



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Viabilidad, infectividad y efectividad del inóculo vegetativo
ectomicorrízico de *Laccaria trichodermophora*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Valeria Stephany Flores Almaraz



DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. Rodolfo Enrique Ángeles Argáiz

Ciudad Universitaria, CDMX

Mayo, 2020



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.

1. Datos del alumno

Flores
Almaraz
Valeria Stephany
5564635443
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
312319023

2. Datos del tutor

M. en C.
Rodolfo Enrique
Ángeles
Argáiz

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Sigfrido
Sierra
Galván

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Roberto
Garibay
Orijel

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Mauricio Alberto
Trujillo
Roldán

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Andrés
Argüelles
Moyao

7. Datos del trabajo escrito

Viabilidad, infectividad y efectividad del inóculo vegetativo ectomicorrízico de *Laccaria trichodermophora*
103 p.
2020

Agradecimientos Académicos

- Al proyecto PAPIIT número IN210217, por la beca de titulación y por el financiamiento para el desarrollo de este trabajo.
- A mi asesor, Rodolfo Ángeles, por la paciencia, la guía, la tolerancia y la amistad brindada durante todas las etapas de este trabajo.
- Al Dr. Roberto Garibay Orijel, primero por aceptarme como parte de su laboratorio y segundo, por facilitarme el acceso a todos los recursos económicos y académicos que hicieron posible el desarrollo de esta tesis, así como mi formación personal. Gracias por facilitar que en el laboratorio se dé un ambiente propicio, no sólo para el trabajo, sino para la formación de relaciones de amistad y cooperación.
- Al Dr. Mauricio Trujillo Roldán, por dejarme trabajar en las instalaciones de la Unidad de Bioprocesos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas y por revisar el trabajo escrito.
- Al M. en C. Alberto Campos López, por su ayuda e instrucción en el trabajo con las plantas y a la Bióloga Ilse Carmona, por su guía con la propagación de micelio en medio líquido.
- A la Dra. Julieta Álvarez Manjarrez, por su ayuda con los cortes y microscopía de las raíces. Gracias también por su disposición a orientarme con los análisis estadísticos en R, la discusión; y por acceder a revisarme el escrito.
- Al M. en C. Christian Quintero Corrales, por las cepas que utilicé en este trabajo y por apoyarme durante la recolecta de los esporomas.
- Al Dr. Pedro Mercado del laboratorio de Morfo-Anatomía y Citogenética del Instituto de Biología, por permitirme utilizar las instalaciones de su laboratorio y el microscopio invertido.
- A la Dra. Lidia Cabrera, por permitirme hacer uso del laboratorio de Biología Molecular del departamento de Botánica del Instituto de Biología.
- Al Dr. Joel Meza Rangel de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por facilitarme las semillas de *Pinus montezumae*.
- A la M. en C. Laura Márquez del Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología, por haber secuenciado las muestras de esta tesis.
- Al Dr. Andrés Argüelles Moyao, por su ayuda con los análisis estadísticos y por revisar cuidadosamente el escrito.
- Al Dr. Sigfrido Sierra Galván por su revisión y comentarios sobre el escrito.
- A la Dra. Camille Truong, por proporcionarme el script que me llevó a adentrarme al uso de R. Además, le agradezco por abrirme las puertas de su laboratorio y por todas las oportunidades que me ha brindado.
- A mis profesores Margarita Villegas, Rodolfo Salas y Abraham Sánchez Hernández por introducirme al increíble reino de los hongos.
- A la Dra. Rosalinda Tapia López, del laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología, por ser una académica muy empática con la situación de los estudiantes, y por enseñarme mucho de lo poco que sé sobre biología molecular. Gracias por integrarme a su equipo de trabajo, por nunca negarme la ayuda y perdón por las veces que le fallé.
- A mis profesores del *Taller de Evolución de plantas: Sistemática, Fisiología y Mecanismos moleculares del desarrollo*; la Dra. Ivalú Cacho, la Dra. Florencia García, el Dr. Ulises Rosas, la Dr. Alejandra Vasco y la Dra. Susana Magallón, Muchas gracias por tolerar que me descarrilara, por incluirme en las pláticas con pizza y permitirme concluir los cuatro niveles del taller satisfactoriamente.
- Al *Taller de Ciencia para Jóvenes 2013* del Centro de Geociencias de la UNAM, Programa UNAM-DGAPA-PAPIME, proyecto PE100912, por ser mi primer acercamiento con la ciencia y descubrirme el maravilloso mundo de la biología.

Agradecimientos Personales

- A mis padres, Nieves Almaraz y Alfredo Flores. Gracias por no rendirse nunca conmigo, sé que tal vez mucho de lo que hago no tiene sentido para ustedes, ni para nuestro contexto, pero gracias por nunca cuestionar la forma en la que he llevado mi vida. Perdón por las veces que les he fallado. Creo que la vida nunca me va a alcanzar para agradecerles lo mucho que han luchado por mí.
- A mi abuelita, Luciana García y a mi hermano Hendrik Flores, por haberme acompañado todo este tiempo.
- A mis compañeras Flores-Almaraz: Vania, Eve, Velma y Dea. Y a mis sobrinos: Hugo, Nadia, Santi y Fernandito; su existencia ha sido suficiente para continuar.
- A Rodo, ahora no como asesor, sino como amigo. Rodis: gracias por la ayuda, por las pláticas, por las comidas, las salidas al monte, los aventones, las caminadas por santocho y por preocuparte por mí en múltiples ocasiones. También gracias por romper un montón de mis esquemas y facilitarme el acceso a "tu reino" a pesar de nuestras personalidades tan diferentes. Estoy muy feliz de que hayamos coincidido y aprendido juntos. Eres el mejor asesor que pude haber tenido.
- A Amaranta Ramírez, que pasó de ser mi maestra a ser mi compañera y amiga del laboratorio. Amaranta: fuiste una parte esencial de este proceso de mi vida. Gracias por las comidas, los aventones, por darme asilo, por la ayuda económica, por acompañarme a deshoras en el lab y por darme soporte emocional tantas veces.
- A Julieta Álvarez, por su amistad, su guía y su ayuda. Julietín, eres una de las mujeres que más admiro, gracias por los chismes, los albures, las comidas, los consejos y por las palmaditas de soporte. Eres un ejemplo de trabajo, inteligencia, humildad, carisma y buen gusto musical.
- A Andrés Argüelles, ya que fue la persona que más me vio llorar del laboratorio. Amigo, sé que mis formas aún te parecen extrañas, pero gracias por tolerarme y escucharme tranquilamente en todas mis facetas. Eres un buen compañero del lado derecho y un gran amigo. Valoro mucho tu guía académica, tu amistad y tu insípido café.
- A los miembros, ex-miembros, anexos y ex-anexos del C-103 (Garibxys): Doctores AM, Amarantiux, Rodis, Chris, Lalín, Oli, Osqui, Galín, Brendi, Gemación, Abraham y Angie. Amigos, perdón por llorar y hablar tanto. Todos ustedes no sólo fueron la alegría del laboratorio, también fueron la alegría de mi vida durante estos tres años. Gracias por aguantarme, ayudarme, escucharme y preocuparse por mi mala postura. Lxs quiero mucho.
- A los chicos y chicas de la UBP (la casa chica): Raudi, Albertito, Ilse, Pao, Ximenita y Mayra; por integrarme a su círculo y brindarme otro refugio en la universidad.
- A los chicos y chicas del laboratorio de Genética Ecológica y Evolución del Instituto de Ecología y a su jefe, el doctor Juan Núñez, por hacerme parte de su dinámica de laboratorio durante el servicio y los viajes a los Tuxtlas.
- A mis compañeritas y compañeritos del taller: Bren, Verito, Itzel, Andy, Fer, Jona y Joel, por estar conmigo durante los cuatro semestres del taller (y los muchos posteriores que me tardé en terminar la tesis) y compartir la frustración, alegría y demás emociones que nos ocasionaron nuestros respectivos trabajos. Todos son muy brillantes, los quiero mucho.
- A mis amigas y amigos de la carrera: Lauv, Torix, Anita, Fer, Alex, Zyan, Luz, Andrésín, Abniux, Alfredo, Gilbert, Leo, Pablito M y Luis G. Ustedes hicieron mi paso por la ciencias más llevadera y feliz. Los quiero mucho.
- A mis amigos del cch: Ivy, Alex, Luisda y Mel. Sé que ya ni nos vemos y parece que vivimos en mundos distintos, pero me alegra saber que aún estamos. Los quiero mucho.
- A Brenda Helecho, por todo y todo. Brend: te quiero mucho, aunque seas una mala persona, nunca me pases nada y no me hayas puesto en los agradecimientos de tu tesis. Te deseo todo el éxito del mundo.
- A las otras personitas que me apoyaron en estos tres años: Mich, Vane, Robe, Kevin, Mateo y Mauricio. Sin su paso por mi vida, es muy probable que yo no estaría escribiendo esto. *"Creo que sabes que el regalo que me hiciste, me cambió la vida entera"*.



"And this is all happening right under our feet"

— Merlin Sheldrake

Ilustración: Enzo Pérès-Labourdette
The secrets of the wood wide web. 2016. The New Yorker.

Índice

1. Resumen	5
2. Introducción	7
2.1. Micorrizas	8
2.2. Asociación ectomicorrízica	9
2.3. Micorrización controlada	11
2.4. Evaluación de la calidad de la planta micorrizada	13
2.5. Preservación de HECM	15
3. Antecedentes y modelos de estudio	16
3.1. Antecedentes	16
3.2. Modelos de estudio	19
3.2.1. <i>Laccaria</i> Berkeley y Broome 1883	19
3.2.2. <i>Laccaria trichodermophora</i> Mueller 1984	20
3.3.3. <i>Pinus</i> Linneo 1753	22
3.3.4. <i>Pinus montezumae</i> Lambert 1832	22
4. Justificación	24
5. Objetivos	24
6. Hipótesis	25
7. Método	25
7.1. Diseño experimental	25
7.2. Viabilidad y recuperación del micelio	27
7.2.1. Inmovilización del micelio en perlas de alginato	27
7.2.2. Obtención de datos y análisis	28
7.2.2.1. Extracción del DNA total	28
7.3. Infectividad del inóculo vegetativo de cuatro cepas de <i>Laccaria trichodermophora</i>	30
7.3.1. Montaje de los microcosmos	30
7.3.2. Producción de inóculo de varias cepas de <i>Laccaria trichodermophora</i> en medio líquido	31
7.3.3. Inoculación de los microcosmos	32
7.3.4. Mantenimiento de las plantas en los microcosmos	33
7.3.5. Porcentaje de micorrización a los tres meses	33
7.3.6. Limpieza de raíces	34
7.3.7. Observación y caracterización morfoanatómica de las micorrizas	34
7.3.8. Porcentaje de micorrización a los 6 meses	34
7.3.9. Obtención de datos de crecimiento	35
7.3.10. Análisis de datos	36
7.4. Efectividad de diferentes métodos de aplicación del inóculo vegetativo	36

7.4.1. Preparación del sustrato, desinfección y germinación de las semillas.....	37
7.4.2. Elaboración de los inóculos e inoculación.....	37
7.4.3. Mantenimiento del experimento y cosecha	40
7.4.4. Porcentaje de micorrización	40
7.4.5. Obtención de datos de crecimiento	41
7.4.6. Análisis de datos	41
8. Resultados	42
8. 1. Viabilidad del micelio inmovilizado en perlas de alginato	42
8.1.1. Morfología de las colonias.....	43
8.1.2. Identidad del micelio.....	43
8.2. Infectividad de cuatro cepas de <i>Laccaria trichodermophora</i>	44
8.2.1. Porcentaje de micorrización	50
8.2.2. Efecto de la cepa sobre el crecimiento de las plántulas.....	51
8.3. Efectividad de diferentes métodos de aplicación del inóculo vegetativo	54
8.3.1. Porcentaje de micorrización	55
8.3.2. Efecto del tipo de inóculo en el crecimiento de las plántulas	57
9. Discusión	60
9.1. Las encapsulación del micelio en perlas de alginato lo mantiene viable hasta por tres meses a 4 °C	60
9.2. Cuatro cepas de <i>Laccaria trichodermophora</i> presentan diferente capacidad de infectar las raíces de las plántulas de <i>Pinus montezumae</i>	62
9.3. El inóculo esporal de <i>Laccaria trichodermophora</i> afecta la supervivencia de las plántulas de <i>Pinus montezumae</i>.....	68
9.4. El desarrollo de una tecnología de inoculación vegetativa exitosa requiere de la selección de cepas infectivas	72
10. Conclusiones	74
11. Referencias	75
ANEXOS	75

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución de <i>Laccaria trichodermophora</i>	21
Figura 2. Distribución de <i>Pinus montezumae</i> en México	23
Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología para la evaluación de la viabilidad, infectividad y efectividad del inóculo vegetativo ectomicorrízico de <i>Laccaria trichodermophora</i>	26
Figura 4. Microcosmos de <i>Pinus montezumae</i> inoculados con micelio de <i>Laccaria trichodermophora</i>	32
Figura 5. Raíz montada para la estimación del porcentaje de micorrización.	35
Figura 6. Puntos de recolecta de esporomas de <i>Laccaria trichodermophora</i>	39
Figura 7. Cambio del porcentaje de viabilidad del micelio encapsulado en perlas de alginato y mantenido a dos temperaturas diferentes.....	42
Figura 8. Morfología de las colonias del micelio de la cepa EF-36 encapsulado en perlas de alginato.	43
Figura 9. Colonización de raíces de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> inoculadas con la cepa CA15-F10 de <i>Laccaria trichodermophora</i>	45
Figura 10. Estructuras asociadas a la colonización ectomicorrízica de raíces de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> inoculadas con la cepa CA15-F10 de <i>Laccaria trichodermophora</i>	46
Figura 11. Raíces terciarias de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> inoculadas con la cepa CA15-11 de <i>Laccaria trichodermophora</i>	47
Figura 12. Raíces terciarias de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> inoculadas con la cepa CA15-75 de <i>Laccaria trichodermophora</i>	48
Figura 13. Raíces terciarias de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> inoculadas con la cepa EF-36 de <i>Laccaria trichodermophora</i>	49
Figura 14. Porcentaje de micorrización de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> después de tres y seis meses de ser inoculadas con cuatro cepas de <i>Laccaria trichodermophora</i>	50
Figura 15. Efecto de la inoculación con cuatro cepas de <i>Laccaria trichodermophora</i> en el peso seco, talla aérea y diámetro de <i>Pinus montezumae</i>	52
Figura 16. Índices de calidad de los pinos inoculados con cuatro cepas de <i>Laccaria trichodermophora</i>	53
Figura 17. Porcentaje de supervivencia de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> inoculadas mediante diferentes metodologías... ..	54
Figura 18. Porcentaje de micorrización de plántulas de <i>Pinus montezumae</i> inoculadas con <i>Laccaria trichodermophora</i> mediante diferentes metodologías.....	55
Figura 19. Diferentes morfologías de las ectomicorrizas formadas en el experimento de esporas y mixto	56
Figura 20. Efecto de diferentes metodologías de inoculación con <i>Laccaria trichodermophora</i> en el peso seco, talla aérea y diámetro de <i>Pinus montezumae</i>	58
Figura 21. Índices de calidad de los pinos inoculados con <i>Laccaria trichodermophora</i>	59

Índice de Tablas

Tabla 1. Procedencia, códigos de acceso del GenBank y números de MEXU de las cepas utilizadas de <i>Laccaria trichodermophora</i>	31
Tabla 2. Afinidad genética del micelio emergido de las perlas.	44
Tabla 3. Resultados de la pruebas de Kruskal-Wallis del experimento de infectividad. 51	
Tabla 4. Resultados de la pruebas de Kruskal-Wallis del experimento de efectividad..	57

Índice de ANEXOS

ANEXO 1. Comparaciones por pares con la prueba de Dunn para los valores de RAR del Experimento de infectividad.....	90
ANEXO 2. Resultados de las pruebas de Shapiro-Wilk del experimento de efectividad.	90
ANEXO 3. Gráfico Cuantil-Cuantil de los datos del porcentaje de micorrización del experimento de efectividad.....	91
ANEXO 4. Gráficos Cuantil-Cuantil de los datos de los estimadores de crecimiento del experimento de efectividad.....	92
ANEXO 5. Gráficos Cuantil-Cuantil de los datos de los índices de crecimiento del experimento de efectividad.....	93
ANEXO 6. Resultados de las pruebas de Levene del experimento de efectividad.....	94
ANEXO 7. Comparaciones por pares con la prueba de Dunn para los datos de porcentaje de micorrización del experimento de efectividad.....	95
ANEXO 8. Comparaciones por pares con la prueba de Dunn para los datos de los estimadores de crecimiento e índices del experimento de efectividad.	96
ANEXO 9. Contenido de SSPs presentes en las cepas CA15-F10, CA15-11, CA15-75 y EF-36 de <i>Laccaria trichodermophora</i>	97
ANEXO 10. CAZymes presentes en los genomas de <i>Laccaria amethystina</i> , <i>L. bicolor</i> y <i>L. trichodermophora</i> cepas CA15-F10, CA15-11, CA15-75 y EF-36.	98
ANEXO 11. Diferencias intraespecíficas de la producción de biomasa y consumo de glucosa de diferentes cepas de <i>Laccaria trichodermophora</i>	99

1. Resumen

Los programas de reforestación en México tienen porcentajes de fracaso mayores al 50%, los cuales están relacionados con la mala calidad de las plantas llevadas al campo. Con el fin de atacar este problema, se ha propuesto micorrizar con hongos ectomicorrizógenos nativos a las plantas en vivero, para así aumentar su crecimiento, nutrición y posterior establecimiento en campo. Sin embargo, la capacidad de un inóculo vegetativo para colonizar las raíces y promover el crecimiento de sus hospederos depende de muchos factores, que van desde diferencias genéticas y fisiológicas de cada cepa, pasando por el almacenamiento del inóculo, hasta la aplicación en la planta.

En este trabajo se planearon tres experimentos para evaluar la viabilidad, infectividad y efectividad de un inóculo vegetativo del hongo ectomicorrízico *Laccaria trichodermophora*. El primer experimento consistió en medir la viabilidad y recuperación del micelio al ser preservado en una matriz polimérica. En el segundo experimento se comparó la infectividad de cuatro cepas de *L. trichodermophora* al inocular plántulas de *Pinus montezumae*. Finalmente, en el tercer experimento se midió la efectividad del micelio de la cepa EF-36 para promover el crecimiento de su planta hospedera y esa efectividad se comparó con inóculos esporales.

Se encontró que la encapsulación en perlas de alginato mantiene la viabilidad del micelio hasta por tres meses a 4 °C. Además, las cuatro cepas de *L. trichodermophora* presentaron diferencias en su capacidad colonizadora, ya que solamente la cepa CA15-F10 presentó más del 60% de micorrización a los seis meses después de la inoculación, mientras que las otras tres cepas solo formaron algunas estructuras relacionadas con la micorrización, como raíces dicotómicas e hifas en la superficie de las raíces. Finalmente, a un año de inocular con distintos métodos, no encontramos diferencias en el crecimiento de la planta al ser inoculada con cada metodología. Los inóculos mixto y esporal alcanzaron porcentajes de micorrización mayores al 50%, mientras que el micelio suspendido y el transportado no infectaron la raíz. La falta de infectividad se atribuye a la identidad de la cepa utilizada (EF-36) y no al tipo de inóculo.

En este trabajo se hace evidente la relevancia de la selección del germoplasma a ser utilizado en la producción de un inóculo vegetativo ectomicorrízico. A través de la evaluación de la infectividad y efectividad será posible garantizar los efectos de los inóculos vegetativos. Para *L. trichodermophora*, la inmovilización en alginato de calcio puede usarse como método de preservación de cepa a corto plazo (3 meses). Sin embargo, el uso de alginato de calcio para mantener la viabilidad del micelio durante la inoculación de la raíz aún debe ser evaluado con cepas infectivas.

Palabras clave: Evaluación de bioinoculantes, inóculo vegetativo, micorrización controlada, microcosmos, perlas de alginato, selección de cepas.

2. Introducción

Los hongos ectomicorrizógenos (HECM) se asocian con el 2% de las plantas terrestres y representan un elemento clave en los ciclos de nutrientes y carbono de los ecosistemas forestales (Anderson y Cairney, 2007). Los HECM contribuyen con la nutrición de sus hospederos mediante la asociación con las plantas, pues facilitan la captación y movilización de nutrimentos que son altamente demandados, como el N y el P (Read y Pérez-Moreno, 2003; Santiago-Martínez, 2008). Por lo anterior, las asociaciones ectomicorrízicas tienen un papel activo dentro de la fisiología, ecología, resistencia, reproducción y otros aspectos de las especies de plantas en los ambientes forestales (Repáč, 2011).

Dada la contribución nutrimental que las asociaciones ectomicorrízicas aportan a sus hospederos, un alto número de investigadores y silvicultores de todo el mundo han utilizado la micorrización controlada con el fin de mejorar la calidad de las plantas en vivero (Cerviño *et al.* 2003). La micorrización controlada puede incrementar el éxito del establecimiento de las plantas, sin embargo, el uso de esta tecnología a escala comercial no es posible si no se dispone de métodos prácticos y eficaces para la producción y aplicación del inóculo (Pera *et al.* 1998).

Algunos viveros forestales son colonizados de manera no intencional por HECM nativos de la zona o por especies que se transportan accidentalmente en los sustratos de producción (Ángeles-Argáiz *et al.* 2016). Cabe destacar que algunas especies de HECM pueden tener un efecto negativo en el crecimiento de las plantas. Por esta razón, diferentes autores sugieren que para la micorrización controlada, sería idóneo seleccionar especies fúngicas que se asocien naturalmente con las plantas a producir, que se distribuyan en los sitios de plantación y que promuevan el crecimiento y nutrición de sus hospederos (Castellano y Molina 1989; Honrubia *et al.* 1992; Repáč, 2011).

Para evaluar la calidad de un inoculante ectomicorrízico, en este trabajo se propone considerar tres parámetros: infectividad, efectividad y viabilidad. La infectividad es una medida de la capacidad de un inóculo en particular para colonizar las raíces de un

hospedero (Hernández-Cuevas *et al.* 2008). La efectividad es la capacidad que tiene el inóculo para promover el crecimiento de la planta en términos de tamaño, peso y contenido de nutrientes (Rossi *et al.* 2007). Por su parte, la viabilidad de un inóculo ectomicorrízico, se refiere a la capacidad de éste para mantener su estabilidad genética, fenotípica y fisiológica a través del tiempo y que finalmente presenten sus características infectivas y efectivas sin que les afecte el almacenamiento (Crahay *et al.* 2013).

2.1. Micorrizas

Las micorrizas son asociaciones formadas entre ciertos hongos habitantes del suelo con las raíces del 86% de las plantas terrestres (Brundrett y Tedersoo, 2018; Smith y Read, 2008). En esta interacción generalmente ambos participantes se ven beneficiados mediante un intercambio de nutrientes (Hobbie *et al.* 2005). La planta le proporciona fotosintatos al hongo, favoreciendo su crecimiento, alimentación y reproducción. A cambio, el hongo mejora la nutrición de la planta, al translocar N y P que obtiene del suelo a través de procesos enzimáticos u oxidativos (Shah *et al.* 2016; van der Heidjen *et al.* 2015). Además, el hongo asociado puede proporcionarle a su hospedero mayor resistencia a diferentes estreses bióticos y abióticos (Tian *et al.* 2019; Toprak, 2020).

La clasificación actual de las micorrizas agrupa la diversidad de las asociaciones en cuatro categorías: micorrizas arbusculares, ectomicorrizas, micorrizas ericoides y micorrizas orquidioides (Brundrett y Tedersoo, 2018; Martin *et al.* 2016). Estas cuatro categorías están basadas en criterios de diferenciación morfológica de los tejidos de raíz y en los linajes evolutivos de las plantas hospederas. Sin embargo, la clasificación más ampliamente utilizada es la de Smith y Read (2008), la cual reconoce siete categorías morfológicas: micorrizas arbusculares, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, micorrizas arbutoides, micorrizas ericoides, micorrizas monotropoides y micorrizas orquidioides.

Algunas plantas pueden estar colonizadas por más de un tipo de micorriza y asociarse con diferentes especies de hongos (Teste *et al.* 2019). Además, pueden establecer conexiones con otras plantas a través de los hongos asociados a sus raíces (Simard, 2018). Estas conexiones se conocen como redes micorrízicas y permiten a las

plantas compartirse nutrientes, entre ellos C, y señales químicas, ya sea con sus descendientes o con individuos de otras especies (Simard *et al.* 2012). Este intercambio puede reducir la competencia entre las plantas y contribuir con la estabilidad y diversidad de los ecosistemas (Simard *et al.* 1997).

2.2. Asociación ectomicorrízica

Las ectomicorrizas son las asociaciones formadas entre las raíces cortas y absorbentes del 2% de las plantas terrestres (Brundrett y Tedersoo, 2018) y algunos hongos del suelo. En este tipo de asociación se ven involucrados algunos miembros de las familias Betulaceae, Fagaceae, Pinaceae, Salicaceae, Myrtaceae, Nothofagaceae, Dipterocarpaceae (Sánchez-Ramírez *et al.* 2017) y algunos hongos pertenecientes a las clases Endogonomycetes, Pezizomycetes y Agaricomycetes (Brundrett y Tedersoo, 2018). Estas asociaciones se presentan principalmente en bosques templados y boreales (Mello y Ballestrini, 2018).

Las interacciones se colocan en la categoría de ectomicorriza debido a la identidad taxonómica de los simbioses y a características morfológicas del órgano denominado ectomicorriza (Smith y Read, 2008). Los HECM modifican las raíces terciarias de las plantas asociadas, envolviendo las raíces cortas con una cubierta o manto de tejido fúngico. Del manto, un entramado de hifas llamado red de Hartig, crece entre las células epidérmicas y corticales. La red de Hartig es importante, ya que es en donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes. Además, en algunos casos se presenta un sistema de hifas que se sobresalen del manto llamado micelio extraradical (Mello y Ballestrini, 2018; Smith y Read, 2008).

Las plantas involucradas en la interacción dependen de la asociación micorrízica para su crecimiento. Los HECM transfieren N de fuentes orgánicas y minerales del suelo a las raíces de las plantas, principalmente en forma de NH_4^+ y NO_3^- y aminoácidos (Bonfante y Genre, 2010). Desde 1885 se ha propuesto esta característica como el papel primario de este tipo de simbiosis (Pérez-Moreno y Read, 2004). Entre otros de los beneficios de la asociación, se encuentra la facilitación en la captación de agua y otros

nutrientes de baja disponibilidad, como el P (Plassard y Dell, 2010). Además, se incrementa la tolerancia de las plantas a la desecación (Lehto y Zwiazek, 2011) y a altas concentraciones de metales pesados (Luo *et al.* 2014).

Para que la interacción ectomicorrízica se establezca se requiere de un sistema complejo de comunicación química y genética entre la planta y el hongo (Martin *et al.* 2016). Durante el establecimiento de la interacción, primero se da un intercambio de señales entre ambos participantes, para lo cual los HECM utilizan compuestos volátiles, como el Thujopseno, un sesquiterpeno encontrado en *L. bicolor* (Ditengou *et al.* 2015). Los HECM también pueden manipular el gradiente de auxinas para inducir la producción de raíces laterales (Krause *et al.* 2015).

Posterior al intercambio de señales, se da un reconocimiento que promueve la adhesión y la penetración del hongo hacia el espacio intracelular de las células epidérmicas y/o corticales para la formación de la red de Hartig (Daguerre *et al.* 2017). Para la formación de la red de Hartig es necesario una remodelación de las paredes celulares de la planta y del hongo (Ballestrini y Kotte, 2017; Daguerre *et al.* 2017). Paralelamente, o un poco después de la penetración del hongo al espacio intracelular de la raíz, se forma una capa delgada de hifas, la cual va formando poco a poco el manto (Ballestrini y Kotte, 2017).

La secuenciación de genomas de HECM es la base de los estudios bioquímicos, genéticos y transcriptómicos llevados a cabo para dilucidar los mecanismos que permiten el establecimiento y mantenimiento de la asociación (Daguerre *et al.* 2017; Kuo *et al.* 2014). El genoma de *Laccaria bicolor* fue el primero de estos (Martin y Selosse, 2008) y facilitó la identificación de moléculas potencialmente involucradas en la interacción (Kuo *et al.* 2014). Algunas de las moléculas que se identificaron fueron más de 2,900 proteínas de secreción, de las cuales, el 10% son *Small Effector-like Secreted Proteins* (SSP). Varios genes codificadores de SSP son específicamente inducidos durante la interacción, por lo que se denominan *Mycorrhiza-induced Small-Secreted Proteins* (MiSSPs) (Martin *et al.* 2008).

Entre las MiSSPs, sólo la MiSSP7 (Plett *et al.* 2011; 2014), la MiSSP8 (Pellegrin *et al.* 2019) y la MiSSP7.6 (Kang *et al.* 2020) han sido descritas como efectores en la interacción de *L. bicolor* y *Populus* spp. La MiSSP7 interactúa con la vía de señalización mediada por ácido jasmónico, de esta manera bloquea las respuestas de defensa de la planta, lo que permite la penetración del hongo al espacio intercelular de la planta (Plett *et al.* 2014). A su vez, la MiSSP8 está relacionada con los primeros pasos de la interacción y regula la agregación de hifas, influyendo en la formación del manto y la red de Hartig (Pellegrin *et al.* 2019). Mientras que la MiSSP7.6 es secretada a la interfase simbiótica y entra hasta el núcleo de las células del hospedero, en donde se une a los reguladores Trihelix para ajustar la expresión de los genes de respuesta inmune de la planta (Kang *et al.* 2020).

Otro de los componentes genómicos identificados como participantes clave en el establecimiento y mantenimiento de la interacción son las *Carbohydrate Active Enzymes* (CAZymes). Las CAZymes están involucradas en la biosíntesis, modificación y catabolismo de carbohidratos. En el genoma de *L. bicolor* se encuentran muy limitadas en número (Martin *et al.* 2008). Sin embargo, se sobre expresan durante los primeros estadios de la interacción, participando en la remodelación de la pared celular de la planta (Veneault-Fourrey *et al.* 2014).

2.3. Micorrización controlada

Las plantas pueden aumentar su crecimiento, establecimiento y supervivencia en campo a través de los mecanismos de intercambio de nutrientes con sus HECM asociados. Esto puede suceder incluso en suelos perturbados o nutrimentalmente pobres (Marx *et al.* 1977; Garbaye, 1990). Sin embargo, aunque el micelio de los HECM generalmente se encuentra de manera natural en los suelos forestales, su capacidad para colonizar y beneficiar a sus hospederos es variable, por lo que se presenta un bajo establecimiento de las plantas en campo (Marx y Cordell, 1989). En programas de reforestación se recomienda inocular a las plántulas con HECM para mejorar su crecimiento y estatus nutrimental con el fin de producir plantas saludables que tengan mayores posibilidades de sobrevivir al trasplante (Repáč, 2011).

El proceso de inoculación en vivero con HECM seleccionados se conoce como “micorrización controlada” (Rossi *et al.* 2007) y es una alternativa energéticamente eficiente y ambientalmente amigable para producir plantas saludables, en comparación con la fertilización del sustrato (Repáč, 2011). La apropiada selección de HECM es esencial para el éxito de la micorrización (Oliver, 2000). Para la selección se prioriza a las especies de HECM que estén adaptadas a las condiciones ambientales del sitio de trasplante (Flores-Rentería *et al.* 2017) y que tengan la capacidad de colonizar y promover el crecimiento y nutrición de sus hospederos (Flores-Rentería *et al.* 2017; Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019; Rossi *et al.* 2007).

