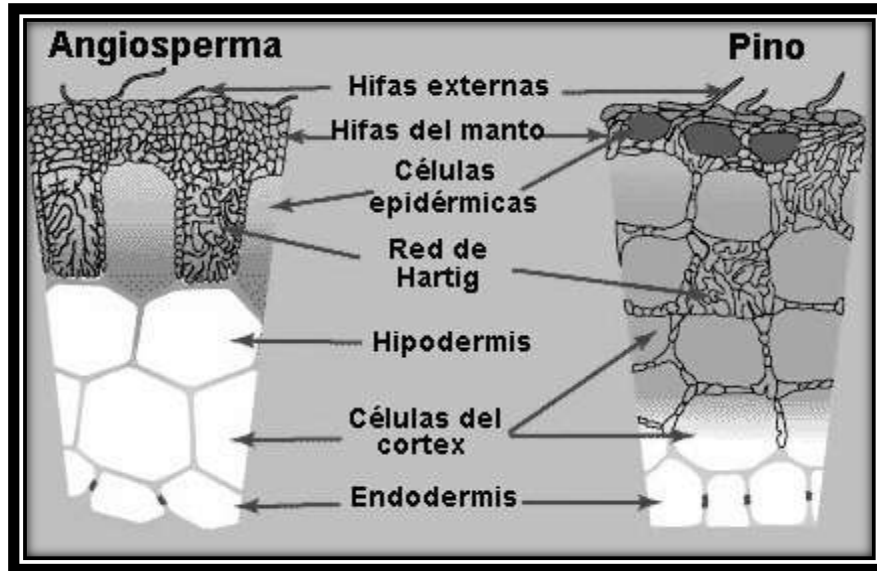
En las gimnospermas la micorriza está constituida por numerosos hongos que forman la simbiosis ectomicorrízica (ECM). Esta también es una constante en especies de las familias Fagaceae, Betulaceae, Rosaceae, Mimosaceae y Salicaceae, localizadas en zonas con climas fríos y templados (Read, 1991). En tal interacción, pueden participar una o más especies de hongos simultáneamente, asociándose a una sola planta o especie (Andrade, 2009). Aunque la ECM no es la micorriza más extendida geográficamente dada la distribución de las gimnospermas en el mundo, la mayoría de estas especies arbóreas no podrían sobrevivir sin la asociación con los hongos, además de que los hongos también contribuyen en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas a través de los ciclos biogeoquímicos. Los hongos ECM que forman parte de los siete tipos de micorrizas morfológicamente reconocidos y son los más importantes desde el punto de vista forestal (fig. 1).



**Figura 1.** Clasificación de las micorrizas. Imagen tomada de: <http://dungun.ufro.cl/~carriga/biorrem.htm>, última actualización 30 de enero del 2013.

La ECM se distingue por dos características principales: un manto de hifas entrelazadas alrededor de la superficie de las raíces y por la red de Hartig, que envuelve a las células corticales parcial o totalmente e incrementa el área superficial de interfase hongo-raíz (fig. 2). También la mayoría de los ECM, producen rizomorfos que son órganos multihifales importantes en el transporte de solutos en grandes distancias (Carney *et al.* 1991), mientras que todo el proceso de intercambio entre hongo-planta se lleva a cabo en la red de Hartig. Algunas especies proliferan en suelos de los bosques, otras sólo

viven en suelo mineral y algunos otros en sustrato en descomposición (Wiensczyk *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Diagrama de los elementos que conforman a la ectomicorriza. Imagen tomada de: <http://www.biologia.edu.ar/fungi/micorrizas.htm>, última actualización 4 de abril del 2013.

Las ECM presentan diferente grado de especificidad, pudiendo formar asociaciones con una o varias plantas, éstas a su vez pueden formar asociación con diferentes tipos de hongos micorrízicos (ectomicorriza y micorriza arbuscular) (Garza, 2002).

### **3.2. Propiedades del suelo que influyen en las ECM**

La distribución de las especies de HECM son influenciadas por las propiedades edáficas tales como la retención de agua, profundidad, contenido de nutrientes, propiedades físicas y/o químicas que a lo largo de la evolución del suelo generan un gradiente de fertilidad o calidad que influye en el crecimiento y productividad de los bosques (Crews *et al.*, 1995; Siebe *et al.*, 1996, Reverchon *et al.*, 2010a).

En suelos volcánicos, los contenidos de nutrimentos varían según el grado de desarrollo que presenten, así que aquellos con menor desarrollo presentan mayores concentraciones de P, mientras que en suelos más desarrollados el N y C estarán en una mayor concentración (Peña-Ramírez *et al.*, 2009) (Cuadro 1). Esto afecta al crecimiento de los árboles y a la producción de esporocarpos, así como a la abundancia y biomasa de especies de ECM (Rosling *et al.*, 2003; Baier *et al.*, 2006; Reverchon *et al.*, 2010b). Nara (2003) observó que estos cambios en las propiedades del suelo crean una sucesión en las comunidades ectomicorrízicas.

**Cuadro 1.** Evolución de la calidad del sitio a lo largo de una cronosecuencia en la Sierra del Chichinautzin, México ( modificado de Peña-Ramírez, 2009).

Sitio (volcán)	Profundidad fisiológica (cm)	Reserva de N (kgm <sup>-2</sup> )	P disponible (gm <sup>-2</sup> )	Bases intercambiables (molm <sup>-2</sup> )	Almacenamiento de agua a CC (Lm <sup>-2</sup> )	Disponibilidad de agua (Lm <sup>-2</sup> )
Chichinautzin	6.0	0.45	1.3	3.2	41.6	28.2
Cuespalapa	35.5	0.74	1.1	16.4	158.0	111.7
Pelado	179.0	2.67	0.6	93.8	1252.8	704.0

CC=capacidad de campo.

### 3.3. Micelio Externo (ME) de ECM

Uno de los componentes más importantes y de los más difíciles de observar de las ECM es el micelio externo (ME). Su importancia deriva de la habilidad que tiene para facilitar la transferencia de iones de fósforo y nitrógeno a través de las raíces del hospedero (Pérez-Moreno y Read, 2000) así como orgánicos (Landeweert *et al.*, 2003) y agua (Genney *et al.*, 2006). Además, permite el contacto con hospederos jóvenes para

iniciar la asociación y funciona como propágulo fúngico (Pérez-Moreno y Read, 2004). Esta es quizá una de las más sorprendentes habilidades que presenta el micelio ECM, la de conectar a los árboles (ya sea de la misma o diferente especie) aun a kilómetros de distancia debido a que las hifas pueden llegar a expandirse considerablemente. Desde 1894, Frank, creador de la palabra “micorriza” propuso la teoría del “nitrogeno orgánico”, donde presentó la importancia del ME en la transferencia a la plantas de este elemento Pero fue hasta mucho después que se le dió importancia a este hecho, cuando se demostró la producción de enzimas degradantes de substratos orgánicos y la movilización del elemento a través de sus redes miceliales (Pérez-Moreno y Read, 2004). Esta interconexión, ayuda a otros árboles: en 1980, Duddrige *et al.* demostraron que el ME servía de transporte de agua, fósforo, carbono y nitrógeno, los cuales eran captados por otros árboles “receptores”.

Diversos trabajos (Woods y Brock, 1964; Woods, 1970) han demostrado mediante isótopos de carbono, la transferencia que existe de un árbol “donante” a un alto número de “receptores”. Sin embargo, aunque la absorción de nutrimentos ya ha sido cuantificada en varios estudios, la respuesta de ME a la disposición de los recursos y su patrón de crecimiento ha sido meramente cualitativo (Donelly, 2004). Esto se debe a lo difícil que resulta su observación en la matriz del suelo por lo que una solución para su estudio bajo condiciones experimentales es la construcción de cámaras transparentes donde la planta micorrizada puede ser observada bajo un cristal. A este dispositivo se le conoce como microcosmo (Pérez-Moreno y Read, 2004) (fig. 3).



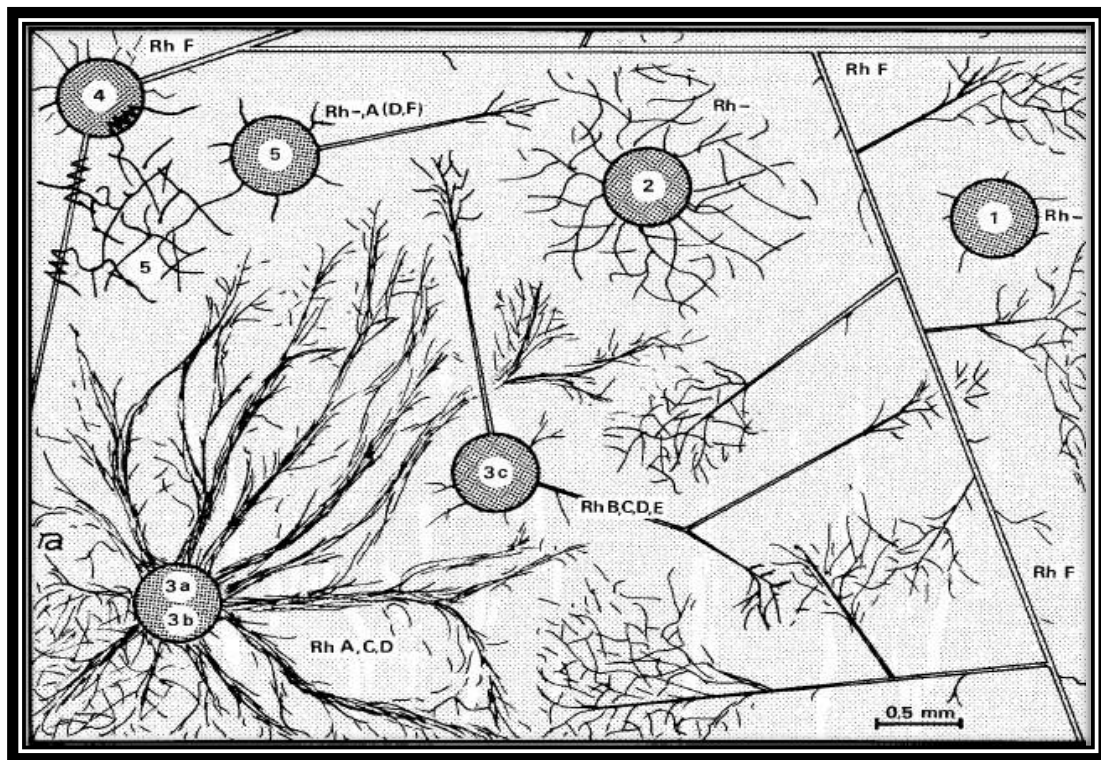
**Figura 3.** Microcosmo en simbiosis micorrízica. con *Pinus montezumae*. Foto: L. Guerrero, 2009.

Bajo estas cámaras experimentales para el estudio del ME, Pérez-Moreno y Read (2000), analizaron la habilidad del hongo *Paxillus involutus* para movilizar N y P de tres diferentes sustratos a través de su micelio externo. Pérez-Moreno (2004) en su artículo “Los hongos ectomicorrízicos. Lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza”, hace una compilación sobre algunos trabajos realizados, donde destaca la importancia del estudio del ME a través de los microcosmos.

Las características (forma y tipo de crecimiento) del ME están relacionadas no sólo con propiedades intrínsecas a la especie sino también se puede deber a las fuentes de obtención de energía en el suelo y sus propiedades. Para esto, es fundamental conocer en primera instancia, las propiedades básicas que conforman al ME de los hongos ECM. Agerer (2001) propuso una clasificación del ME de las ECM en “tipos exploratorios” basada en la cantidad y grado de diferenciación del micelio extramatricial, clasificación que constituye una herramienta importante para la caracterización de los patrones de crecimiento que presentan en el suelo las comunidades fúngicas ectomicorrízicas. Según esta clasificación, el ME se puede dividir básicamente en:

- a) micelio de tipo exploratorio de contacto, con un manto liso y pocas hifas;
- b) tipo exploratorio de corta distancia, con muchas hifas emergentes pero sin rizomorfos;
- c) tipo exploratorio de media y larga distancia, cuya característica típica es la existencia de rizomorfos, masas densas de hifas con estructuras diferenciadas (fig. 4).

Los dos últimos tipos exploratorios están basados en el grado de diferenciación de sus rizomorfos (conjunto de hifas agrupadas en una estructura cilíndrica responsable del transporte de agua) que varían desde indiferenciados hasta altamente diferenciadas.



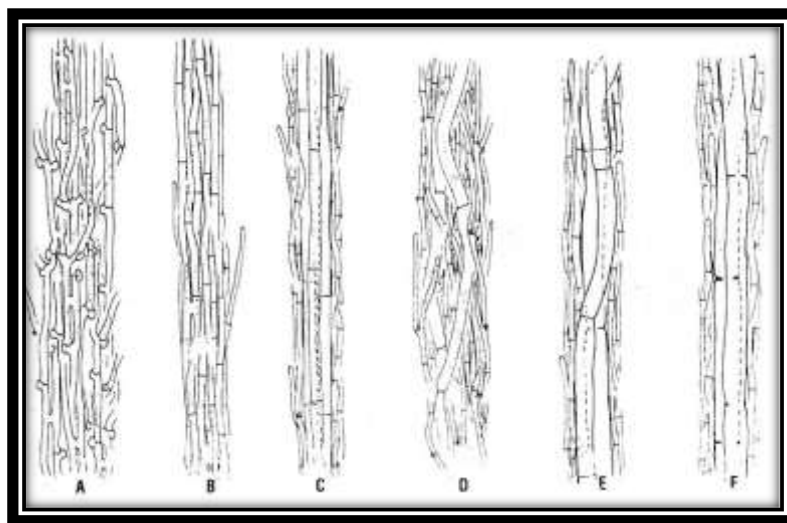
**Figura 4.** Esquema de los diferentes tipos de exploración de ME en un corte transversal de la ectomicorriza. 1) Exploración de contacto, 2) exploración de corta distancia, 3)a, b, exploración de media distancia en franja y parche, respectivamente; 3)c exploración de media distancia lisa, 4) exploración de larga distancia, 5) exploración pick a back. Rh = rizomorfos, Rh- = sin rizomorfos, A-F tipos de organización de los rizomorfos según Agerer (1987-1998) (imagen tomada de Agerer, 2001).



