

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**INDUCCIÓN DE BROTES ADVENTICIOS *in vitro* Y
MICORRIZACIÓN EN CONDICIONES DE VIVERO DE
Pseudotsuga macrolepis FLOUS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA VEGETAL)
P R E S E N T A
GEMA LILIA GALINDO FLORES

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARTURO ESTRADA-TORRES
CODIRECTOR DE TESIS: DR. VÍCTOR M. CHÁVEZ ÁVILA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Arturo Estrada-Torres y la codirección del Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Arturo Estrada-Torres

Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Dra. Lucía Yolanda Varela Fregoso

Dra. María Cecilia del Carmen Nieto de Pascual-Pola

Formó parte del proyecto "Selección de hongos ectomicorrizógenos para la producción de inoculantes en el estado de Tlaxcala", No. 4690 apoyado por el CONACYT, dirigido por la Dra. Guadalupe Santiago Martínez del Laboratorio de Micorrizas de Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Se contó con beca del CONACyT para los estudios de posgrado, beca de Intercambio Académico UNAM-UAT para la realización de la tesis y con apoyo de PROMEP-SEP.

Con un enorme agradecimiento a mis padres, Ernesto Galindo Florentino y Ofelia Flores Arriaga por su cariño y apoyo incondicional para lograr mis metas, por ser un ejemplo de superación.

A mis hermanos Perla Marina y Ernesto, por su paciencia y apoyo en este camino andado.

En memoria de Reyna Aurora, porque siempre estas conmigo.

A esa pequeña personita que me ha dado más motivos para seguir adelante....

....OSCAR LIAM

Con mucho cariño a Oscar, por su apoyo en todos los momentos recorridos juntos y por todo lo que nos falta.....

.....LOS QUIERO!!!

AGRADECIMIENTOS

Con todo mi agradecimiento y reconocimiento a mi director de tesis Dr. Arturo Estrada-Torres, por haberme abierto las puertas en el campo de las micorrizas, por su invaluable apoyo e inagotable paciencia por ser algo más que un asesor.....un amigo.

De manera muy especial al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, codirector de tesis, por guiarme en el cultivo de tejidos vegetales, por sus enseñanzas, por su apoyo y su gran amistad.

A mi jurado, la Dra. Lucía Varela Fregoso, la Dra. Cecilia Nieto de Pascual-Pola, el Dr. Teofilo Herrera Suárez, el Dr. Martín Mata Rosas y la Dra. Ana Laura López Escamilla, por la atención y cuidado puesto en la corrección del manuscrito, por todas sus sugerencias.

A Ana Laura López Escamilla por su apoyo desinteresado en la elaboración del trabajo y por su gran amistad.

A mis compañeros y amigos Laura Hernández, Lupita Santiago, Paty Olguín, Yolanda Nava, Adriana Montoya, Alejandro Kong-Luz, Mercedes Rodríguez y Alejandro Martínez por su apoyo y amistad sin medida.

A mis queridos alumnos y amigos Florencia García, Lupita Monjarás, Margarito Cruz, Lisbeth Espinosa, Esmeralda Cervantes, Erika Xochipa por aprender juntos, por soportarme y por todos los buenos momentos vividos.

A todas aquellas personas que de alguna manera se involucraron en la realización de este trabajo....

A todos, GRACIAS!!!

PRÓLOGO

En el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico de Instituto de Biología de la UNAM, se han dado a la tarea de propagar especies vegetales mexicanas en peligro de extinción o con graves problemas de regeneración natural, esto con el fin de ayudar a conservar el valioso germoplasma y la biodiversidad con la que cuenta nuestro país.

Aunado a esto, en el Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala se ha preocupado en el estudio de los hongos ectomicorrizógenos y su uso potencial para el establecimiento de prácticas sustentables de manejo forestal y conservación de bosques. Los enfoques de estudio han sido variados, desde inventariar la diversidad fungística, reconocer los usos que le dan los habitantes, hasta la selección de especies que garanticen el establecimiento de plantaciones forestales de importancia económica y/o ecológica.

La conjunción de disciplinas como la micropropagación mediante el cultivo de tejidos vegetales y el estudio de la ectomicorriza nos permite conocer y entender algunos de los procesos biológicos que ocurren en las plantas y proponer estrategias de conservación para aquellas que están amenazadas.