Después de la selección de especies para micorrizar se debe seleccionar y producir el inóculo. Existen tres tipos de estos: inóculo natural, inóculo esporal e inóculo vegetativo (Repáč, 2011, Rossi *et al.* 2007). Antes de detallar cada uno de ellos, cabe resaltar que para seleccionar el tipo de inóculo a utilizar es necesario tener en cuenta los siguientes parámetros: 1) el inóculo debe permanecer viable durante el transporte y almacenamiento, y mantener su infectividad por varios meses después de su elaboración; 2) el inóculo debe ser fácil de aplicar y no acarrear patógenos de plantas o microorganismos de vida libre que puedan afectar a la planta inoculada (Schwartz *et al.* 2006); 3) el costo del inóculo debe ser accesible y no incrementar significativamente el precio de la planta producida en vivero (Brundrett *et al.* 1996; Flores-Rentería *et al.* 2017; Rossi *et al.* 2007).

El inóculo natural consiste en suelo obtenido de bosques, viveros o plantaciones establecidas en los cuales se encuentran los HECM (Rossi *et al.* 2007). Este suelo se mezcla con el sustrato de crecimiento de las plantas. Sin embargo, en primera instancia es difícil saber la o las especies de hongos con las que se inoculó y su potencial infectivo, por lo cual, aunque induce la micorrización, no es posible considerarlo como una técnica de micorrización controlada (Castellano y Molina, 1989). Aunque se recomienda utilizar este tipo de inóculo si no hay ningún otro disponible (Marx, 1991; Marx *et al.* 1991). Además, se requiere una gran cantidad de suelo para inocular viveros completos, por lo que propicia la erosión y destrucción de las áreas forestales de las cuales se extrae (Carrasco-Hernández *et al.* 2018). Finalmente, se presenta un riesgo muy alto de que se

introduzcan patógenos que comprometan la salud de las plantas (Castellano y Molina, 1989).

El inóculo esporal está compuesto por esporas o esporomas secos molidos recolectados en bosques naturales, viveros o plantaciones establecidas (Theodorou, 1990). De este tipo de inóculo destaca que la aplicación no compromete instrumental especializado, pues se puede realizar suspendiendo directamente las esporas o los píleos molidos con el agua de riego (Rossi *et al.* 2007). Además, este tipo de inóculo tiende a presentar una alta variación genética y es tolerante al almacenamiento (Repáč, 2011; Rossi *et al.* 2007). Sin embargo, la cantidad de inóculo que se puede obtener se ve limitada a la producción de esporomas de esa temporada. Además, la velocidad de formación de micorrizas es lenta en comparación con el inóculo vegetativo (Repáč, 2011).

El inóculo vegetativo consta de micelio metabólicamente activo obtenido en cultivos puros. A pesar de que el cultivo a gran escala de los HECM es complicado debido al crecimiento lento que presentan, aunado a que no es sencillo aislarlos y cultivarlos (Repáč, 2011; Rossi *et al.* 2007), una vez logrado el aislamiento y encontrando un buen protocolo de propagación, es posible mantener un cultivo indefinidamente bajo condiciones de laboratorio (de la Bastide *et al.* 1994). Pese a los inconvenientes que presenta, el inóculo vegetativo es el único capaz de satisfacer las demandas de la industria forestal (Rossi *et al.* 2007). El inóculo vegetativo se puede aplicar directamente en la superficie de la raíz de la planta o aplicarse suspendido en agua de riego, antes, durante o después de la germinación de las semillas (Pera y Parladé, 2005; Rossi *et al.* 2007).

2.4. Evaluación de la calidad de la planta micorrizada

Para medir el efecto de la inoculación sobre las plantas hospederas se evalúa la calidad de la planta de manera tradicional a como se hace con las plantas en vivero. La calidad de la planta se define como la capacidad que tienen los individuos de establecerse y sobrevivir en el campo (Prieto *et al.* 2009) y se estima midiendo un conjunto de

características morfológicas y fisiológicas que en conjunto dan una idea sobre el estado de la planta.

De manera general, las características morfológicas que se miden son el diámetro, la altura y la biomasa que alcanzaron las plantas (Quiroz-Marchant *et al.* 2009). Estas características son ampliamente evaluadas debido a que pueden medirse de forma simple sin la necesidad de utilizar instrumentos especializados. Entre más altos sean los valores obtenidos en estos parámetros, se espera que las plantas sean más resistentes y capaces de sobrevivir (Arnold, 1996; Duryea, 1985). Los rangos entre los cuales deben estar las medidas son específicas para cada especie de planta producida (Secretaría de Economía, 2016).

Los parámetros de crecimiento por sí solos no proporcionan la información completa sobre el estado de las plantas. Es por esto que, además de las medidas morfológicas, es necesario establecer una relación entre ellas a través de índices de crecimiento (Quiroz-Merchant *et al.* 2009). Uno de los índices evalúa la relación entre la talla aérea y el diámetro (RAD) y otro usa la relación entre el peso seco aéreo y el peso seco radical (RAR) para estimar qué tan equilibrada está la distribución de la biomasa de la planta. Finalmente, el Índice de Calidad de Dickson (DQI) (Dickson, 1960) expresa el equilibrio de la distribución de la masa y la robustez, evitando seleccionar plantas desproporcionadas. Para ello toma en cuenta el peso seco total, la RAD y RAR. Para coníferas se recomienda plantas con DQI mayores a 0.15 (Hunt, 1990).

Los parámetros fisiológicos de la calidad miden la distribución de biomasa y carbono en la planta, además miden la respuesta de las plantas a distintos estreses (López-Gutiérrez *et al.* 2018; Robles-Villanueva *et al.* 2017). Uno de los parámetros fisiológicos más ampliamente utilizados para medir la calidad de la planta es la concentración de macronutrientes (N, P y K) en el follaje y la parte radical (Landis, 1985). La concentración de nutrientes proporciona información sobre la condición nutricional y se relaciona con el comportamiento que pueden exhibir en campo (Quiroz-Merchant *et al.* 2009). Por otra parte, para evaluar la respuesta de las plántulas a distintos estreses

se puede medir el potencial hídrico o el intercambio de gases (Robles-Villanueva *et al.* 2017).

2.5. Preservación de HECM

La preservación de HECM es complicada debido a que su micelio crece a un ritmo lento y es más sensible a condiciones ambientales. Además, en condiciones *in vitro* los HECM no producen estructuras de resistencia (Sundari y Adholeya, 1999; Homolka *et al.* 2014). Para preservar HECM se han utilizado diferentes métodos que van desde el mantenimiento en suelo o sustrato a otros que reducen o arrestan el crecimiento o el metabolismo (Corbery y Le Tacon, 1997; Marx y Daniel, 1976; Homolka *et al.* 2014).

Dentro de los métodos de preservación de HECM a corto y mediano plazo, el cultivo continuo en medios nutritivos es el más ampliamente utilizado (Lalaymia *et al.* 2014). Sin embargo, este método requiere de resiembras constantes en las cuales, además de requerirse una gran cantidad de material, se presentan una alta probabilidad de contaminación y modificación de características genéticas de las cepas (Marx y Daniel, 1976; Smith y Onions, 1994). Por otro lado, mejores resultados en cuanto a factibilidad económica y estabilidad de las cepas han sido reportados con técnicas de preservación a mediano plazo, como el almacenamiento del micelio en agua (Richter *et al.* 2016), aceite mineral (Smith y Onions, 1994) o la inmovilización en perlas de alginato (Oliveira *et al.* 2006).

En particular, la inmovilización en perlas de alginato ha resultado útil para la preservación de HECM, ya que es barato, simple y no ejerce daño físico a las hifas (Abdullah *et al.* 1995). Además, las perlas pueden ser almacenadas fácilmente y no ocupar mucho espacio (Kuek *et al.* 1992). En este sistema de inmovilización se crea una barrera física con el exterior, que además de proteger al micelio, ayuda a retener la humedad, por lo que el hongo puede sobrevivir mayor tiempo en el sustrato (Garbaye, 1990; Kuek *et al.* 1992). La inmovilización en gel de alginato también protege al micelio en contra de antagonistas presentes que el suelo, asegurando su viabilidad hasta que el hospedero desarrolle raíces receptoras (Garbaye, 1990).

Los métodos de preservación a largo plazo, como la criopreservación, se reportan como la forma más confiable para el almacenamiento de hongos filamentosos (Crahay *et al.* 2017). Estos métodos son capaces de reducir o arrestar el crecimiento o el metabolismo e incluso pueden mantener características como la infectividad y la efectividad (Crahay *et al.* 2013, 2017; Piattoni *et al.* 2017). Sin embargo, estos tipos de preservación no son ampliamente utilizados para HECM, debido a que los HECM carecen de estructuras de resistencia, por lo que no se adaptan muy bien a estas metodologías (Lalaymia *et al.* 2014).

3. Antecedentes y modelos de estudio

3.1. Antecedentes

México tiene un problema muy grande de degradación de sus tierras forestales (CONAFOR, 2019), el cual se ha tratado de contrarrestar mediante los programas de reforestación nacionales con producción de planta en vivero (CONAFOR, 2010; López-Gutiérrez *et al.* 2018). Sin embargo, los programas de reforestación gubernamentales alcanzan una tasa de supervivencia de plantas menores al 50% durante el primer año (Burney *et al.* 2015), pero usualmente este porcentaje baja hasta el 5% en los años posteriores (Ricker *et al.* 2010). Se estima que el 13% de la mortalidad está relacionado con la mala calidad de las plantas (Orozco-Gutiérrez *et al.* 2010).

Un gran número de trabajos han sugerido la aplicación de HECM en vivero para mejorar la calidad de la plantas (Brundrett *et al.* 1996; Fortin *et al.* 1983; Garbaye *et al.* 1988; Gover y Le Tacon, 1993; Rincón *et al.* 2007). Esta propuesta surgió al evidenciarse que las plantas presentan problemas de crecimiento cuando son propagadas en sustratos que carecen de HECM (Smith y Read, 2008). Sin embargo, se ha recalcado el uso de especies de HECM simpátricas (Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019), pues están genéticamente predispuestas a asociarse con sus hospederos y naturalmente adaptadas a las condiciones edáficas y locales. A pesar de ello, la micorrización con HECM seleccionados, más allá de ensayos experimentales, es una práctica poco utilizada en México (Pérez- Moreno y Martínez-Reyes, 2014; Pérez-Moreno *et al.* 2020).

Los porcentajes de micorrización en plantas hospederas varían entre el 20-98% dependiendo del tipo de inóculo que se utilice (Carrasco-Hernández *et al.* 2011; Parladé, 1992; Pera *et al.* 1998; Rincón *et al.* 2001; Pérez-Moreno *et al.* 2020; Rodríguez-Guitérrez *et al.* 2019). El inóculo vegetativo es el que tiene un mayor potencial de satisfacer las demandas de la industria forestal (Marx, 1991; Rossi *et al.* 2007), ya que no es necesario extraer recursos del suelo forestal y se puede tener disponible una gran cantidad de inóculo sin importar el ciclo de vida de las especies (Repáč, 2011). Sin embargo, hay pocos estudios que evalúen las diferencias entre inóculos vegetativos y esporales, con respecto al efecto que tienen en el crecimiento de la planta (Gomes *et al.* 2013; Honrubia *et al.* 1997; González-Ochoa *et al.* 2003; Kaewgrajang *et al.* 2019).

Una de las razones por las que se espera que el inóculo vegetativo tenga un mejor efecto en el crecimiento de las plantas es debido a su naturaleza dicariótica (Daguerre *et al.* 2017), pues en condiciones naturales, este estado es el que predomina en el ciclo de vida de los Basidiomycota, por lo tanto, el proceso de apareamiento entre dos monocariontes ocurre antes del establecimiento de la asociación simbiótica (Niculita-Hirzel *et al.* 2008). A pesar de esto, en condiciones de laboratorio, el micelio de algunos basidiomicetes monocariontes tiene el potencial para formar ectomicorrizas, pero es menor en comparación con el del micelio dicariótico (Kropp y Fortin, 1987).

A pesar de los resultados esperados, se ha reportado un porcentaje de micorrización ligeramente mayor por parte del inóculo esporal, en comparación con el inóculo vegetativo (González-Ochoa *et al.* 2003; Honrubia *et al.* 1997). Tal es el caso de plántulas de *Pinus halepensis* inoculadas con *Pisolithus tinctorius*, las cuales presentaron hasta un 40% de micorrización cuando fueron inoculadas con esporas, en comparación con un 20% y 0% cuando fueron inoculadas con micelio en sustrato y suspensiones miceliales, respectivamente (Honrubia *et al.* 1987). A su vez, en otro trabajo utilizando plántulas de *P. halepensis* y *P. pinaster*, la diferencia entre el inóculo esporal o vegetativo sólo se puede observar con ciertas especies de HECM. En *P. halepensis* se obtiene un mayor porcentaje de micorrización utilizando el inóculo esporal de *Suillus collinitus*, mientras que en *P. pinaster* el inóculo esporal de *Lactarius deliciosus* es el que presenta valores más altos de colonización (González-Ochoa *et al.* 2003).

En cuanto a la efectividad de los tipos de inóculo, se reporta que el efecto positivo en el crecimiento de plántulas de *Arbutus unedo* sólo fue observado con el inóculo esporal de *Pisolithus arhizus* (Gomes *et al.* 2013). Mientras que plántulas de *Dipterocarpus tuberculatus* y *Shorea roxburghii* inoculadas con esporas o micelio de *Astraeus odoratus* no presentaban diferencias en su crecimiento (Kaewgrajang *et al.* 2019).

La inmovilización de micelio en perlas de alginato se ha utilizado ampliamente en la elaboración de inóculos vegetativos de HECM (Kuek *et al.* 1992; Le Tacon *et al.* 1985; Maupérin *et al.* 1987; Mortier *et al.* 1989, Oliveira *et al.* 2006; Pera y Parladé 2005; Repáč y Sendecký; 2018) y se han obtenido buenos resultados en cuanto a colonización y promoción del crecimiento de diferentes especies de plantas (Kropáček *et al.* 1990; Kuek *et al.* 1992; Maupérin *et al.* 1987). Sin embargo, diferentes trabajos sobre inoculación vegetativa (Kuek *et al.* 1992; Le Tacon *et al.* 1985; Maupérin *et al.* 1987; Mortier *et al.* 1989; Parladé *et al.* 2003), concluyeron que la efectividad de la inoculación con perlas de alginato sobre la planta hospedera depende de la especie de HECM con la que se trabaje.

Además de utilizarse como un método de inoculación, la inmovilización del micelio en perlas de alginato también se ha utilizado para la preservación de la viabilidad del inóculo, la cual se ve influida por la temperatura de almacenamiento. Por ejemplo, Lapeyrie y Bruchet (1985) reportaron que el micelio preservado en sustrato de crecimiento de *Pi. tinctorius* puede ser almacenado por más de 19 semanas a 3 °C, mientras que el de *Pa. involutus* no se mantiene viable por más de dos semanas a la misma temperatura. Sin embargo, ninguno de los dos mantiene su viabilidad a 24 °C después de cinco semanas. Por su parte, da Silva *et al.* (1999) pudieron preservar el 100% del micelio encapsulado de *Hebeloma crustuliniforme* por 60 días a 6 y a 25 °C. Mientras que Maupérin *et al.* (1987) reportaron que es posible mantener el micelio de la misma especie en perlas de alginato por hasta cinco meses a 4 °C. Con este mismo método de preservación, Kuek y colaboradores (1992) mantuvieron 11 hongos de los géneros *Paxillus*, *Laccaria* y *Hebeloma* a 25 °C por siete meses.

A pesar de que las estimaciones de viabilidad, infectividad y efectividad se han reportado por especie, poco ha sido mencionado sobre las diferencias intraespecíficas que pueden presentarse. Esto resulta importante debido a que cada especie de hongo existe como un conjunto de individuos genéticos que se nombran genets (Bobbu, 2016). En especial, estudios de genética de poblaciones han demostrado que las comunidades de los HECM presentan una variación considerable dentro de las especies (Johnson *et al.* 2012; Quintero-Corrales, 2019). Estas diferencias pueden afectar en la habilidad de los HECM de colonizar y promover el crecimiento y nutrición de su planta hospedera (Bobbu, 2016).

Las diferencias intraespecíficas en la colonización ectomicorrízica fueron documentadas entre 24 cepas de *L. indigo* y plántulas de *Pinus pinaster* a los 30 y 60 días (Parladé *et al.* 2011). De igual manera, distintas cepas de *L. bicolor* presentan diferentes capacidades de beneficiar a su hospedero cuando se encuentran en sustratos con fuentes inorgánicas de nutrientes (Hazard *et al.* 2017a). Incluso, a nivel estructural de las micorrizas, se observan diferencias entre cepas. Tal es el caso de las micorrizas formadas por dos cepas de *Tuber borchii* en asociación con *Tilia platyphyllos*. Estas micorrizas presentan diferentes características morfológicas en las hifas del manto y presentan diferencias en la capacidad colonizadora de cada cepa con una respuesta diferencial por parte del hospedero (Sisti *et al.* 2003).

3.2. Modelos de estudio

3.2.1. *Laccaria* Berkeley y Broome 1883

Laccaria Berkeley y Broome 1883 (Agaricales, Hydangiaceae) es un género cosmopolita y común de hongos que forma asociaciones ectomicorrízicas con numerosas especies de árboles alrededor del mundo, muchas de las cuales tienen una gran importancia económica (Kropp y Mueller, 1999). Actualmente, se han inferido filogenéticamente 116 especies provenientes de 30 países (Wilson *et al.* 2017). En México, los reportes de diversidad del género incluyen alrededor de 17 especies (Ramos *et al.* 2017). Algunas de las especies del género, como *L. bicolor*, *L. laccata* y *L. proxima*,

han sido fácilmente manipuladas bajo condiciones de laboratorio, por lo que se han usado en la investigación básica y aplicada de las asociaciones ectomicorrízicas (Kropp y Mueller, 1999; Martin y Selosse, 2008; Larsen *et al.* 2011).

El género *Laccaria* se ha utilizado experimentalmente para la inoculación de árboles de importancia económica, como aquellos del género *Pinus* (Carrasco-Hernández *et al.* 2010; López-Gutiérrez *et al.* 2018; Pera *et al.* 1998; Pérez-Moreno *et al.* 2009; Rentería-Chávez *et al.* 2017). La inoculación entre diferentes especies de *Laccaria* y *Pinus* spp. ha mostrado buenos resultados con respecto a la promoción del crecimiento y contenido de nutrientes, en comparación con las plántulas no inoculadas (Carrasco-Hernández *et al.* 2010; Carrera-Nieva y López-Ríos, 2004; López-Gutiérrez *et al.* 2018; Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019). También se ha evidenciado *Laccaria* prevalece en las raíces de plantas inoculadas después del trasplante (de la Bastide *et al.* 1994; Di Battista *et al.* 2002; Franco *et al.* 2014).

3.2.2. *Laccaria trichodermophora* Mueller 1984

Laccaria trichodermophora Mueller 1984 fue descrita a partir de esporomas asociados con *Pinus palustris* en suelo arenoso (Mueller, 1984). Se distribuye desde el sureste de Estados Unidos, pasando por México, y hasta Colombia (Figura 1) (Kropp y Mueller, 1999). Se asocia con la familia Pinaceae en Norte América, aunque se le ha encontrado asociada con *Quercus* tropicales en Costa Rica y Colombia (Mueller y Strack, 1992). También hay reportes excepcionales de su asociación con individuos del género *Fagus* en México (Ramos *et al.* 2017). La característica principal de esta especie es el arreglo perpendicular de las hifas de la cutícula conocido como tricodermo (Mueller, 1984; Osmundson, 2003).

En México, *L. trichodermophora* se ha reportado en la Faja Volcánica Transmexicana, en un rango altitudinal que va de los 3,000 a los 4,000 msnm. Se encuentra asociada, principalmente, a *P. montezumae* y *P. hartwegii* (Ángeles-Argáiz, 2012; 2015; Franco-Maass *et al.* 2016; GBIF Secretariat, 2017; Galindo-Flores *et al.* 2015; Montoya *et al.* 2004; 2014; Pacheco-Cobos *et al.* 2015; Pérez-Silva *et al.* 2011;

Ramos, 2018). Aunque también se le ha encontrado en otros bosques de pino en el país (Kong *et al.* 2018). Los esporomas de esta especie han sido aprovechados por los pobladores de los bosques templados del centro de México, pues es un hongo comestible silvestre que suele fructificar durante toda la temporada de lluvia (Carrasco-Hernández *et al.* 2010; Montoya *et al.* 2004).



Figura 1. Distribución de *Laccaria trichodermophora* (Mapa realizado en QGIS3.12 con datos de ocurrencia de GBIF Secretariat, 2017a).

L. trichodermophora es una especie de interés para ser utilizada en programas de micorrización controlada (Galindo-Flores *et al.* 2015; López-Gutiérrez *et al.* 2018; Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019) porque se asocia con diferentes especies de importancia económica (Galindo-Flores *et al.* 2015). Además, produce abundantes

esporomas en bosques jóvenes, por lo que representan una buena fuente de inóculo (Reverchon *et al.* 2010, 2012). Experimentalmente, *L. trichodermophora* se ha utilizado para la inoculación de plántulas de *P. pringlei* y *P. montezumae* (Galindo-Flores *et al.* 2015; López-Gutiérrez *et al.* 2018; Rodríguez-Gutiérrez, 2019), con las cuales se comprobó su asociación *in vitro*. Además, la inoculación propició un aumento en el peso seco, la talla aérea y el contenido de nutrientes de las plántulas (López-Gutiérrez *et al.* 2018; Rodríguez-Gutiérrez, 2019). las cuales presentaron un 30% de supervivencia en campo después de un año de trasplante, en comparación con un 0% de las plantas no inoculadas (López- Gutiérrez *et al.* 2018).

3.3.3. *Pinus* Linneo 1753

Pinus Linneo 1753 es un género compuesto por plantas leñosas, generalmente árboles, que se distribuyen en todo el hemisferio norte. Dentro de la familia Pinaceae, es el género más diverso (Farjon, 1996). México representa un centro importante de diversificación de este género, pues cuenta con 60 de las 142 especies descritas en el mundo, además, presenta un alto porcentaje de endemismos concentrados en islas biogeográficas (Sánchez-González, 2008).

Especies nativas de este género han sido gradualmente incorporadas a los programas de reforestación en el país (Farjon, 2013). Esto debido a que las actividades económicas relacionadas al aprovechamiento de los recursos forestales se enfocan principalmente en especies de este género (Burney *et al.* 2015). Además, es uno de los géneros forestales que presenta mejores resultados en cuanto a supervivencia de la planta en vivero (Pérez-Moreno *et al.* 2009).

3.3.4. *Pinus montezumae* Lambert 1832

Pinus montezumae Lambert 1832 se encuentra distribuido en una amplia gama de condiciones edáficas y climáticas a lo largo de las regiones montañosas del centro y sur de México y el altiplano guatemalteco (Farjon, 2013) (Figura 2). En México se distribuye en la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre Oriental, la Faja Volcánica Transmexicana y la Sierra Madre del Sur (Sánchez-González, 2008). Su rango altitudinal de distribución

va de los 2,000 a los 3,200 msnm, sin embargo, hay registros debajo de 2,000 m, principalmente en Nayarit, Nuevo León y Tamaulipas (Farjon, 2013).

Los árboles de esta especie se han utilizado con éxito en varios programas de reforestación, para la protección de cuencas hidrogeográficas y restauración de suelos degradados (CONAFOR, 2012). De igual manera, es considerada una especie maderable con gran importancia económica, ya que se utiliza en la industria de la construcción y elaboración de muebles, además clasifica como excelente para la fabricación de papel (CONAFOR, 2012; Farjon, 2013).

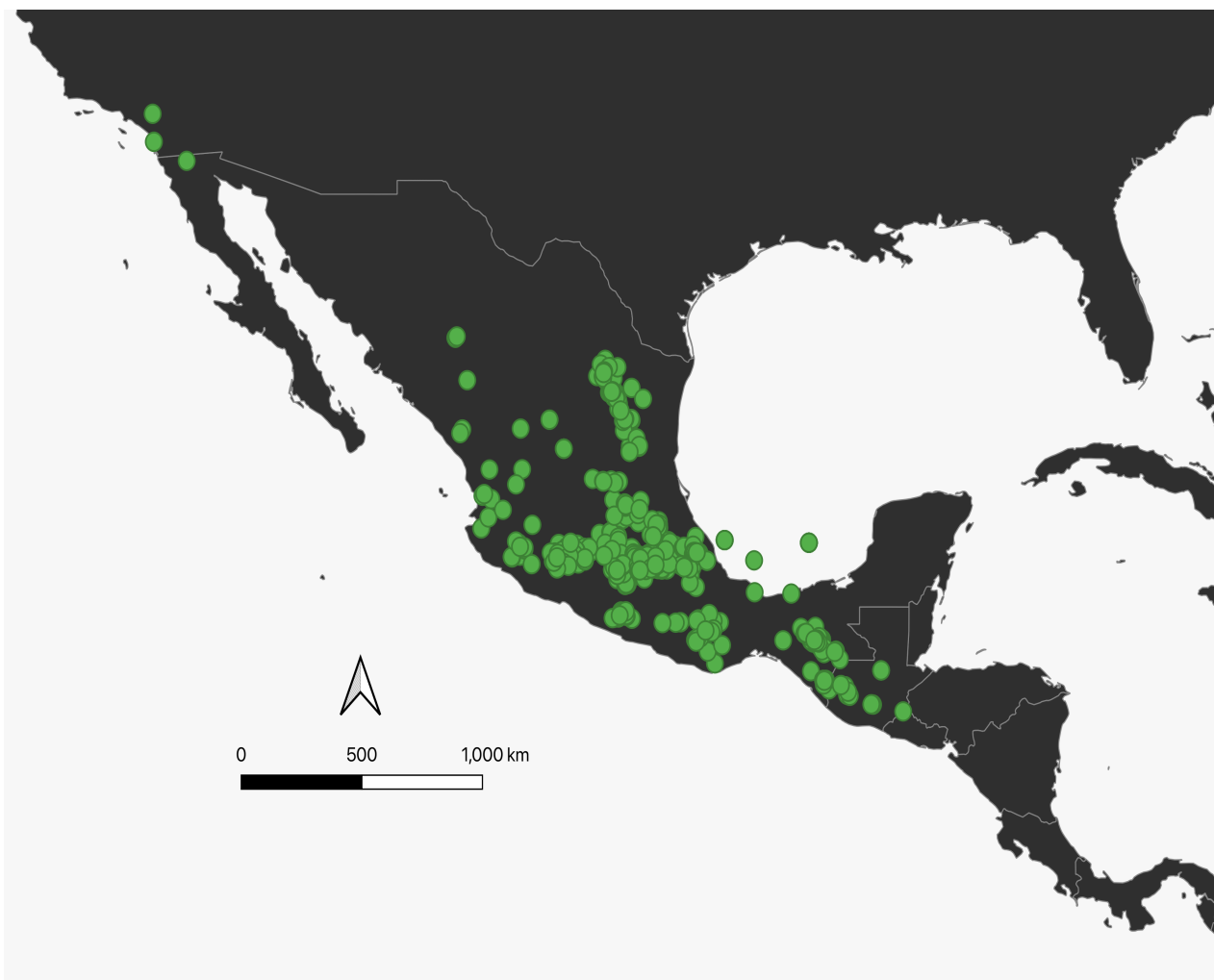


Figura 2. Distribución de *Pinus montezumae* (Mapa realizado en QGIS3.12 con datos de ocurrencia de GBIF Secretariat, 2017b).

4. Justificación

Los programas de reforestación en México son poco exitosos. Gran parte de este fracaso está asociado con la mala calidad de la planta producida. Una manera de mejorar la calidad de la planta es mediante la micorrización controlado. Particularmente, la micorrización controlada con inóculo vegetativo ofrece ventajas técnicas en comparación con el los inóculos natural y esporal. Sin embargo, es necesario evaluar la viabilidad, infectividad y efectividad del inóculo en particular, en interacción con la planta a producir, en este caso *Laccaria trichodermophora* y *Pinus montezumae*.

5. Objetivos

General

Evaluar la viabilidad, infectividad y efectividad del inóculo vegetativo ectomicorrízico de *Laccaria trichodermophora* al inocular plántulas de *Pinus montezumae in vitro* y en contenedor.

Particulares

1. Medir la viabilidad del inóculo vegetativo al ser preservado en una matriz polimérica.
2. Documentar la capacidad formadora de ectomicorrizas del inóculo vegetativo de *Laccaria trichodermophora* en las raíces de *Pinus montezumae* en condiciones *in vitro*.
3. Comparar la capacidad formadora de ectomicorrizas de cuatro cepas de *L. trichodermophora*.
4. Comparar el efecto del tipo de inóculo (vegetativo, esporal y mixto), sobre el crecimiento de *P. montezumae*.

6. Hipótesis

H1: Si las perlas de alginato son capaces de proteger al micelio, entonces el inóculo se mantendrá viable por varios meses, independientemente de la temperatura de almacenamiento.

H2: Si el inóculo vegetativo es metabólicamente activo y dicariótico, entonces tendrá la capacidad de asociarse a su planta hospedera *in vitro*.

H3: Si las cepas de una misma especie de HECM tienen diferentes edades y presentan diferencias genéticas importantes, entonces presentarán diferencias en la capacidad de colonizar a su hospedero.

H4: Si el inóculo vegetativo tiene una mayor capacidad de infectar a su hospedero, entonces tendrán una mayor efectividad en el crecimiento y calidad de sus plantas hospederas.

7. Método

7.1. Diseño experimental

Con el fin de abordar cada uno de los objetivos particulares se plantearon tres experimentos:

Experimento 1: Viabilidad y recuperación del micelio.

Experimento 2: Infectividad del inóculo vegetativo.

Experimento 3: Efectividad de diferentes métodos de aplicación del inóculo vegetativo.