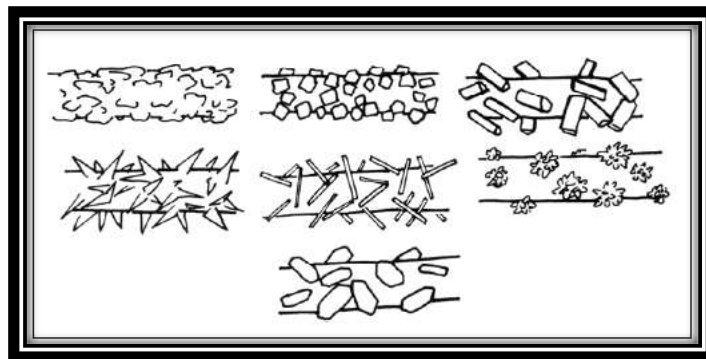
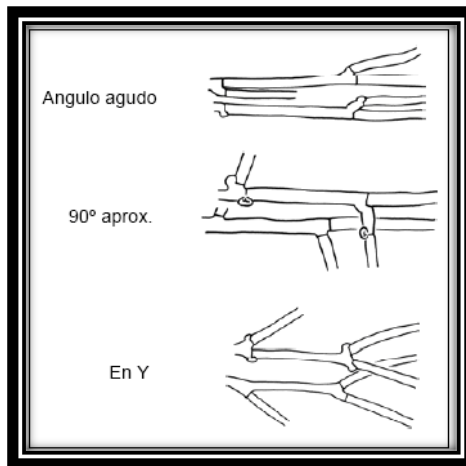
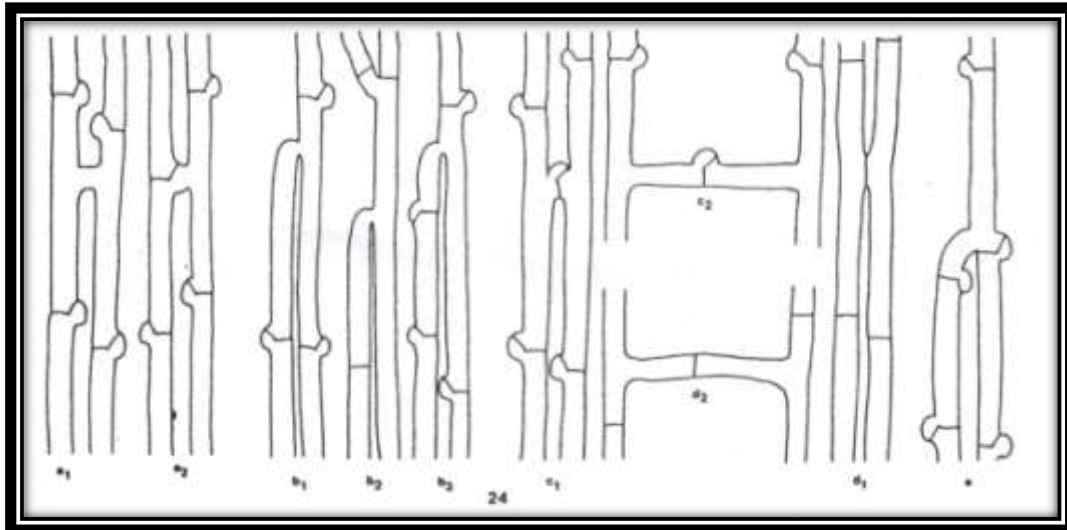
Siendo los rizomorfos una estructura importante en las ectomicorrizas, encargadas del transporte a larga distancia de nutrimentos, Agerer también propuso una clasificación para ellos, determinando su conexión con el manto y su forma (fig. 5) así como las características de las hifas que los conforman (figs. 6 y 7).



**Figura 5.** Superior. Conexión de los rizomorfos con el manto de los ápices ECM. Inferior: morfología de los rizomorfos (imágenes tomadas de Martin, 2011).



**Figura 6.** Tipos de organización estructural de rizomorfos. Tipo A, hifas isodiaméticas sueltas. Tipo B, hifas isodiaméticas apretadas. Tipo C, tejidos diferenciados con hifas engrosadas en el centro. Tipo D, tejidos más diferenciados con algunas hifas engrosadas distribuidas al azar. Tipo E, tejidos bastante diferenciados con hifas engrosadas formando un núcleo central y septos completos. Tipo F, tejidos altamente diferenciados con núcleo central y septos frecuentemente disueltos. Tomado de Martin, 2011.



**Figura 7.** Anastomosis (imagen superior) clasificada en varios tipos que se diferencian por las letras en: a, fíbulas orientadas en una sola dirección; b, fíbulas en direcciones opuestas, intercaladas o sin fíbulas; c, fíbulas en una sola dirección y en la fusión de micelio, d, hifas fusionadas sin fíbulas, e, fíbulas en bifurcaciones basales y subíndices, tipos de ramificación (imagen intermedia) y tipo de cristales (imagen inferior) en grumos, sales, cilindros, proyecciones agudas, bastones, cúmulos y romboides de las hifas del micelio externo de las ectomicorrizas. Tomado de Martín, 2011.

Todas estas clasificaciones facilitan el reconocimiento taxonómico de algunos géneros o grupos de ECM que forman la asociación. Sin embargo, es una clasificación artificial y no es propia de las especies en particular, por lo que no son caracteres taxonómicos *sensu stricto*. Dado que ha sido escaso el trabajo que se ha realizado sobre el tipo de exploración de ECM y los esporocarpos o morfotipos de ECM, se tiene poca información que permita realizar inferencias taxonómicas en especies mexicanas. Una de las posibles aplicaciones, es relacionar cualitativamente el tipo de exploración, con las características del sustrato, siendo posible que algunas comunidades de hongos ECM desarrollen formas de crecimiento específicas. Éstas los ayudarían a explorar más fácilmente algunos tipos de materia orgánica del suelo o permitirían su especialización en el transporte a larga distancia de iones interconectando a varios árboles en el bosque.

### **3.4. Importancia de los microcosmos en el estudio del ME**

La naturaleza indeterminada de las hifas filamentosas en el suelo, hace muy difícil su observación y muestreo en campo así como su identificación taxonómica en ausencia de los cuerpos fructíferos (Bridge y Spooner, 2001; Cairney, 2005). La gran parte de lo que se conoce sobre la fisiología de las ECM ha surgido a partir de estudios en microcosmos demostrando su papel en la absorción y traslocación de agua, P y N del suelo a los hospederos (Duddridge *et al.*, 1980, Finlay y Read, 1986a, b; Finlay *et al.*, 1989; Ek *et al.*, 1994; Andersson *et al.*, 1996; Timonen *et al.*, 1996; Ek, 1997). También han facilitado el estudio del importante papel del micelio en la traslocación de C de los hospederos al suelo (Leake *et al.*, 2001; Mahmood *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2002; Heinonsalo *et al.*, 2004; Rosling *et al.*, 2004). Con este modelo, además se han descrito

muchos de los patrones de crecimiento y diferenciación a través del gradientes de pH en el suelo así como ha servido para cuantificar la densidad de micelio y su biomasa (Erland *et al.*, 1990; Read, 1992; Ek, 1997; Schubert *et al.*, 2003; Agerer y Raidl, 2004; Donnelly *et al.*, 2004; Hagerberg *et al.*, 2005; Mahmood *et al.*, 2001). A partir de estos modelos, se descubrió la habilidad del ME denominado “forrajero”, colonizando densamente parches de necromasa o materia orgánica, movilizandoo nutrientes y participando activamente en los ciclos biogeoquímicos, creando áreas de mayor acumulación de carbono (Finlay y Read, 1986a, b; Carleton y Read, 1991; Bending y Read, 1995; Pérez-Moreno y Read, 2000; Leake *et al.*, 2001; Lilleskov y Bruns, 2003; Donnelly *et al.*, 2004; Wallander y Pallon, 2005). La utilización de C<sub>14</sub> en experimentos en microcosmos, ha permitido observar la traslocación de los minerales a otras plantas, por medio de la interconexión hifal con el hospedero “donante” (Hagerberg *et al.*, 2003). Algunos otros aspectos de la fisiología que se han podido observar mediante la utilización de microcosmos, han sido el envejecimiento del micelio y su tasa de recambio, las interacciones con minerales de suelo y la respuesta del micelio a elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub> atmosférico, expresión génica y habilidad enzimática (Downes *et al.*, 1992; Rouhier y Read, 1998; Wallander y Pallon, 2005; Fransson *et al.*, 2005; Timonen y Sen, 1998; Wright *et al.*, 2005). También la competencia entre diferentes especies de ECM y la inhibición de una especie respecto a la otra, han sido descritos al utilizar estos modelos (Wu *et al.*, 1999).

La formación de masas de hifas permite el aprovechamiento de microhábitats del suelo, así como un mayor contacto con el sustrato, sin embargo, los microcosmos permiten ver que estas zonas con alta densidad de hifas finas reduce la colonización de nuevo micelio (Finlay y Read, 1986a y b). La influencia de la fauna del suelo sobre el crecimiento del hospedero en ausencia o presencia de micorrizas, también ha sido cuantificada mediante

el uso de estos modelos, concluyendo que esta influencia es positiva en presencia de la asociación micorrízica (Setälä, 2000).

#### **IV. ANTECEDENTES**

En el mundo, los bosques boreales cubren aproximadamente el 70% de la superficie del Hemisferio Norte (Read *et al.*, 2004) y en su mayor parte están dominados por pináceas de los géneros *Abies*, *Larix*, *Pinus* y *Picea*. En México, los bosques representan el segundo lugar de los recursos renovables después de los ecosistemas marinos; el 73% del territorio nacional está cubierto de bosques de climas templados, especies tropicales y de zonas áridas (Jiménez y Kramer 1991, 1992). Los bosques muchas veces están limitados por la poca disposición de nitrógeno y son las ectomicorrizas, que al adaptarse a esta condición, ayudan a los árboles a mejorar la captación de agua y el transporte del nitrógeno hacia las raíces (Nilsson y Wallander, 2003). Algunos estudios han demostrado que la asociación micorrízica de los pinos ha facilitado la evolución de los mismos (Axelrot, 1986). Muchas de las especies arbóreas que forman asociación con los ECM son micotróficas obligadas, es decir, que su supervivencia depende de la asociación, tal como es el caso de los pinos. La ectomicorriza que se forma en muchas de las especies pertenecientes a las familias Dipterocarpaceae, Fagaceae, Myrtaceae y se diferencia de la morfología de la ectomicorriza que se desarrolla en pinos (fig. 2), ya que se presenta una forma dicotómica en las raíces laterales (Read, 1998).

Como se mencionó anteriormente, México es uno de los centros de diversidad de especies de pinos, reconocido como el segundo lugar con el 42% de las especies existentes (Perry *et al.*, 1998). El pino blanco, *P. montezumae* Lamb., denominado comúnmente ocote o chalmaite blanco, crece en pendientes y en valles de las cordilleras

mexicanas, desde el estado de Colima en la costa del Pacífico, hasta el estado de Veracruz en el Golfo de México (Aldrete, 2002). Su distribución abarca la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre del Sur y la Sierra Madre de Chiapas, llegando hasta Guatemala. Esta especie de pino suele desarrollarse en suelos de origen volcánico ricos en nitrógeno, calcio y potasio y cuando llega a establecerse en suelos de climas secos o áridos, su crecimiento es lento y puede tornarse débil (Fuente: <http://www.conafor.gob.mx>, última actualización 4 de abril del 2013). En la Sierra del Chichinautzin que se ubica en el estado de Morelos y hacia el sur de la Ciudad de México, existen bosques dominados por *Pinus montezumae* en varios conos volcánicos con diferentes condiciones edáficas (Peña-Ramírez, 2009).

#### **4.1. Micorrizas en *Pinus montezumae* Lamb.**

Son varios los trabajos realizados en ECM para esta especie. Reverchon (2010) en su tesis de doctorado, realizó estudios relacionados a la caracterización de las comunidades de hongos ectomicorrízicos asociada a *P. montezumae* en suelos de tres volcanes de diferente edad en la Sierra del Chichinautzin. Encontró que la proporción de especies de esporocarpos dependió del sitio, siendo así el sitio más joven o el menos fértil (Cuadro 2) el que presentó una mayor diversidad (Reverchon *et al.*, 2010a). La relación entre la diversidad de ECM y los factores edáficos se vió influenciada por la edad de los suelos y sólo algunas especies de los géneros *Laccaria* e *Inocybe* fueron comunes en los tres sitios. La riqueza de especies presentó una elevada variabilidad intragenérica como respuesta a las variables del suelo, mostrando que la distribución de los esporomas presenta un alto grado de especialización de las comunidades ECM a lo largo del gradiente de calidad de suelo (Reverchon *et al.*, 2011).

Reverchon (2010), también realizó experimentos con bioensayos para caracterizar a los hongos ECM que pudieran colonizar en invernadero a plántulas de *P. montezumae*. Este trabajo tuvo como objetivo el comparar si las especies asociadas a pinos adultos eran las mismas que las especies asociadas a las plántulas. Al comparar las comunidades de hongos ECM asociadas a ambas fases de desarrollo, se mostró que sólo unas cuantas especies de ECM dominantes estuvieron asociadas a plántulas, mientras que para el caso de pinos adultos, hubo mayor diversidad de especies dominantes. Los índices de similitud indicaron que la micorrización de las plántulas provino de las redes miceliares en el sitio antiguo, mientras que en el sitio joven se pudo haber iniciado mediante estructuras de resistencia (carpóforos).