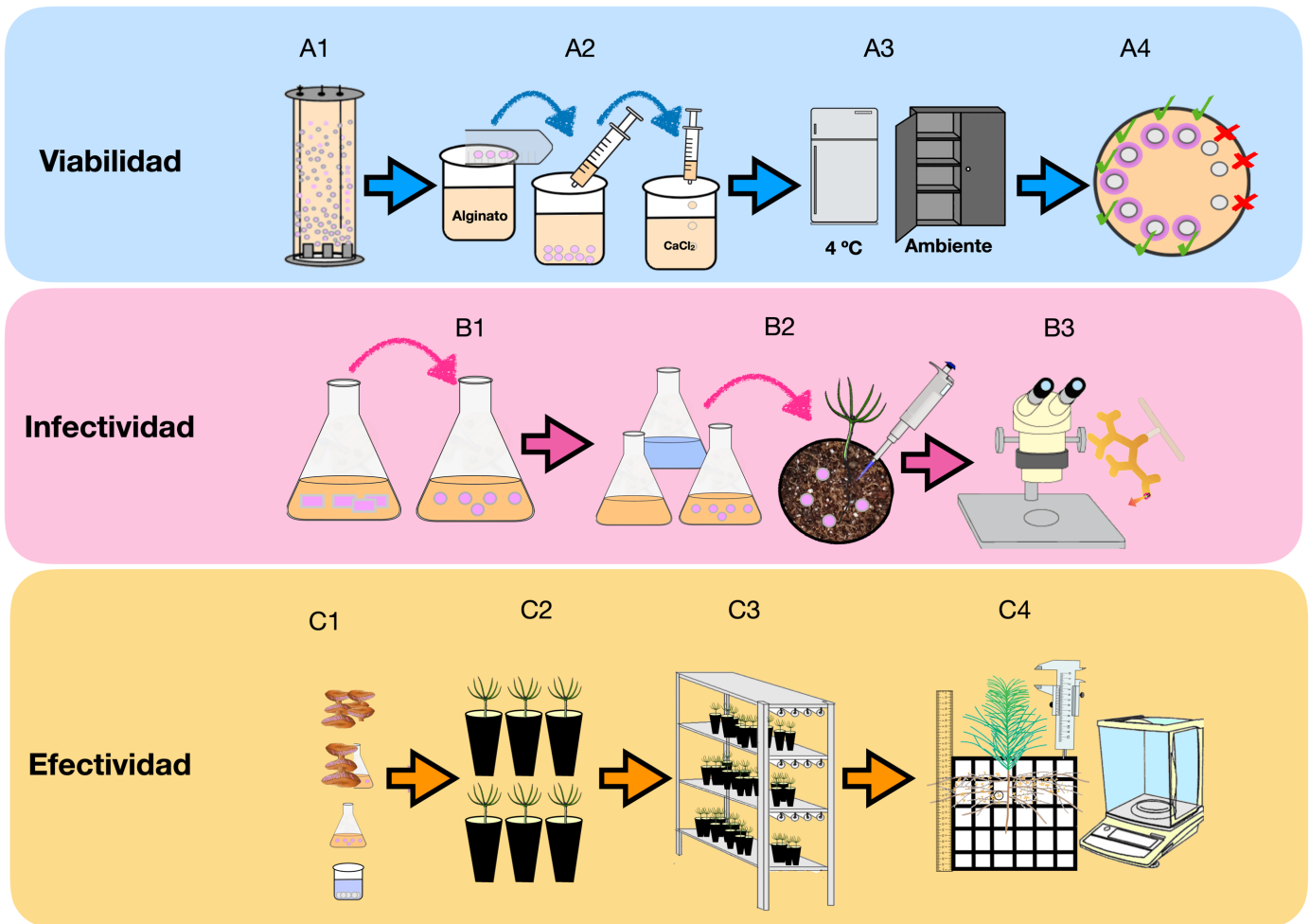


Figura 3. Diagrama de flujo de la metodología para la evaluación de la viabilidad, infectividad y efectividad del inóculo vegetativo ectomicorrízico de *Laccaria trichodermorphora*. **A)** La viabilidad fue evaluada mediante la propagación en biorreactor (A1) y posterior encapsulación del micelio en perlas de alginato (A2), las cuales se almacenaron a dos temperaturas diferentes (A3) para finalmente evaluar el porcentaje de perlas de las cuales emergió micelio al colocarse en cajas Petri con medio PDA (A4). **B)** La infectividad se evaluó mediante la propagación de micelio de cuatro cepas en matraces (B1) que sirvieron como inóculo para los microcosmos montados en cajas Petri (B2) y después de 6 meses, evaluar la colonización en las raíces de *Pinus montezumae*. **C)** La efectividad se midió mediante la inoculación con esporas, micelio en suspensión, micelio encapsulado y una mezcla de esporas y micelio (C1) de plántulas en tubetes (C2) que se mantuvieron en una cámara de propagación de planta (C3), y a las cuales, después de 12 meses posteriores a la inoculación, se les midieron distintos parámetros de crecimiento. Ilustraciones hechas en GIMP-2.10.

7.2. Viabilidad y recuperación del micelio

Este experimento fue diseñado para medir la viabilidad del inóculo vegetativo al ser preservado en una matriz polimérica de alginato de Ca. Para esto se aprovechó micelio producido en biorreactor de columna de burbujas de la Unidad de Bioprocesos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas. La recuperación del micelio inmovilizado en las perlas de alginato fue detectada al sembrarlas en caja Petri 1, 3 y 6 meses después de ser almacenadas a 4 °C y a temperatura ambiente.

7.2.1. Inmovilización del micelio en perlas de alginato

El micelio fue producido en un biorreactor de columna de burbujas con 5 L de medio BAF (dextrosa: 10 g; peptona: 2 g; extracto de levadura: 0.2 g; CaCl₂; KH₂PO₄: 0.5 g; MgSO₄:0.5 g; FeCl₃:10 mg; ZnSO₄: 1 mg; MnSO₄: 5 mg; tiamina HCl: 100 µg; biotina: 1 µg, ácido fólico: 100 µg; inocitol: 50 µg; cloranfenicol: 0.1 g; H₂O: 1000 ml), pH inicial libre 5.5, 25 °C (± 0.4), inoculado a 2% y a 0.31 vvm de aire. Este procedimiento fue realizado en la unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. El protocolo de propagación de micelio en biorreactor de columna de burbujas se detalla en Ángeles-Argáiz *et al.* (2020).

Para la inmovilización del micelio, este se filtró al vacío en condiciones de esterilidad. Después, el micelio (2.5 g peso fresco) se depositó en un tubo de plástico de 50 mL con agua destilada estéril y perlas de vidrio en el fondo. El tubo se colocó por 2 min en un vórtex para la homogeneización del micelio y se mezcló con un volumen equivalente de solución de alginato de sodio (C₆H₇O₆Na) al 2%. Esta solución de alginato: micelio (1:1) se vació por goteo con una micropipeta a ocho matraces con 50 mL de solución estéril de CaCl₂ a 0.7 M, para formar las perlas por la reacción de polimerización. Se dejó que se llevara a cabo la reacción de polimerización y después de 1 h se realizaron múltiples lavados con agua destilada estéril para eliminar restos de sodio y calcio (Maupérin *et al.* 1987; Ryan, 2001).

Las perlas se cubrieron con un poco agua destilada estéril para evitar su desecación. Los matraces se taparon con tapones de algodón y se conservaron cuatro

matraces para cada tratamiento. Un tratamiento consistió en el almacenamiento de las perlas a 4 °C y otro a temperatura ambiente.

7.2.2. Obtención de datos y análisis

La viabilidad del inóculo inmovilizado en alginato se midió observando el crecimiento y la formación de colonia al sembrar 10 perlas en dos placas Petri con medio PDA para cada tratamiento. Se midió la viabilidad de las perlas a 0, 1, 3 y 6 meses después de la inmovilización. La identidad del micelio que emergió de la perla fue comprobada mediante la secuenciación de la región ITS del rDNA.

7.2.2.1. Extracción del DNA total

La extracción del DNA de dos colonias de cada caja de cada muestra se realizó utilizando el kit X-N-Amp (Sigma-Aldrich®). Este consta de dos pasos: primero, en una campana de flujo laminar se colocaron 20 µL de la solución de extracción en un tubo de 0.2 mL (Axygen™) y se le añadió 1 mm³ de muestra del micelio aéreo de la colonia que emergió de las perlas. La muestra se incubó en un termociclador con un programa de dos temperaturas: 65 °C por 10 min y 95 °C por 10 min. Posteriormente, al tubo se le añadieron 30 µL de la solución de dilución y la reacción se incubó por 30 min a temperatura ambiente, para finalmente almacenar la muestra a 4° C.

7.2.2.2. PCR de la región ITS del rDNA

La amplificación de la región ITS se realizó utilizando el kit Taq PCRx DNA Polymerase (Life technologies, California, USA). Se utilizaron los primers ITS1 con ITS4F (Gardes y Burns, 1993). El programa de PCR fue 4 min iniciales de desnaturalización a 95 °C por 4 min, 40 ciclos que consistieron en: 94 °C por 1 min de desnaturalización, 54 °C por 1 min de alineamiento de los primers, 72 °C por 1 min de extensión. Se continuó con una extensión final de 72 °C por 1 min y se mantuvo a 4 °C. Estas reacciones fueron almacenadas a 4° C.

7.2.2.3. Electroforesis

La amplificación de la región ITS se verificó con una electroforesis en gel de agarosa al 1%: (0.5 g de agarosa, 50 mL de TBE 1X y 5 µL de SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen)), a 80 volts por 50 minutos. Posteriormente, la fluorescencia fue detectada con un sistema de adquisición de imágenes de gel (MultiDoc-It™) acoplado a un transiluminador M-20 (Analytik Jena US LLC).

7.2.2.4. Limpieza de los productos de PCR

La limpieza de los productos de PCR se realizó previo a la reacción de secuenciación. Para este procedimiento, a 3.5 µL del producto de PCR se le añadió el reactivo ExoSAP-IT (Applied Biosystems) diluido con 1 µL de agua destilada estéril en proporción 1:1. Finalmente, las reacciones se incubaron a 37 °C por 45 min para activar la enzima y posteriormente a 80 °C por 15 min para inactivarla.

7.2.2.5. Secuenciación

La secuenciación Sanger y la reacción de secuenciación se realizaron en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la UNAM. Las muestras fueron secuenciadas en ambas direcciones mediante dideoxinucleótidos terminales siguiendo el protocolo BigDye Terminator 3.1 y la electroforesis capilar se realizó en un secuenciador 3130 (Applied Biosystems).

7.2.2.6. Edición de secuencias y BLAST

Los electroferogramas fueron editados manualmente usando el programa Geneious Prime. Las secuencias editadas se alinearon en la base de datos GenBank del National Center of Biotechnology Information (NCBI) (NR Coordinators 2016) usando el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul *et al.* 1990), para así comparar las secuencias obtenidas con otras publicadas con un porcentaje de similitud mayor al 99% y un E-value de 0.0.

7.3. Infectividad del inóculo vegetativo de cuatro cepas de *Laccaria trichodermophora*

Este experimento fue diseñado para evidenciar la capacidad del inóculo vegetativo de *L. trichodermophora* de formar ectomicorrizas en las raíces de *P. montezumae* y comparar la capacidad de formar ectomicorrizas de cuatro cepas de *L. trichodermophora*. Para esto se inocularon plántulas de *P. montezumae* con el micelio de cuatro cepas de *L. trichodermophora* propagado en medio BAF directamente sobre las raíces finas de plántulas de *P. montezumae* en pequeños microcosmos hechos con cajas Petri.

7.3.1. Montaje de los microcosmos

Las semillas de *P. montezumae* fueron sometidas a un proceso de germinación, siguiendo el protocolo de Carrasco-Hernández *et al.* (2010). La viabilidad de las semillas se midió mediante la técnica de sales de tetrazolio. Posteriormente, las semillas se hidrataron por 24 horas en 1 L de agua destilada estéril adicionado con 1 g del fungicida Captán (Agroquímica Tridente). Finalmente, las semillas se desinfectaron superficialmente con agua oxigenada al 30% por 20 min y de 4-6 semillas fueron colocadas directamente en contenedores de producción de pino.

El montaje de los microcosmos se realizó 15 días después del tratamiento de germinación. Primero, se realizó una abertura al borde de 20 cajas Petri de 10 cm de diámetro con una aguja caliente en condiciones asépticas. Siguiendo el procedimiento de Duponnois y Garbaye (1991), las cajas fueron llenadas con una mezcla de turba/vermiculita (1:1) esterilizada por irradiación con rayos gamma a 50 KGy. El sustrato fue esterilizado de este modo, ya que hay reportes de hongos ectomicorrízicos transportados en el sustrato (Ángeles-Argáiz *et al.* 2016). Después, las plántulas germinadas fueron transplantadas sacándolas de los contenedores y colocándolas una por una dejando la parte del tallo y las acículas fuera de la caja a través de la abertura. La raíz se cubrió con el sustrato estéril y se sellaron las cajas con papel film (Parafilm®).

7.3.2. Producción de inóculo de varias cepas de *Laccaria trichodermophora* en medio líquido

Cuatro cepas de *L. trichodermophora* fueron utilizadas en este experimento. Estas cepas son integrantes de un conjunto generado entre los años 2013 y 2015 (Ángeles-Argáiz, 2015; Quintero-Corrales, 2019) y fueron previamente seleccionadas para representar la diversidad genética y fenotípica de *L. trichodermophora* en la FVT (Cuadro 1).

Tabla 1. Procedencia, códigos de acceso del GenBank y números de MEXU de las cepas utilizadas de *Laccaria trichodermophora*.

Cepa	Voucher	MEXU	ITS NCBI	Origen	Latitud	Longitud	Elevación (msnm)	Hospedero
CA15-F10	CA15-F10	29987	MN710481	NT	19.12212	99.77871	4,028	<i>P. hartwegii</i>
CA15-11	CA15-11	29986	MN710460	SN	18.98375	97.28178	3,836	<i>P. hartwegii</i>
CA15-75	CA15-75	29985	MN710467	LM	19.28429	98.041142	3,067	<i>P. montezumae</i>
EF-36	REAA13- 59	27575	KT354980	VP	19.125575	99.21537	3,094	<i>P. montezumae</i>

NT: Nevado de Toluca, Estado de México; **SN:** Sierra Negra, Puebla; **LM:** La Malinche, Tlaxcala; **VP:** Volcán Pelado, Ciudad de México.

Quince días previos a la inoculación de los microcosmos, se tomaron cuatro fragmentos de 1 cm³ del borde de colonias crecidas en caja Petri de cada una de las cepas y se colocaron en matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio líquido nutritivo BAF (dextrosa:10 g; peptona: 2 g; extracto de levadura: 0.2 g; CaCl₂; KH₂PO₄: 0.5 g; MgSO₄:0.5 g; FeCl₃:10 mg; ZnSO₄: 1 mg; MnSO₄: 5 mg; tiamina HCl: 100 µg; biotina: 1 µg, ácido fólico: 100 µg; inositol: 50 µg; clorafenicol: 0.1 g; H₂O: 1000 mL) con un pH inicial de 5.5. Los matraces inoculados se mantuvieron por 15 días en una incubadora a 25 °C y a 100 rpm de agitación orbital.

7.3.3. Inoculación de los microcosmos

La inoculación de los microcosmos se realizó una vez que se observó la presencia de raíces secundarias de las plántulas en las cajas Petri (aproximadamente 1 mes después de la germinación). Esta se realizó quitando ligeramente el sustrato sobre de la raíz de la planta, después se colocaron 5 mL de medio BAF, se le agregaron 5 mL del cultivo líquido de *L. trichodermophora* (aproximadamente 1.25 mg de micelio seco) y se le agregaron 5 mL de agua destilada estéril. Los microcosmos montados se ilustran en la figura 4. Las cajas se sellaron con papel film (Parafilm®) y se cubrieron con fundas hechas para proteger la raíz de la luz.



Figura 4. Microcosmos de *Pinus montezumae* inoculados con micelio de *Laccaria trichodermophora*.

7.3.4. Mantenimiento de las plantas en los microcosmos

Las plantas en los microcosmos se mantuvieron en el cuarto de crecimiento vegetal de la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con las siguientes condiciones: 22.27 ± 0.35 °C, 36 % de humedad relativa y 16 horas de fotoperiodo a 3691.32 ± 322.76 lx. Los riegos se realizaron con una jeringa con agua destilada estéril. Estos fueron hechos semanalmente sin abrir los microcosmos y dentro de una campana de flujo laminar.

Dos semanas posteriores a la inoculación, se revisaron las raíces de las plantas en los microcosmos utilizando un microscopio estereoscópico (Olympus SZ60) y se documentó la presencia de raíces cortas dicotomizadas o en su caso, presencia o ausencia de micorrizas. Esto se hizo cada dos semanas durante seis meses.

7.3.5. Porcentaje de micorrización a los tres meses

La estimación del porcentaje de micorrización de cada una de las plantas en los microcosmos se realizó de manera no destructiva, tres meses posteriores a la inoculación. Esto se realizó con un acetato con cuadrículas de 1 cm², la cual se colocó encima de la caja Petri y, para estimar el porcentaje de micorrización, de ambos lados de la caja se escogieron cinco cuadrantes al azar con la ayuda de una tabla de números aleatorios. En cada cuadrante se midió el total de raíces cortas micorrizadas y el total de raíces cortas no micorrizadas. El porcentaje de micorrización por cuadrante se obtuvo con la siguiente fórmula (López-Gutiérrez *et al.* 2018):

(1)

$$\%m = \frac{RCM}{RCM + RCNM} (100)$$

En donde, RCM corresponde a las raíces cortas micorrizadas y RCNM corresponde a las raíces cortas no micorrizadas.

Finalmente, el porcentaje de micorrización por planta fue calculado como el promedio de los 10 cuadrantes evaluados.

7.3.6. Limpieza de raíces

Seis meses posteriores a la inoculación se realizó la limpieza de las raíces, para la cual se siguió el protocolo de Schweiger *et al.* (2002). Las plantas se colocaron en charola de disección llena de agua y se separó el sustrato de las raíces. Con agujas de disección y jeringas se retiró la mayor cantidad de sustrato sobrante.

7.3.7. Observación y caracterización morfoanatómica de las micorrizas

Para la observación de la anatomía de las micorrizas, se eligieron las puntas micorrizadas más firmes y en mejor estado. Se colocaron en un cubreobjetos con papel film (Parafilm®) y una gota de agua. Con ayuda de un microscopio estereoscópico (Olympus SZ60) y navajas de doble filo se realizaron cortes transversales. Se observaron los cortes con un microscopio óptico (Olympus BX51) a 40x. Aquellos cortes en los que se apreciaban las características anatómicas de la ectomicorriza, se tiñeron con rojo Congo (2% en 30% de etanol). Finalmente, estos cortes se observaron en un microscopio invertido (Zeiss Axio Imager.Z2) en el laboratorio de Morfo-Anatomía y Citogenética del Instituto de Biología de la UNAM. En aquellas cepas en las cuales las puntas formaban micorrizas incipientes y no pudieron ser teñidas, la presencia de hifas se evidenció con una tinción de azul de tripano.

7.3.8. Porcentaje de micorrización a los 6 meses

El sistema radical se montó sobre un acetato con cuadrículas de 1 cm² y encima se colocó una placa de vidrio (Figura 5). Al igual que en la estimación del porcentaje de micorrización a los tres meses (sección 7.3.5), esto se realizó eligiendo 10 cuadrantes al azar, con la ayuda de una tabla de números aleatorios. El porcentaje de micorrización de cada uno de los cuadrantes se obtuvo con la Fórmula 1. Finalmente, el porcentaje de micorrización por planta fue calculado como el promedio de los 10 cuadrantes evaluados.

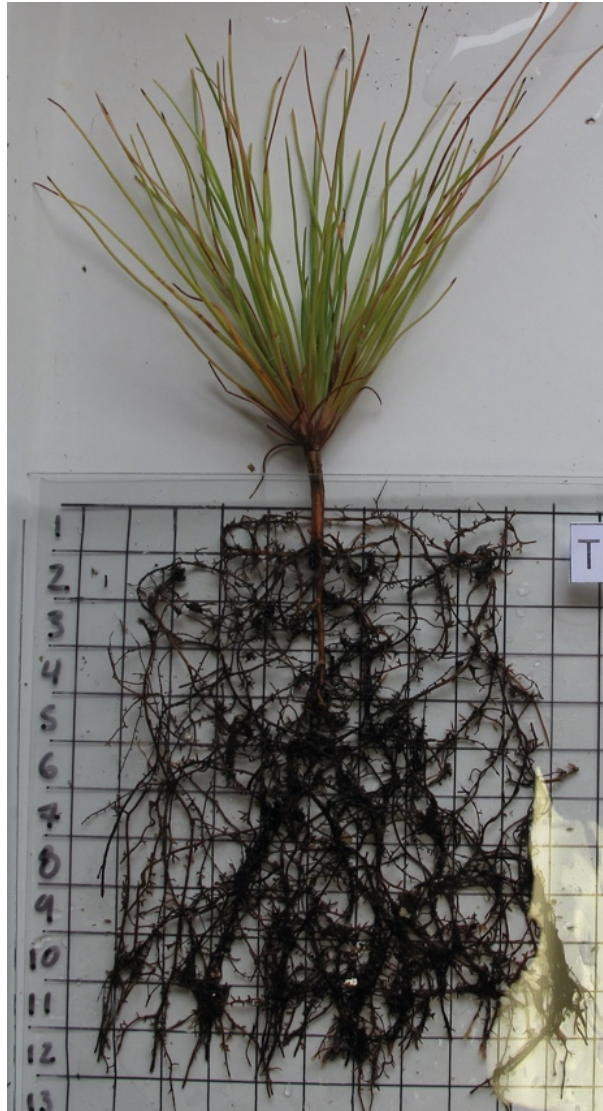


Figura 5. Raíz montada para la estimación del porcentaje de micorrización.

7.3.9. Obtención de datos de crecimiento

Después de medir el porcentaje de micorrización, con ayuda de un vernier se midió el diámetro de las plantas a la altura del collarín. Además, con una hoja milimétrica se midió la talla aérea. Posteriormente, se cortó la planta a la altura del collarín para separar la parte aérea de la parte radical y se colocaron en una bolsa de papel para ser secados a 60 °C hasta obtener un peso constante. Finalmente, se midió el peso seco de cada uno.

7.3.10. Análisis de datos

Con los datos obtenidos de los estimadores de crecimiento (talla aérea, diámetro a la altura de collarín y peso seco) se obtuvieron tres índices de crecimiento. El primer índice fue la Razón Altura/Diámetro (RAD), que es el cociente entre la altura de la parte aérea (cm) y el diámetro (mm). El segundo índice fue la Razón Aérea/Radical (RAR), definida como la razón entre el peso seco de la parte aérea (g) y el peso de la raíz (g) (Quiroz-Marchant *et al.* 2009). El último fue el Índice de Calidad de Dickson DQI, el cual expresa el equilibrio de la distribución de la masa y la robustez (López-Gutiérrez *et al.* 2018) (Fórmula 2)

(2)

$$DQI = \frac{PST(g)}{RAD + RAR}$$

En donde PST corresponde al peso seco total.

Debido al número de individuos por cepa (5), las diferencias de los estimadores de crecimiento y de los índices entre cepas se analizaron con pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis con una significancia de $p \leq 0.05$. Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas, se llevaron a cabo pruebas de comparaciones múltiples de Dunn con ajustes de Bonferroni (Dinno y Newton, 2015). Todos los análisis fueron hechos en R Core Team v 3.6.1 (2019), los gráficos fueron realizados con la paquetería ggplot2 (Wickman, 2016) y la visualización de pares de pruebas no significativas en las comparaciones múltiples se realizó con la paquetería multcompView (Graves *et al.* 2015).

7.4. Efectividad de diferentes métodos de aplicación del inóculo vegetativo

Este experimento fue diseñado para comparar el efecto del tipo de inóculo (vegetativo, esporal y mixto), sobre el crecimiento de *P. montezumae*. Para lo cual se realizaron cuatro tratamientos de inoculación en plantas en contenedor. Dos de estos tratamientos fueron con inóculos vegetativos: micelio de la cepa EF-36 suspendido en agua e inmovilizado en perlas de alginato. Otro tratamiento consistió en la inoculación con

esporas y otro fue una mezcla de esporas y micelio. Como control se utilizó un tratamiento de plantas sin inoculación. Cada tratamiento estuvo integrado por 49 plantas.

7.4.1. Preparación del sustrato, desinfección y germinación de las semillas

Contenedores de plástico de 130 mL fueron lavados con cloro comercial y se llenaron con una mezcla de turba/vermiculita (1:1) esterilizada con rayos gamma a 50 KGy. La irradiación se realizó por las Unidad de Irradiación y Seguridad Radiológica del Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM.

Las semillas de *P. montezumae* fueron sometidas a un proceso de germinación, siguiendo el protocolo de Carrasco-Hernández *et al.* (2010). La viabilidad de las semillas se midió mediante la técnica de sales de tetrazolio. Posteriormente, las semillas se hidrataron por 24 horas en 1 L de agua destilada estéril adicionado con 1 g del fungicida Captán (Agroquímica Tridente). Finalmente, las semillas se desinfectaron superficialmente con agua oxigenada al 30% por 20 min y de 4-6 semillas fueron colocadas directamente en contenedores de producción de pino a una profundidad de 0.5 cm. Los contenedores fueron regados tres veces a la semana con 20 mL de agua destilada estéril en una campana de flujo de laminar hasta que emergieron las plántulas. Después los riegos se realizaron sólo dos veces a la semana.

7.4.2. Elaboración de los inóculos e inoculación

La inoculación de las plántulas en los contenedores se realizó un mes después del tratamiento de germinación de las semillas. Antes de la inoculación se revisaron todos los contenedores para asegurarse de que sólo hubiera una planta por contenedor.

7.4.2.1. Inóculo vegetativo en agua de riego

Para este tratamiento se utilizó micelio de la cepa EF-36 que fue obtenido mediante cultivos líquidos en medio BAF. Para inocular los matraces se tomaron cuatro fragmentos de 1 cm³ de colonias de la cepa EF-36 creciendo en cajas Petri y se colocaron en matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio nutritivo. Los matraces se

mantuvieron a 25 °C y a 100 rpm de agitación orbital por 15 días. Transcurrido ese tiempo, en una campana de flujo laminar se colocó el vaso estéril de una licuadora y se homogeneizó el contenido de dos matraces con cultivo miceliar (50 mL cada uno) por 7 s (Oliveira *et al.* 2006). El micelio homogeneizado se vació en 1.5 L de agua destilada estéril y se le añadieron 30 mL a cada planta (lo que corresponde a 6.2 mg secos de micelio).

7.4.2.2. Inóculo vegetativo encapsulado perlas de alginato

Para este tratamiento se utilizó micelio de la cepa EF-36 que fue obtenido mediante cultivos líquidos en medio BAF, como se detalla en la sección 7.4.2.1. La encapsulación del micelio se realizó como se describe en el experimento de viabilidad (sección 7.2.1), con la modificación que el micelio no fue filtrado, sino que 100 mL de cultivo miceliar se mezclaron con un volumen equivalente de la solución del alginato de calcio al 2%. Después de los lavados para eliminar restos de Cl y Na, dentro de una campana de flujo laminar, se pesó el total de perlas que se produjeron. Posteriormente, a cada planta se le colocaron 5 g de perlas (alrededor de 6.2 mg de micelio seco encapsulado).

7.4.2.3. Inóculo esporal

Para la recolección de esporomas de *Laccaria trichodermophora* se realizaron salidas a campo durante los meses junio a septiembre de 2017. Se visitaron los volcanes Nevado de Toluca, La Malinche, Pelado y Sierra Negra, los mismos en los cuales se obtuvieron las cepas utilizadas en el experimento de infectividad (Figura 6). También se realizaron encargos especiales con recolectores de hongos de poblados cercanos al volcán La Malinche. Se logró juntar un total de 3.8 kg (peso fresco), que correspondían a un total de 1,280 esporomas.

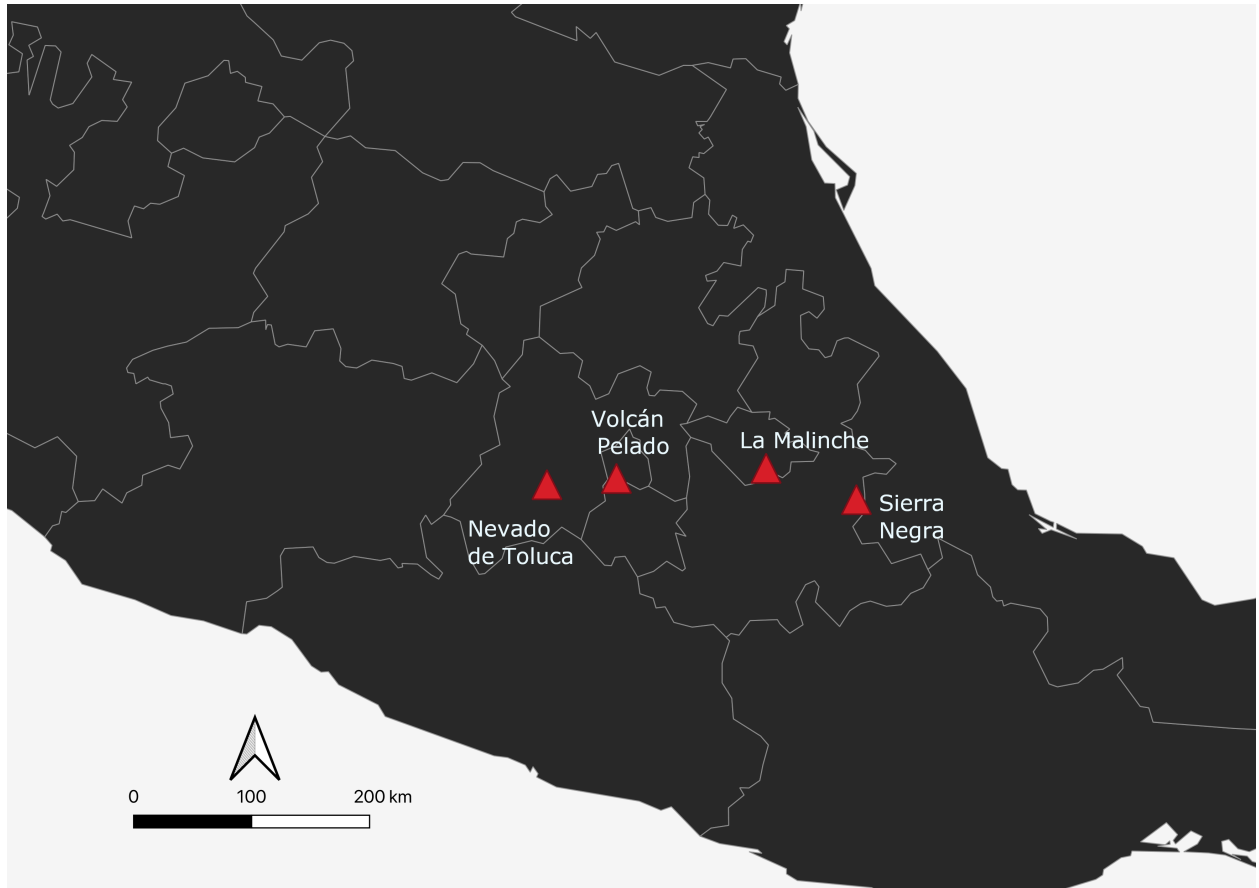


Figura 6. Ubicación de los volcanes en donde se recolectaron los esporomas de *Laccaria trichodermophora* (Mapa realizado en QGIS3.12 con datos de posición de Google Earth, 2020).

Siguiendo la metodología de Carrasco-Hernández *et al.* (2010) se deshidrataron los púleos a una temperatura de 35 °C y se pesaron. En total se obtuvieron 228 g de púleos secos, los cuales fueron triturados con una batidora de inmersión (Robot 200 Inox marca *Taurus*). Se midió la viabilidad de las esporas con la técnica de sales de tetrazolio (Honrubia *et al.* 1992) y se realizó el conteo con una cámara de Neubauer.

A partir del conteo de esporas se determinó que se necesitaban 0.75 g de púleos secos molidos para inocular cada planta con 1×10^7 esporas viables, es decir, alrededor de cuatro esporomas frescos. Por lo tanto, para inocular todo el tratamiento se colocaron 36.75 g de inóculo esporal en un vaso de precipitados con un agitador magnético y 1.5 L de agua destilada estéril. A cada planta se le añadieron 30 mL de la suspensión de esporas.

7.4.2.4. Inóculo mixto

Para este tratamiento se utilizó micelio de la cepa EF-36 que fue producido como se describe en la sección 7.4.2.1. Después, dentro de una campana de flujo laminar se colocó el vaso estéril de una licuadora y se homogeneizó el contenido de un matraz con cultivo miceliar (con 50 mL) por 7 s (Oliveira *et al.* 2006). El micelio homogeneizado se suspendió en 1.5 L de agua destilada estéril con un agitador magnético. A esta suspensión miceliar se le añadieron 18.375 g de píceos secos molidos, lo cual representó la mitad de la dosis del inóculo esporal. Se dejó que los restos de píleo precipitaran y se colocaron 30 mL de la suspensión miceliar con esporas a cada planta.

7.4.3. Mantenimiento del experimento y cosecha

Al igual que en el experimento de infectividad, las plantas se mantuvieron en el cuarto de crecimiento vegetal de la Unidad de Bioprocesos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM a una temperatura de UNAM, con las siguientes condiciones: 22.27 ± 0.35 °C, 36% de humedad relativa y 16 horas de fotoperiodo a 3691.32 ± 322.76 lx. Los riegos se realizaron dos veces a la semana con 20 mL de agua destilada estéril.

Después de 12 meses posteriores a la inoculación, se realizó la cosecha de las plantas. Cada planta se liberó del tubete en el que se encontraba y cuidando el sistema radical, se eliminó el exceso de sustrato. Con el propósito de dejar la raíz lo más limpia posible, se lavó cuidadosamente con agua. Posteriormente, con ayuda de un microscopio estereoscópico, agujas de disección y jeringas, se quitaron los restos de turba o vermiculita que aún se encontraban en las raíces.

7.4.4. Porcentaje de micorrización

La estimación del porcentaje de micorrización se realizó como en el experimento de infectividad (sección 7.3.5). El sistema radical se montó sobre un acetato cuadrado cada cm^2 y encima se colocó una placa de vidrio. Con la ayuda de una tabla de números aleatorios se eligieron 10 cuadrantes al azar. El porcentaje de micorrización de cada uno

de los cuadrantes se obtuvo con la fórmula 1. Posteriormente se calculó el promedio por planta y el promedio por tratamiento.

7.4.5. Obtención de datos de crecimiento

Después de medir el porcentaje de micorrización, se midió el diámetro de las plantas a la altura del collarín con un vernier. Con la ayuda de una hoja milimétrica se midió la talla aérea. Posteriormente, se cortó la planta a la altura del collarín y se secaron a 60 °C dentro de una bolsa de papel. Finalmente, después de una semana, se tomó independientemente el peso seco de la parte aérea y de la raíz.

7.4.6. Análisis de datos

Al igual que en el experimento de infectividad (Sección 7.3.10), con los datos obtenidos de los parámetros de crecimiento (talla aérea, diámetro a la altura de collarín y peso seco) se calcularon tres índices de crecimiento de las plantas (RAD, RAR y DQI), tal como se detalla en la sección 7.3.10. Debido a la diferencia del porcentaje de supervivencia entre tratamientos, las diferencias entre el porcentaje de micorrización, estimadores e índices de crecimiento se analizaron con pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis con una significancia de $p \leq 0.05$. Previamente, se hicieron pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y gráficas cuantil-cuantil. También se realizó la prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de las varianzas. Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas se llevaron a cabo pruebas de comparaciones múltiples de Dunn con ajustes de Bonferroni.

8. Resultados

8. 1. Viabilidad del micelio inmovilizado en perlas de alginato

Los resultados del experimento de viabilidad muestran una tendencia a la disminución de la emergencia de hifas de las perlas de alginato a través del tiempo, independientemente del tratamiento de almacenamiento (Figura 6). En el tratamiento de temperatura ambiente, esta pérdida de viabilidad se observó desde el segundo mes y durante los meses 3 y 6, la viabilidad se redujo hasta el 0 %. Mientras que en el experimento almacenado a 4 °C se mantuvo una viabilidad del 100 % hasta el segundo mes, bajo al 90 % en el tercer mes, pero entre el mes tres y seis, al igual que el otro tratamiento, su viabilidad se redujo hasta el 0 %.

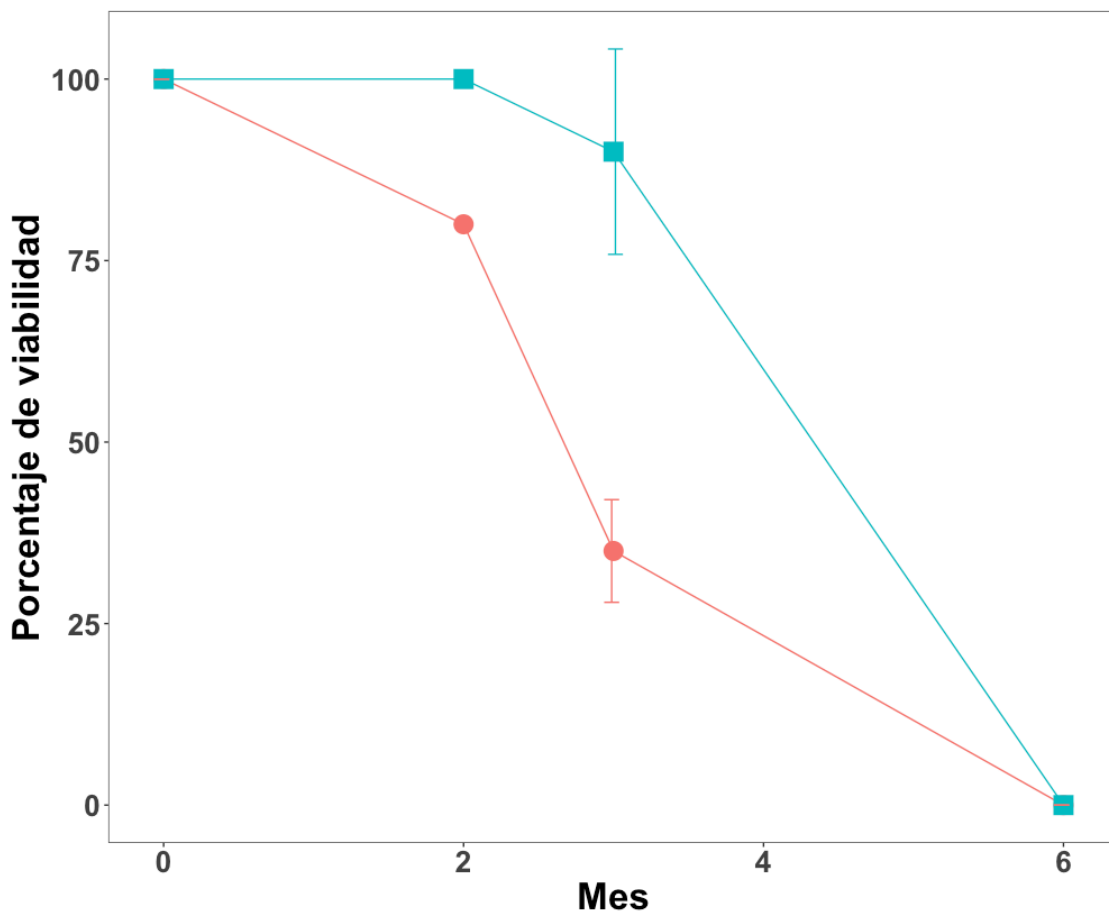


Figura 7. Cambio del porcentaje de viabilidad del micelio de la cepa EF-36 encapsulado en perlas de alginato y almacenado a 4 °C (línea azul) y a temperatura ambiente (línea roja).

8.1.1. Morfología de las colonias

En ambos tratamientos de almacenamiento las colonias se mostraron densas y presentaron una forma de crecimiento circular asimétrica, con márgenes filamentosos difusos y con elevación plana (Figura 8). Además, en ambos tratamientos, las colonias tenían una consistencia seca, filamentososa y opaca con pigmentación blanca.

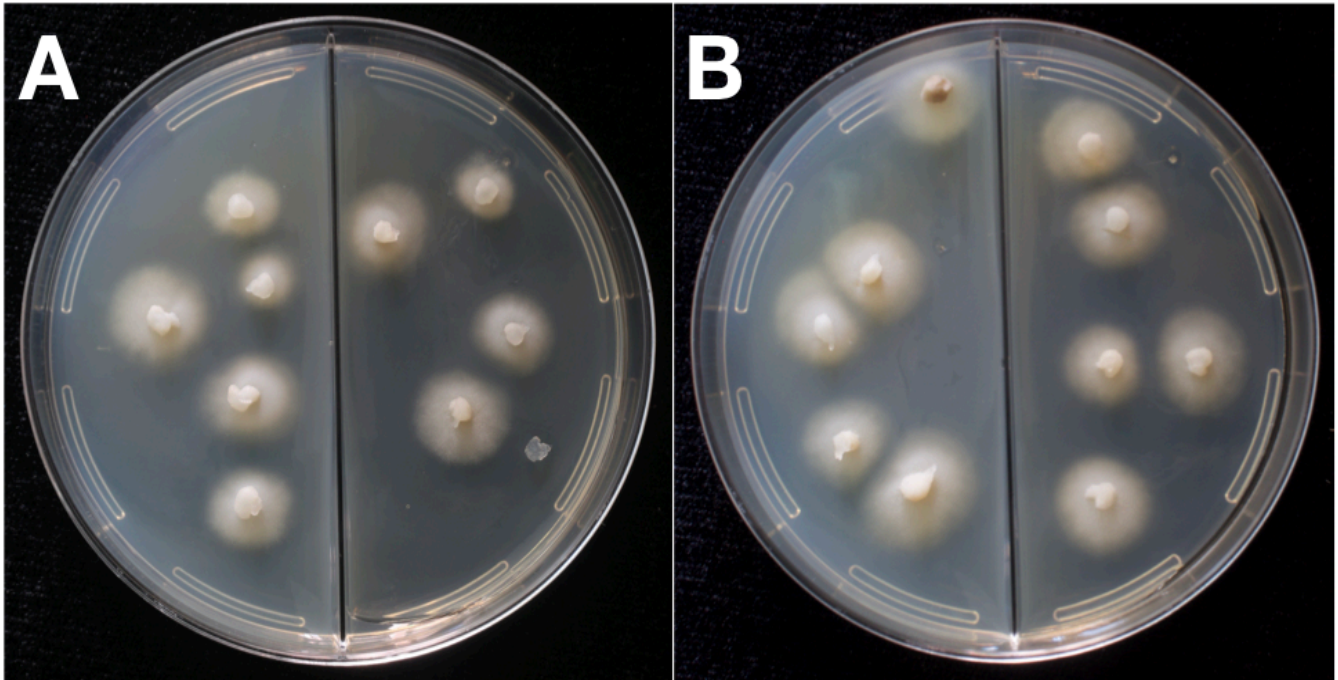


Figura 8. Morfología de las colonias del micelio de la cepa EF-36 encapsulado en perlas de alginato y colocadas en medio PDA. **A)** Perlas almacenadas a temperatura ambiente **B)** Perlas almacenadas a 4 °C.

8.1.2. Identidad del micelio

La identidad del micelio que emergió de las perlas se determinó con el algoritmo BLAST. En todos los muestreos se obtuvieron los mismos resultados. Los códigos de acceso y la identidad de los organismos más parecidos a las secuencias obtenidas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Afinidad genética del micelio emergido de las perlas.

Acceso NCBI	IDNCBI	Similitud	Cobertura	País
KC152145	<i>Laccaria trichodermophora</i>	99.8	99.8	México
KC152146	<i>Laccaria trichodermophora</i>	99.8	99.8	México
KT354980	<i>Laccaria trichodermophora</i>	99.8	99.8	México
KC152147	<i>Laccaria trichodermophora</i>	99.8	99.7	México
JX030197	<i>Laccaria sp.</i>	99.5	99.5	Estados Unidos

8.2. Infectividad de cuatro cepas de *Laccaria trichodermophora*

Los resultados mostraron que la cepa CA15-F10 fue la única que promovió la formación de ectomicorrizas maduras en las raíces de *Pinus montezumae* durante los seis meses que duró el experimento. Las micorrizas formadas por esta cepa presentaron manto incipiente a partir de la quinta semana (Figura 9A) y manto maduro para la octava semana (Figura 9B). Durante las demás observaciones se hicieron evidentes micorrizas en varias etapas de desarrollo (Figura 9C).

Finalmente, a los seis meses se observaron micorrizas incipientes, maduras y senescentes. Las micorrizas maduras presentaban ramificaciones dicotómicas y tenían tonalidades ligeramente anaranjadas con las puntas blancas. El manto presentaba buena visibilidad y la textura de la superficie era ligeramente algodonosa (Figura 10A). Al hacer los cortes se observaron las estructuras que definen la ectomicorriza, como el manto y la red de Hartig, la cual colonizó el espacio intracelular de las células epidérmicas y de

la primera capa de células corticales (Figura 10B). Además, se pudieron observar primordios de esporomas en los microcosmos (Figura 10C).

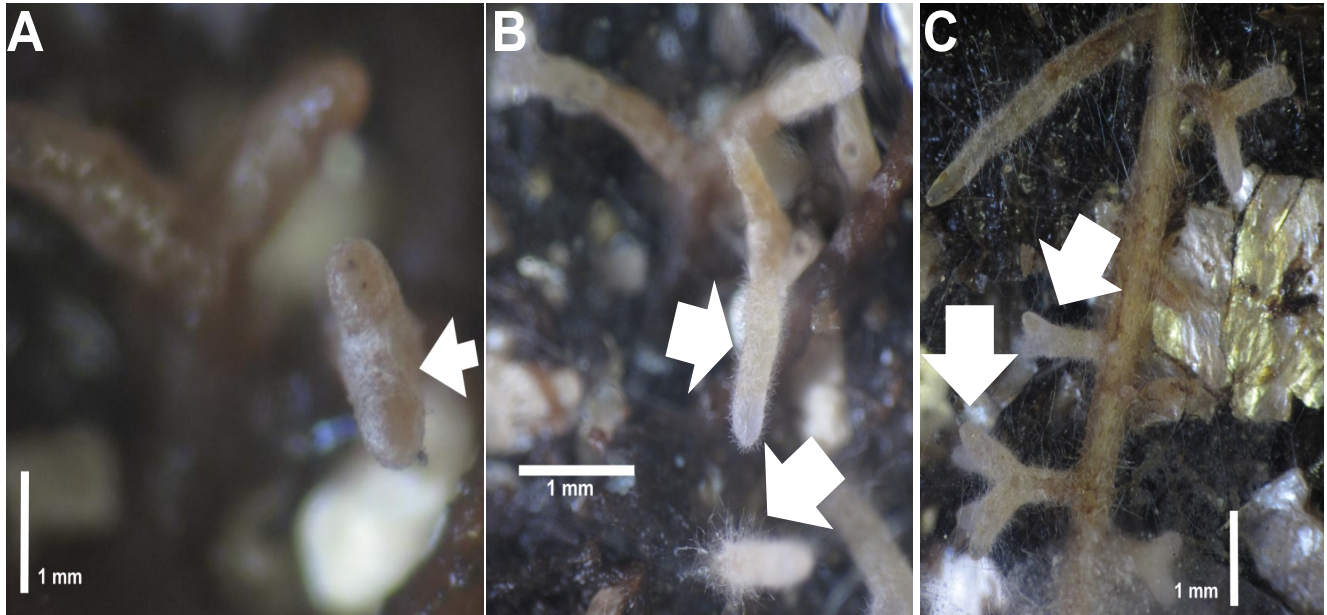


Figura 9. Colonización de raíces de plántulas de *Pinus montezumae* inoculadas con la cepa CA15-F10 de *Laccaria trichodermophora*. **A)** Micorrizas incipientes observadas a las 5 semanas después de la inoculación. Con la flecha se señala el manto incipiente **B)** Colonización de raíces terciarias en desarrollo a las 8 semanas **C)** Raíces cortas con un manto más desarrollado observadas a las 12 semanas después de la inoculación.

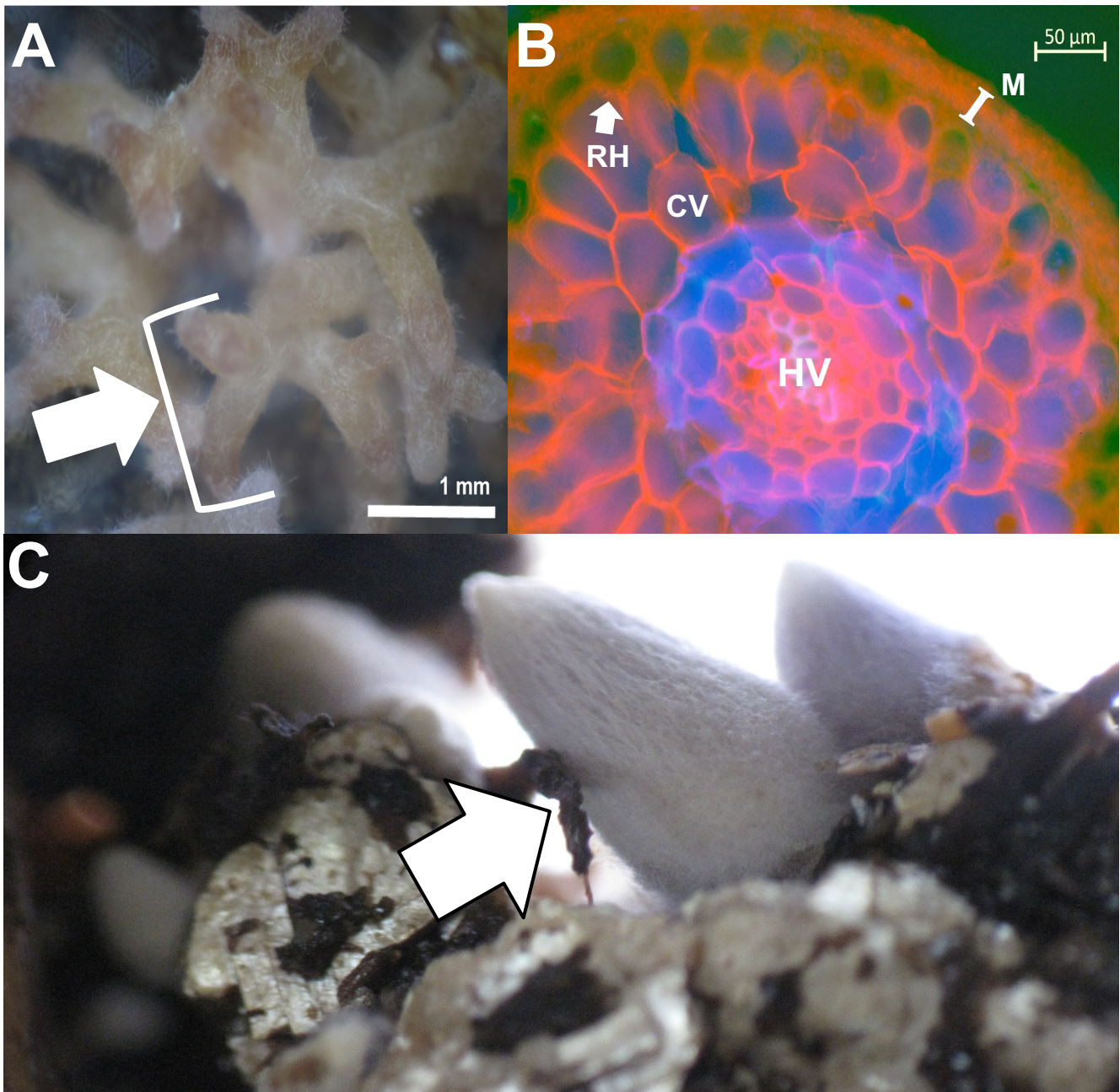


Figura 10. Estructuras asociadas a la colonización ectomicorrízica de raíces de plántulas de *Pinus montezumae* inoculadas con la cepa CA15-F10 de *Laccaria trichodermophora*. **A)** Puntas dicotómicas con manto maduro observadas a las 24 semanas después de la inoculación **B)** Corte transversal de punta colonizada teñida con rojo Congo y observado en un microscopio invertido a 40x. **M:** Manto; **RH:** Red de Hartig; **CV:** Célula vegetal; **HV:** Haces vasculares. **C)** Primordios de esporomas de *Laccaria trichodermophora*.

Ninguno de los pinos inoculados con las otras cepas presentó puntas con manto maduro durante las observaciones. Al momento de la cosecha se observaron estructuras que podrían indicar una interacción de la planta con el hongo. Los pinos inoculados con la cepa CA15-11 presentaron puntas dicotomizadas sin pelos radicales (Figura 11A), pero no se observaron estructuras fúngicas al hacer la microscopía (Figura 11B).

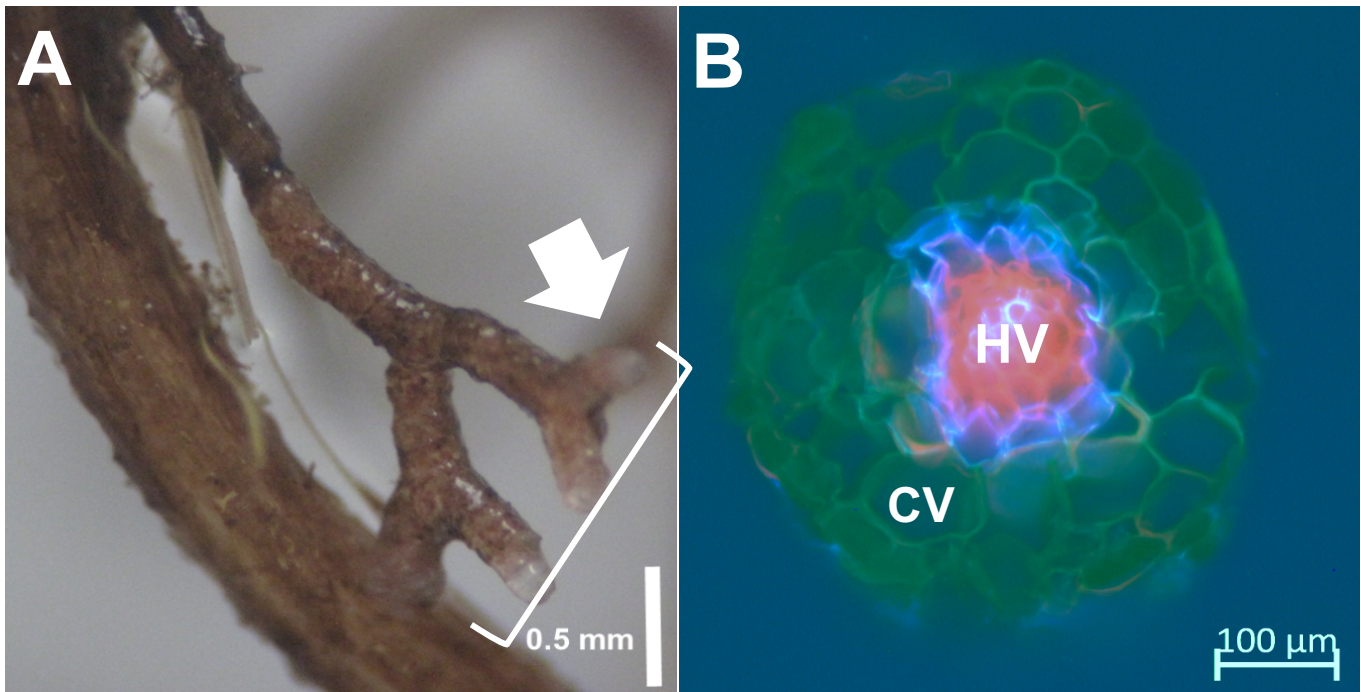


Figura 11. Raíces terciarias de plántulas de *Pinus montezumae* inoculadas con la cepa CA15-11 de *Laccaria trichodermophora*. **A)** Raíces dicotomizadas sin presencia de manto. **B)** Corte transversal de raíz dicotomizada teñido con rojo Congo y observado en microscopio invertido. En el corte no se observa la presencia de estructuras asociadas a la colonización ectomicorrízica. **HV:** Haces vasculares; **CV:** Células vegetales.

A su vez, las plantas inoculadas con la cepa CA15-75 presentaron hifas en la superficie de las raíces (Figura 12A, 12B y 12C), pero no la penetraron, ni desarrollaron manto maduro o red de Hartig (Figura 12 D).

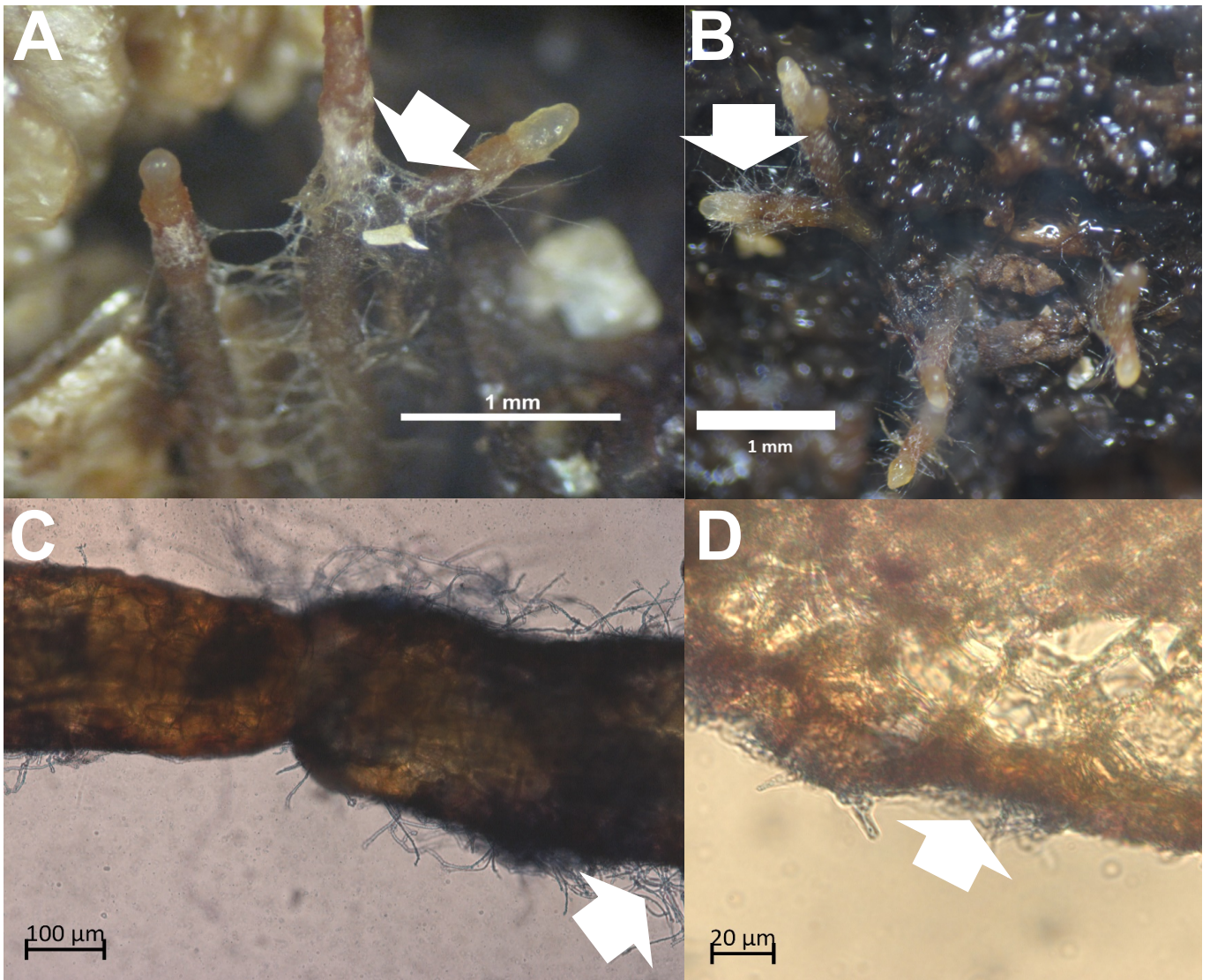


Figura 12. Raíces terciarias de plántulas de *Pinus montezumae* inoculadas con la cepa CA15-75 de *Laccaria trichodermophora*. **A y B)** Raíces dicotomizadas con hifas en la superficie. **C)** Punta teñida con azul de tripano y observado en microscopio óptico. En la imagen se pueden observar las hifas teñidas en la superficie. **D)** Corte transversal de punta teñida con azul de tripano. La flecha indica las hifas rodeando la superficie, pero no penetrando la raíz.

Finalmente, las plantas inoculadas con la cepa EF-36 presentaba raíces cortas dicotomizadas con hifas sobre su superficie (Figura 13A y B), sin embargo no se observaron manto o red de Hartig maduras (Figura 13C).

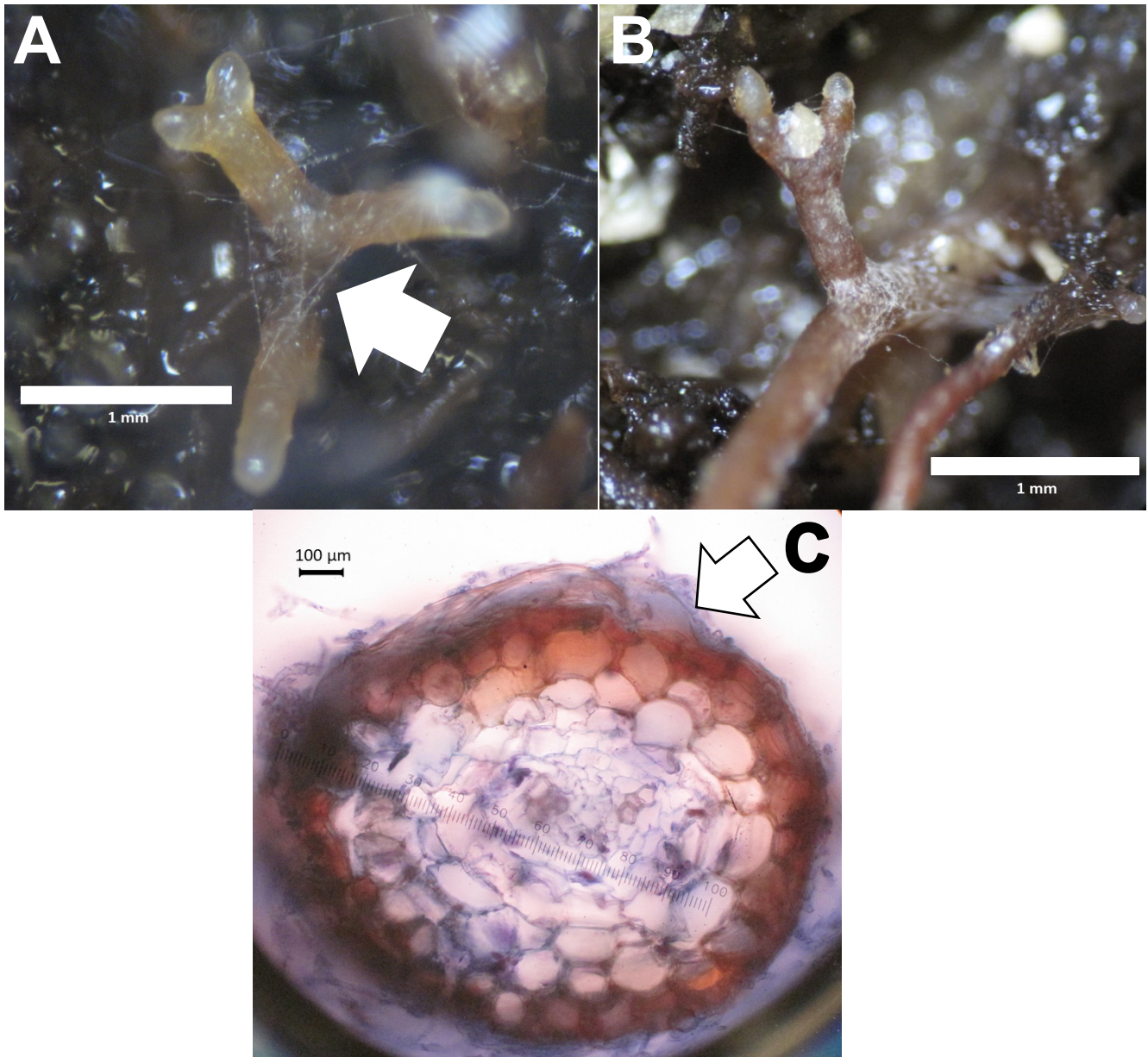


Figura 13. Raíces terciarias de plántulas de *Pinus montezumae* inoculadas con la cepa EF-36 de *Laccaria trichodermophora*. **A y B)** Raíces dicotomizadas con hifas en la superficie que se indican con la flecha. **C)** Corte transversal de punta teñida con azul de tripano. La flecha indica las hifas rodeando la superficie, pero no penetrando la raíz.