En el 2012, Reverchon junto con otros colaboradores, realizó un estudio similar en un bosque neotropical, donde se compararon las comunidades ECM asociadas a *Pinus montezumae* en árboles jóvenes y adultos, determinando tanto la estructura como la composición de estas comunidades. Obtuvieron un total de 42 especies de ECM, además de que la diversidad y los índices de similitud mostraron que la estructura de las comunidades fue similar para plantas jóvenes y adultos. Esto no estuvo relacionado con la diversidad filogenética o grupos de hongos emparentados ni tampoco para la riqueza de especies, siendo mayor para las plántulas.

En otro estudio sobre la relación de comunidades ECM y el desarrollo del suelo, Ramírez (2011) realizó una caracterización de morfotipos ECM asociados a brinzales de *Pinus montezumae* en la parte central de la Faja Volcanica Transmexicana en tres sitios donde el suelo presentó propiedades físicas y químicas diferentes dependiendo de su edad y grado de desarrollo. Se calculó la diversidad con el índice de Shannon-Wiener y los valores de similitud entre sitios con el índice de Sorensen. Con esto se obtuvo que la

diversidad de morfotipos ECM estuvo influenciada por las características edáficas de los sitios siendo mayor la riqueza y abundancia en el sitio más joven.

## 4.2. Justificación

En México, la mayor parte de los bosques de pino se distribuyen en suelos volcánicos. En el eje neovolcánico, se ha documentado en una cronosecuencia edáfica, que la estructura de comunidades ECM puede variar en función de la calidad de sitio (Reverchon *et al.*, 2010). Sin embargo, son casi nulos los estudios sobre el ME en gimnospermas mexicanas, comparado con los otros componentes de las ectomicorrizas como lo son los carpóforos. Uno de los motivos es que el estudio del ME se dificulta por su carácter microscópico y que crece inmerso en la matriz de suelo lo que complica llevar a cabo mediciones sobre su extensión, morfología, para hacer inferencias ecológicas. Los patrones de crecimiento en los que predominan los agregados miceliales lineares (rizomorfos) sobre la proliferación del micelio tipo forrajero al desarrollarse en la matriz edáfica, pueden relacionarse con el papel ecológico de las especies involucradas, siendo unas mayoritariamente interconectivas en los recursos a distancia y otras que participan más en el reciclaje de nutrientes. El estudio sobre los patrones de exploración de ME en distintos suelos volcánicos permitiría documentar si está en función de las propiedades de los suelos. Estos estudios también generarían información sobre el potencial de utilizar distintos hongos ectomicorrizicos asociados a plántulas de *Pinus montezumae*, que es una de las especies de mayor distribución en México, en prácticas de reforestación de bosques. Actualmente, el grado de perturbación de estos bosques ha acelerado su deterioro y es muy importante llevar a cabo prácticas de restauración con hongos mexicanos adaptados a las condiciones particulares de cada



suelo. Además, las ECM no sólo ayudan al hospedero, ya que el extenso micelio que se produce debido a la micorrización, ayuda a la aireación del suelo y en la formación de agregados, evitando así su erosión y permitiendo retener los nutrientes en los mismos. Todos estos aspectos han sido tradicionalmente estudiados en modelos experimentales denominados microcosmos, los cuales tienen limitaciones relacionadas con el diseño, éxito en su establecimiento, duración prolongada y estadio no cespitoso de las plántulas hospedadas. Por tal motivo, la presente investigación tiene como uno de los objetivos principales poder montar un sistema de estudio a largo plazo en el que se puedan realizar estudios de dinámica de micelio para hacer inferencias ecológicas en donde se postula que el factor suelo puede influir en la manifestación de los patrones de crecimiento micelial. Una vez que se hayan establecido los protocolos para determinar la factibilidad del escalamiento y permanencia a largo plazo, en posteriores estudios se podrá tener el procedimiento para el montaje de unidades experimentales que permitan pasar de un estudio cualitativo a estudios cuantitativos.

## **V. Hipótesis**

Los patrones de crecimiento de ME de micorrizas asociadas a *Pinus montezumae* pueden verse influenciados por distintos tipos de suelo según sus propiedades edáficas.

## **Objetivo General**

- Realizar la documentación de los patrones de exploración de micelio externo en tres suelos con distinto grado de desarrollo.

## Objetivo particular

- Lograr el escalamiento volumétrico de microcosmos donde se ha establecido la simbiosis micorrízica con *P. montezumae*.

## VI. Materiales y Métodos

### 6.1. Obtención de las muestras para los microcosmos.

La especie de pino utilizada en este trabajo fue *Pinus montezumae* Lamb. Las plantas, así como el sustrato, fueron proporcionados del proyecto de tesis de doctorado de Reverchon (2010). En este proyecto, las plantas fueron germinadas y crecidas como se describe a continuación.

Se sembraron semillas del vivero San Luis Tlaxialtemalco, Xochimilco, D. F. encargado de proveer material para los programas de reforestación del área metropolitana. Estas semillas provinieron de la localidad de Quepil Ajusco, en el Distrito Federal, recolectadas a una altura de 2800 m. En el laboratorio, se desinfectaron con agua oxigenada al 30% durante 25 minutos. El suelo utilizado provino de tres conos volcánicos con un diferente grado de desarrollo pedogenético. El de mayor desarrollo fue el recolectado en el volcán Pelado; el de desarrollo intermedio del Cuespalapa y el más joven del volcán Chichinautzin. El suelo recolectado en agosto del 2006 en cada sitio se tamizó (2 mm) y se colocó en contenedores cónicos de polietileno de 25 cm de largo × 6.5 cm de diámetro, aireados en la parte baja para permitir el drenaje. En el cuadro 2 se proporcionan sus propiedades edáficas. En octubre del 2006 se sembraron las semillas de *P. montezumae* en los tres tipos de suelo para montar el experimento de bioensayos.

**Cuadro 2.** Lugar de recolecta y propiedades físicas y químicas de los suelos utilizados (tomado de Peña-Ramirez, 2009).

	<b>Chichinautzin</b>	<b>Cuespalapa</b>	<b>Pelado</b>
<b>Coordenadas (UTM)</b>	X: 482,041	X: 482,037	X: 475,922
	Y: 2,109,907	Y: 2,112,505	Y: 2,114,796
<b>Edad del suelo (años A.P.)</b>	1835 ± 55	2835 ± 75 a 4690 ± 90.	9620 ± 160 a 10,900 ± 280
<b>Clasificación del suelo (WRB, 2006)</b>	Mollic Leptosol	Lepti-vitric Andosol	Eutrisilic Andosol
<b>Profundidad fisiológica del suelo (cm)</b>	6/35	35.5	179
<b>Profundidad del horizonte Ah (cm)</b>	6	27	42.5
<b>pH (H<sub>2</sub>O)*</b>	4.8	5.7	6.1
<b>Densidad aparente (g cm<sup>-3</sup>)*</b>	0.56	0.86	0.61
<b>C (kg m<sup>-2</sup>)*</b>	6.6	10.8	19.3
<b>N (kg m<sup>-2</sup>)*</b>	0.5	0.7	1.2
<b>P disponible (g m<sup>-2</sup>)*</b>	1.3	1.1	0.6
<b>C/N (%)</b>	15.7	15.6	15.5
<b>Agua disponible (L m<sup>-2</sup>)**</b>	28.2	95.4	301.6

A.P.: Antes del Presente. Fecha de la última erupción y principio de la formación del suelo.

\* Calculado para el horizonte Ah solamente.

\*\* Calculado para la totalidad de la profundidad fisiológica.

## 6.2. Escalamiento de los microcosmos.

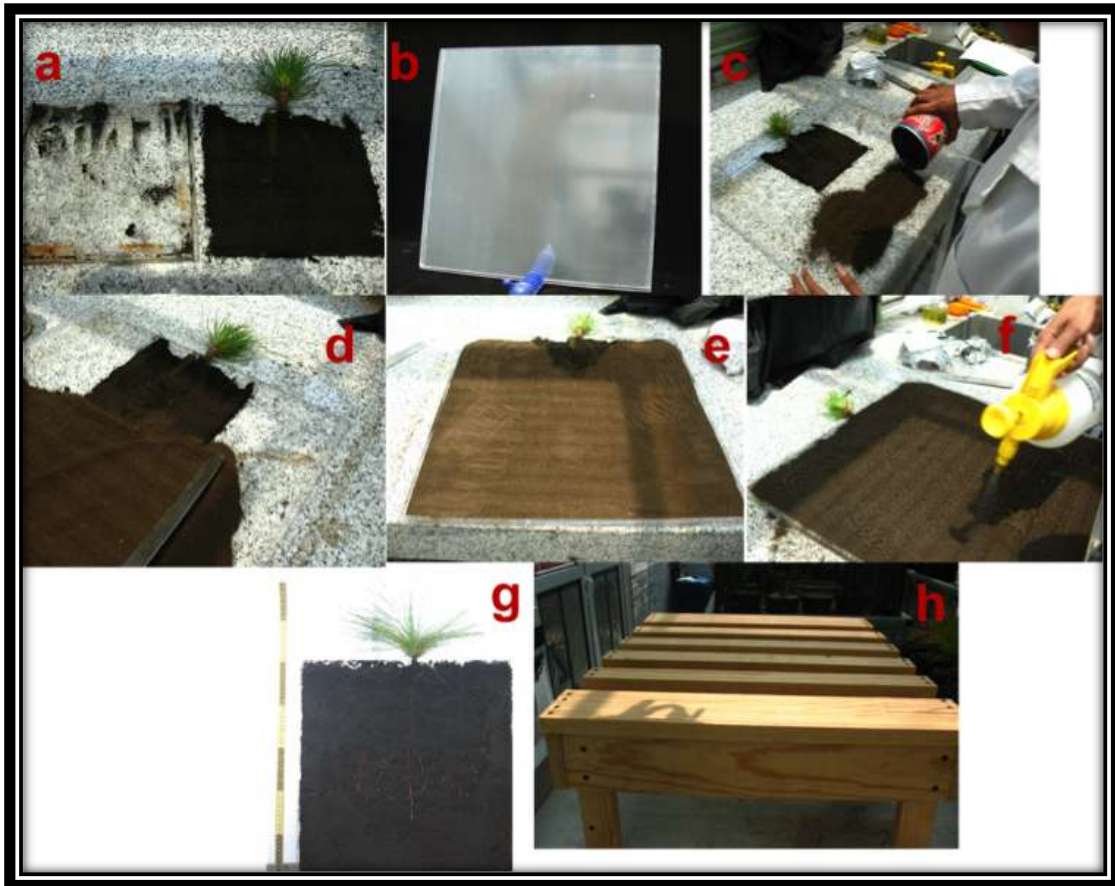
El experimento con los bioensayos se mantuvo durante 18 meses en condiciones de invernadero aclimatizado ( $21 \pm 2$  °C). Para el montaje de los micocosmos como sistemas experimentales se utilizaron dos placas de acrílico de 25 x 25 cm de lado y 5 mm de espesor (fig. 8a-b). A una de estas placas se le colocaron en tres de los cuatro

lados, varillas de acrílico de 5 mm, pegándolas con silicón para formar un marco para contener el suelo dentro de la placa. Una vez fija la varilla y colocada una capa de suelo de cada tratamiento, se transplantaron los pinos previamente micorrizados por los propágulos de los suelos de los contenedores de los bioensayos a los que previamente se le limpiaron con cuidado las raíces. Posteriormente, se cubrieron las raíces con un poco más suelo extendiéndolo todo para que quedara homogéneo y nivelado. Con ayuda de un atomizador se regó con agua corriente hasta humedecer completamente el suelo. Una vez humedecido se colocó la otra placa y se sostuvieron ambas con clips de presión (2 por cada lado) (fig. 8c). Cada unidad fue recubierta dentro de bolsas de polietileno de color negro para evitar la proliferación de organismos fotosintéticos y fue etiquetada (fig. 8d). Dado que se obtuvo un número desigual de pinos micorrizados de los tres suelos que sobrevivieron a los bioensayos, el número inicial de unidades montadas en este sistema fue diferente para los tratamientos, además de que por el estrés del trasplante, hubo pérdida de unidades disminuyendo diferencialmente el número de repeticiones.



**Figura 8.** a. Placas de acrílico de 25 x 25 cm. b. Cámara experimental con pinzas de presión. c. Espesor de 5 mm de las placas de acrílico. d. Bolsa para proteger el microcosmo de la radiación solar y evitar la formación de algas. Fotos: L. Guerrero, 2011.

Una vez que los pinos en los microcosmos presentaron crecimiento radical y aumento de talla, se transplantaron a unidades de 50 x 50 cm utilizando la metodología descrita anteriormente (fig. 9). Esto se realizó en un periodo de 9 a 13 meses dado que no todos los individuos crecieron al mismo ritmo en estos sistemas.



**Figura 9.** Construcción de los sistemas experimentales. a. Remoción de las unidades de 25 x 25 cm. b. Placa de acrílico de 50 x 50 cm. c-e. Trasplante de las unidades de 25 cm en las placas de 50 cm y relleno con suelo del mismo tratamiento. f. Riego por aspersión. g. Vista final de la unidad después de algunas semanas de crecimiento. h. Soportes para contener verticalmente los microcosmos grandes. Fotos: L. Guerrero, 2011.

### 6.3. Mantenimiento de los microcosmos.

Las unidades ya escaladas fueron mantenidas durante aproximadamente 10 meses en un invernadero templado a  $25 \pm 2$  °C y 45-50 % de humedad relativa. El riego se realizó semanalmente por aspersión. A los cuatro meses del transplante, se hizo un riego

mensual con solución nutritiva Melín-Norkrans modificado (Cuadro 3) recomendado para experimentos de gimnospermas con micorrizas (García-Rodríguez y Pérez-Moreno, 2006).

**Cuadro 3.** Reactivos para el medio Melín-Norkrans modificado.

<b>REACTIVO</b>	<b>g / L</b>	<b>g / 50 L</b>
CaCl <sub>2</sub>	0.050	2.50
NaCl	0.025	1.25
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.500	25.00
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *	0.125	6.25
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.150	7.50
FeNaEDTA	27.03 mg	1.35

\*50% de la fórmula original.

#### **6.4. Caracterización de micelio externo.**

Para la caracterización del ME se tomaron en cuenta los criterios propuestos por Agerer (2001) en cuanto al tipo de exploración descrito en la introducción. El frente de crecimiento del ME, así como el crecimiento de las raíces y los ápices ectomicorrízicos, se marcaron en la cara exterior de observación de las unidades a los 10 meses después de haberlas escalado. Para cuantificar el área y linealmente la longitud de las raíces, se transportaron todas las marcas a un plástico transparente y posteriormente se calcaron a papel milimétrico para la medición del área total en cm<sup>2</sup>. Además, se realizaron registros fotográficos del crecimiento del ME, las raíces y los ápices ectomicorrízicos durante todo el periodo en el que crecieron en los microcosmos.

Para describir microscópicamente el patrón exploratorio del ME en los microcosmos, se muestreó un segmento de suelo de 5 x 5 cm aproximadamente, extraído con la ayuda de un bisturí y unas pinzas de disección. Este se observó al microscopio estereoscópico a 8 y 25 magnificaciones y se hicieron registros fotográficos.

Para la caracterización microscópica del ME, se tomaron muestras en diferentes puntos de crecimiento dentro de los microcosmos y fueron montadas en portaobjetos y fijadas con alcohol polivinílico lacto-glicerol con fucsina ácida 0.01% en agua destilada.

## **VII. RESULTADOS**

### **7. 1. Tipo de exploración en función del suelo.**

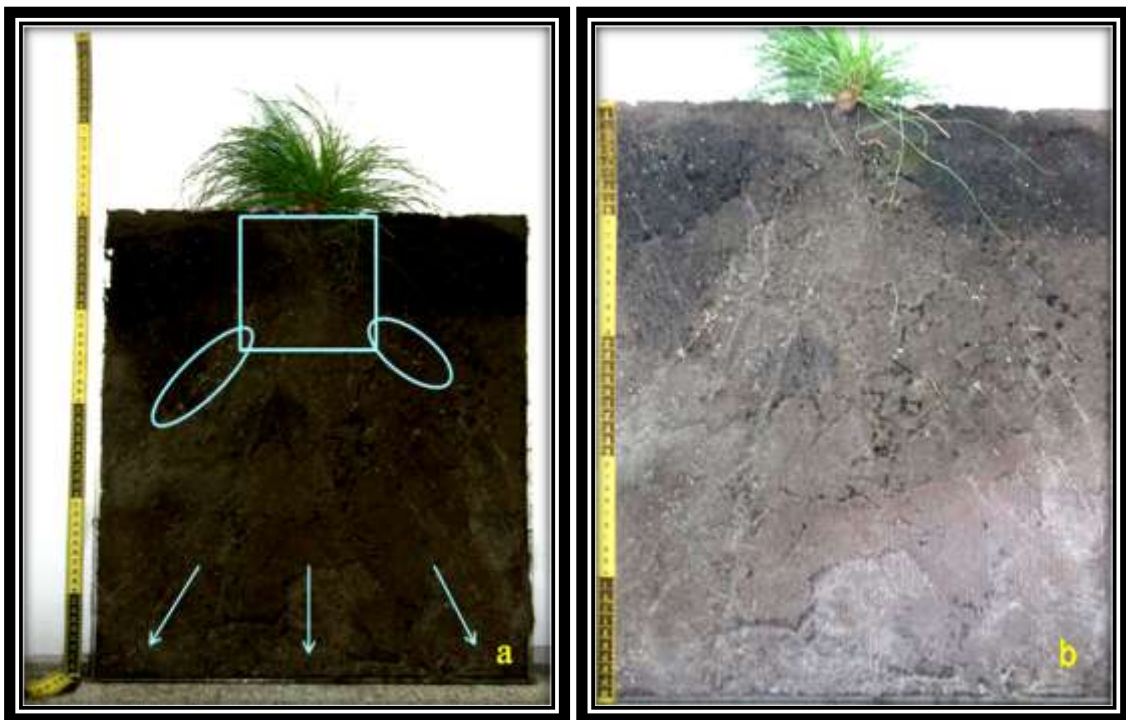
En las figuras 10 a la 12 se presenta el desarrollo del ME en los suelos de tres microcosmos que fueron caracterizados hasta su última fase de escalamiento en unidades de 50 x 50 cm a los 31 meses después de haber sido germinado las semillas.

#### **7.1.1. Desarrollo y tipo de exploración micorrízico en el Leptosol-mólico (Chichinautzin).**

En la figura 10 se ilustra el desarrollo del ME en el suelo Leptosol-mólico. La caracterización final en los tres suelos se llevó a cabo en las unidades de 50 x 50 cm. A los 11 meses de establecidos en unidades de este tamaño, las raíces habían colonizado completamente el área del microcosmo como se observa en las flechas azules de la fig. 10a. En algunas zonas, se pudieron apreciar segmentos de raíces micorrizadas (círculos

azules en la misma figura) y el ME colonizando toda la matriz del suelo. En este tiempo, el ME se desarrolló fino y poco conspicuo.

A los 14 meses (fig. 10b), el frente de crecimiento de las raíces llegó al límite de la unidad y aun cuando fue difícil observar un mayor número de raíces micorrizadas, ocurrió una proliferación en la cobertura de la matriz del suelo que se aprecia en la parte inferior del microcosmo.



**Figura 10.** Microcosmo con suelo Leptosol-mólico del volcán Chichinautzin (MCC-Ch3). a) Microcosmo de 50 x 50 cm a los 11 meses de establecido, donde en el recuadro superior se observa el área del microcosmo inicial de 25 x 25 cm. Ocorre la proliferación de ápices micorrízicos en la parte superior de la unidad (óvalos) recolonizando la matriz del suelo en la nueva unidad mientras que el ME se manifiesta en la parte inferior (flechas). b) Microcosmo a los 14 meses que evidencia abundantes ápices micorrízicos (superior) y ME (inferior).

El crecimiento del micelio se fue dando en los espacios porosos del suelo en donde las hifas se ramificaron más profusamente. A los 20 meses después de establecido (fig. 10c), el grosor de las raíces fue mayor en toda el área del microcosmo. A pesar de esto,



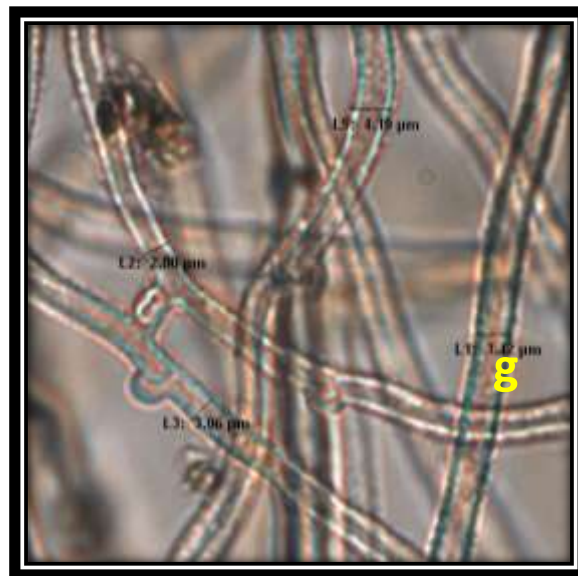
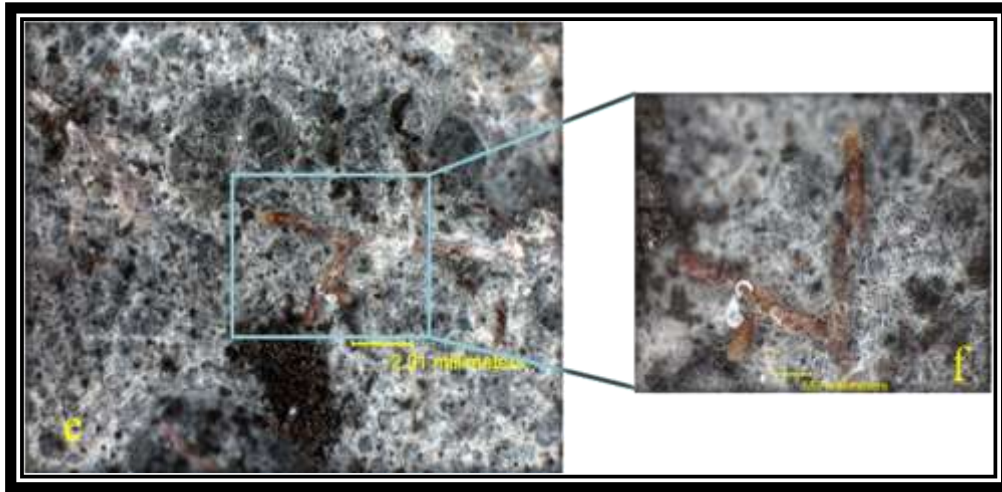
las raíces micorrizadas no se apreciaron, a diferencia de la abundante proliferación del ME. A los 23 meses ya es casi indistinguible la matriz del suelo que quedó cubierta completamente por el ME (fig. 10d). En un acercamiento con el zoom de la cámara se apreció que las raíces estuvieron micorrizadas (fig. 10e). En una magnificación de 8 × del microscopio estereoscópico, se observó que estas raíces presentaron un patrón dicotómico de micorrización característico para el género *Pinus* (fig. 10f). La conexión con los rizomorfos se dio en abanicos hifales de filamentos interconectados. Las hifas de los rizomorfos presentaron una anastomosis tipo C<sub>2</sub> (fig. 7) y con ramificación de hifas a 90°. Las medidas que tuvieron las hifas se presentan en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Diámetro de las hifas de los rizomorfos (µm) en los distintos suelos.

<b>Microcosmo</b>	<b>Media</b>	<b>d.e.</b>
Chichinautzin	3.45	0.48
Cuespalapa	3.45	0.44
Pelado	3.08	0.52



**Figura 10 (continuación).** c) Colonización total del microcosmo anterior a los 20 meses, el ME ha cubierto todo el suelo y el sistema radical y aunque difícil de observar hay una mayor proliferación de ápices micorrízicos (flechas). d) A los 23 meses el suelo es imperceptible debido al ME de una consistencia algodonosa.



**Figura 10 (continuación).** e) Acercamiento del ME en el microcosmo anterior donde no se aprecian rizomorfos individualmente (escala 3 mm). f) Mayor resolución de la imagen anterior (barra 1 mm) donde se observa la extensión de cobertura del suelo por las hifas finas entretejidas (exploración a corta distancia con ausencia de rizomorfos). g) Las hifas presentan una media de  $3.45 \pm 0.48 \mu\text{m}$  (de), con una anastomosis tipo  $C_2$  y cristales en su superficie.

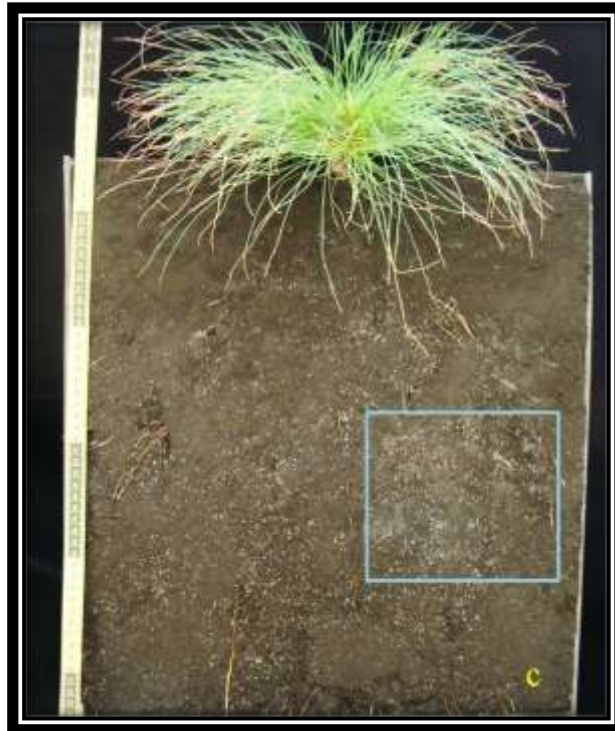
### **7.1.2. Desarrollo y tipo de exploración micorrízico en el Andosol Lepti-vítrico (Cuespalapa).**

En la figura 11a, se presenta el microcosmo inicial (25 x 25 cm) antes del escalamiento a 50 x 50 cm. Aunque fue difícil observar raíces micorrizadas en ambas caras, algunos ápices micorrízicos fueron visibles (círculo negro) y se evidenció la proliferación del ME en toda la matriz del suelo, en especial en la parte basal. A los cinco meses de establecido (fig. 11b), el suelo presentó una mayor compactación con respecto al microcosmo anterior dado su mayor contenido de arcillas y densidad aparente, por lo que las raíces no fueron visibles y el ME no fue apreciable. Tres meses después, el crecimiento de las raíces abarcaba casi toda el área del suelo (fig. 11c), se dio una proliferación mayor de raíces no micorrizadas y el crecimiento del ME se observó más denso hacia el lado derecho del microcosmo (recuadro azul) como respuesta a zonas de mayor aireación. La densidad de hifas ectomicorrízicas fue mucho menor que en el suelo anterior observándose la matriz del suelo colonizada extensivamente por el ME a los 17 meses de establecimiento (fig. 11d).