8.2.1. Porcentaje de micorrización

Las estimaciones del porcentaje de micorrización indicaron que la cepa CA15-F10 fue la única que tuvo un porcentaje de micorrización en las raíces de las plántulas de *P. montezumae*, tanto a los tres, como a los seis meses posteriores a la inoculación (Figura 14).

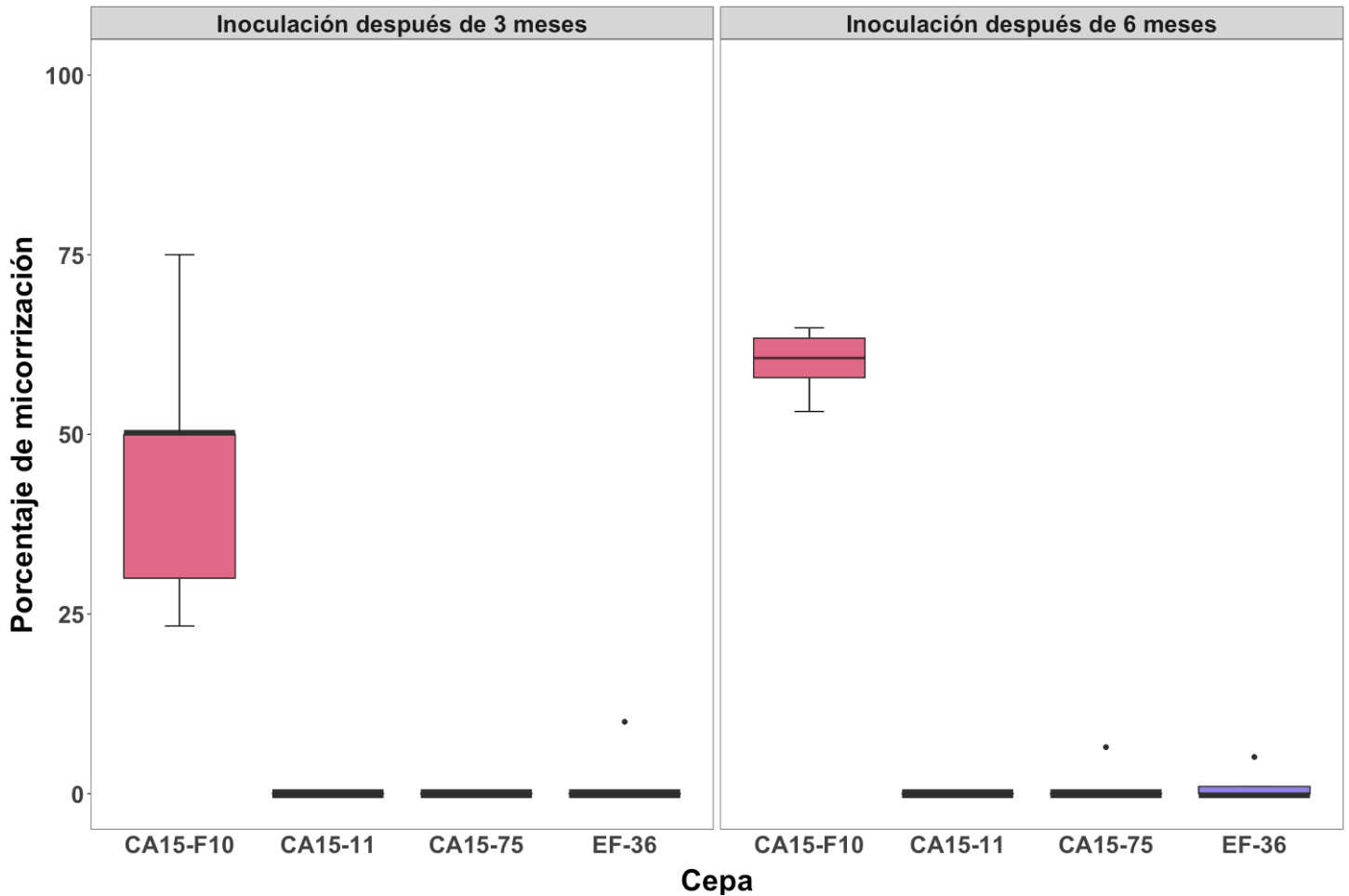


Figura 14. Porcentaje de micorrización de plántulas de *Pinus montezumae* después de tres y seis meses de ser inoculadas con cuatro cepas de *Laccaria trichoderma*.

8.2.2. Efecto de la cepa sobre el crecimiento de las plántulas

No se presentaron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento entre ninguna cepa (Tabla 3 y Figura 15). En cuanto a los índices de crecimiento (Tabla 3 y Figura 16), sólo la razón aérea/radical (RAR) presentó diferencias estadísticamente significativas entre las cepas (Cuadro 3), siendo la cepa CA15-F10 la que tenía un RAR más cercano a 1 (Figura 16C). Los resultados de las pruebas de Dunn para la asignación de grupos se presentan en el ANEXO 1.

Tabla 3. Resultados de la pruebas de Kruskal-Wallis del experimento de infectividad ($p \leq 0.05$).

	χ^2	p	df
Talla aérea	2.1239	0.5471	3
Diámetro	6.0447	0.1095	3
Peso seco aéreo	0.6	0.8964	3
Peso seco radical	5.7657	0.1236	3
RAD	1.4343	0.6975	3
RAR	9.6743	0.02155	3
DQI	2.3829	0.4968	3

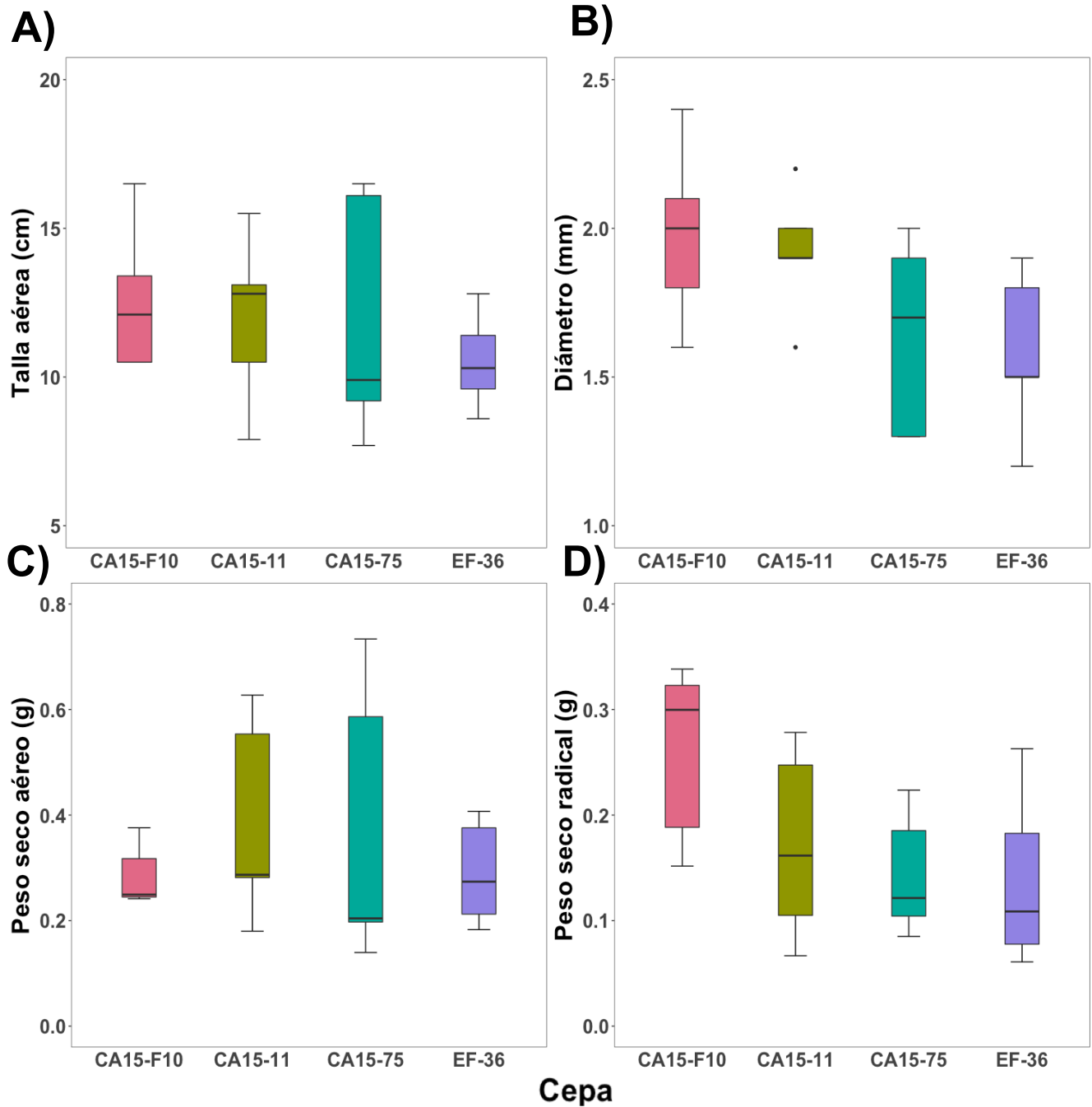


Figura 15. Efecto de la inoculación con cuatro cepas de *Laccaria trichodermorphora* en el peso seco, talla aérea y diámetro de *Pinus montezumae*. **A)** Talla aérea **B)** Diámetro **C)** Peso seco aéreo y **D)** Peso seco radical.

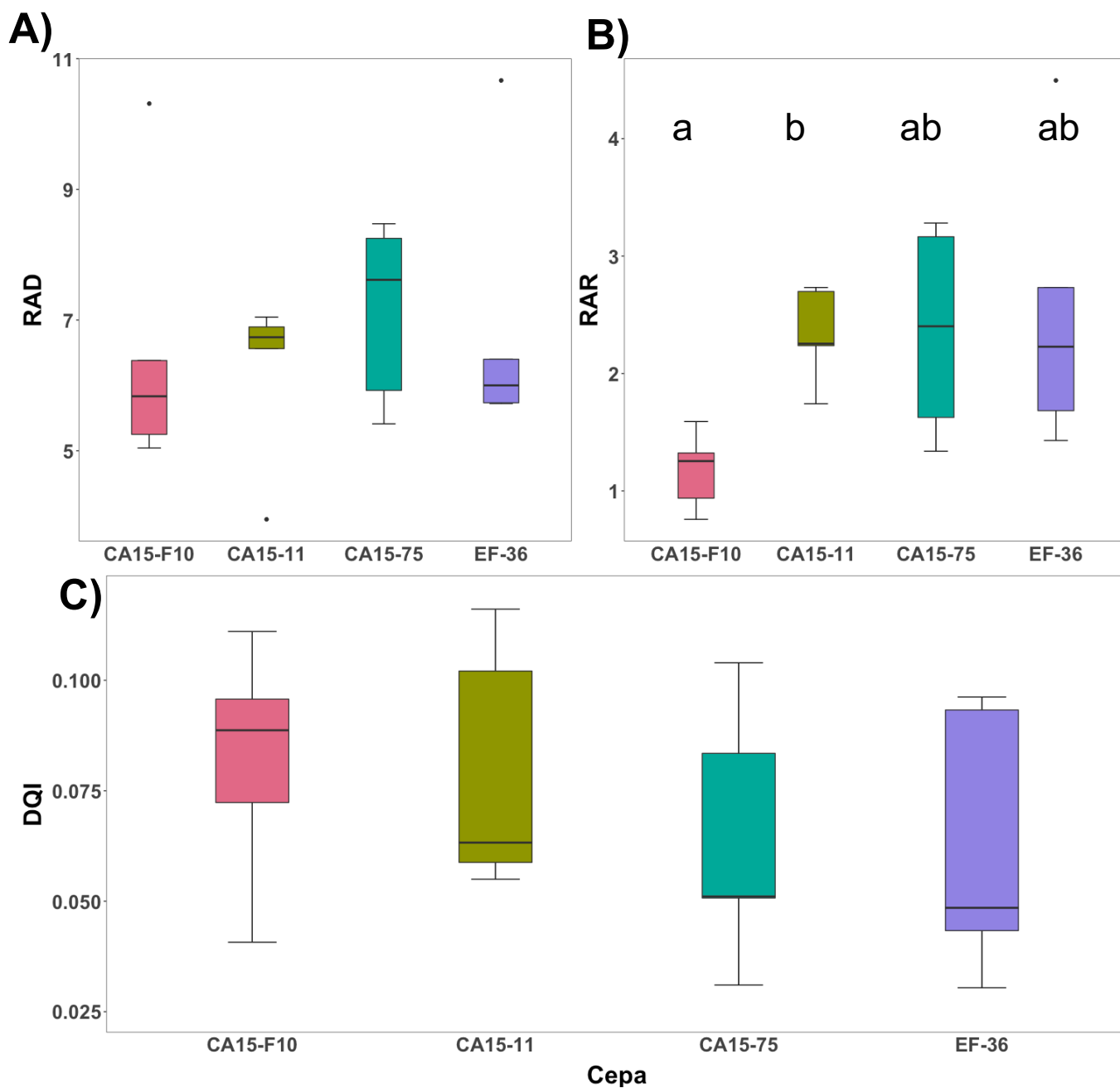


Figura 16. Índices de calidad de los pinos inoculados con cuatro cepas de *Laccaria trichoderophora*. **A)** Razón aérea /diámetro (RAD) **B)** Razón aérea/radical (RAR) **C)** Índice de calidad de Dickson (DQI). La asignación de grupos se realizó solo cuando $p \leq 0.05$, las cepas que comparten una letra no presentan diferencias significativas entre ellas.

8.3. Efectividad de diferentes métodos de aplicación del inóculo vegetativo

En general, se mostró una mortandad muy alta en los tratamientos de esporas y mixto, mientras que en los tratamientos de micelio de la cepa EF-36 suspendido en agua y encapsulado en perlas de alginato, así como en el control, el número de plantas muertas no fue tan elevado (Figura 17). También se evidenció que el inóculo vegetativo de la cepa EF-36 (suspendido en agua o encapsulado en perlas de alginato) no formó micorrizas con las plántulas de *P. montezumae*, mientras que el inóculo esporal y el mixto sí formaron micorrizas (Figura 18).

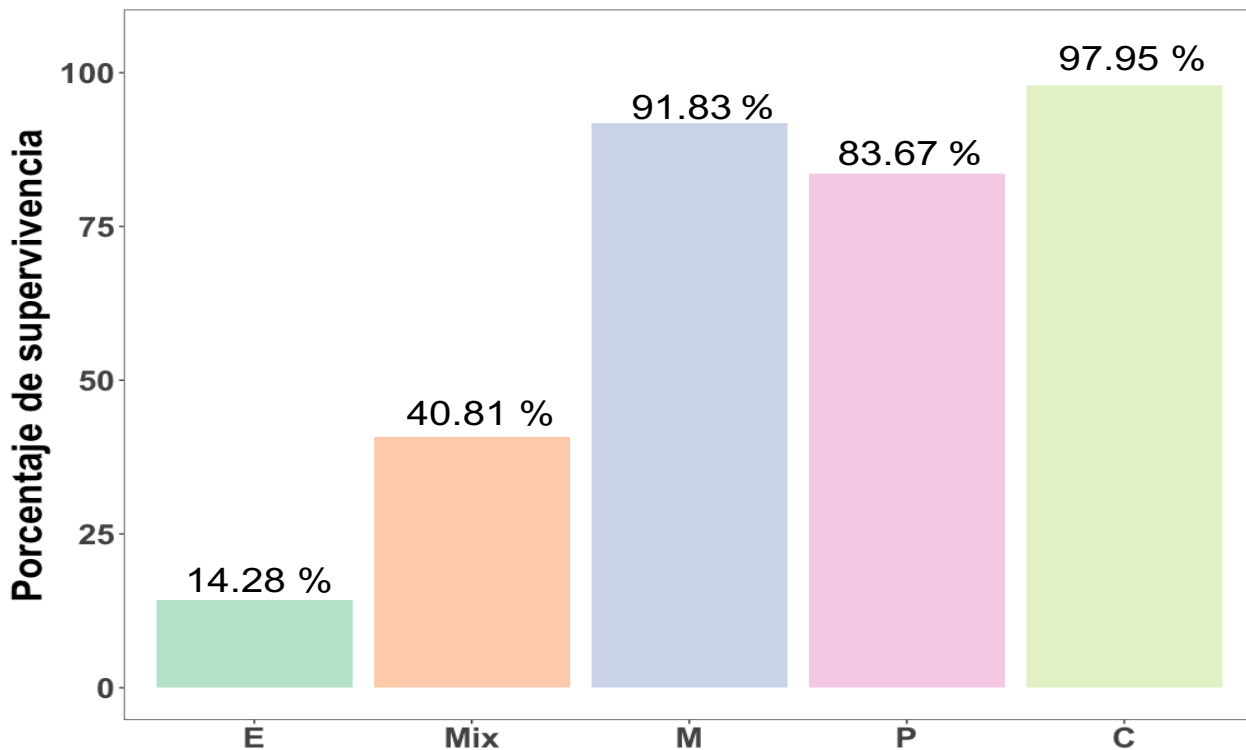


Figura 17. Porcentaje de supervivencia de plántulas de *Pinus montezumae* inoculadas mediante diferentes metodologías. **E:** Esporas; **Mix:** Mixto; **M:** Micelio de la cepa EF-36; **P:** Perlas y **C:** Control sin inoculación.

8.3.1. Porcentaje de micorrización

Las estimaciones del porcentaje de micorrización muestran que sólo el tratamiento de esporas y el tratamiento mixto de esporas y micelio de la cepa EF-36 fueron los que presentaron micorrizas (Figuras 18 y 19).

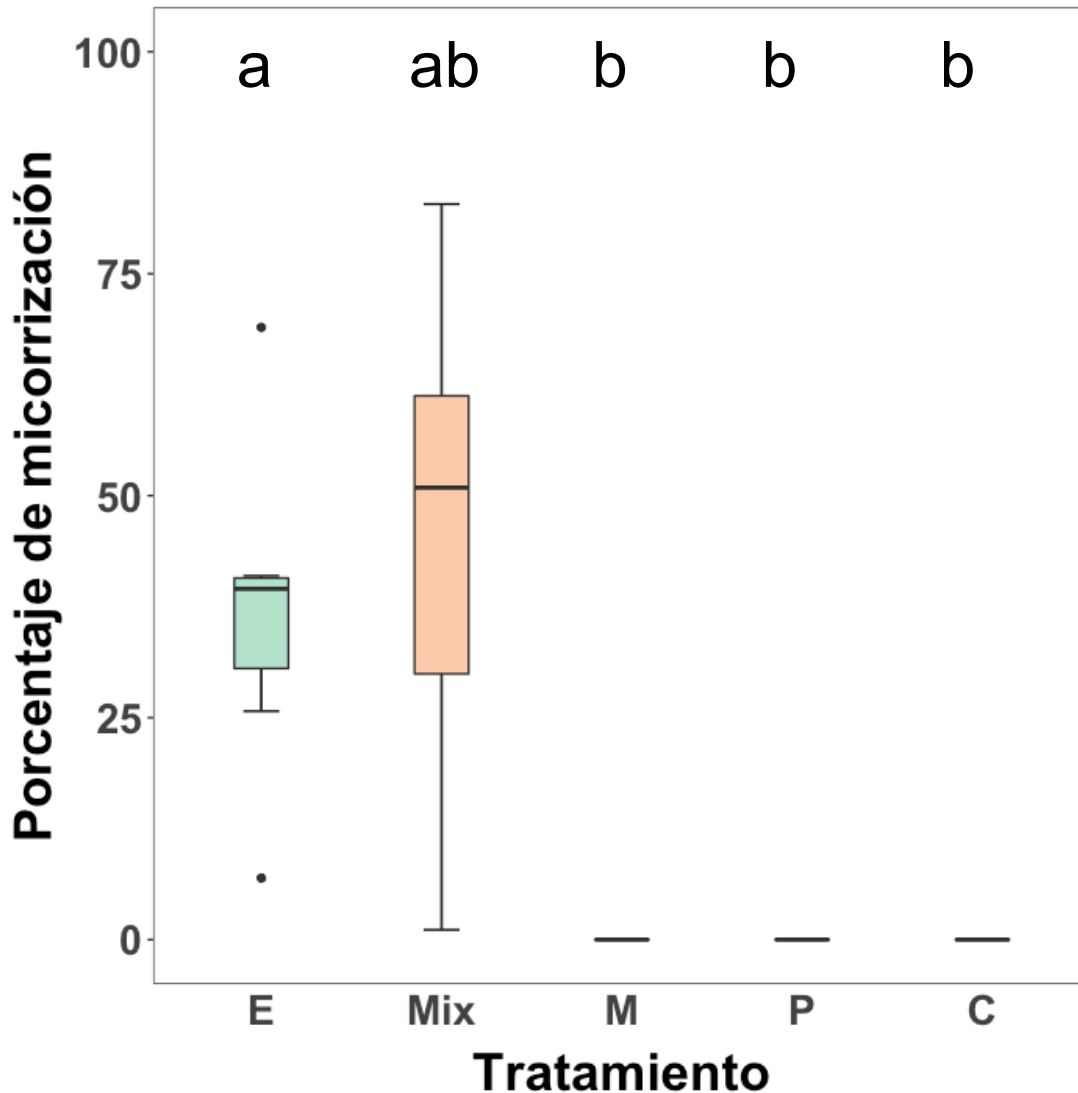


Figura 18. Porcentaje de micorrización de plántulas de *Pinus montezumae* inoculadas con *Laccaria trichodermophora* mediante diferentes metodologías. **Tratamiento:** **E:** Esporas; **Mix:** Mixto (Esporas y micelio); **M:** Micelio de la cepa EF-36; **P:** Micelio de la cepa EF-36 encapsulado en perlas de alginato; **C:** Control sin inoculación. Los tratamientos que comparten una letra no presentan diferencias significativas entre ellos ($p \leq 0.05$).

Las morfologías de las micorrizas presentadas en los tratamientos de inoculación por esporas y mixto fueron muy similares entre sí. En general, presentaron ramificaciones dicotómicas o no presentaron ramificación alguna. Presentaron claras tonalidades naranjas a cafés con las puntas blancas. El manto presentaba buena visibilidad, la textura de la superficie era suave a ligeramente algodónosa.

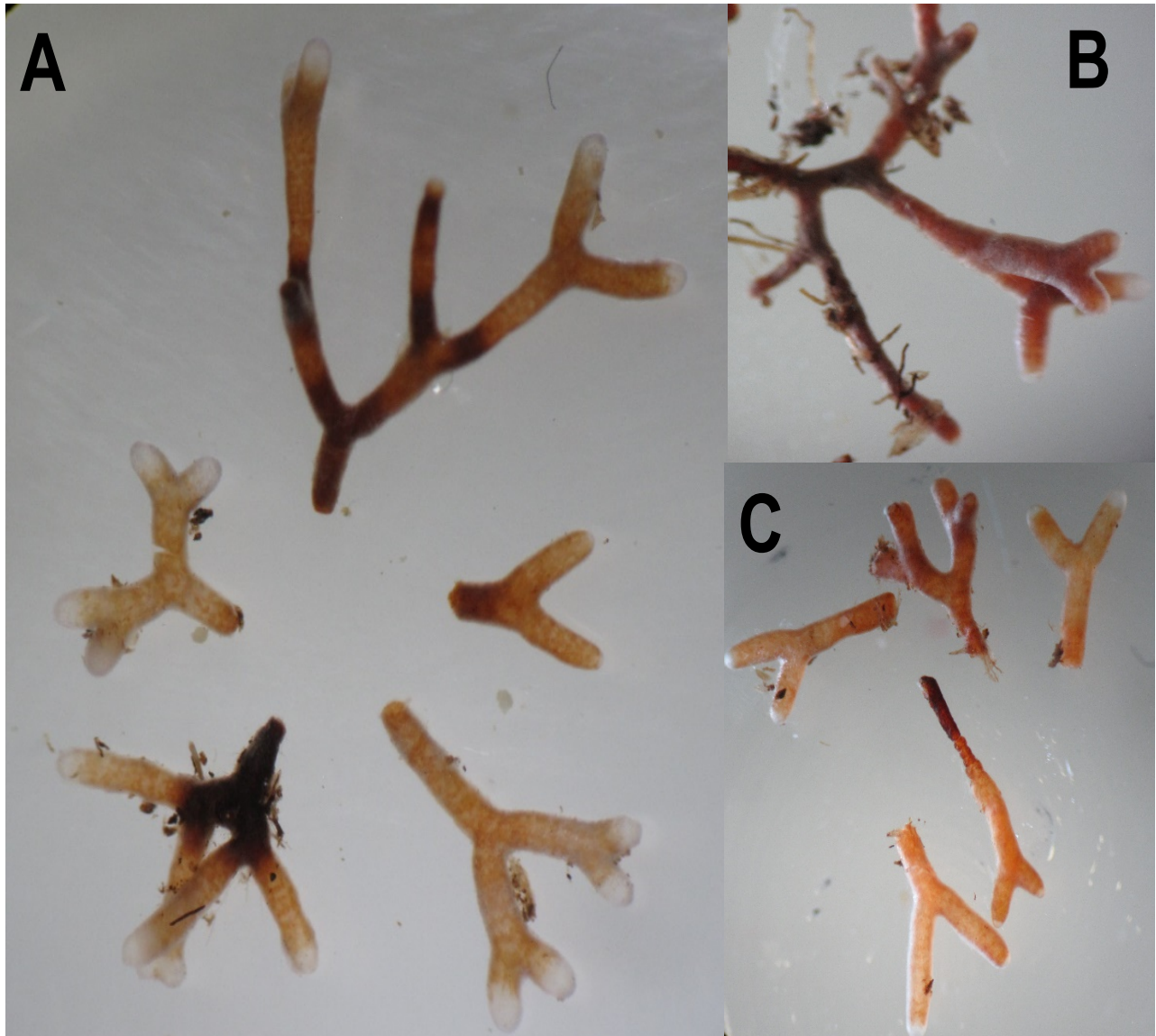


Figura 19. Diferentes morfologías de las ectomicorrizas formadas en el experimento de esporas (A y B) y mixto (C).

8.3.2. Efecto del tipo de inóculo en el crecimiento de las plántulas

Todos los parámetros de crecimiento presentaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos de inoculación (Tabla 4). De manera general, el inóculo esporal, el inóculo del micelio de la cepa EF-36 y el inóculo mixto con esporas y micelio de la cepa EF-36 fueron los que presentaron los valores más altos en los parámetros de crecimiento evaluados (Figura 20).

En cuanto a los índices de calidad, la razón altura/diámetro (RAD) fue el único que no presentó diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Cuadro 4 y Figura 21A). En los anexos se presentan las pruebas de normalidad (ANEXO 2, 4 y 5), heterocedasticidad (ANEXO 6) y las comparaciones múltiples con la prueba de Dunn (ANEXO 8).

Tabla 4. Resultados de las pruebas de Kruskal-Wallis del experimento de efectividad ($p \leq 0.05$).

	χ^2	p	df
Talla aérea	29.602	5.897e-06	4
Diámetro	4.895e-05	5.897e-06	4
Peso seco aéreo	46.117	2.329e-09	4
Peso seco radical	39.831	4.692e-08	4
RAD	6.2956	0.1781	4
RAR	13.907	0.007598	4
DQI	25.349	4.279e-05	4

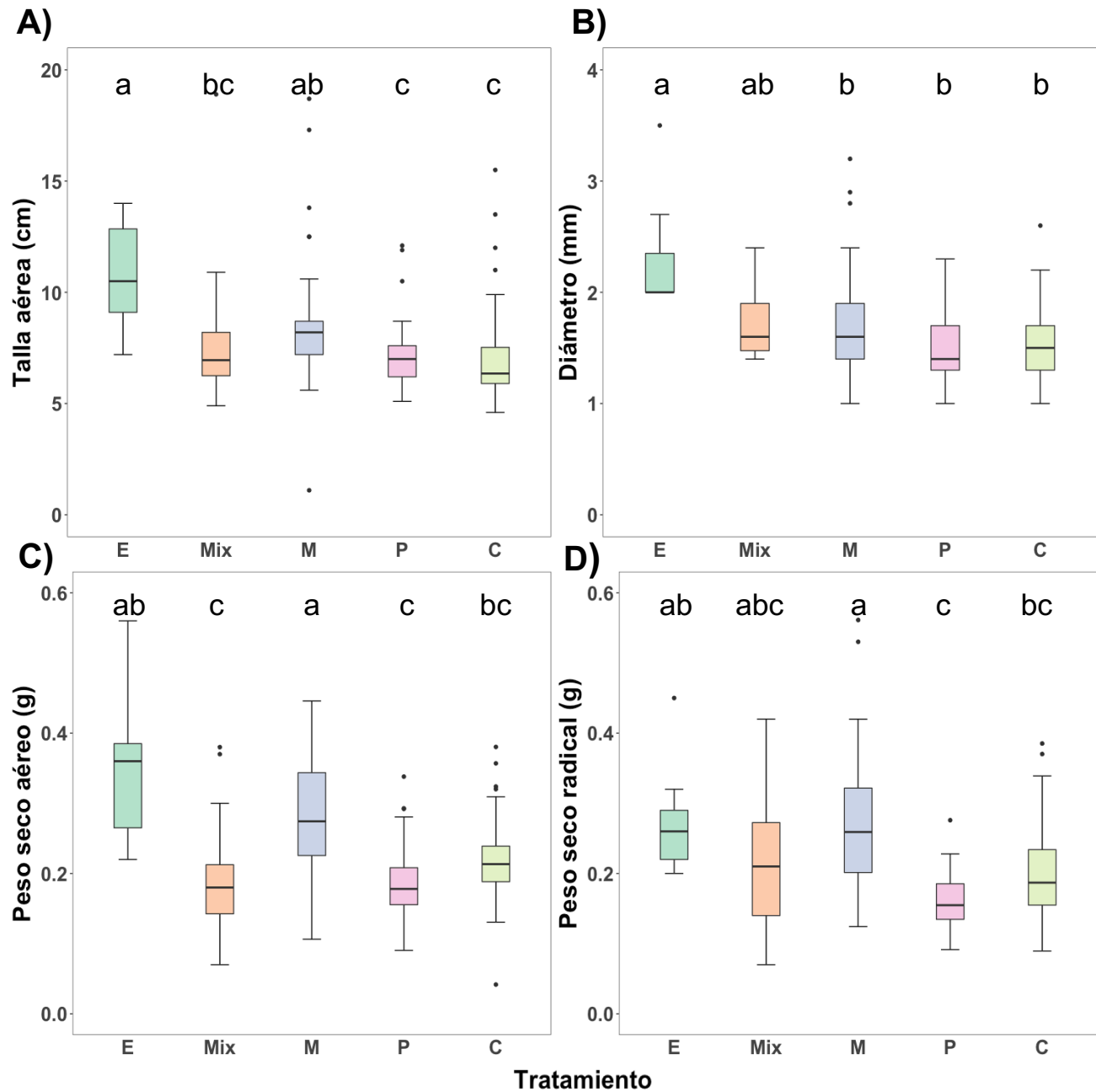


Figura 20. Efecto de diferentes metodologías de inoculación con *Laccaria trichodermorphora* en el peso seco, talla aérea y diámetro de *Pinus montezumae*. **A)** Talla aérea **B)** Diámetro **C)** Peso seco aéreo y **D)** Peso seco radical. Los tratamientos que comparten una letra no presentan diferencias significativas entre ellos ($p \leq 0.05$). **Tratamiento:** **E:** Esporas; **Mix:** Mixto; **M:** Micelio de la cepa EF-36; **P:** Perlas y **C:** Control sin inoculación.