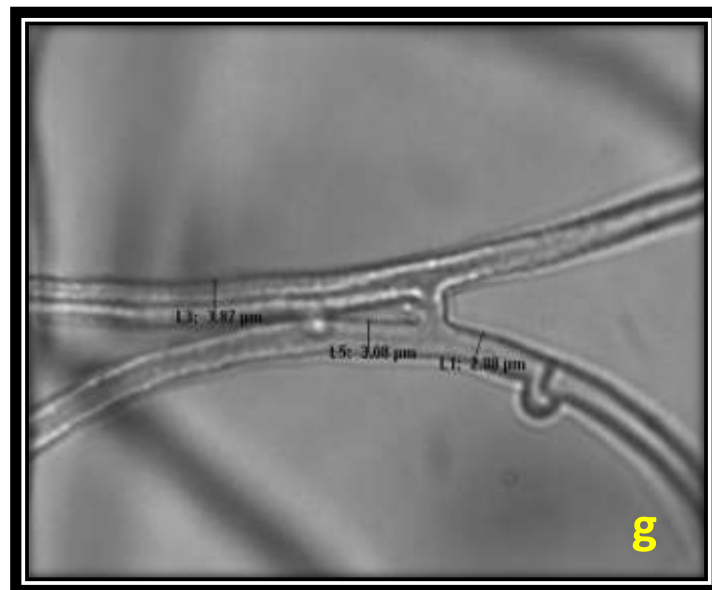
En este tiempo, se distinguieron más raíces micorrizadas en la cara superficial del microcosmo. El micelio colonizó primero la parte inferior, resurgiendo posteriormente de las zonas cercanas a la base del pino (flechas). Las hifas bajo magnificaciones de 8 y 25 × (fig. 11e y fig. 11f, respectivamente) pudieron observarse formando una fina red de filamentos interconectados que provenían de los ápices sub-superficiales que no se apreciaron en las fotografías. Las hifas a 400 × presentaron una anastomosis tipo d2, creciendo en ángulo recto según la misma clasificación (Fig. 11g) y con anastomosis tipo A y C (fig. 7). Las medidas de estas hifas se encuentran presentes en el cuadro 4.



**Figura 11.** a) Microcosmo inicial de 18 meses (25 x 25 cm) en un suelo Andosol Lepti-vítrico, donde se ve la colonización del ME y raíces con ápices micorrízicos (círculo). b) Cinco meses después del escalamiento del mismo microcosmo (recuadro superior blanco) a una unidad de 50 x 50 cm, es difícil de observar ME o ápices micorrízicos debido a que el suelo cubre el microcosmo inicial.



**Figura 11 (continuación).** c) Microcosmo anterior a los 8 meses donde comienza la proliferación del ME en la parte inferior derecha, cubriendo las raíces (recuadro). d) Aumento del crecimiento del micelio (17 meses), donde los ápices micorrízicos son difíciles de apreciarse. Se observa la colonización del ME en la parte inferior aun cuando también hay micelio cerca de la superficie con hifas finas (flechas).

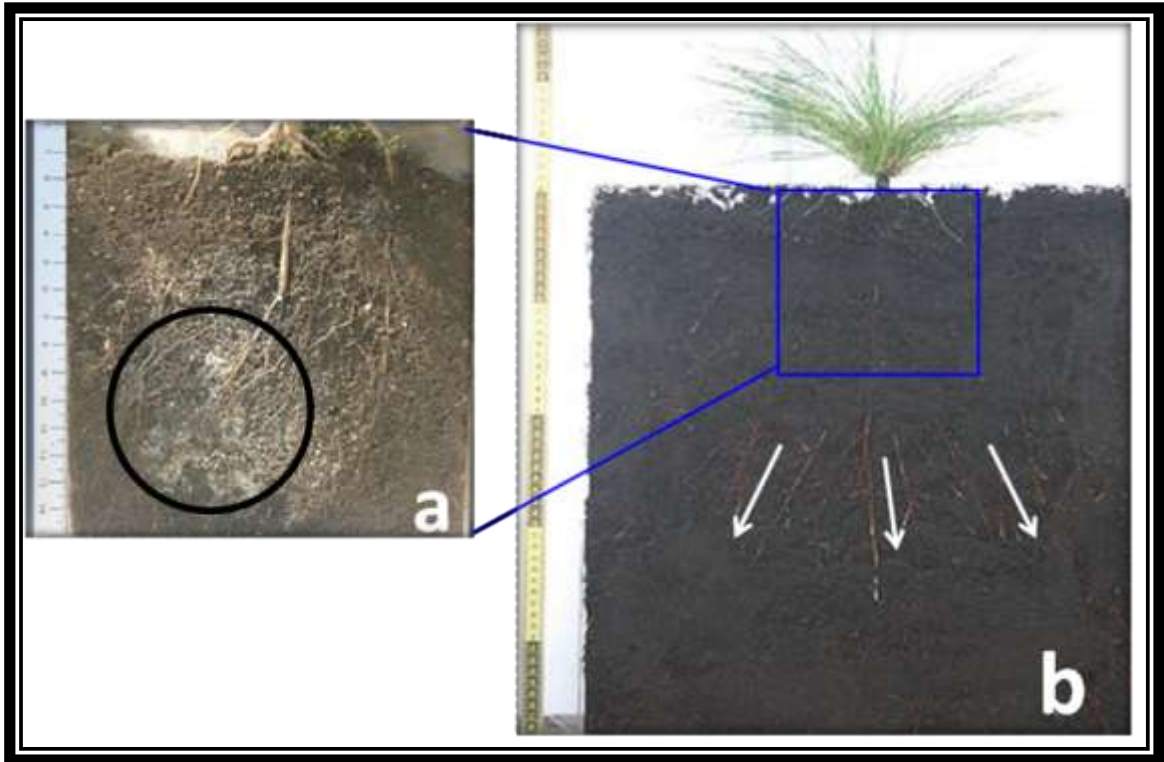


**Figura 11 (continuación).** e) Magnificación donde se muestra el crecimiento del ME en el suelo con un tipo de exploración fina sin rizomorfos. f) Acercamiento de la imagen anterior donde se observa la colonización de las partículas de suelo cubiertas menos densamente que en el suelo del Chichinautzin. g) Las hifas en este microcosmo tuvieron una media de  $3.45 \pm 0.48 \mu\text{m}$  y un patrón de anastomosis  $d_2$  y cristales en la superficie que se notan a manera de grumos en los bordes de las hifas.

### **7.1.3. Desarrollo y tipo de exploración micorrízico en el Andosol-éutrico (Pelado).**

En el caso del suelo del volcán Pelado se observaron raíces micorrizadas en el microcosmo de 25 x 25 cm antes del escalamiento, principalmente en la parte inferior (círculo negro) con crecimiento de ME (fig. 12a). Éste se extendió más rápidamente que en los demás microcosmos desde su fase inicial, aunque fue posterior a la expansión de raíces no micorrizadas (flechas blancas) a los seis meses del trasplante a la una unidad de 50 x 50 cm (fig. 12b). Tres meses después (9 meses después del escalamiento), el ME proliferó de manera regular (fig. 12c), el sistema radical se extendió hacia la parte basal del microcosmo (flechas) con pocas raíces micorrizadas (recuadro). El crecimiento del ME se observó hasta los 16 meses (fig. 12d), donde recubrió zonas ya colonizadas y se hizo más evidente (óvalo negro). A los 19 meses, el ME cubrió casi en su totalidad la matriz superior del suelo (fig. 12e) creciendo en filamentos interconectados en forma de abanico que emanó de los ápices micorrízicos (fig. 12f-g). En este microcosmo, se observaron cuatro distintos tipo de anastomosis siendo el más común el a1 (fig. 12h) seguidos del d1, c1 y d2 (fig. 8). Las medidas de las hifas se presentan en el cuadro 4.

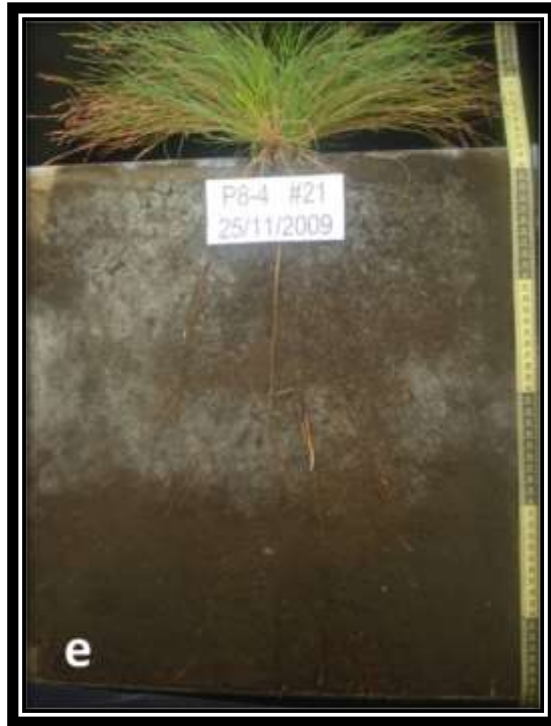




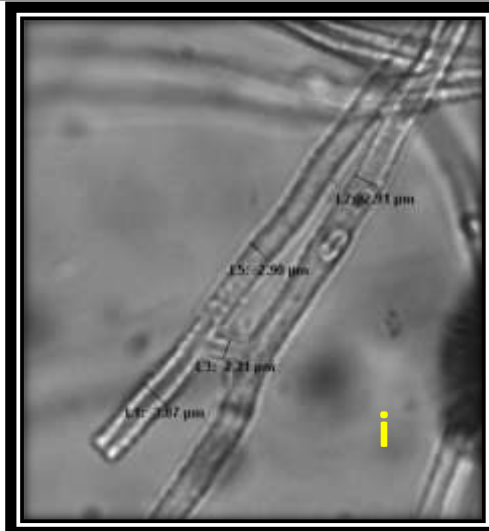
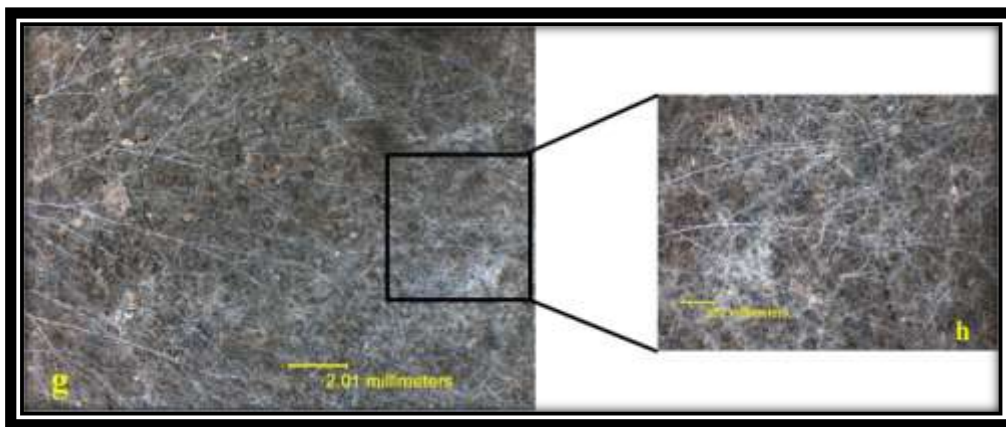
**Figura 12.** Microcosmo elaborado con suelo Andoso-eutrítico del volcán Pelado (MCC-P5). a) Microcosmo inicial de 25 x 25 cm a los 19 meses de establecido donde se aprecia la zona de crecimiento de micelio externo ME (circulo negro). b) Escalamiento de la misma unidad a un microcosmo de 50 x 50 cm a los 6 meses del trasplante, en donde aun no se aprecia la reanudación del crecimiento del ME. Se observa el frente de crecimiento de raíces no micorrizadas hacia la parte basal de la unidad (flechas).



**Figura 12 (continuación).** c) Microcosmo anterior con 9 meses aproximadamente de su escalamiento donde se aprecia una proliferación del ME (flechas) y la micorrización de las raíces finas hacia la zona superficial (recuadro superior izquierdo). d) Estabilización del crecimiento de ME cercano a los 16 meses en donde se marcan con flecha las zonas de expansión que recubrieron los ápices micorrizados.



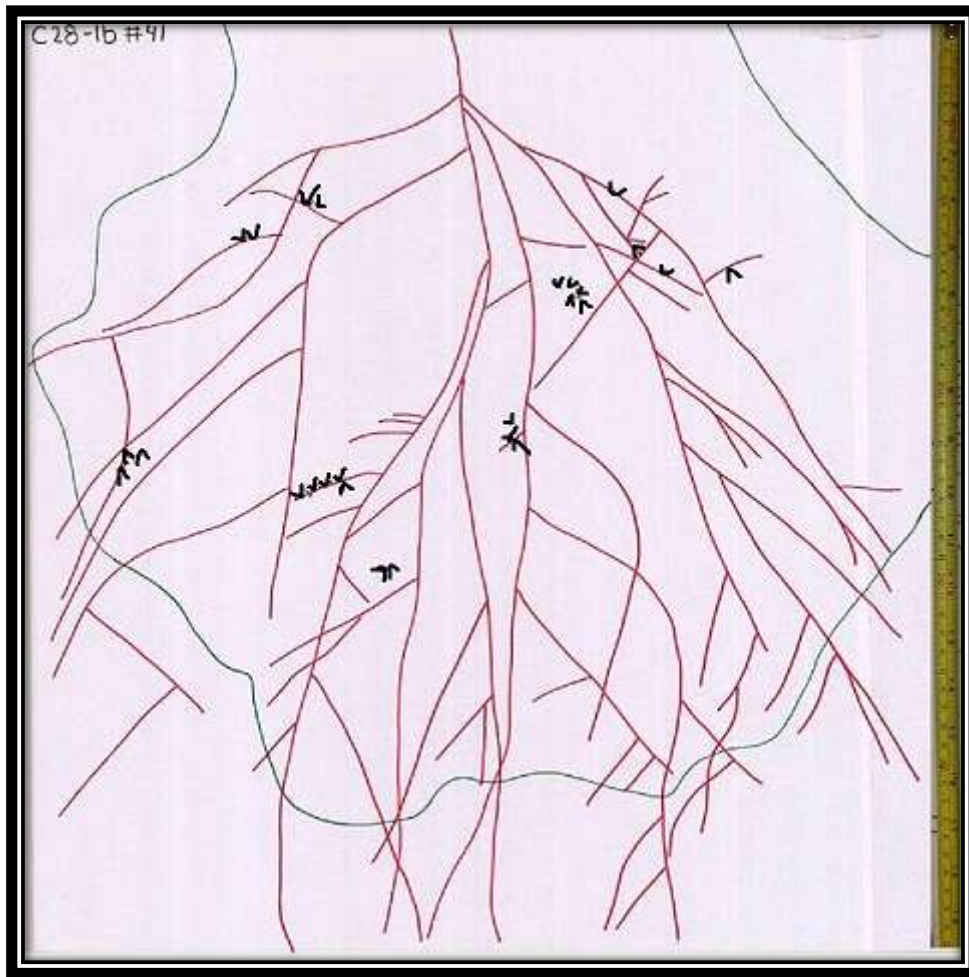
**Figura 12 (continuación).** e) Microcosmo a los 19 meses. Exploración del ME a los lados del microcosmo y recolonización de zonas donde ya había crecido anteriormente.