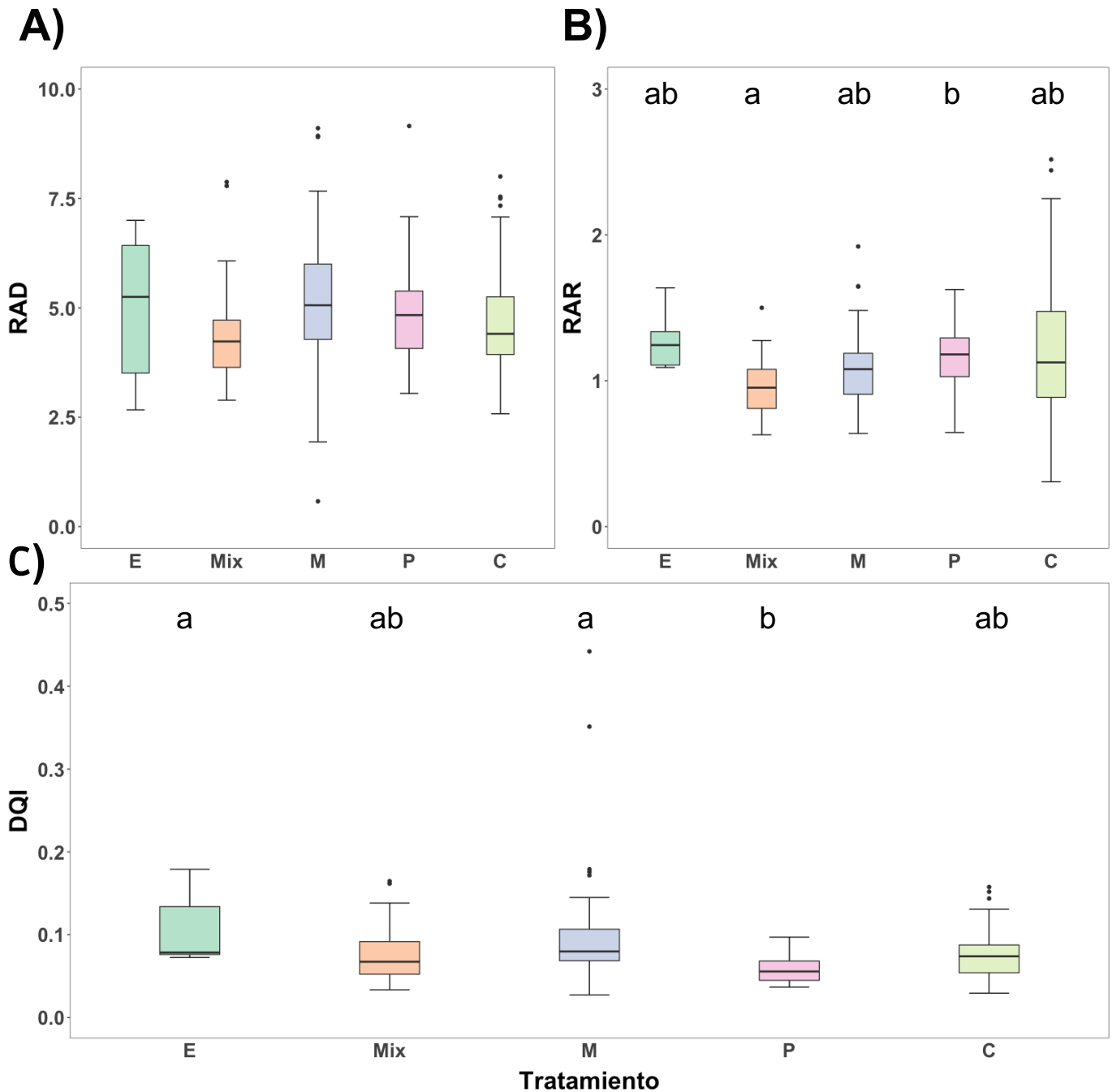


Figura 21. Índices de calidad de los pinos inoculados con *Laccaria trichodermophora*. **A)** Razón aérea /diámetro (RAD) **B)** Razón aérea/radical (RAR) y **C)** Índice de calidad de Dickson (DQI). La asignación de grupos se realizó solo cuando $p \leq 0.05$, las cepas que comparten una letra no presentan diferencias significativas entre ellas. **Tratamiento:** **E:** Esporas; **Mix:** Mixto; **M:** Micelio de la cepa EF-36; **P:** Perlas y **C:** Control sin inoculación.

9. Discusión

9.1. Las encapsulación del micelio en perlas de alginato lo mantiene viable hasta por tres meses a 4 °C

Con el experimento diseñado para medir la viabilidad del micelio de la cepa EF-36 al ser encapsulado en una matriz polimérica, se pudo observar que independientemente de la temperatura de almacenamiento, la viabilidad del micelio encapsulado no se mantiene al llegar al sexto mes. Sin embargo, es posible mantener una viabilidad del micelio del 90% hasta por tres meses al almacenar las perlas a 4 °C.

La pérdida de viabilidad del micelio encapsulado está relacionada con propiedades de las perlas, como el agua o la formulación, que inciden en procesos metabólicos del hongo. Entre estos factores, el que tiene una mayor influencia en la disminución de la viabilidad del micelio encapsulado es la pérdida de agua (da Silva *et al.* 1999; Le Tacon *et al.* 1985). Si se alcanzan porcentajes de desecación de las perlas del 30% se pierde bruscamente la viabilidad del micelio encapsulado (Le Tacon *et al.* 1985). Posiblemente durante los meses 3 y 6, ambos tratamientos alcanzaron esos niveles de desecación. La adición de elementos como la turba o la bentonita pueden mejorar la retención de agua del gel de alginato (Maupérin *et al.* 1987).

La diferencia de viabilidad entre el tratamiento almacenado a 4 °C y a temperatura ambiente en los meses 2 y 3, también puede ser atribuida a la pérdida de agua. A temperatura ambiente se propició una mayor y más rápida evaporación a través de los tapones de algodón, en comparación con el tratamiento a 4°C, en el cual fue posible mantener las condiciones de humedad por más tiempo (Maupérin *et al.* 1987). Para evitar la pérdida de agua hacia el exterior, los contenedores deben cerrarse de manera hermética (da Silva *et al.* 1999), de esta manera también se evitan contaminaciones del inóculo. Sin embargo, el llenado de los recipientes que contengan las perlas debe ser parcial, de tal forma que se almacene el suficiente aire que permita la respiración del hongo durante el periodo de almacenamiento, en analogía a la proporción volumétrica 1:5 sugerida para el llenado de los matraces para cultivos microbiológicos (Nair, 2008).

Durante la encapsulación, el tiempo de exposición de las perlas al CaCl_2 es un factor que puede comprometer la viabilidad del micelio encapsulado. La exposición prolongada a los iones de calcio incrementa la polimerización y mejora la estabilidad de la perla, por lo se que promueve la viabilidad del micelio encapsulado (Maupérin *et al.* 1987). En este trabajo la reacción de polimerización se mantuvo durante 1 h, como lo reportan Parladé *et al.* (2003), y solo 15 minutos más de lo reportado por Maupérin *et al.* (1987). Sin embargo, es necesario ser cuidadoso con la concentración de CaCl_2 en la formulación. Pues una alta concentración de calcio no sustituye una exposición prolongada a bajas concentraciones. Cuando los iones de calcio son muy abundantes reaccionan con los componentes L-gulurónicos del alginato y causan una polimerización excesiva que disminuye el tamaño de poro en la matriz de alginato (da Silva *et al.* 1999). Las altas concentraciones de iones de calcio también afectan la estabilidad de las membranas del hongo, influyendo en su equilibrio osmótico (Griffin, 1994) y comprometiendo la viabilidad celular.

Una alta proporción volumétrica de alginato: solución micelar (10:5) afecta el tamaño del poro en la matriz de alginato, influyendo negativamente en la transferencia de gases y, por lo tanto, en el metabolismo del hongo (Maupérin *et al.* 1987). Mientras que, una proporción 4:5 puede promover una perla mejor formada y con una mayor viabilidad (da Silva *et al.* 1999). Sin embargo, ya que estos parámetros también pueden variar entre especies (da Silva *et al.* 1999), en este trabajo decidimos mantener la proporción de alginato de sodio y solución micelar reportadas por Maupérin *et al.* (1987) (5:5), la cual también presentó buenos resultados en cuanto a viabilidad en el trabajo de da Silva (1999). Sin embargo, modificar esa proporción podría repercutir en la viabilidad del micelio encapsulado.

Al igual que existe una diferencia de viabilidad debido a la formulación de las perlas, también el grado y la velocidad de la pérdida de la viabilidad del micelio encapsulado depende de la especie de hongo (Kuek *et al.* 1992). Por lo tanto, para futuras evaluaciones de viabilidad tanto de diferencias interespecíficas como intraespecíficas, es necesario probar distintas proporciones de los componentes,

distintos tiempos de exposición e incluso diferentes edades del cultivo miceliar al momento de la encapsulación (da Silva, 1999).

9.2. Cuatro cepas de *Laccaria trichodermophora* presentan diferente capacidad de infectar las raíces de las plántulas de *Pinus montezumae*

Con el experimento de infectividad diseñado para evidenciar la capacidad formadora de ectomicorrizas del inóculo vegetativo de *L. trichodermophora* y comparar esa capacidad entre cuatro cepas, se pudo observar la formación de micorrizas *in vitro*. Sin embargo, esa capacidad colonizadora solo fue presentada por una de las cuatro cepas con las que se trabajó, la CA15-F10 (Figuras 9, 10 y 14). Aunque las cepas CA15-11, CA15-75 y EF-36 no formaron micorrizas maduras, sí se presentaban estructuras que podrían dar indicios de una interacción con el hongo, como raíces cortas dicotomizadas, ausencia de pelos radicales (Figura 11) y micelio en la superficie (Figuras 12 y 13).

Uno de los factores que pudo provocar la nula colonización por parte de tres de las cuatro cepa fue la luz, pues el ambiente lumínico en el que se encuentran las plantas influye en su crecimiento y en la abundancia de las raíces micorrizadas (Trocha *et al.* 2016). Esto ocurre debido a que el espectro de luz afecta la tasa fotosintética y la distribución de los carbohidratos, y dado que del 1-21 % de la producción fotosintética neta es traslocada al HECM hospedero (Hobbie, 2006), el proceso de fotosíntesis resulta crucial para mantener la relación. La intensidad de luz a la que estaban expuestas las plántulas en el cuarto de cultivo (3691 lx) se considera alta y, de acuerdo con Jha *et al.* (2008), promueve una alta colonización por parte del HECM debido al incremento en la cantidad de fotosintatos disponibles para el hongo. Sin embargo, es posible que no haya sido la intensidad de luz, sino la fuente, la que afectara la colonización de las plantas. Una fuente de luz blanca fría, como la utilizada en este experimento, reduce la interacción de la planta con el hongo (Niemi *et al.* 2005). A pesar de que las condiciones de luz pudieron afectar la formación de micorrizas, la cepa CA15-F10 fue capaz de asociarse con las plántulas a partir de la quinta semana. Próximos experimentos podrían evaluar el desempeño de la cepa CA15-F10 en condiciones de luz natural, como a las que se ven expuestas en viveros de producción de planta.

Otro de los factores que pudo influir en la colonización fue el origen de la semilla, como lo destacan Rodríguez-Gutiérrez *et al.* (2019), pues al utilizar especies de hongos con distribución simpátrica a las plantas producidas se obtienen porcentajes de micorrización mayores, en comparación con el uso de especies de hongos alopátricas. Esto mismo podría aplicar dentro de las poblaciones, es decir, es posible que las cepas simpátricas tengan una mayor capacidad de asociarse con las poblaciones de plantas con las que comparten su distribución (Hazard *et al.* 2017a). Quintero-Corrales (2019) detectó que la estructura de las poblaciones de *L. trichodermophora* de la Faja Volcánica Transmexicana está determinada por la distribución geográfica. Sin embargo, ninguna de las cepas de nuestro trabajo pertenecía al lugar de la plantación productiva de donde se obtuvieron las semillas. Para evaluar el efecto intraespecífico de la simpatria sería necesario un experimento en el que se incluyan semillas de los lugares en los que se recolectaron cada una de las cepas y hacer combinaciones.

Dado que las plántulas inoculadas con las cepas CA15-11, CA15-15 y EF-36 presentaron estructuras relacionadas con la asociación ectomicorrízica, es posible que con más tiempo, los microcosmos inoculados con estas cepas sí presentaran micorrizas maduras. Sin embargo, ya que no hay ningún estudio publicado sobre el desarrollo *in vitro* de ectomicorrizas entre *L. trichodermophora* y *P. montezumae*, no es posible saber si los tiempos de la interacción son diferentes. Los estudios sobre micorrización de *P. montezumae* por parte de *L. trichodermophora* no evalúan el desarrollo de la interacción a través del tiempo (Galindo-Flores *et al.* 2015; Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019). En estos estudios, las evaluaciones más tempranas de la micorrización son a los ocho meses (Galindo-Flores *et al.* 2015), además, la inoculación en estos trabajos se realizó con esporas. Esto no es comparable en tiempo con la inoculación vegetativa, pues el establecimiento de la interacción a partir de esporas es más lento, ya que las esporas requieren más tiempo para germinar, crecer, encontrar un talo compatible y formar un talo dicariótico, con el cual puedan colonizar las raíces de sus hospederos (Ishida *et al.* 2008).

Con la información actual sobre desarrollo de las micorrizas de *L. trichodermophora* no es posible aseverar si lo normal es el inicio de la formación de

micorrizas hasta los seis meses, como lo pudieron hacer las cepas que no formaron micorrizas, o si la cepa CA15-F10 es muy reactiva y por eso formó micorrizas desde las cinco semanas. Sin embargo, existen estudios con otras especies que nos podrían indicar que el inicio de una micorrización a las cinco semanas es común, con lo que podríamos sugerir la incapacidad de las otras cepas para formar micorrizas. Por ejemplo, el modelo *L. bicolor* con *Populus* spp. presenta micorrizas maduras desde la semana 12 (Tschaplinski *et al.* 2014; Veneault-Fourrey *et al.* 2014) y con *Pseudotsuga menziesii* desde la sexta semana (Plett *et al.* 2015). Además, plántulas de tres especies distintas de pinos inoculadas con micelio de *Cantharellus cibarius* presentaron micorrizas a partir de la segunda semana después de la inoculación (Garza-Ocañas *et al.* 2014). También, cepas de *Lactarius indigo* forman micorrizas con plántulas de *P. pinaster* a partir de los 30 días post inoculación (Parladé *et al.* 2011).

El mantenimiento y el subcultivo por varios años puede promover variaciones fenotípicas de los HECM. Múltiples resiembras afectan la habilidad de las cepas para formar asociaciones con sus hospederos (Di Battista *et al.* 1996; Thomson *et al.* 1993), pues se ha observado una correlación negativa entre la edad de la cepa (tiempo que ha transcurrido después del aislamiento) y su capacidad formadora de micorrizas (Parladé *et al.* 2011). En este trabajo no se realizaron estimaciones de la infectividad de las cepas recién aisladas, por lo que no es posible medir el efecto que tuvieron las resiembras en el potencial infectivo de cada cepa. En nuestro caso, la cepa más vieja (EF-36), colectada en el año 2013, no presentó micorrización. Sin embargo, de las cepas colectadas en 2015, la cepa CA15-F10 sí resultó infectiva. Por lo tanto, a pesar de la edad, la cepa CA15-F10 conservó su capacidad de colonización.

A pesar de que las condiciones lumínicas, el origen de las semillas y la edad de las cepas pueden afectar la colonización, cabe resaltar que, de manera natural, entre distintas cepas de HECM existe variación fenotípica en distintos procesos del crecimiento. Estos pueden estar relacionados con su capacidad de utilizar distintas fuentes de N (Guidot *et al.* 2005), solubilizar fuentes inorgánicas de P (de la Bastide *et al.* 1994) y colonizar a sus plantas hospederas (Hazard *et al.* 2017b; Parladé *et al.* 2011; Sisti *et al.* 2003; Repáč y Sendecký, 2018). En el caso de las cepas utilizadas en este

trabajo, los datos de crecimiento en cultivo líquido también señalan una alta variabilidad intraespecífica en la producción de biomasa entre cepas (ANEXO 11). Específicamente, las cepas CA15-11 y EF-36 producen mayor biomasa en comparación con las cepas CA15-F10 y CA15-75 (Ángeles-Argáiz *et al.* 2020). Estos resultados nos señalan que una cepa que crece bien en cultivo líquido y que produce una alta cantidad de biomasa, no es necesariamente una cepa adecuada para ser utilizada como inoculante ectomicorrízico; su capacidad colonizadora puede no estar relacionada con su producción de biomasa. En nuestro experimento de infectividad, las cepas que más crecieron (CA15-11 y EF-36) no micorrizaron a las plántulas en los microcosmos.

Las diferencias intraespecíficas en la capacidad de un HECM para colonizar y beneficiar a un hospedero pueden estar fundamentadas en el contenido de ciertos genes importantes para el establecimiento y mantenimiento de la interacción (Hedh *et al.* 2009). Para que se pueda dar una interacción exitosa es necesario la participación y coordinación de diferentes compuestos de la planta y el hongo, como los sesquiterpenos, las MiSSPs o las CAZymes (Ditengou *et al.* 2015; Plett *et al.* 2014; Pellegrin *et al.* 2019; Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Las estructuras parecidas a ectomicorrizas que observamos en nuestros ensayos con las cepas no infectivas, como las raíces dicotomizadas o las hifas en la superficie de las raíces, nos podrían indicar la presencia de algunos componentes genéticos, pero la falta de otros; esto inhibiría la coordinación en el intercambio de señales y por lo tanto, no se formó la micorriza.

Los sesquiterpenos, presentes en *L. bicolor*, son de los primeros involucrados en la formación de la ectomicorriza, pues promueven la formación de raíces laterales, incluso en plantas que no forman ectomicorrizas, como *Arabidopsis thaliana* (Ditengou *et al.* 2015). Es posible que las cepas de nuestros experimentos sí produjeran sesquiterpenos y por eso se redujo el crecimiento y la proliferación de pelos radicales, mientras que se promovía el crecimiento de las raíces laterales y se daba un reconocimiento que permitió al hongo adherirse a las raíces, como se observa en las figuras 12 y 13. Sin embargo, es posible que no presentaran MiSSPs relacionados con la protección del hongo a los mecanismos de defensa de la planta (Plett *et al.* 2014), por lo que la planta se defendía y no permitía al hongo colonizar y formar la red de Hartig.

Los datos genómicos de *L. trichodermorphora* con los que se cuenta actualmente, nos indican existe variedad en el contenido genómico de SSPs y CAZymes (Ángeles-Argáiz, datos no publicados). Estas diferencias podrían explicar por qué distintas cepas de una misma especie de HECM tienen diferente capacidad de asociarse a su hospedero.

En el caso de las SSPs, el contenido genómico no está directamente relacionado con la infectividad de la cepa. Pues la cepa con más SSPs fue la 11 y las plantas inoculadas no presentaron ni siquiera hifas en la superficie de sus raíces (Figura 11). Por otro lado, la cepa CA15-F10 que fue la que presentó una colonización más evidente, tiene un menor número de SSPs que la cepa CA15-11 (ANEXO 9). Estos resultados nos dicen es que el número de SSPs no determina la capacidad de colonización de una cepa. La cepa CA15-F11 puede tener un mayor número de SSPs, pero puede que éstas no sean claves para el establecimiento de la interacción ectomicorrízica. Por lo tanto, las diferencias en la identidad de las SSPs de cada cepa, más que el contenido de éstas, es lo que podría influir en la capacidad de colonización. Sin embargo, es necesario generar datos transcriptómicos para identificar qué SSPs están involucradas en la micorrización y evaluar si hay diferencias en la expresión de éstas entre cepas, para finalmente poder adjudicarle a las SSPs las variaciones intraspecificas de la capacidad de colonización.

Los datos de los genomas también nos indican que hay diferencias en el contenido de CAZymes de cada una de las cepas de *L. trichodermorphora* (ANEXO 10A). La cepa CA15-F10 presenta un mayor número de *Auxiliary Activities Proteins* (AA), *Carbohydrate-binding Modules* (CB), *Glycosyl Hydrolases* (GH) y *Polysaccharide Liases* (PL) (ANEXO 10B). Las CAZymes se presentan en menor número en los genomas de los HECM, sin embargo, están involucradas en la remodelación de la pared celular durante el desarrollo de la interacción ectomicorrízica, pues están involucradas en la biosíntesis, degradación y modificación de oligo y polisacáridos (Veneault-Fourrey *et al.* 2014). Estas diferencias en el contenido de CAZymes entre las cepas de *L. trichodermorphora* y una mayor representación en el genoma de la cepa infectiva (CA15-F10) nos podrían indicar una mayor capacidad de la cepa para establecer la interacción ectomicorrízica. Sin embargo, al igual que con las SSPs, para validar estos supuestos es necesario contar con los datos de expresión e identificar si esta variación genómica se ve reflejada.

En el trabajo de McCarthy y Fitzpatrick (2019) se muestra que dentro de algunas especies modelo de hongos, del 80-90% de genes son altamente conservados entre cepas. Estos son genes constitutivos involucrados en los procesos de supervivencia de los individuos. Algunos de los genes remanentes están involucrados en procesos de patogénesis y resistencia microbiana. Por ejemplo, en *Candida glabrata*, un hongo patógeno oportunista, se observó variación en el número de copias de genes que puede estar relacionada con la presencia de diferencias fenotípicas relevantes en la infección que este hongo ocasiona (Carreté *et al.* 2018).

Las variaciones genómicas entre hongos de una misma especie puede deberse a la cantidad de elementos transponibles (Daboussi y Capy 2003; Muszewska *et al.* 2011). Los elementos transponibles son piezas de DNA que le dan forma al genoma mediante la combinación o transposición, esto lleva a rearrreglos cromosomales, creando nuevos vecindarios y alterando la expresión genómica (Muszewska *et al.* 2017). Los genomas de HECM presentan un número elevado de elementos transponibles (alrededor de 60% en *Tuber melanosporum* y del 21-24% en *L. bicolor*) (Martin *et al.* 2010; Labbé *et al.* 2012). Se ha propuesto que la alta densidad de elementos genéticos transponibles presentes en el genoma de *L. bicolor* es lo que ha dirigido la divergencia genómica entre cepas conespecíficas (Labbé *et al.* 2012).

El crecimiento de las plantas no depende de las micorrizas. Tomando en cuenta la longevidad de los pinos, las evaluaciones de calidad resultaron poco informativas, sin embargo, la RAR sí ofrece un poco de información sobre la condición de la planta a los seis meses. De acuerdo con Quiroz-Marchant *et al.* (2009), una RAR cercana a uno es indicio de plantas con mayor calidad. Sin embargo, para tener una información más completa sobre el estado fisiológico de las plantas, es necesario contar con la información del contenido de nutrientes, como el N, P y K, tanto en la parte aérea, como en la parte radical.

Las cepas de HECM presentan diferencias en la capacidad de asociarse a un hospedero. Para fines biotecnológicos es necesario identificar cepas competentes desde el aislamiento y posteriormente monitorear que la capacidad infectiva se mantenga tras

las resiembras. La variación genómica intraespecífica dentro de los HECM puede influir en la capacidad infectiva, sin embargo para poder asegurarse de ello es necesario contar con los datos de expresión. Con este trabajo identificamos que los ensayos con la cepa CA15-F10 de *L. trichodermophora* se pueden hacer estimaciones sobre infectividad en periodos relativamente cortos.

9.3. El inóculo esporal de *Laccaria trichodermophora* afecta la supervivencia de las plántulas de *Pinus montezumae*

Con el experimento de efectividad diseñado para comparar el efecto del tipo de inóculo (vegetativo, esporal y mixto), sobre el crecimiento de *P. montezumae* pudimos observar que el principal efecto que tuvo el tipo de inóculo sobre las plantas fue en el porcentaje de supervivencia, pues los tratamientos que incluían esporas presentaron los porcentajes de supervivencia más bajos (Figura 17).

El porcentaje tan bajo de supervivencia puede deberse que el inóculo esporal, al igual que cualquier esporoma en medio natural, no solo acarrea esporas de *L. trichodermophora*, sino que potencialmente puede transportar otro tipo de microorganismos, como microartrópodos o bacterias (Liu *et al.* 2018; Walter *et al.* 2013), que puedan afectar la calidad de las plantas. Un ejemplo de estos microorganismos son las bacterias *Pseudomonas syringae* las cuales producen una alta mortandad de plántulas de *Pinus radiata* en vivero (Langridge y Dye, 1982). Es posible que incluso los procedimientos previos a la inoculación, como el pesado, el molido y el almacenamiento, influyeran en la contaminación de los inóculos.

Por otra parte, es posible que la asociación ectomicorrízica tenga un efecto contrario al de mejorar el crecimiento y la nutrición de las plantas en vivero. Pese a la definición tradicional de micorriza como mutualista, es importante recordar que este tipo de asociación se desarrolla en un continuo que va del mutualismo al parasitismo (Johnson *et al.* 1997). El simbiote ectomicorrízico puede demandar una gran cantidad de recursos de la planta sin aportarle beneficios equitativos. Por ejemplo, en un modelo de intercambio de C-N entre árboles y HECM (Näsholm *et al.* 2013) se identificó que en

suelos con un contenido limitado de N, la translocación de C de los árboles hacia el HECM resulta en una reducción gradual de la translocación de N de los HECM a las plantas hospederas. Es decir, una mayor cantidad de C hacia el hongo significa menor N para los árboles, mientras que menos N para los árboles significa más C para el hongo. De igual manera, la inoculación con *Thelephora terrestris* reduce el crecimiento de sus plantas hospederas dependiendo de su eficiencia del uso de C (Colpaert, 1999) o promueve una limitada absorción de P en presencia de fertilizantes (Smith *et al.* 2015).

Las plantas micorrizadas con inóculos vegetativos no presentaron tanta mortalidad como en el tratamiento esporal, pero sí, en comparación con el control (Figura 17). En el caso de las perlas de alginato, los componentes de la formulación pudieron resultar tóxicos para las plantas, sin embargo, este efecto no ha sido reportado (Bashan *et al.* 2002). En cuanto al inóculo con micelio suspendido, la manipulación al momento de inocular pudo tener un efecto negativo mínimo en las plantas.

Los tratamientos que contenían esporas fueron los únicos que resultaron infectivos (Figura 18). Cabe destacar que los tratamientos de inoculación vegetativa se llevaron a cabo con la cepa EF-36, la cual en trabajos previos había mostrado buenos resultados en cuanto a producción de biomasa en cultivo líquido (ANEXO 10). Sin embargo, esta cepa no presentó capacidad colonizadora en el experimento de infectividad (Figuras 13 y 14). Esto nos indica que, al año, la cepa EF-36, sigue sin ser infectiva. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Honrubia *et al.* (1997) en donde plántulas de *Pinus halepensis* inoculadas con *Pisolithus tinctorius* presentaron porcentajes de micorrización más altos al ser inoculadas con esporas, mientras que la inoculación con micelio suspendido tuvo un porcentaje de micorrización del 0%. Sin embargo, en el trabajo de González-Ochoa *et al.* (2003) un tipo de inóculo resulta más o menos infectivo de acuerdo a la combinación de simbiontes. *P. halepensis* presenta mayor porcentaje de micorrización utilizando el inóculo esporal de *Suillus collinitus*, mientras que *P. pinaster* presenta mayor porcentaje de micorrización al ser inoculado con esporas de *L. deliciosus*. Por lo tanto, las diferencias entre inóculos esporales y vegetativos son especie dependientes.

Los porcentajes de micorrización entre los tratamientos que sí presentaron colonización no fueron constantes, pues el tratamiento mixto presentó una alta variabilidad (Figura 18). La aplicación del inóculo vegetativo incide en la colonización por parte de las esporas. Posiblemente, la baja colonización se podría explicar debido a que el tratamiento mixto solo contiene la mitad de la dosis de esporas que el del tratamiento de inóculo exclusivamente esporal. Sin embargo, algunas unidades experimentales inoculadas con el inóculo mixto alcanzaron porcentajes de micorrización mayores a los de las plantas del tratamiento esporal. Es posible que esto se deba a que las plantas reaccionan positivamente a la aplicación de micelio, aunque éste no sea infectivo. El micelio puede funcionar como una fuente adicional de materia orgánica o como una fuente de nitrógeno que benefició tanto a los nuevos propágulos como a las plantas hospedadoras, en un sustrato pobre en nutrientes (mezcla de turba y vermiculita). Los datos obtenidos no sirven para concluir alguna de estas opciones. Para probar el efecto de la adición de micelio como fuente de nutrientes sería necesario inocular a las plantas con micelio muerto.

Contrario a lo que se esperaba, se obtuvieron porcentajes de micorrización más altos utilizando el inóculo esporal, en comparación con el inóculo vegetativo. Esto debido a que la cepa usada en este experimento demostró su incapacidad infectiva en experimento de infectividad (Figuras 13 y 14), mismo que fue desarrollado de manera simultánea al experimento de efectividad. A pesar de que el tiempo de colonización por esporas es más lento, existen algunos factores que favorecen la infectividad en un inóculo esporal. Un mayor número de propágulos propicia una mayor probabilidad de que las raíces se colonicen. Las esporas presentan una mayor diversidad genética, en comparación con un solo geneto presente en el inóculo vegetativo. Aunado a esto, el inóculo esporal también puede acarrear otros microorganismos del suelo que pueden facilitar la micorrización, como las *Mycorrhizal Helper Bacteria* (MHB) las cuales promueven la colonización del hospedero y mejoran la interacción (Vik *et al.* 2013; Obase, 2020). En ensayos con plántulas de *P. montezumae* inoculadas con esporas de *L. trichodermophora* y MHB se ha visto que se incrementa el crecimiento y la calidad

fisiológica de las plantas, en comparación con las que no tenían MHB (Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019).

Otros trabajos en los que se ha obtenido una exitosa colonización y promoción del crecimiento con inóculos esporales han sido puestos en condiciones de luz natural, riegos diarios y una alta humedad relativa. Incluso se han utilizado fertilizantes y otros sustratos ricos en nutrientes que pueden beneficiar a las plantas en los primeros estadios antes de que ocurra la colonización por parte del hongo (Barragán-Soriano, 2018; López-Gutiérrez *et al.* 2018; Oliveira *et al.* 2006; Rentería-Chávez *et al.* 2017; Rodríguez-Gutiérrez *et al.* 2019). Es posible que esto y los tratamientos fungicidas a los que se exponen los sustratos, permitiera que en dichos ensayos las plantas fueran resistentes a los patógenos que las esporas pudieran acarrear.

Con el experimento de efectividad pudimos evaluar las diferencias entre inóculos esporales y vegetativos de *L. trichodermophora*. También pudimos detectar que, en estas condiciones específicas de luz, riego y humedad, el inóculo esporal actuó de manera contraproducente perjudicando la supervivencia de las plántulas. Además, a pesar de no haber obtenido colonización con el inóculo vegetativo, no se presentan diferencias en la promoción del crecimiento en comparación con el inóculo esporal. A pesar de todo esto, se necesitan más estudios para poder asegurar que el inóculo esporal sirve como vehículo de patógenos que afectan la supervivencia de las plantas en el vivero.

Incluso con esta falta de información, la inoculación esporal sigue representando una técnica problemática debido a la cantidad de biomasa necesaria para inocular viveros completos. La cantidad de plántulas a reforestar en una hectárea de bosque depende de las condiciones topográficas del terreno, sin embargo, en el caso de plantaciones con fines productivos, se recomienda un diseño de 2x2 (i.e. el espacio entre las plántulas es de 2 m de separación). Por lo tanto, la densidad final sería de 2,500 plantas por hectárea (CONAFOR, 2010). Tomando en cuenta nuestras estimaciones sobre viabilidad de esporas, si cada plántula se reforesta con 0.75 g de píceos secos molidos para obtener una concentración final de 1×10^7 esporas viables, entonces se necesitan alrededor de 1.87 kg de píceos secos molidos para reforestar una hectárea. Si

tomamos en cuenta que los púleos secos representan solo el 6 % del peso fresco total, entonces se requieren alrededor de 31 kg de esporomas frescos de *L. trichodermophora* para reforestar una hectárea.

Por otra parte, la inoculación con hongos ectomicorrízicos no es el único factor que participa en el mejoramiento de la calidad de la planta, también influyen las buenas técnicas de los viveros, como la selección de semillas de acuerdo a las características climáticas y edáficas de los sitios a reforestar; la aplicación de dosis adecuadas de fertilizantes; los esquemas de riegos adecuados en dosis y frecuencia; y la selección de mezclas y sustratos (Rodríguez, 2010). Para conseguir este propósito es importante un trabajo integral en el que la academia y los viveristas trabajen en conjunto para adaptar las técnicas de los viveros con apoyo del conocimiento científico generado.

9.4. El desarrollo de una tecnología de inoculación vegetativa exitosa requiere de la selección de cepas infectivas

A partir de los tres experimentos pudimos darnos cuenta de la complejidad que representa el desarrollo de una técnica de inoculación vegetativa, pues aún cuando se logra aislar una cepa y obtener grandes cantidades de biomasa en cultivos líquidos, la infectividad y efectividad no están garantizadas. Dentro de la especie *L. trichodermophora* existe variabilidad en distintos aspectos genómicos y funcionales, incluso en la capacidad de asociarse a un hospedero natural *in vitro*.

Las diferencias intraespecíficas de asociarse a sus hospederos *in vitro* afectan el desarrollo de tecnologías de inoculación vegetativa. Incluso si se obtienen buenos resultados en cuanto a colonización y promoción del crecimiento, no existe la certeza de que esa cepa se va a mantener viable, infectiva y efectiva a través del tiempo. Pues se ha demostrado que las cepas pierden infectividad conforme se hacen más viejas (Parladé *et al.* 2011). Sin embargo, debido a los riesgos o deficiencias que presentan los inóculos naturales y esporales, los problemas técnicos y científicos del desarrollo de un inoculante vegetativo deberán ser sorteados si se pretende abastecer la demanda de la industria forestal.

Las perlas de alginato no se descartaron como un potencial vehículo del micelio, ya que la falta de colonización es atribuida a la cepa utilizada y no a la encapsulación del micelio. Además, al menos a los tres meses a 4 °C, mantuvieron el 90 % de la viabilidad del micelio, el cual resulta un buen tiempo para el almacenamiento del inóculo (Rossi *et al.* 2007). Para considerarlo un buen método de preservación del inóculo, sería necesario encapsular el micelio de la cepa CA15-F10 y verificar que el inóculo almacenado en perlas de alginato sea infectivo y efectivo.

10. Conclusiones

- La encapsulación del micelio de *Laccaria trichodermophora* en perlas de alginato puede mantener viable el 90% del micelio hasta por tres meses a 4 °C. El micelio encapsulado resulta conveniente para el almacenamiento y vida de anaquel del inóculo vegetativo de *L. trichodermophora*, sin embargo, es necesario comprobar que la cepa encapsulada sea infectiva y efectiva.
- Existe variación en la capacidad formadora de ectomicorrizas entre cuatro cepas de *L. trichodermophora*. La única cepa que fue capaz de colonizar las raíces de *P. montezumae* fue la CA15-F10. Antes de evaluar la efectividad de los inóculos vegetativos en las plantas, es necesario asegurarse de trabajar con una cepa que sí sea infectiva. El modelo *P. montezumae* y *L. trichodermophora* CA15-F10 permitió hacer estimaciones sobre infectividad en tiempos relativamente cortos (seis semanas).
- Los tratamientos de inoculación por esporas y mixto (esporas y micelio) fueron los únicos que promovieron la formación de ectomicorrizas. Sin embargo, no hubo relación del porcentaje de micorrización con la calidad de la planta. Además, estos tipos de inoculaciones tuvieron un efecto negativo en la supervivencia de las plantas.
- Para desarrollar una tecnología de inoculación vegetativa es necesario medir la infectividad de cada cepa tras el aislamiento, gracias al modelo que resultó infectivo en el experimento de infectividad, fue posible saber que esas estimaciones se pueden hacer a partir de las seis semanas postinoculación y no es necesario esperar un año. Estas estimaciones de infectividad deben hacerse tras varias resiembras, pues aún se desconoce el efecto que tuvieron en el potencial infectivo de las cepas. Además, la infectividad debe ser estimada tras cada modificación en el proceso productivo, incluso después de encapsular el micelio.

11. Referencias

- Abdullah, N. Iqbal, M. y Zafar, S. 1995. Potential of immobilized fungi as viable inoculum. *Mycologist* 9:168–71.
- Altschul, S. Gish, W. Miller, W. Myers, E. y Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Anderson I. y Cairney, J. 2007. Ectomycorrhizal fungi: exploring the mycelial frontier. *FEMS Microbiology Reviews* 31(4): 388– 406.
- Ángeles-Argáiz, R. 2012. *Estrategias de micorrización y producción de plantas de Pinus montezumae (Lamb.) en vivero* (tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México.
- Ángeles-Argáiz, R. 2015. *Propagación de cepas de hongos ectomicorrizicos con fines de inoculación* (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Ángeles-Argáiz, R. Flores-García, A. Ulloa, M. y Garibay-Orijel, R. 2016. Commercial *Sphagnum* peat moss is a vector for exotic ectomycorrhizal mushrooms. *Biological invasions* 18(1): 89-101.
- Ángeles-Argáiz, R. Carmona-Reyes, I. Quintero-Corrales, C. Medina-Macías, F. Blancas-Cabrera, A. Valdez-Cruz, N. Ulloa, M. Trujillo-Roldán, M. y Garibay-Orijel, R. 2020. From field sampling to pneumatic bioreactor mycelia production of the ectomycorrhizal mushroom *Laccaria trichodermophora*. *Fungal Biology* 124(3-4): 205- 218.
- Ángeles-Argáiz, R. en preparación. *Genómica comparativa de Laccaria trichodermophora como herramienta para entender su potencial biotecnológico* (tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Arnold, F.1996. Manual de vivero forestal: Elaborado para algunas especies forestales nativas de la zona templada del Sur de Chile. Documento Técnico CONAF-DED. 123 pp.
- Ballestrini, R. y Kottke, I. 2017. Structure and development of ectomycorrhizal roots. En: F. Martin (ed). *Molecular Mycorrhizal Symbiosis*. Oxford: Wiley-Blackwell pp: 47–61.
- Barragán-Soriano, J. Pérez-Moreno, J. Almaraz-Suárez, J. Carcaño-Montiel, M. y Medrano-Ortiz, K. 2018. Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 24(1): 3-16.
- Bashan, Y. Hernandez, J. Leyva, L. y Bacilio, M. 2002. Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 35(5): 359-368.
- Bobbu, H. 2016. Host specificity, mycorrhizal compatibility and genetic variability of *Pisolithus tinctorius*. *International Journal of Advanced Engineering, Management and Science* 2(11): 1835- 1848.

- Bonfante, P. y Genre, A. 2010. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature communications* 1(1): 1-11.
- Brundrett, M. Bougher, N. Dell, B. Grove, T. y Malajczuk, N. 1996. *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. ACIAR monograph. (ACIAR: Canberra).
- Brundrett, M. y Tedersoo, L. 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist* 220(4): 1108-1115.
- Burney, O. Aldrete, A. Alvarez-Reyes, R. Prieto-Ruíz, J. Sánchez-Velazquez, J. y Mexal, J. 2015. México—Addressing challenges to reforestation. *Journal of Forestry* 113(4): 404-413.
- Castellano, M. y Molina, R. 1989. *Mycorrhizae*. En: Landis T.D. Tinas T.W. McDonald S.E. Barnett J.P. (eds.) *The contaminar tree nursery manual*, Vol. 5. pp: 101- 167. Agric. Handbook. 674, Washington, D.C.
- Carrasco-Hernández, V. Pérez-Moreno, J. Espinosa-Hernández, V. Almaraz-Suárez, J. Quintero-Lizaola, R. Torres-Aquino. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 1 (4): 567-577.
- Carrasco-Hernández, V. Pérez-Moreno, J. Espinosa-Hernández, V. Almaraz-Suárez, J. Quintero-Lizaola, R. y Torres-Aquino, M. 2011. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista chilena de historia natural* 84(1): 83-96.
- Carrasco-Hernández, V. Rodríguez-Trejo, D. Pérez-Moreno, J. Duarte-Zaragoza, V. Navarro-Sandoval, J. y Quintero-Lizaola, R. 2018. Evaluación del costo de producción de inoculantes ectomicorrízicos neotropicales a base de esporas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 9(2): 417-429.
- Carrera-Nieva, A. y López-Ríos, G. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* 10(2): 93-98.
- Carreté, L. Ksiezopolska, E. Pegueroles, C. Gómez-Molero, E. Saus, E. Iraola-Guzmán, S. ... y Gabaldón, T. 2018. Patterns of genomic variation in the opportunistic pathogen *Candida glabrata* suggest the existence of mating and a secondary association with humans. *Current Biology* 28(1): 15-27.
- Cerviño F. J. Repiso V. Tapias R. 2003. *Micorrización controlada de especies forestales del suroeste de la península ibérica con hongos ectomicorrizógenos*. XII Congreso Forestal Mundial, Québec City, Canadá. Recuperado el 20 de abril de 2019 de: <http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/WFC/XII/0518-B4.HTM>
- Colpaert, J. 1999. *Thelephora*. En: Cairney, J. y Chambers, S. (eds.) *Ectomycorrhizal fungi. Key genera in profile*. pp 325-346. Springer-Verlag, Berlin.
- CONAFOR Comisión Nacional Forestal, M. 2010. *Prácticas de reforestación. Manual básico*. Zapopan, Jalisco. México.

- CONAFOR Comisión Nacional Forestal. 2012. *Evaluación Complementaria del PROCOREF Ejercicio Fiscal 2011*. Universidad Autónoma Chapingo.
- CONAFOR. Comisión Nacional Forestal. 2019. *Estado que Guarda el Sector Forestal en México 2019*. Jalisco, México.
- Corbery, Y. y LeTacon, F. 1997. Storage of ectomycorrhizal fungi by freezing. *Annals of Forest Science* 54(1): 211–217.
- Crahay, C. Wevers, J. Munaut, F. Colpaert, J. y Declerck, S. 2013. Cryopreservation of ectomycorrhizal fungi has minor effects on root colonization of *Pinus sylvestris* plantlets and their subsequent nutrient uptake capacity. *Mycorrhiza* 23(6): 463-471.
- Crahay, C. Munaut, F. Colpaert, J. Huret, S. y Declerck, S. 2017. Genetic stability of ectomycorrhizal fungi is not affected by cryopreservation at- 130° C or cold storage with repeated sub-cultivations over a period of 2 years. *Mycorrhiza* 27(6): 595-601.
- Daboussi, M. J. y Capy, P. 2003. Transposable elements in filamentous fungi. *Annual Reviews in Microbiology* 57(1): 275-299.
- da Silva, L. Kasuya, M. y Borges, A. 1999. Viability of ectomycorrhizal fungus mycelium entrapped in calcium alginate gel. *Mycorrhiza* 8(5): 263-266.
- Daguerre, Y. Plett, J. y Veneault-Fourrey, C. 2017. Signaling pathways driving the development of ectomycorrhizal symbiosis. En: F. Martin (ed.) *Molecular Mycorrhizal Symbiosis* pp: 141-157.
- de la Bastide, P. Kropp, B. y Piché, Y. 1994. Spatial distribution and temporal persistence of discrete genotypes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) Orton. *New Phytologist* 127: 547–556
- Di Battista, C. Selosse, M. Bouchard, D. Stenström, E. Le Tacon, F. 1996. Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 238. *Mycological Research* 100(11): 1315-1324.
- Di Battista, C. Bouchard, D. Martin, F. Genere, B. Amirault, J. y Le Tacon, F. 2002. Survival after outplanting of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N inoculated on *Douglas fir* (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) cuttings. *Annals of Forest Science* 59(1): 81-92.
- Dickson, A. Leaf, A. y Hosner, J. 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedling stock in nurseries. *The Forestry Chronicle* 36(1): 10-13.
- Ditengou, F. Müller, A. Rosenkranz, M. Felten, J. Lasok, H. Van Doorn, M. y Polle, A. 2015. Volatile signalling by sesquiterpenes from ectomycorrhizal fungi reprogrammes root architecture. *Nature communications* 6: 62- 79.
- Dinno, A. y Newton, H. 2015. Nonparametric Pairwise Multiple Comparisons in Independent Groups Using Dunn's Test. *The Stata Journal* 15(1): 292–300.

- Duponnois, R. y Garbaye, J. 1991. Techniques for controlled synthesis of the Douglas-fir-*Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. *Annales des sciences forestières* 48(6).
- Duryea, M. 1985 Evaluating seedlings: Importance to reforestation. En: Duryea, M. (ed). Evaluating seedling quality: Principles, procedures and predictive abilities of major test. Forest Research Laboratory. Oregon State University. Corvallis, Oregon. Estados Unidos.
- Farjon, A. 1996. Biodiversity of *Pinus* (Pinaceae) in Mexico: speciation and palaeoendemism. *Botanical Journal of the Linnean Society* 121(4): 365-384.
- Farjon A. 2013. *Pinus pringlei*. The IUCN Red list of threatened species. Recuperado de: 10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T42403A2977612.en
- Flores-Rentería, D. Barradas, V. y Álvarez-Sánchez, J. 2017. Ectomycorrhizal pre-inoculation of *Pinus hartwegii* and *Abies religiosa* is replaced by native fungi in a temperate forest of central Mexico. *Symbiosis* 74(2): 1-14.
- Fortin, J. Piché, Y. y Godbout, C. 1983, Methods for synthesizing ectomycorrhizas and their effect on mycorrhizal development. *Plant Soil* 71(1): 275-284.
- Franco, A. Sousa, N. Ramos, M. Oliveira, R. y Castro, P. 2014. Diversity and Persistence of ectomycorrhizal fungi and their effect on nursery-inoculated *Pinus pinaster* in a Post-fire plantation in Northern Portugal. *Microbial ecology* 68(4):761-772.
- Franco-Maass, S. Burrola-Aguilar, C. Arana-Gabriel, Y. y García-Almaraz, L. 2016. A local knowledge-based approach to predict anthropic harvesting pressure zones of wild edible mushrooms as a tool for forest conservation in Central Mexico. *Forest policy and economics* 73(1): 239-250.
- Galindo-Flores, G. Castillo-Guevara, C. Campos-López, A. y Lara, C. 2015. Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences* 93(4): 855-863.
- Garbaye, J. Dellwaulle, J. y Diangana, D. 1988, Growth responses of eucalypts in the Congo to ectomycorrhizal inoculation. *Forest Ecology and Management* 24(2): 151-157.
- Garbaye, J. 1990. Use of Mycorrhizas in Forestry. En: *Les Mycorrhizes des Arbres et Plantes Cultivées*, D.G. Strullu (ed.). Lavoisier, Paris, France, pp. 197–248.
- Gardes, M. y Bruns, T. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology* 2(2): 113-118.
- Garza-Ocañas, F. Carrillo-Parra, A. Guevara, G. García, J. Ocañas, L. Foroughbakhch, R. Quiñónez-Martínez, M. 2014. *Cantherellus cibarius* Fr.: An Ectomycorrhiza in Temperate Forests in Mexico. En: Ratikanta Maiti *et al.* (eds.) Applied Botany A Text Book. Puspaa Publishing House, India.

- GBIF Secretariat. 2017a. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2019-05-16. *Laccaria trichodermophora* G.M.Muell. accessed via GBIF.org on 2019-05-16.
- GBIF Secretariat. 2017b. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2019-05-16. *Pinus montezumae* Lamb. accessed via GBIF.org on 2019-05-16.
- Gomes, F. Machado, H. San Martin, E. Portugal, A. y Canhoto, J. M. 2013. Mycorrhizal synthesis between *Pisolithus arhizus* and adult clones of *Arbutus unedo* *in vitro* and in nursery. *Journal of forestry research* 24(4): 659-670.
- González-Ochoa, A. de Las Heras, J. Torres, P. y Sánchez-Gómez, E. 2003. Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill. and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *Annals of forest science* 60(1): 43-48.
- Graves, S. Piepho, HP. y Selzer, L. 2015. multcompView: Visualizations of Paired Comparisons. R package version 0.1-7. <https://CRAN.R-project.org/package=multcompView>.
- Griffin DH.1994. *Fungal physiology*, Wiley, New York.
- Grove, T. y Le Tacon, F. 1993. Mycorrhiza in plantation forestry. *Advances in Plant Pathology* 23(1): 191-227.
- Guidot, A., Verner, M. Debaud, J. y Marmeisse, R. 2005. Intraspecific variation in use of different organic nitrogen sources by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mycorrhiza* 15(3):167–177.
- Hedh, J. Johansson, T. y Tunlid, A. 2009. Variation in host specificity and gene content in strains from genetically isolated lineages of the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* s. lat. *Mycorrhiza* 19(8): 549-558.
- Hazard, C. Kruitbos, L. Davidson, H. Taylor, F. y Johnson, D. 2017a. Contrasting effects of intra- and interspecific identity and richness of ectomycorrhizal fungi on host plants, nutrient retention and multifunctionality *New Phytologist* 213(1): 852–863.
- Hazard, C. Kruitbos, L. Davidson, H. Mbow, F. Taylor, A. y Johnson, D. 2017b. Strain identity of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* is more important than richness in regulating plant and fungal performance under nutrient rich conditions. *Frontiers in microbiology* 8(1): 1874.
- Hernández-Cuevas, L. Guadarrama-Chávez, P. Sánchez-Gallén, I. y Ramos-Zapata, J. 2008. Micorriza arbuscular: colonización intrarradical y extracción de esporas. En: Álvarez-Sánchez, J. y Monroy-Ata, A. (eds): *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración*. UNAM, Facultad de Ciencias, México.
- Hobbie, E. A. Jumpponen, A. y Trappe, J. 2005. Foliar and fungal 15 N: 14 N ratios reflect development of mycorrhizae and nitrogen supply during primary succession: testing analytical models. *Oecologia* 146(2): 258-268.

- Hobbie, E. 2006. Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. *Ecology* 87(3): 563– 569.
- Homolka, L. 2014. Preservation of live cultures of basidiomycetes. Recent methods. *Fungal Biology* 118(2): 107–125.
- Honrubia, M. Torres, P. Díaz, G. y Cano, A. 1992. Proyecto LUCDEME VIII. *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales*. ICONA, 44 pp.
- Honrubia, M. Díaz, G. y Gutiérrez, A. 1997. Micorrización controlada de *Pinus halepensis* en vivero en función del tipo de inóculo y técnicas de cultivo. En *Congresos Forestales*.
- Hunt, G. 1990. Effect of styroblock design and copper on morphology of conifer seedlings. En: Rose, R., S. J. Campbell y T. D. Landis (eds.). Proceedings, Western Forest Nursery Association; 1990 August 13-17; Roseburg, OR. General Technical Report RM-200. Fort Collins, CO: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station: 218-222.
- Ishida, T. Nara, K. Tanaka, M. Kinoshita, A. y Hogetsu, T. 2008. Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist* 180(2): 491-500.
- Jha, B. Sharma, G. y Shukla, A. 2008. Effect of ectomycorrhizal development on growth in pine seedlings. *Journal of Plant Sciences* 3(1): 77-84.
- Johnson, D. Martin, F. Cairney, W. y Anderson, I. C. 2012. The importance of individuals: intraspecific diversity of mycorrhizal plants and fungi in ecosystems. *New Phytologist* 194(1): 614–628.
- Johnson, N. Graham, J. y Smith, F. 1997. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum. *New Phytologist* 135(4): 575-585.
- Kaewgrajang, T. Sakolrak, B. y Sangwanit, U. 2019. Growth Response of *Dipterocarpus tuberculatus* and *Shorea roxburghii* Seedlings to *Astraeus odoratus*. *Environment and Natural Resources Journal* 17(3): 80-88.
- Kang, H. Chen, X. Kemppainen, M. Pardo, A. G. Veneault-Fourrey, C. Kohler, A. y Martin, F. M. 2020. The small secreted effector protein MiSSP7. 6 of *Laccaria bicolor* is required for the establishment of ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental Microbiology* 22(4): 1435- 1446.
- Kong, A. Montoya, A. García-de Jesús, S. Ramírez-Terrazo, A. Andrade, R. Ruan-Soto, F. y Estrada-Torres, A. 2018. Hongos ectomicorrizógenos del Parque Nacional Lagunas de Montebello, Chiapas. *Revista mexicana de biodiversidad* 89(3): 741-756.
- Krause, K. Henke, C. Asiiimwe, T. Ulbricht, A. Klemmer, S. Schachtschabel, D. y Kothe, E. 2015. Biosynthesis and secretion of indole-3-acetic acid and its morphological effects on *Tricholoma vaccinum*-spruce ectomycorrhiza. *Applied and Environmental Microbiology* 81(20): 7003-7011.

- Kropáček, K. Cudlín, P. y Mejstřík, V. 1990. The use of granulated ectomycorrhizal inoculum for reforestation of deteriorated regions. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 28(1): 263-269.
- Kropp, B. y Fortin, J. A. 1987. The incompatibility system and relative ectomycorrhizal performance of monokaryons and reconstituted dikaryons of *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany* 66(2): 289-294.
- Kropp B. y Mueller G. 1999. *Laccaria*. In: Cairney J.W.G., Chambers S.M. (eds). *Ectomycorrhizal Fungi Key Genera in Profile*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kuek C. Tommerup I. y Malajczuck, N. 1992. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalyptus for plantations. *Mycological Research* 96(4):73–77.
- Kuo, A. Kohler, A. Martin, F. y Grigoriev, I. 2014. Expanding genomics of mycorrhizal symbiosis. *Frontiers in microbiology* 5: 582.
- Labbé, J. Murat, C. Morin, E. Tuskan, G. Le Tacon, F. y Martin, F. 2012. Characterization of transposable elements in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* *PLoS One* 7(8): e40197.
- Lalaymia, I., Cranenbrouck, S. y Declerck, S. 2014. Maintenance and preservation of ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 24(5): 323-337.
- Langridge, Y. y Dye, D. 1982. A bacterial disease of *Pinus radiata* seedlings caused by *Pseudomonas syringae*. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 25(2): 273-276.
- Lapeyrie, F. y Bruchet, G. 1985. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. *New phytologist* 100(4): 585-593.
- Larsen, P. Sreedasyam, A. Trivedi, G. Podila, G. Cseke, L. y Collart, F. 2011. Using next generation transcriptome sequencing to predict an ectomycorrhizal metabolome. *BMC Systems Biology*, 5: 70.
- Le Tacon, F. Jung, G. Mugnier, J. Michelot, P. y Mugnier, J. 1983. Efficacité en pépinière forestière d'un inoculum de champignon ectomycorhizien produit en fermenteur et inclus dans une matrice de polymères. *Annals of Forest Science* 40(2): 165- 176.
- Le Tacon, F. Jung, G. Mugnier, J. Michelot, P. y Maupérin C. 1985. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermenter and entrapped in polymeric gels. *Canadian Journal of Botany* 63(1): 1664–1668.
- Lehto, T. y Zwiazek, J. 2011. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza* 21(2):71-90.
- Liu, Y. Sun, Q. Li, J. y Lian, B. 2018. Bacterial diversity among the fruit bodies of ectomycorrhizal and saprophytic fungi and their corresponding hyphosphere soils. *Scientific reports* 8(1): 1-10.

- López-Gutiérrez, A. Pérez-Moreno, J. Hernández-Santiago, F. Uscanga-Mortera, E. García-Esteva, A. Cetina-Alcalá, V. y Xoconostle-Cázares, B. 2018. Nutrient mobilization, growth and field survival of *Pinus pringlei* inoculated with three ectomycorrhizal mushrooms. *Botanical Sciences* 96(2): 286-304.
- Luo, Z. B. Wu, C. Zhang, C. Li, H. Lipka, U. y Polle, A. 2014. The role of ectomycorrhizas in heavy metal stress tolerance of host plants. *Environmental and Experimental Botany* 108:47-62.
- Martin, F. y Selosse, M. A. 2008. The *Laccaria* genome: a symbiont blueprint decoded. *New Phytologist* 180: 296–310.
- Martin, F. Aerts, A. Ahrén, D. Brun, A. Danchin, E. Duchaussoy, F. y Salamov, A. 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452: 88-92.
- Martin, F. Kohler, A. Murat, C. Balestrini, R. Coutinho, P. Jaillon, O. ... y Porcel, B. 2010. Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464(7291): 1033-1038.
- Martin, F. Kohler, A. Murat, C. Veneault-Fourrey, C. Hibbett, D. 2016. Unearthing the roots of ectomycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology* 14(12): 760.
- Marx, D. y Daniel, W. 1976. Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Canadian Journal of Microbiology* 22:338–341.
- Marx, D. Hatch, A y Mendicino, J. 1977. High soil fertility decreases sucrose content and susceptibility of loblolly pine roots to ectomycorrhizal infection by *Pisolithus tinctorius*, *Canadian Journal of Microbiology* 55: 1569–1574.
- Marx, D. y Cordell, C. 1989. The Use of Specific Ectomycorrhizas to Improve Artificial Forestation Practices. En: *Biotechnology of Fungi Improving Plant Growth*, J.M. Whipps y R.D. Lumsden (Eds.), New York, USA, pp. 1–25.
- Marx, D. 1991. The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment. En: The Marcus Wallenberg Foundation Symposia No. 7, 1991, Stockholm. *Ecophysiology of ectomycorrhizae of forest trees*. Marcus Wallenberg Foundation, Stockholm, pp: 54–90.
- Marx, D. Ruehle, J. y Cordell, C. 1991. Methods for Studying Nursery and Field Response of Trees to Specific Ectomycorrhiza. En: *Methods in Microbiology*, J.R Norris, D.J. Read, A.K. Varma (Eds.), Academic Press, London, UK, pp: 383–411.
- Maupérin, C. Mortier, F. Garbaye, J. Le Tacon, F. y Carr, G. 1987. Viability of an ectomycorrhizal inoculum produced in a liquid medium and entrapped in a calcium alginate gel. *Canadian Journal of Botany* 65: 2329–2336.
- McCarthy, C. y Fitzpatrick, D. 2019. Pan-genome analyses of model fungal species. *Microbial genomics* 5(2): 1-23.

- Mello, A. y Balestrini, R. 2018. Recent insights on biological and ecological aspects of ectomycorrhizal fungi and their interactions. *Frontiers in Microbiology* 9: 216.
- Montoya, A. Kong, A. Estrada-Torres, A. Cifuentes, J. y Caballero, J. 2004. Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Diversity* 17(11): 115-143.
- Montoya, A. Kong, A. Garibay-Orijel, R. Méndez-Espinoza, C. Tulloss, R. E. y Estrada-Torres, A. 2014. Availability of wild edible fungi in La Malinche National Park, México. *Journal of Mycology*.
- Mortier, F. Le Tacon, F y Garbaye, J. 1989. Effect of dose and formulation of *Laccaria laccata* inoculum on mycorrhizal infection and growth of Douglas fir in a nursery. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 28(1): 351–354.
- Mueller, G. 1984. New North American species of *Laccaria* (Agaricales). *Mycotaxon* 20(1): 101-116.
- Mueller, G. y Strack, B. 1992. Evidence for a mycorrhizal host shift during migration of *Laccaria trichodermophora* and other agarics into neotropical oak forest. *Mycotaxon* 65(1): 249-256.
- Muszewska, A. Hoffman-Sommer, M. y Grynberg, M. 2011. LTR retrotransposons in fungi. *PLoS One* 6(12): e29425.
- Muszewska, A. Steczkiewicz, K. Stepniewska-Dziubinska, M. y Ginalski, K. 2017. Cut-and-paste transposons in fungi with diverse lifestyles. *Genome biology and evolution* 9(12): 3463-3477.
- Nair, A. J. 2008. *Introduction to biotechnology and genetic engineering*. Laxmi Publications, Ltd.
- Näsholm, T. Högborg, P. Franklin, O. Metcalfe, D. Keel, S. Campbell, C. ... y Högborg, M. N. 2013. Are ectomycorrhizal fungi alleviating or aggravating nitrogen limitation of tree growth in boreal forests?. *New Phytologist* 198(1): 214-221.
- Niculita-Hirzel, H. Labbé, J. Kohler, A. Le Tacon, F. Martin, F. Sanders, I. y Kües, U. 2008. Gene organization of the mating type regions in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* reveals distinct evolution between the two mating type loci. *New Phytologist* 180(2):329-342.
- Niemi, K. Julkunen-Tiitto, R. Tegelberg, R. y Häggman, H. 2005. Light sources with different spectra affect root and mycorrhiza formation in Scots pine in vitro. *Tree Physiology* 25(1): 123-128.
- NCBI Resource Coordinators. 2016. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 44(D1): D7–D19.
- Obase, K. 2020. Effects of bacterial strains isolated from the ectomycorrhizal roots of *Laccaria parva* on sporocarp production by the fungus in vitro. *Mycoscience* 61(1): 9-15.