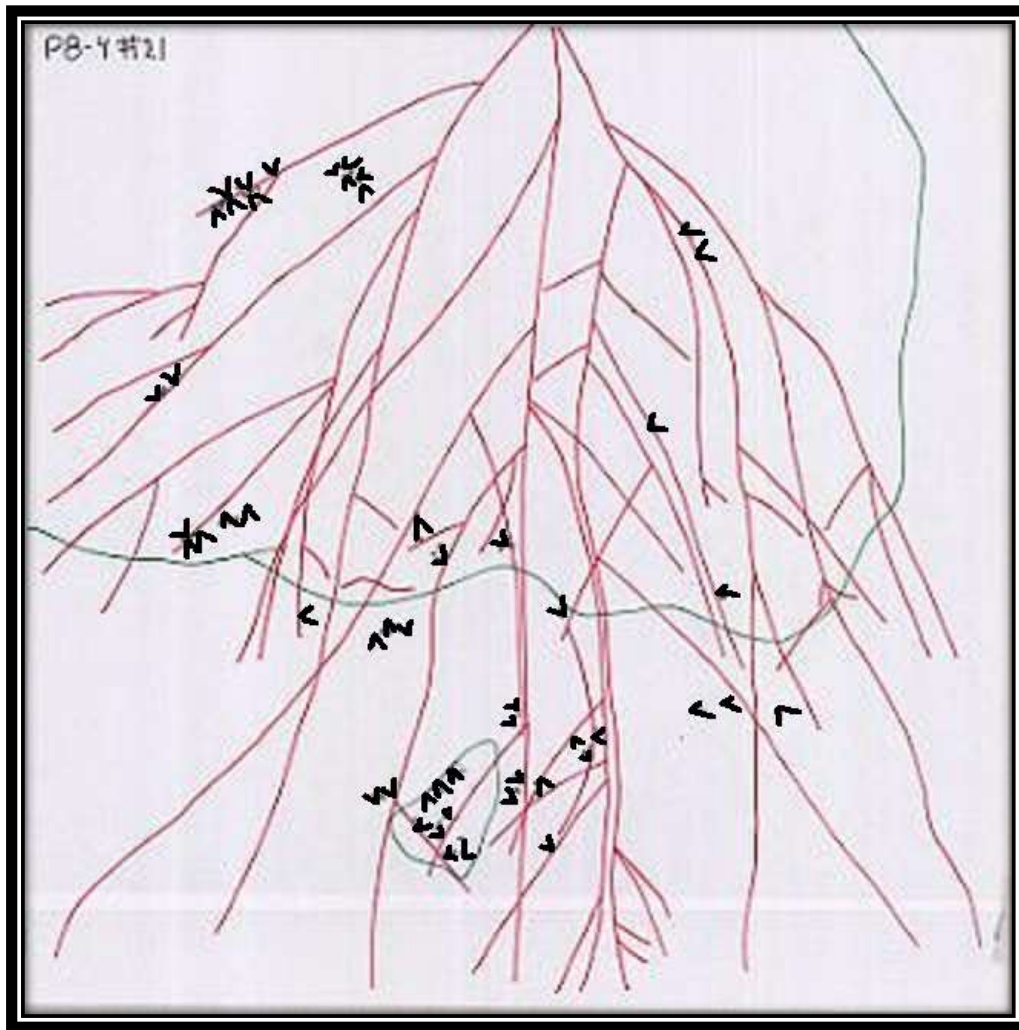
**Figura 12 (continuación).** f) Acercamiento del ME del microcosmo anterior donde se aprecia su grado de ramificación y jerarquización en rizomorfos tipo a<sub>1</sub> e hifas finas (~ 3 μm) con un tipo de exploración de larga distancia. g) Mayor resolución de la imagen anterior donde se observa la extensión de cobertura del suelo por las hifas ramificadas que emanan de los rizomorfos (área aprox. 19.4 mm<sup>2</sup>). h) Las hifas presentaron una anastomosis tipo a<sub>1</sub> y cristales en la superficie que se aprecian por el aspecto grumoso en el borde irregular de las hifas.

## 7.2. Área expansión del micelio y raíces en los microcosmos

Para facilitar la medición de la longitud de las raíces del pino y el área de colonización del ME de los microcosmos con el mismo tipo de suelo documentados en la figura 11d y 12e, se esquematizó en papel su trazo y área de expansión respectivamente (Cuadro 5). En el Andosol del Cuespalapa, a los 17 meses, fueron muy pocos los ápices micorrizados visibles (marcas negras), aun cuando se desarrolló un extenso sistema radical (líneas rojas) de difícil apreciación en la fotografía sin ayuda de este esquema (fig. 13a). El sistema radical llegó a medir 726.6 cm lineales en donde las raíces de 2do. y 3er. orden presentaron una mayor longitud, cuantificada de manera parcial y el ME tuvo un área de expansión de 1541 cm<sup>2</sup> que correspondió al 62% del área total del microcosmo en esa cara.



**Figura 13.** a) Diagrama de la longitud de las raíces (líneas rojas) y el área de expansión final del micelio externo (línea verde) a los 17 meses (fig. 11d). Las marcas negras en las líneas rojas representan los ápices micorrizados. El área de expansión del ME medida por este método fue de 1541 cm<sup>2</sup> y la longitud de raíces de 726 cm.



**Figura 13. b)** Diagrama del avance de la colonización del suelo por el ME (líneas verdes) con relación al crecimiento de las raíces (líneas rojas) y los ápices micorrizados (marcas negras). El área circunscrita en la línea verde en la parte inferior representó zonas de crecimiento de ME muy fino que no se precian en la figura 12e. El diagrama permitió cuantificar milimétricamente el área exacta de colonización correspondiente a 1297 cm<sup>2</sup> y la longitud de las raíces de 803.7 cm.

**Cuadro 5. Longitud (cm) de raíces de diferente orden y área de expansión de ME (mm<sup>2</sup>) en dos de los suelos estudiados\*.**

	Orden						Longitud total de raíces	Área de expansión del micelio
	1°	2°	3°	4°	5°	6°		
Cuespalapa	52.0	225.4	300.5	123.9	20.3	4.5	726.6	1541
Pelado	47.9	252.9	270.3	181.9	44.1	6.6	803.7	1297

\*n.d. en el Leptosol del Chichinautzin.

La figura 13b representa el diagrama del área de expansión de ME y de la longitud del crecimiento radical en el Andosol del volcán Pelado. En este suelo, se apreciaron más ápices micorrizados que en de Cuespalapa (marcas negras) y una menor zona de colonización de ME, (52% o 1297 cm<sup>2</sup>), aún cuando la longitud de las raíces fue ligeramente mayor (803.7 cm lineales), siendo las de 2do. y 3er. orden las de mayor longitud (cuadro 5).

La proliferación del ME en las tres unidades experimentales no permitió cuantificar completamente la longitud de las raíces en el suelo más joven, pero fue muy similar a la calculada para los otros dos suelos en los microcosmos de Cuespalapa y Pelado de 726 y 803 cm lineales. En este último, la diferencia entre ambos microcosmos fue de 70 cm. Estas medidas corresponden a lo que se visualiza en esa cara del microcosmo dado que de la otra no se evidenció el crecimiento (fig. 14). Se observó un mayor número de ápices micorrízicos en el microcosmo del Pelado, que de igual manera que con lo que ocurrió con la estimación de la longitud radical, este número debió ser mayor por los que quedaron incluidos dentro de la matriz edáfica y que no pudieron ser cuantificados. El crecimiento de las raíces en donde se llevó a cabo la micorrización de los ápices fue mayoritariamente de tercer orden. El área de crecimiento del micelio externo fue también mayor en la del Pelado por 244 cm<sup>2</sup> con relación al mismo tipo de suelo del volcán Cuespalapa. El área de expansión en el suelo más joven del volcán Chichinautzin fue del 100% por lo que los hongos en el Cuespalapa crecieron 959 cm<sup>2</sup> menos y en el Pelado 1203 cm<sup>2</sup>.



**Figura 14.** Aspecto del reverso de uno de los microcosmos.

## **VIII. Discusión**

### **8.1. Tipo de exploración en función de suelo.**

Como se documentó en los resultados, el tipo de exploración del ME en todos los suelos fue de abanicos hifales y las interconexiones hifales fueron tramas entretejidas en los tres suelos, en donde la diferencia fue la densidad de las hifas más que su grosor o formación de rizomorfos complejos. El crecimiento de este tipo de micelio ECM que se denomina forrajero, crece conforme va buscando nutrimentos y agua en el suelo (Read, 1992). Las hifas establecen redes interconectadas heterogéneas, indeterminadas estructural y fisiológicamente que forman parte de las raíces micorrizadas (Rayner, 1991; Cairney y Burke, 1996). Las distintas densidades hifales apreciadas en los suelos



podieron darse como una respuesta a un mayor o menor acceso a los nutrimentos ya que el suelo más joven con una mayor densidad hifal, se presentaron los menores contenidos de C y N.

El tipo de exploración también está en función de la especie de hongo ECM por lo que es posible que haya sido debida a la dominancia de una de las especies en todos los suelos. Se detectaron al menos 3, 2 y 5 morfotipos en el suelo del Chichinautzin, Cuespalapa y Pelado respectivamente. Entre el Pelado y Chichinautzin se compartió uno, entre el Chichinautzin y el Cuespalapa otro y entre el Pelado y el Cuespalapa también uno. La identificación molecular del ME permitirá esclarecer si los patrones de exploración se debieron a la dominancia de la misma especie sobre la de los morfotipos encontrados en las raíces.

Los rizomorfos sólo se formaron en el suelo del Pelado, en donde se presentaron las hifas de menor diámetro. Según la descripción de Letho (2011), el tipo de exploración de contacto que se presentó en los tres tipos de suelos, tiende a formarse por hongos hidrofílicos, que se diferencia de los tipos de exploración a distancia realizados por largos rizomorfos donde predominan las hifas de tendencia hidrofóbica. Esto establece una diferencia en el transporte de agua en los micelios hidrofílicos que exploran u obtienen el agua de la matriz del suelo a diferencia de los rizomorfos especializados en la conducción de agua de una planta a otra posiblemente en zonas del suelo con distinto régimen hídrico. Donnelly *et al.* (2004) argumentaron que la experimentación o manipulación de los hongos micorrízicos en los microcosmos puede sobreestimar el área de expansión de micelio externo dada la reducción del volumen de crecimiento, haciendo que las hifas aumenten su capacidad de exploración y/o lisis en áreas reducidas. Es posible que los hongos tiendan a formar menos rizomorfos en este sistema dado que no pueden explorar grandes distancias como lo harían naturalmente en el suelo

para conectarse con otras plantas como lo documentaron al estudiar la dinámica de expansión de ME de *Suillus* en *Pinus sylvestris*.

Algunos hongos saprófitos producen también rizomorfos robustos en el suelo, lo que le facilita su medición y el mapeo de su crecimiento en sistemas intactos (Thompson, 1984). Sin embargo, en el caso de los encontrados en el suelo del volcán Pelado, la mayoría de los micelios de ECM son muy finos, tendiendo a formar rizomorfos de menor diámetro. Es por esto que los estudios de rizomorfos se han realizado a partir de los esporomas o de los ápices micorrízicos aunque es evidente que su formación varía considerablemente de especie en especie de HECM (Agerer, 2001). Es posible que en el suelo del Pelado con el mayor número de morfotipos, haya habido una especie formadora de rizomorfos que no se manifestó en los otros suelos.

El micelio no rizomórfico o hidrofílico, refleja una limitada habilidad para explorar los alrededores a diferencia del que forma los rizomorfos para explorar distancias de varios decímetros a partir de los ápices (Agerer, 2001). Sin embargo, en ambos extremos también hay tipos de ME intermedios para explorar distancias intermedias (Agerer, 2001). Algunos HECM producen matas miceliales densas y pueden extenderse por varios centímetros ( $<1 \text{ m}^2$ ) a lo largo y profundo del suelo (Cromack *et al.*, 1979; Griffiths *et al.*, 1991) y aunque estos tapetes de micelio puedan cuantificarse en biomasa, no es claro si comprenden un solo o múltiples tipos de micelio como lo evidenció Murata *et al.* (2005). Este tapete puede persistir por años en el suelo como se observó en el escalamiento de las unidades experimentales en este estudio a lo largo de los meses.

En los microcosmos también puede haber modificaciones artificiales sobre el patrón de crecimiento del ME dadas las limitaciones volumétricas. Smith y Read (1997),

enfataron que su crecimiento no homogéneo puede ser consecuencia de la distribución heterogénea de la materia orgánica y a variaciones puntuales en la densidad y aereación que ha sido también documentada por otros trabajos (Finlay y Read, 1986a, b; Bending y Read, 1995; Pérez-Moreno y Read, 2000; Leake *et al.*, 2001a y b). En el presente estudio, se observó claramente que la proliferación de las hifas obedecía a zonas de mayor aereación en el microcosmo, en respuesta al acomodo diferencial de las partículas del suelo a lo largo del tiempo.