- Orozco-Gutiérrez, G. Muños-Flores, H. Rueda-Sánchez, A. Sígala-Rodríguez, J. Prieto-Ruiz, J. García-Magaña, J. 2010. *Diagnóstico de la calidad de planta en los viveros forestales del estado de Colima*. Folleto Técnico Núm.1. Campo experimental Uruapan, Michoacán, México: SAGARPA. INIFAP. CIRPAC
- Oliveira, L. Rossi, M. Furigo-Junior, A. Nunes-Silva, F y Lopes, V. 2006. Viability and infectivity of an ectomycorrhizal inoculum produced in an airlift bioreactor and immobilized in calcium alginate. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:251–255.
- Osmundson, T. 2003. *Systematics of Rocky Mountain alpine Laccaria (basidiomycota, agaricales, tricholomataceae) and ecology of Beartooth Plateau alpine macromycetes* (Tesis doctoral). Montana State University. Estados Unidos.
- Pacheco-Cobos, L. Rosetti, M. Esquivel, A. y Hudson, R. 2015. Towards a traditional ecological knowledge-based monitoring scheme: a proposal for the case of edible mushrooms. *Biodiversity and Conservation* 24(5): 1253-1269.
- Parladé, X. 1992. *Técnicas de inoculación de abeto de Douglas (Pseudotsuga menziessi (Mirb.) Franco) con hongos ectomicorrízicos y su aplicación en reforestación*. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Parladé, J. Pera, J. Luque, J. 2003. Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza* 14(3): 171-175.
- Parladé, X. Hortal, S. de la Varga, H. y Pera, J. 2011. Intraspecific variability of *Lactarius deliciosus* isolates: colonization ability and survival after cold storage. *Mycorrhiza* 21(5): 393-401.
- Peart, P. Reynolds, W. y Reese, P. 2016. The generation of a steroid library using filamentous fungi immobilized in calcium alginate. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 125: 16-24.
- Pera, J. Álvarez, I. y Parladé, J. 1998. Eficacia del inoculo miceliar de 17 especies de hongos ectomicorrízicos para la micorrización controlada de: *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii*, en contenedor. *Forest Systems* 7(1):139-153.
- Pera, J. y J. Parladé. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria Sistema de Recursos Forestales* 14(3): 419-433.
- Pellegrin, C. Daguerre, Y. Ruytinx, J. Guinet, F. Kemppainen, M. Frey, N. y Veneault-Fourrey, C. 2019. *Laccaria bicolor* MiSSP8 is a small-secreted protein decisive for the establishment of the ectomycorrhizal symbiosis. *Environmental microbiology* 21(10): 3765-3779.
- Pérez-Moreno, J. y Read, D. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29(5):239-247.
- Pérez-Moreno, J. Martínez-Reyes, M. lorenzana-Fernández, A. Carrasco-Hernández, V. Méndez-Neri, M. 2009. Social and biotechnological studies of wild edible

- muushrooms in Mexico, with emphasis in the Izta-Popo and Zoquiapan national Parks. *Acta Botanica Yunnica* 15: 55-61.
- Pérez-Moreno, J. y Martínez-Reyes, M. 2014. Edible ectomycorrhizal mushrooms: biofactories for sustainable development. En: Guevara-Gonzalez, R. y Torres-Pacheco, I. (eds.). *Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI*, Switzerland: Springer International Publishing.
- Pérez-Moreno, J. Martínez-Reyes, M. Hernández-Santiago, F. y Ortiz-Lopez, I. 2020. Climate Change, Biotechnology, and Mexican Neotropical Edible Ectomycorrhizal Mushrooms. En: Pérez-Moreno, J. Guerin-Laguette, A. y Flores-Arzú, R. (eds.) *Mushrooms, Humans and Nature in a Changing World*. Springer, Cham. pp. 61-99).
- Pérez-Silva, E. Herrera, T. y Ocampo López, A. 2011. Nuevos registros de macromicetos para el municipio de Temascaltepec, Estado de México. *Revista mexicana de micología* 34(1): 23-30.
- Piattoni, F. Leonardi, P. Siham, B. Iotti, M. y Zambonelli, A. 2017. Viability and infectivity of *Tuber borchii* after cryopreservation. *CryoLetters* 38(1): 58-64.
- Plassard, C y Dell, B. 2010. Phosphorus nutrition of mycorrhizal trees. *Tree Physiology* 30(9):1129-1139.
- Plett, J. Kemppainen, M. Kale, S. Kohler, A. Legué, V. Brun, A. y Martin, F. 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. *Current Biology* 21(14): 1197-1203.
- Plett, J. M. Daguerre, Y. Wittulsky, S. Vayssières, A. Deveau, A. Melton, S. y Martin, F. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(22): 8299-8304.
- Plett, J. Tisserant, E. Brun, A. Morin, E. Grigoriev, I. Kuo, A... y Kohler, A. 2015. The mutualist *Laccaria bicolor* expresses a core gene regulon during the colonization of diverse host plants and a variable regulon to counteract host-specific defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28(3): 261-273.
- Prieto, J. García, J. Mejía, J. Huchín, A. y Aguilar, J. 2009. *Producción de planta del género Pinus en vivero en clima templado frío*. Publicación Especial Núm. 28. Campo Experimental Valle del Guadiana INIFAP-SAGARPA. Durango, Dgo. México. 48 p.
- Quintero-Corrales, C. 2019. *Allopatric instead of parapatric divergence of in an ectomycorrhizal fungus (Laccaria trichodermophora) in tropical sky-islands* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Quiroz-Marchant, I. Chung Guin-po, P. García- Rivas, E. González-Ortega, M. P. y Soto Guevara, H. 2009. Vivero forestal: producción de plantas nativas a raíz cubierta. *Gobierno de Chile, Infor, Centro Tecnológico de la planta forestal*, 128.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena Austria. URL <http://www.R-project.org/>

- Ramos, A. Bandala, V. y Montoya, L. 2017. A new species and a new record of *Laccaria* (Fungi, Basidiomycota) found in a relict forest of the endangered *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *MycKeys* 27(1): 77.
- Ramos, J. 2018. Estudio sobre la diversidad de los hongos y su conocimiento local del Cerro Comunal Teoca, Santa Cecilia Tepetlapa, Xochimilco, Ciudad de México, México (Tesis doctoral) Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Read, D. y Pérez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance?. *New Phytologist* 157(3): 475-492.
- Rentería-Chávez, M. Pérez-Moreno, J. Cetina-Alcalá, V. Ferrera-Cerrato, R. y Xoconostle-Cázares, B. 2017. Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrícicos en dos sustratos. *Revista argentina de microbiología* 49(1): 93-104.
- Repáč, I. 2011. Ectomycorrhizal inoculum and inoculation techniques. In: Rai R, Varma A (eds) *Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae*. Soil biology series. Springer, Berlin.
- Repáč, I. y Sendecký, M. 2018. Response of juvenile Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) to ectomycorrhizal inoculation of perlite-peat substrates in a nursery. *Journal of sustainable forestry* 37(8): 771-786.
- Reverchon, F. Ortega-Larrocea, M. Pérez-Moreno, J. Peña-Ramírez, V. y Siebe, C. 2010. Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* across a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, Mexico. *Canadian journal of forest research* 40(6): 1165-1174.
- Reverchon, F. Ortega-Larrocea y Pérez-Moreno, J. 2012. Soil factors influencing ectomycorrhizal sporome distribution in neotropical forests dominated by *Pinus montezumae*, Mexico. *Mycoscience* 53(3): 203-210.
- Richter, D. Dixon, T. y Smith, J. 2016. Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures after 30 years in cold storage in sterile water. *Canadian journal of microbiology* 62(11): 932-937.
- Ricker, M. Castillo-Santiago, M. Mendoza-Márquez, P. Nava-Cruz, Y. y Peña-Ramírez, V. 2010. Revisión del Programa Pro-Árbol 2008.
- Rincón, A. Alvarez, I. y Pera, J. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 11: 265- 271.
- Rincón, A. De Felipe, M. y Fernández-Pascual, M. 2007. Inoculation of *Pinus halepensis* Mill. with selected ectomycorrhizal fungi improves seedling establishment 2 years after planting in a degraded gypsum soil. *Mycorrhiza* 18(1): 23-32.
- Rodríguez, R. 2010. Manual de prácticas de viveros forestales. *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Colección "Manuales de Ingeniería Forestal". Primera Edición, México, 52 pp.*

- Rodríguez-Gutiérrez, I. Ramírez-Martínez, D. Garibay-Orijel, R. Jacob-Cervantes, V. Pérez-Moreno, J. Ortega-Larrocea, P y Arellano-Torres, E. 2019. Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 90(1).
- Robles-Villanueva, F. Rodríguez-Trejo, D. y Villanueva-Morales, A. 2017. Calidad de planta y supervivencia en reforestación de *Pinus montezumae* Lamb. *Revista mexicana de ciencias forestales* 8(42): 55-76.
- Rossi, M. Furigo, A. y Oliveira, V. 2007. Inoculant Production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. *Food Technology and Biotechnology* 45: 277- 288.
- Ryan, M. 2001. The use of immobilisation for the preservation of *Serpula lacrymans*. *Mycologist* 15(2): 65-67.
- Shah, F. Nicolás, C. Bentzer, J. Ellström, M. Smits, M. Rineau, F. ... 2016. Ectomycorrhizal fungi decompose soil organic matter using oxidative mechanisms adapted from saprotrophic ancestors. *New Phytologist* 209 (4): 1705–1719.
- Sánchez-González, A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y bosques* 14(1): 107-120.
- Sánchez-Ramírez, S. Wilson, A. y Ryberg, M. 2017. Overview of phylogenetic approaches to mycorrhizal biogeography, diversity and evolution. En: *Biogeography of Mycorrhizal Symbiosis*. Springer, Cham.
- Santiago-Martínez, M. 2008. Los hongos ectomicorrizógenos en las prácticas de restauración. En: Álvarez-Sánchez, J. y Monroy-Ata, A. (eds): *Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración*. UNAM, Facultad de Ciencias, México.
- Schwartz, M. Hoeksema, D. Gehring, C. Johson, N. Klironomos, J. Abbott, L. Pringle, A. 2006. The promise and the potential consequences of the global transport of mycorrhizal fungal inoculant *Ecology Letters* 9(1): 501–515.
- Schweiger, P. Rouhier, H. y Söderström, B. 2002. Visualisation of ectomycorrhizal rhizomorph structure using laser scanning confocal microscopy. *Mycological Research* 106(3): 349-354.
- Secretaría de Economía. 2016. Certificación de la operación de viveros forestales. NMX-AA-170-SCFI-2016. *Diario Oficial de la Federación*, 190-190.
- Simard, S. Jones, M. Durall, D. Perry, D. Myrold, D. Molina, R. 1997. Reciprocal transfer of carbon isotopes between ectomycorrhizal *Betula papyrifera* and *Pseudotsuga menziesii*. *New Phytologist* 137(3):529-542.
- Simard S, Beiler K, Bingham M. 2012. Mycorrhizal networks: mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews* 26 (1): 39–60.

- Simard, S. 2018. Mycorrhizal networks facilitate tree communication, learning, and memory. En: Baluska, F. *et al.* (eds.) *Memory and Learning in plants*. Springer, 191–213.
- Sisti, D. Giomaro, G. Cecchini, M. Faccio, A. Novero, M. y Bonfante, P. 2003. Two genetically related strains of *Tuber borchii* produce *Tilia* mycorrhizas with different morphological traits. *Mycorrhiza* 13(2): 107-115.
- Smith, A. Potvin, L. y Lilleskov, E. 2015. Fertility-dependent effects of ectomycorrhizal fungal communities on white spruce seedling nutrition. *Mycorrhiza* 25(8): 649-662.
- Smith, S. y Read, D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York, USA.
- Smith, D. y Onions, A. 1994. *IMI Technical Handbooks 2: the preservation and maintenance of living fungi*, 2nd ed. CAB International, Wallingford.
- Sundari, K. y Adholeya, A. 1999. Freeze-drying vegetative mycelium of *Laccaria fraterna* and its subsequent regeneration. *Biotechnology Techniques* 13:491–495.
- Teste, F. Jones, M. y Dickie, I. 2019. Dual-mycorrhizal plants: their ecology and relevance. *New Phytologist* 225(5): 1835-1851.
- Theodorou, C. 1990. Introduction of mycorrhizal fungi into soil by spore inoculation of seed. *Australian Forestry* 35: 23–26.
- Thomson BD, Malajczuk N, Grove TS, Hardy GESJ. 1993. Improving the colonization capacity and effectiveness of ectomycorrhizal fungal cultures by association with a host plant and re-isolation. *Mycological Research* 97:839–844.
- Tian, L. Chang, C. Ma, L. Nasir, F. Zhang, J. Li, W. ... y Tian, C. 2019. Comparative study of the mycorrhizal root transcriptomes of wild and cultivated rice in response to the pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Rice* 12(1): 35.
- Toprak, B. 2020. Early growth performance of mycorrhizae inoculated Taurus Cedar (*Cedrus libani* A. Rich.) seedlings in a nursery experiment conducted in inland part of Turkey. *Journal of Plant Nutrition* 43(2): 165-175.
- Trocha, L. Weiser, E. y Robakowski, P. 2016. Interactive effects of juvenile defoliation, light conditions, and interspecific competition on growth and ectomycorrhizal colonization of *Fagus sylvatica* and *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 26(1): 47-56.
- Tschaplinski, T. Plett, J. Engle, N. Deveau, A. Cushman, K. C. Martin, M. Z. ... y Martin, F. 2014. *Populus trichocarpa* and *Populus deltoides* exhibit different metabolomic responses to colonization by the symbiotic fungus *Laccaria bicolor*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27(6): 546-556.
- van der Heijden, M. Martin, F. Sanders, I. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytologist* 205 (4): 1406–1423.

- Veneault-Fourrey, C. Kohler, A. Morin, E. Balestrini, R. Plett, J. Danchin, E. ... y Martin, F. 2014. Genomic and transcriptomic analysis of *Laccaria bicolor* CAZome reveals insights into polysaccharides remodelling during symbiosis establishment. *Fungal Genetics and Biology* 72(1): 168-181.
- Vik, U. Logares, R. Blaalid, R. Halvorsen, R. Carlsen, T. Bekke, I. 2013. Different bacterial communities in ectomycorrhizal and surrounding soil. *Scientific Reports* 3(1): 1–8.
- Walter, D. y Proctor, H. 2013. Sex and celibacy. En: *Mites: Ecology, Evolution y Behaviour*. pp. 105-159. Springer, Dordrecht.
- Wickham, H. 2016. Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer- Verlag. New York.
- Wilson, A. Hosaka, K, Mueller, G. 2017. Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytologist* 213(4): 1862–1873.

ANEXOS

ANEXO 1. Comparaciones por pares con la prueba de Dunn para los valores de RAR del Experimento de infectividad.

Tabla A1. Comparaciones por pares con la prueba de Dunn ($p \leq 0.05$).

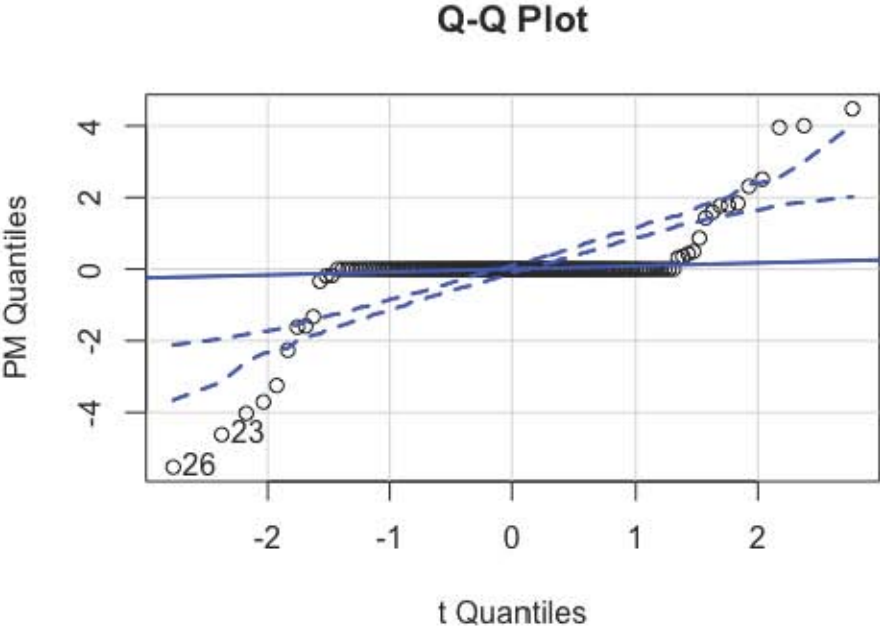
	CA15-F10	CA15-11	CA15-75
CA15-11	0.045	-	-
CA15-75	0.072	1.00	-
EF-36	0.097	1.00	1.00
Ajuste del p-value: Bonferroni			

ANEXO 2. Resultados de las pruebas de Shapiro-Wilk del experimento de efectividad.

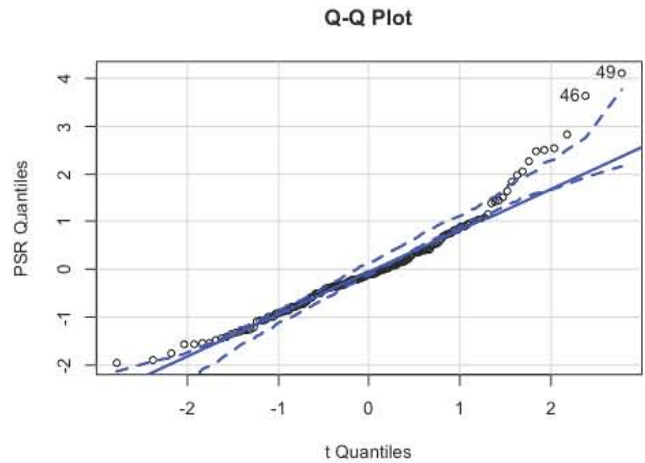
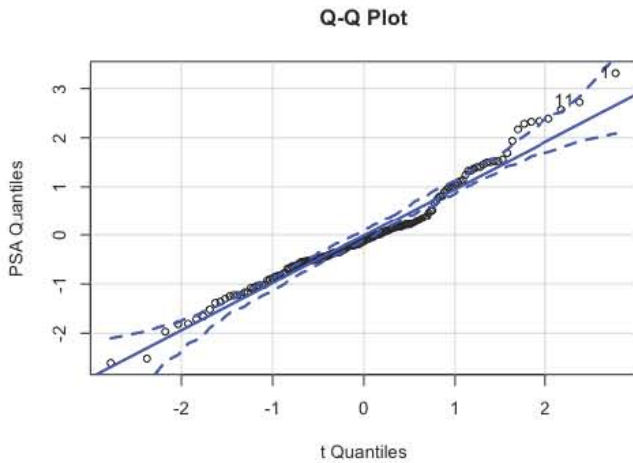
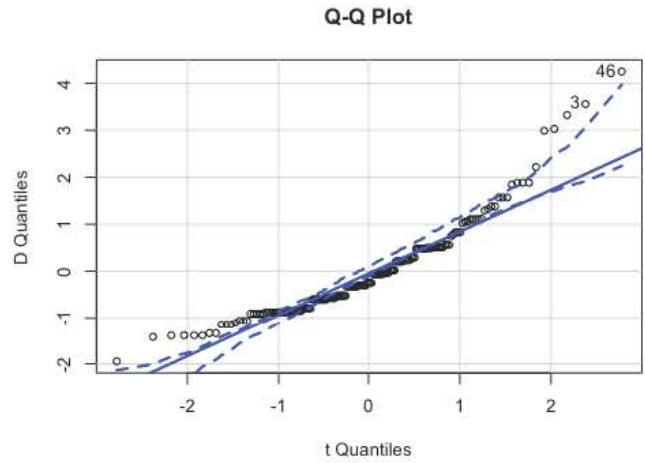
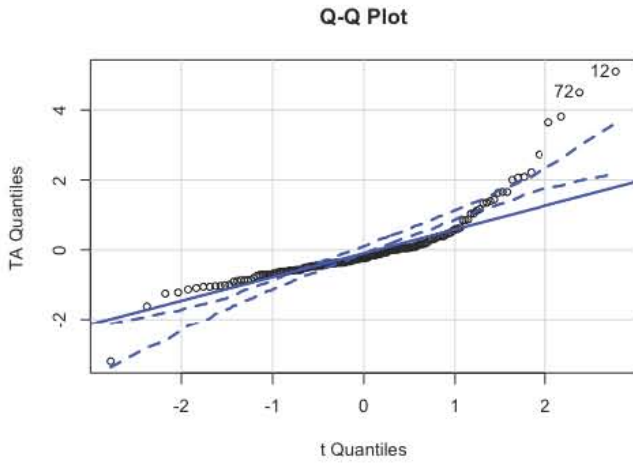
Tabla A2. Resultados de las pruebas de Shapiro-Wilk ($p \leq 0.05$).

	W	p
Porcentaje de micorrización	0.44637	< 2.2 e-16
Talla aérea	0.83561	3.605e-12
Diámetro	0.89896	4.572e-09
Peso seco aéreo	0.9552	4.904e-05
Peso seco radical	0.91979	8.92e-08
RAD	0.96086	0.0001668
RAR	0.93743	1.615e-06
DQI	0.67352	< 2.2e-16

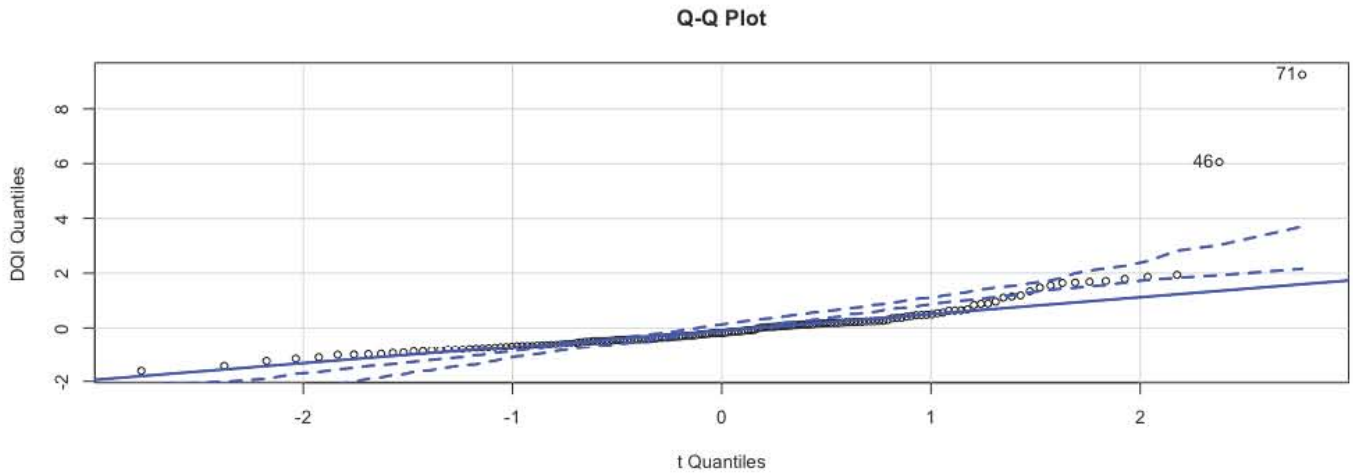
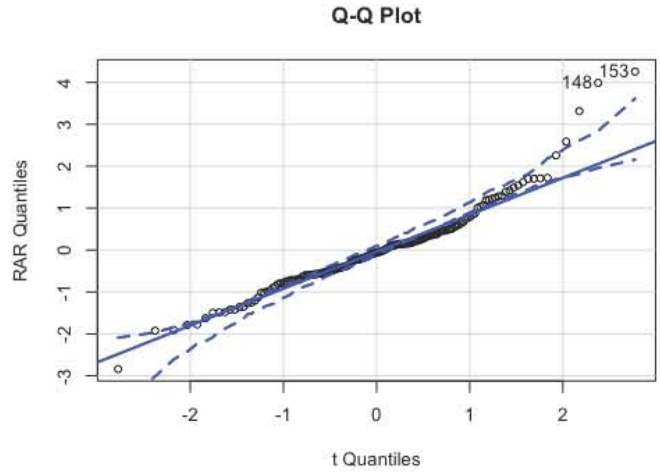
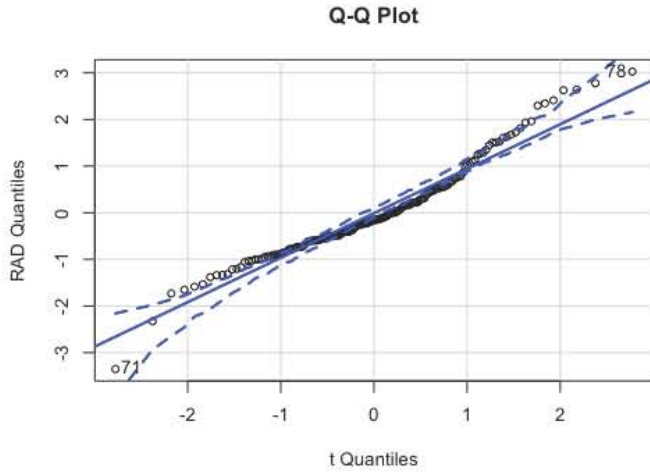
ANEXO 3. Gráfico Cuantil-Cuantil de los datos del porcentaje de micorrización del experimento de efectividad.



ANEXO 4. Gráficos Cuantil-Cuantil de los datos de los estimadores de crecimiento del experimento de efectividad.



ANEXO 5. Gráficos Cuantil-Cuantil de los datos de los índices de crecimiento del experimento de efectividad.



ANEXO 7. Comparaciones por pares con la prueba de Dunn para los datos de porcentaje de micorrización del experimento de efectividad.

Tabla A4. Comparaciones por pares con las pruebas de Dunn ($p \leq 0.05$).

	E	Mix	M	P
Mix	1	-	-	-
M	2.8e-09	<2e-16	-	
P	3.6e-09	<2e-16	1	-
C	2.3e-09	<2e-16	1	1

Ajuste del p-value: Bonferroni

ANEXO 8. Comparaciones por pares con la prueba de Dunn para los datos de los estimadores de crecimiento e índices del experimento de efectividad ($p \leq 0.05$).

Talla aérea

	E	Mix	M	P
Mix	0.04519	-	-	-
M	1	0.31129	-	
P	0.00920	1	0.01449	-
C	0.00119	1	0.00018	1

Ajuste del p-value: Bonferroni

Diámetro

	E	Mix	M	P
Mix	0.15534	-	-	-
M	0.03726	1	-	
P	0.00029	0.17349	0.13545	-
C	0.00047	0.28458	0.24331	1

Ajuste del p-value: Bonferroni

PSA

	E	Mix	M	P
Mix	0.00265	-	-	-
M	1	0.00028	-	
P	0.00031	1	1.2e-07	-
C	0.05198	0.76633	0.01589	0.06910

Ajuste del p-value: Bonferroni

PSR

	E	Mix	M	P
Mix	0.5900	-	-	-
M	1	0.1628	-	
P	0.0036	0.2063	3.3e-08	-
C	0.2841	1	0.0070	0.0697

Ajuste del p-value: Bonferroni

RAR

	E	Mix	M	P
Mix	0.056	-	-	-
M	0.8877	0.514	-	
P	1	0.012	0.979	-
C	1	0.061	1	1

Ajuste del p-value: Bonferroni

DQI

	E	Mix	M	P
Mix	0.545	-	-	-
M	1	0.819	-	
P	0.009	0.598	5.5e-05	-
C	0.583	1	0.607	0.054

Ajuste del p-value: Bonferroni

ANEXO 9. Contenido de SSP presentes en las cepas CA15-F10, CA15-11, CA15-75 y EF-36 de *Laccaria trichodermophora* (Tabla proporcionada por Ángeles-Argáiz, R.).

Tabla A5. Contenido de proteínas secretadas en los genomas de *Laccaria*, tipo de predicción y secuenciación.

Muestra	Secuenciación	Predicción	Secretoma	SSPs (≤ 300 aa)
<i>L. trichodermophora</i> (10Lt)	Illumina	AUGUSTUS	620	450
<i>L. trichodermophora</i> (11Lt)	Híbrido	AUGUSTUS	1730	813
<i>L. trichodermophora</i> (36Lt)	Híbrido	AUGUSTUS	983	438
<i>L. trichodermophora</i> (75Lt)	Illumina	AUGUSTUS	594	405
<i>L. amethystina</i>	Illumina	AUGUSTUS	845	398
<i>L. bicolor</i>	Sanger	AUGUSTUS	1002	451

ANEXO 10. CAZymes presentes en los genomas de *Laccaria amethystina*, *L. bicolor* y *L. trichodermophora* cepas CA15-F10, CA15-11, CA15-75 y EF-36 (Datos no publicados de Ángeles-Argáiz, R.). Gráficos elaborados con la paquetería ggplot2 (Wickham, 2016) de R Core Team v 3.6.1 (2019).

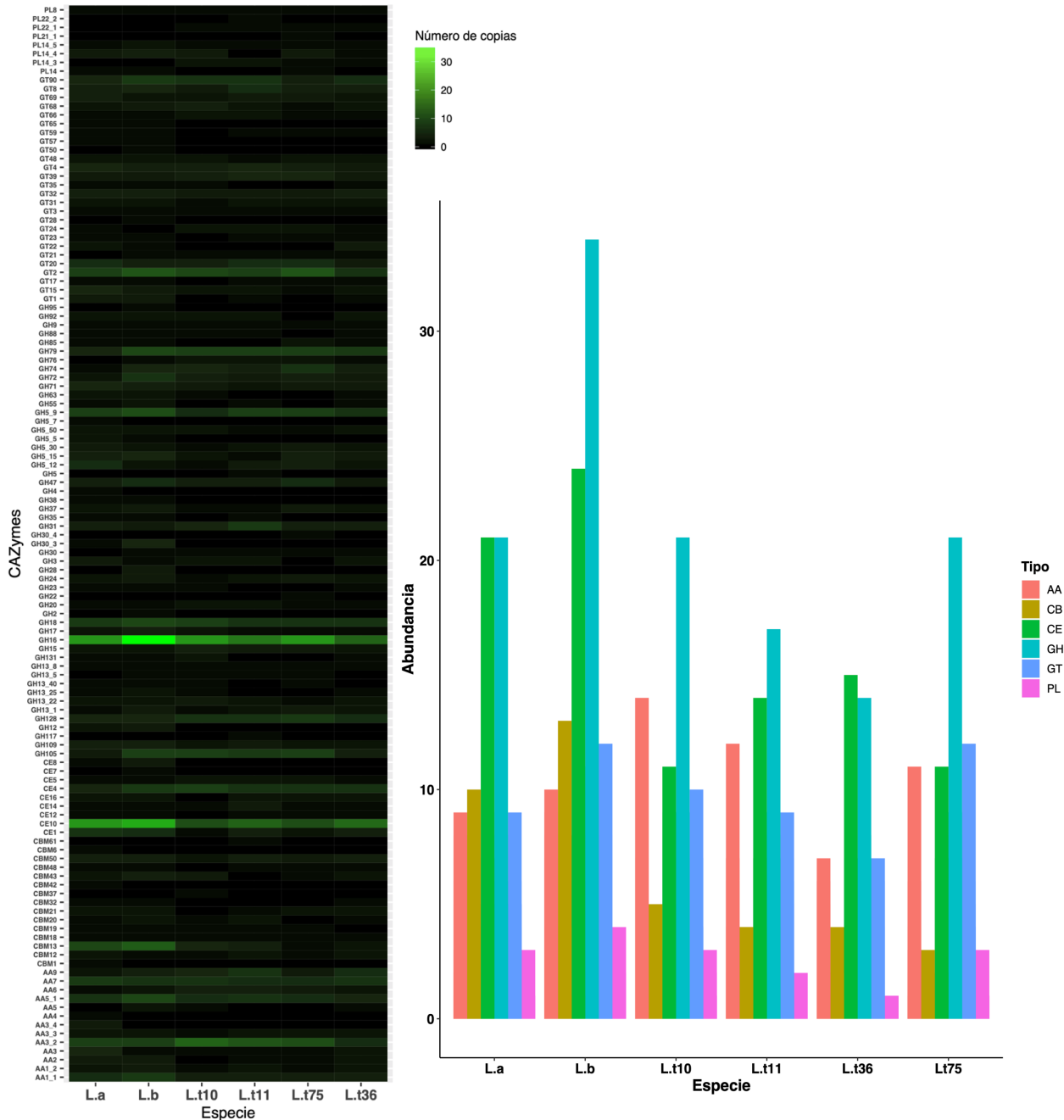


Figura A10. Contenido genómico de CAZymes en *Laccaria trichodermophora*. **A)** Heatmap de CAZymes en tres especies de *Laccaria* **L.a:** *Laccaria amethystina*; **L.b:** *Laccaria bicolor*; **L.t10:** *Laccaria trichodermophora* CA15-F10; **L.t11:** *Laccaria trichodermophora* CA15-11; **L.t75:** *Laccaria trichodermophora* CA15-75; **L.t36:** *Laccaria trichodermophora* EF-36. **B)** Número de CAZymes presentes en distintos genomas de *Laccaria* y organizadas por tipo **AA:** Auxiliary Activities; **CB:** Carbohydrate-binding modules; **CE:** Carbon Esterases; **GH:** Glycoside Hydrolases; **GT:** Glycosyl transferases; **PL:** Polysaccharide Liases.

ANEXO 11. Diferencias intraespecíficas de la producción de biomasa y consumo de glucosa de diferentes cepas de *Laccaria trichodermophora* (Modificado de Ángeles-Argáiz *et al.* 2020 con el permiso del autor), las estrellas rojas señalan las cepas usadas en este trabajo.