## **8.2. Crecimiento radical y de ME en función del tipo de suelo.**

El crecimiento radical y de micelio externo pueden estar relacionados con la especie de hongo micorrízico que dominó la colonización de los microcosmos. Las especies de ECM inducen distintos patrones de ramificación de las raíces y aunque en los pinos, este patrón es siempre dicotómico (Setälä, 2000), las micorrizas pueden provocar que las raíces disminuyan su longitud o que modifiquen el número de raíces de segundo o tercer orden que se formen. Las raíces micorrizadas han sido estudiadas para estimar la distribución restringida de los genotipos en el suelo, contrariamente a la de los esporocarpos que facilitan la dispersión en algunos taxa (Guidot *et al.*, 2001; Hirose *et al.*, 2004). Genney *et al.* (2006) argumentaron que los patrones de distribución espacial de los ápices ectomicorrízicos no reflejan necesariamente los patrones de distribución de micelio en el suelo. Los patrones de exploración del ME se conocen poco debido a que se ha dado un mayor interés en caracterizar las raíces (Donnelly *et al.*, 2004) aun cuando el crecimiento del micelio en el suelo puede diferir bastante del de los ápices (Horton y Bruns, 2001; Cairney, 2005; Anderson, 2006; Genney *et al.*, 2006;

Wallander, 2006). Brundrett *et al.* (1996) describieron que los ápices de ECM proliferan en las zonas superficiales de los horizontes orgánicos. Igualmente, Véjar (2000) mencionó que el mayor porcentaje de micorrización se da en los primeros 15 cm del suelo, así como en lugares donde existe un mayor enriquecimiento de nutrimentos. En este trabajo se pudo documentar que en el suelo más joven, el crecimiento del ME fue dominante sobre la longitud y micorrización de las raíces, y que el área de expansión del ME fue disminuyendo conforme la edad del suelo, contrariamente a lo que sucedió con la longitud de las raíces y ápices micorrízicos. Es posible que en suelos más evolucionados con mejor calidad de sitio, las micorrizas predominen sobre el ME porque tienen una menor necesidad de invertir en la exploración gracias a una mayor disponibilidad de nutrimentos, contrario a lo que sucede en el Chichinautzin en donde una menor disponibilidad de nutrimentos puede traer como consecuencia la predominancia del ME sobre las raíces y ápices micorrízicos.

En el trabajo previo de Reverchon que dio origen a las unidades experimentales de esta investigación, (Reverchon *et al.*, sometido) los hongos ectomicorrízicos que dominaron en el suelo más joven, pertenecieron a la Familia Atheliaceae. En el suelo de edad intermedia, predominó el género *Wilcoxina* y en el suelo del Pelado, además de estos dos taxa, dominó el género *Rhizopogon*. Scales y Peterson (1991) describen un rápido crecimiento del ME en una especie de *Wilcoxina* asociada en *Pinus banksiana*. En este estudio se observó que el crecimiento del ME en el suelo de edad intermedia fue el más lento de los tres por lo que es posible que el ME en este suelo no fuera de algún hongo perteneciente a este género. Bidartondo *et al.* (2001) encontraron en *Pinus muricata* colonizado por *Rhizopogon*, un crecimiento aproximado de ME de 150-343 mg<sup>-1</sup>. Este crecimiento es intermedio en comparación a otras especies ectomicorrízicas como *Suillus* o *Paxillus* que pueden crecer más de 300 mg<sup>-1</sup>. En algunos estudios, se ha

encontrado que el crecimiento de *Pisolithus* y *Cenococum* es mucho menor a  $10 \text{ mg}^{-1}$ . En este estudio, se calculó el área de crecimiento del ME sin relacionarlo con el peso del suelo. Sin embargo se observa que el crecimiento del hongo en el suelo del Pelado fue intermedio entre los dos microcosmos lo que coincide con lo esperado para el género *Rhizopogon* según lo descrito. Los distintos tipos de anastomosis documentados, así como la densidad hifal y morfotipos sugieren que en cada suelo pudiera predominar alguna de estas identidades taxonómicas.

En el año 2011, Rudawska y colaboradores, cuantificaron las especies y diversidad de las comunidades ectomicorrízicas asociadas a *Pinus silvestre* en tres diferentes sitios. *Wilcoxina rehmii* resultó ser el simbionte dominante y las especies subdominantes pertenecieron a la familia Atheliaceae, siendo dos de ellas las que presentaron una mayor formación de micelio extramatricial como lo ocurrido en el suelo más joven con la más densa cobertura micelial. El hecho de que las condiciones edáficas afectan fuertemente el crecimiento del micelio en el suelo (Erland *et al.*, 1990; Smith y Read, 1997), debe también verse influenciado por la competencia dado que cuando interaccionan varias especies en estos modelos, se observa que los patrones de crecimiento se ven alterados significativamente (Wu *et al.*, 1999; Lindahl *et al.*, 1999, 2001; Leake *et al.*, 2001, 2002). La naturaleza bidimensional del sistema también puede influir en la competencia que de otro modo los hongos podrían evitar al crecer tridimensionalmente en el suelo (Cairney, 2005). Al igual que los patrones de exploración, se debe tener cuidado al interpretar los resultados desde un punto de vista absoluto. Sen (2000) argumentó que el análisis del crecimiento vegetativo de las hifas en los microcosmos se considera como ideal ya que en el suelo este patrón se puede ver afectado por su heterogeneidad en la distribución de las partículas como se discutió anteriormente. La extensión del micelio en un plano dimensional puede ser mayor que

de manera tridimensional como ocurre en el suelo en donde hay una estratificación horizontal.

## **IX. Conclusiones**

Los HECM que se encuentran en suelos con propiedades fisicoquímicas distintas heredadas por su distinto grado de evolución, presentaron distintos patrones de crecimiento de ME al asociarse con *Pinus montezumae*.

En el suelo de reciente evolución con menor contenido de nutrientes y mayor porosidad, se manifestó la expresión de un ME forrajero y abundante que colonizó por completo la matriz del suelo ramificándose de manera densa y que pudo corresponder a una mayor necesidad de obtener nutrientes de la materia orgánica menos humificada.

En el suelo de edad intermedia, hubo un mayor equilibrio entre la longitud de las raíces, la abundancia de ápices micorrízicos y el área de crecimiento del ME.

En el suelo de mayor evolución y contenido de nutrientes, hubo la menor cobertura del ME, mayor proliferación de raíces y ápices micorrizados y formación de micelio de exploración a distancia a través de rizomorfos.

Los datos morfológicos sugieren que estos patrones pueden deberse a la manifestación de especies distintas de HECM en los suelos cuya manifestación morfológica puede obedecer a las características propias de los suelos cuando están colonizando a la misma especie de hospedero.

Los patrones de crecimiento de los hongos en este modelo puedan no reflejar necesariamente las condiciones en las que se desarrollan el mismo en la naturaleza. Sin embargo, estas observaciones pueden ser consideradas para entender la dinámica de colonización micorrízica de las plántulas.

## X. Referencias

- Agerer, R. 1987-1998 ed. Color Atlas of Ectomycorrhizae. 1<sup>st</sup> delivery. Einhorn-Verlag, Schwäbisch Gmünd.
- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. *Mycorrhiza* 11:107-114.
- Agerer, R. y Raidl, S. 2004. Distance-related semi-quantitative estimation of the extramatrical ectomycorrhizal mycelia of *Cortinarius obtusus* and *Tylospora asterophora*. *Mycological Progress* 3: 57–64.
- Aldrete, A. 2002. *Pinus muntezuma* Lam. Tropical tree seed manual, USDA Forest Service. Vol. 1. 625-627.
- Andersson, S., Jensén, P. y Söderström, B. 1996. Effects of mycorrhizal colonization by *Paxillus involutus* on uptake of CA and P by *Picea abies* and *Betula pendula* grown in unlimed and limed peat. *New Phytologist* 133: 695–704.
- Anderson, I.C. 2006. Molecular ecology of ectomycorrhizal fungal communities: new frontiers. In: Cooper, J.E. y Rao, J.R. (eds.), *Molecular Approaches to Soil, Rhizosphere and Plant Microorganism Analysis* pp. 183–197. CAB International, Wallingford, UK.
- Andrade, A. 2009. Interacción entre abetos y hongos en La ciencia y el hombre, Vol. XXII, No. 2. Veracruz.
- Axelrod, D.I. 1986. Cenozoic history of some western American pines. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73, 565-641.
- Baier, R., Ingenhaag, J., Blaschke, H., Götlein, A., y Agerer, R. 2006. Vertical distribution of ectomycorrhizal community in uppersoil horizons of young

- Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karsst.) stand of the Bavarian Limestone Alps. *Mycorrhiza* 16: 197-206.
- Bending, G.D. y Read, D.J. 1995. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. V. Foraging behaviour and translocation of nutrients from exploited litter. *New Phytologist* 130: 401–409.
- Bidartondo, M.I., Ek, H., Wallander, H. y Söderström, B. 2001. Do nutrient additions alter carbon sink strength of ectomycorrhizal fungi? *New Phytologist* 151: 543–550.
- Bridge, P. y Spooner, B. 2001. Soil fungi: diversity and detection. *Plant and Soil* 232: 147–154.
- Brundett, M.C., Bouguer, N., Dell, B., Grove, T. y Malaczuk, N. 1996 Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra, Australia. 374 pp.
- Brundrett, M.C. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant and Soil* 320: 37-77.
- Cairney, J.W.G., Jennings, D.H. y Agerer, R. 1991. The nomenclature of fungal multi-hyphal linear aggregates. *Cryptogamic Botanica* 2(3): 246–251.
- Cairney, J.W.G. y Burke, R.M. 1996. Physiological heterogeneity within fungal mycelia: an important concept for a functional understanding of the ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 134: 685–695.
- Cairney, J.W.G. 2005. Basidiomycete mycelia in forest soils: dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. *Mycological Research* 109: 7–20.



- Carleton, T.J. y Read, D.J. 1991. Ectomycorrhizas and nutrient transfer in conifer–feather moss ecosystems. *Canadian Journal of Botany* 69: 778–785.
- Carrera-Nieva, A. y López-Ríos, G.F. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo, Serie ciencias forestales y del ambiente*. Universidad Autónoma de Chapingo. Año/vol. 10, número 002.
- Cordier, C., Pozo, M.J., Barea, J.M., Gianinazzi, S. y Gianinazzi-Pearson, V. 1998. Cell defence responses associated with localized and systematic resistance to *Phytophthora parasitica* induced by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 1017-1028.
- Crews, T.E., Kitayama, K., Fownes, J.H., Riley, R.H., Herbert, D.A., Mueller-Dombois, D., y Vitousek, P. 1995. Change in soil phosphorous fractions and ecosystem dynamics across a long chronosequence in Hawaii. *Ecology* 76: 1407-1424.
- Cromack, K., Sollins, P., Graustein, W.C., Speidel, K., Todd, A.W., Spycher, G., Li, C.Y. y Todd, R.L. 1979. Calcium oxalate accumulation and soil weathering in mats of the hypogeous fungus *Hysterangium crassum*. *Soil Biology and Biochemistry* 11: 463–468.
- Donnelly, D.P., Boddy, L. y Leaker, J. R. 2004. Development, persistence and regeneration of foraging ectomycorrhizal mycelial systems in soil microcosms. *Mycorrhiza* 14: 37-45.
- Downes, G.M., Alexander, I.J. y Cairney J.W.G. 1992. A study of ageing of spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] ectomycorrhizas. I. Morphological and cellular changes in mycorrhizas formed by *Tylospora fibrillosa* (Burt.) Donk and *Paxillus involutus* (Batsch. ex Fr.) Fr. *New Phytologist* 122: 141–152.

- Duchesne, L.C., Peterson, R.L. y Ellis, B.E. 1989. The future of ectomycorrhizal fungi as biological control agents. *Phytoprotection* 70: 51-57.
- Duddridge, J.A., Malabari, A. y Read, D.J. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287: 834-836.
- Ek, H., Ahderesson, S., Arnebrant, K. y Söderström, B. 1994. Growth and assimilation of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_3^-$  by *Paxillus involutus* in association with *Betula pendula* and *Picea abies* as affected by substrate pH. *New Phytologist* 128: 629–637.
- Ek, H. 1997. The influence of nitrogen fertilization on the carbon economy of *Paxillus involutus* in ectomycorrhizal association with *Betula pendula*. *New Phytologist* 135: 133–142.
- Erland, S., Söderström, B. y Andersson, S. 1990 Effects of liming on ectomycorrhizal fungi infecting *Pinus sylvestris* L. II. Growth rates in pure culture at different pH values compared to growth rates in symbiosis with the host plant. *New Phytologist* 115: 683–688.
- Finlay, R.D. y Read, D.J. 1986a. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. I. Translocation of  $^{14}\text{C}$ -labelled carbon between plants interconnected by a common mycelium. *New Phytologist* 103: 143–156.
- Finlay, R.D. y Read, D.J. 1986b. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. II. The uptake and distribution of phosphorus by mycelial strands interconnecting host plants. *New Phytologist* 103: 157–165.

- Finlay R. D., Ek, H, Odham, G. y Söderström, B. 1989. Uptake, translocation and assimilation of nitrogen from  $^{15}\text{N}$ -labelled ammonium and nitrate sources by intact ectomycorrhizal systems of *Fagus sylvatica* infected with *Paxillus involutus*. *New Phytologist* 113: 47–55.
- Frank, A.B. 1894. Die Bedeutung der Mykorrhizal-pilze für die gemeine Kiefer. *Forstwissenschaftliches Centralblatt* 16: 185-190.
- Fransson, P.M.A., Taylor, A.F.S. y Finlay, R.D. 2005. Mycelial production, spread and root colonisation by the ectomycorrhizal fungi *Hebeloma crustuliniforme* and *Paxillus involutus* under elevated atmospheric  $\text{CO}_2$ . *Mycorrhiza* 15: 25–31.
- García, J. 1999. Estudio sobre la taxonomía, ecología y distribución de algunos hongos de la Familia Boletaceae (Basidiomycetos, Agaricales) en México. Tesis de maestría inédita. Facultad de ciencias Forestales, U.A.N.L.
- García, R.J.L., Pérez-Moreno, J. 2006. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con Eucalipto y Pino. *Agrociencia* 40: 665-676.
- Garza, F., García, J., Estrada, E., Villalón, H. 2002. Macromicetos, ectomicorrizas y cultivos de *Pinus culminicola* en Nuevo León. *Ciencia UANL*. Vol. V, No. 2: 204-210.
- Genney, D.R., Anderson, I.C., y Alexander I.J. 2006. Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. *New Phytologist* 170: 381-390.
- Grandmaison, J., Olah, G.M., van Calsteren, M.R. y Furlan, V. 1993. Characterisation and localisation of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza* 3: 155-164.

- Griffiths, R.P., Castellano, M.A. y Caldwell, B.A. 1991. Hyphal mats formed by two ectomycorrhizal fungi and their association with Douglas-fir seedlings: a case study. *Plant and Soil* 134: 255–259.
- Guidot, A., Debaud, J.C. y Marmeisse, R. 2001. Blackwell Science, Ltd. 2001. Correspondence between genet diversity and spatial distribution of above- and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Ecology* 10: 1121–1131.
- Guzmán-Dávalos L. y Guzmán, G. 1979. Estudio ecológico comparativo entre los hongos (macromycetos) de los bosques tropicales y de los de coníferas del sureste de México. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología* 13: 89-125.
- Guzman, G. 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biod. And Conser.* 7: 369-384.
- Hagerberg, D., Thelin, G. y Wallander, H. 2003. The production of ectomycorrhizal mycelium in forests: relation between forest nutrient status and local mineral sources. *Plant and Soil* 252: 279–290.
- Hagerberg, D., Pallon, J. y Wallander, H. 2005. The elemental content in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Piloderma* sp. during the colonization of hardened wood ash. *Mycorrhiza* 15: 387–392.
- Heinonsalo, J., Hurme, K.R. y Sen, R. 2004. Recent <sup>14</sup>C-labelled assimilate allocation to Scots pine seedling root and mycorrhizosphere compartments developed on reconstructed podsol humus, E- and B- mineral horizons. *Plant and Soil* 259: 111–121.
- Hirose, D.; Kikuchi, J.; Kanzaki, N. y Futai K (2004) Genet distribution of sporocarps and ectomycorrhizas of *Suillus pictus* in a Japanese white pine plantation. *New Phytologist* 164:527–541.

- Horton, T.R. y Bruns, T.D. 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology* 10: 1855–1871.
- Jiménez, J. y Kramer, H. 1991. Breve análisis sobre la situación actual de los recursos forestales en México. Reporte Científico No. Esp. 7. Facultad de Ciencias Forestales. Linares, N.L. 21 S.
- Jiménez, J. y Kramer, H. 1992. Dinámica del crecimiento de especies arbóreas en un rodal mixto-incoetáneo mediante la metodología de análisis troncal. Reporte Científico No. 31. Facultad de Ciencias Forestales. Linares, N.L. 36 S.
- Landeweert, R., Leeflang, P., Kuyper, T.W., Hoffland E., Rosling, A. Wernars K. y Smit, E. 2003. Molecular identification of Ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 327-333.
- Leake, J.R., Donnelly, D.P., Saunders, E.M., Boddy, L. y Read, D.J. 2001. Rates and quantities of carbon flux to ectomycorrhizal mycelium following  $^{14}\text{C}$  pulse labeling of *Pinus sylvestris* seedlings: effects of litter patches and interaction with a wooddecomposer fungus. *Tree Physiology* 21: 71–82.
- Leake, J.R., Donnelly, D.P. y Boddy, L. 2002. Interactions between ectomycorrhizal and saprotrophic fungi. *Mycorrhizal Ecology (Ecological Studies Vol. 157)* (van der Heijden MGA & Sanders IR, eds.), pp. 345–372. Springer-Verlag, Berlin.
- Lilleskov, E.A. y Bruns, T.D. 2003. Root colonization dynamics of two ectomycorrhizal fungi of contrasting life history strategies are mediated by addition of organic nutrient patches. *New Phytologist* 159: 141–151.
- Lindahl, B., Stenlid, J., Olsson, S. y Finlay, R. 1999. Translocation of  $^{32}\text{P}$  between interacting mycelia of a wood-decomposing fungus and ectomycorrhizal fungi in microcosm systems. *New Phytologist* 144: 183-193.

- Lindahl, B., Stenlid, J. y Finlay, R.D. 2001. Effects of resource availability on mycelial interactions and  $^{32}\text{P}$  transfer between a saprotrophic and an ectomycorrhizal fungus in soil microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* 38: 43–52.
- Little, L.R., Maun, M.A. 1996. The '*Ammophila* problem' revisited: a role for mycorrhizal fungi. *Journal of Ecology* 84: 1-7.
- Mahmood, S., Finlay, R.D., Erland, S. y Wallander, H. 2001. Solubilization and colonization of wood ash by ectomycorrhizal fungi isolated from a wood ash fertilized spruce plot. *FEMS Microbiology Ecology* 35: 151–161.
- Martín, A., 2011. Efectos de la inoculación del hongo de micorrización *Tuber melanosporum* y la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* en la calidad de la plántula de *Pinus halepensis*. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica de Madrid.
- Morin, C., Samson, J. y Dessureault, M. 1999. Protection of black spruce seedlings against *Cylindrocladium* root rot with ectomycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany* 77: 169-174.
- Murata, H., Ohta, A., Yamada, A., Narimatsu, M. y Futamura, N. 2005. Genetic mosaics in the massive persisting rhizosphere colony “shiro” of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricholoma matsutake*. *Mycorrhiza* 15: 505–512.
- Nara, K., Nakaya, H., Wu, B., Zhou, Z. y Hogetsu, T. 2003. Underground primary succession of ectomycorrhizal fungi in a volcanic desert on Mount Fuji. *New Phytologist* 159: 743–756.
- Nilsson, L.O., Wallander, H. 2003. Production of external mycelium by ectomycorrhizal fungi in a norway spruce forest was reduced in response to nitrogen fertilization. *New Phytologist* 158: 409-416.

- Peña-Ramírez, V.M., Vázquez-Slem, L., y Siebe, C. 2009. Soil organic carbon stocks and forest productivity in volcan ash soils of different age (1835-30,500 year B.P.) in Mexico. *Geoderma* 149: 224-234.
- Pérez-Moreno y J., Read, D.J. 2000. Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedling via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist* 145: 301-309.
- Pérez-Moreno y J., Read, D.J. 2004. Los hongos ectomicorrizicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*. 29: 239-247.
- Perry, J.P.Jr., Graham, A. y Richardson, M.D. 1998. The history of pines in Mexico and Central America. In: Richardson, M.D. (ed.), *Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K. pp. 137-139 pp.
- Ramírez, K. 2011. Caracterización de morfotipos ectomicorrízicos asociados a brinzales de *Pinus montezumae* Lamb., en suelos volcánicos de diferente edad (1,000-100,000 años A. P.). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 74 p.
- Rayner, A. D. M. 1991. The challenge of the individualistic mycelium. *Mycologia* 83: 48–71.
- Read, D. J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia* 47: 376–391.
- Read, D.J. 1992. The mycorrhizal mycelium. In: *Mycorrhizal functioning*, Allen, M.F. Ed. Chapman and Hall, London. pp. 102–133.
- Read, D.J. 1998. The mycorrhizal status of *Pinus*. In *Ecology and Biogeography of Pinus*. Edited by D.M. Richardson, Cambridge University Press, Cambridge, U.K. pp. 324-340.

- Read, D.J., Leake, J.R., y Pérez-Moreno, J. 2004. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes. *Canadian Journal of Botany* 82: 1243-1263.
- Read, D. J. y Pérez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems a journey towards relevance? *New Phytologist* 157: 475-492.
- Reverchon, F. 2010. Cambios en las comunidades de hongos ectomicorrízicos asociadas a *Pinus montezumae* a lo largo de una cronosecuencia volcánica, Sierra del Chichinautzin, Morelos. Tesis Doctorado. Instituto de Geología UNAM, México, D.F. 120 pp.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.P., Pérez-Moreno, J., Peña-Ramírez, V.M. y Siebe, C. 2010a. Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associated to *Pinus montezumae* across a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, Mexico. *Canadian Journal of Forest Research* 40: 1165-1174.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.P., Pérez-Moreno, J. 2010b. Saprophytic fungal communities change in diversity and species composition across a volcanic soil chronosequence at Sierra del Chichinautzin, Mexico. *Annals of Microbiology* 60: 217-226.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.P. y Pérez-Moreno, J. 2011. Soil factors influencing ectomycorrhizal sporome distribution in neotropical forests dominated by *Pinus montezumae*, Mexico. *Mycoscience* 53: 203-210.
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M.P., Bonilla-Rosso, G. y Pérez-Moreno, J. 2012. Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forests. *FEMS Microbiology Ecology* 80: 479-487.



- Rosling, A., Landeweert, R., Lindahl, B.D., Larsson, K.-H., Kuyper, T.W., Taylor, A.F.S. y Finlay, R.D. 2003. Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytologist* 159: 775-783.
- Rosling, A., Lindahl, B.D. y Finlay, R.D. 2004. Carbon allocation to ectomycorrhizal roots and mycelium colonising different mineral substrates. *New Phytologist* 162: 795–802.
- Rouhier, H. y Read, D.J. 1998. Plant and fungal responses to elevated atmospheric carbon dioxide in mycorrhizal seedlings of *Pinus sylvestris*. *Environmental Experimental Botany* 40: 237–246.
- Rudawska, M., Leski, T. y Stasińska, M. 2011. Species and functional diversity of ectomycorrhizal fungal communities on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees on three different sites. *Annals of Forest Science* 68: 5–15.
- Scales, P.F. y Peterson, R. L. 1991. Structure and development of *Pinus banksiana* – *Wilcoxina* ectendomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* 69: 2135-2148.
- Schubert, R., Raidl, S., Funk, R., Bahnweg, G., Müller-Starck, G. y Agerer, R. 2003. Quantitative detection of agar-cultivated and rhizotron-grown *Piloderma croceum* Erikss. & Hjortst. By ITS1-based fluorescent PCR. *Mycorrhiza* 13: 159–165.
- Sen, R. 2000. Budgeting for the wood-wide web. *New Phytologist* 145: 161–165.
- Setälä, H. 2000. Reciprocal interactions between Scots pine and soil food web structure in the presence and absence of ectomycorrhiza. *Oecologia* 125: 109–118.
- Siebe, Ch., Jahn, R. y Stahr, K. 1996. Manual para la descripción y evaluación ecológica de suelos en el campo. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Chapingo, México. 57 p.

- Smith, S.E. y Read, D.J. 2008. Mycorrhizal symbiosis, third ed. Academic Press, Londres.
- Thompson, W. 1984. Distribution, development and functioning of mycelial cord systems of decomposer basidiomycetes of the deciduous woodland floor. In: The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium (Jennings D.H. y Rayner A.D.M., eds.), pp. 185–214. Cambridge University Press, Cambridge.
- Timonen, S., Finlay, R.D., Olsson, S. y Söderström, B. 1996. Dynamics of phosphorus translocation in intact ectomycorrhizal systems: non-destructive monitoring using a b-scanner. FEMS Microbiology Ecology 19: 171–180.
- Timonen, S. y Sen, R. 1998. Heterogeneity of fungal and plant enzyme expression in intact Scots pine –*Suillus bovinus* and *Paxillus involutus*- mycorrhizospheres developed in natural forest humus. New Phytologist 138: 355–366.
- Véjar, L. 2000. Cuantificación del grado de colonización micorrízica en bosque nativo y *Eucalyptus globulus* Labill y su relación con la profundidad y el pH del suelo. Memoria para optar al título de Ingeniero Forestal. Concepción, Chile. Departamento de Silvicultura, Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción, Chile. 47 pp.
- Wallander, H. y Pallon, J. 2005. Temporal changes in the elemental composition of *Rhizopogon* rhizomorphs during colonization of patches with fresh organic matter or acid-washed sand. Mycologia 97: 295–303.
- Wallander, H. 2006. External mycorrhizal mycelia – the importance of quantification in natural ecosystems. New Phytologist 171: 240–242.
- Wiensczyk, A.M., Gamiet, S., Durall, D.M., Jones, M.D. y Simard, S.W. 2002. Ectomycorrhizae and forestry in British Columbia: A summary of current

- research and conservation strategies. *B.C. Journal of Ecosystems and Management*. 2: 1-20.
- Woods, F.W. y Brock, K. 1964. Interspecific of Ca-45 and P-32 by roots systems. *Ecology* 45: 886.
- Woods, F.W. 1970. Interspecific transfer of inorganic materials by root systems of woody plants. *Journal of Applied Ecology* 7: 481-486.
- Wright, S.F. y Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 198: 97-107.
- Wright, D.P., Johansson, T., Le Quéré, A., Söderström, B. y Tunlid, A. 2005. Spatial patterns of gene expression in the extrametrical mycelium and mycorrhizal root tips formed by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* in association with birch (*Betula pendula*) seedlings in soil microcosms. *New Phytologist* 167: 579–596.
- Wu, B., Nara, K. y Hogetsu, T. 1999. Competition between ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus densifolia*. *Mycorrhiza* 9: 151–159.
- Wu, B., Nara, K. y Hogetsu, T. 2002. Spatiotemporal transfer of carbon-14-labelled photosynthate from ectomycorrhizal *Pinus densiflora* seedlings to extrametrical mycelia. *Mycorrhiza* 12: 83–88.