En presente trabajo de investigación se trataron de conjuntar ambas disciplinas con la finalidad de regenerar plántulas completas de *Pseudotsuga macrolepis*, especie sujeta a protección especial, mediante el cultivo de tejidos vegetales y favorecer su crecimiento mediante el uso de hongos ectomicorrizógenos.

El trabajo está estructurado en cuatro capítulos. Inicia con una introducción sobre el conocimiento, importancia y problemática de la especie. El segundo capítulo corresponde a la micropropagación *in vitro*, se describe el proceso morfogénico para la formación de brotes adventicios y se analiza el efecto de los reguladores de crecimiento en la respuesta morfogénica. En el tercer capítulo se contemplan aspectos fisiológicos de algunas cepas de hongos ectomicorrizógenos asociadas a *P. macrolepis*, como es el efecto de la fuente de carbono (glucosa) y su concentración en el crecimiento de la colonia miceliar, esto con el fin de optimizar su desarrollo para la producción de inóculo. El último capítulo trató sobre la micorrización de *P. macrolepis* con dos cepas de hongos ectomicorrizógenos, con ello se pretende corroborar la importancia que juega la ectomicorriza en la supervivencia y desarrollo de plantas de interés forestal.

La integración de los resultados obtenidos en los ensayos realizados en este trabajo, permitirán plantear nuevas estrategias de conservación de *P. macrolepis* y otras especies forestales que presentan serios problemas para su regeneración natural y por ende que están gravemente amenazadas o en riesgo de desaparecer de su hábitat natural.

Con el mejor deseo de que el presente estudio contribuya de alguna manera al conocimiento y aprovechamiento de los recursos forestales de nuestro país.

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1.1 Situación forestal del estado de Tlaxcala	5
1.2 El género <i>Pseudotsuga</i>	6
1.2.1 Reproducción y desarrollo	8
1.2.2 Producción y dinámica de los conos y semillas	11
1.2.3 Distribución y ecología	12
1.2.4 Importancia económica	13
1.3 Descripción taxonómica de <i>Pseudotsuga macrolepis</i>	14
1.4 Estado actual del conocimiento y problemática de los bosques de <i>Pseudotsuga</i> en México	16
1.5 Alternativas de propagación y perspectivas de conservación de los bosques de <i>Pseudotsuga</i> en México	18
1.6 Justificación	18
1.7 Objetivo general de la tesis	20
1.7.1 Objetivos generales de los capítulos	20
CAPITULO II. REGENERACIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Pseudotsuga macrolepis</i> FLOUS21	
2.1 Introducción	21
2.2 Métodos de regeneración <i>in vitro</i>	23
2.3 Requerimientos para el establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	31
2.4 Problemas asociados con el uso del cultivo de tejidos vegetales en la propagación de especies forestales	36
2.5 Micropropagación mediante el cultivo de tejidos del género <i>Pseudotsuga</i>	37
2.5.1 Inducción y formación de brotes adventicios	37
2.5.2 Inducción del enraizamiento <i>in vitro</i>	42
2.6 Justificación	45
2.7 Objetivo general	46
2.7.1 Objetivos específicos	46
2.8 Materiales y métodos	47
2.8.1 Procedencia del material biológico	47
2.8.2 Pretratamiento de las semillas: escarificación, desinfección y selección	48
2.8.3 Preparación de medios de cultivo	49
2.8.4 Cultivo de megagametofitos y embriones	50
2.9 Resultados y discusión	53
2.9.1 Procedencia del material biológico	53
2.9.2 Influencia del proceso de desinfección y los medios de cultivo en las respuestas morfogénicas	55
2.9.3 Respuesta morfogénica	57
2.9.3.1 Proceso de formación de brotes adventicios	57
2.9.3.2 Efecto de los tratamientos con reguladores de crecimiento en la respuesta morfogénica de los embriones	66
2.9.4 Enraizamiento	72
2.10 Conclusiones	75

CAPÍTULO III. PRUEBAS DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS ASOCIADOS CON <i>Pseudotsuga macrolepis</i> FLOUS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA	77
3.1 Introducción	77
3.2 Concepto de micorriza	79
3.3 Clasificación de la micorriza	80
3.4 Beneficios de la simbiosis micorrízica	81
3.5 Estructura de la ectomicorriza	82
3.6 Captación de nutrimentos	83
3.7 Importancia del carbón en el metabolismo del hongo	84
3.8 Estudios realizados con relación a los carbohidratos involucrados en la asociación planta-hongo ectomicorrizógeno	85
3.9 Estudios en México sobre aislamiento y desarrollo de cepas de hongos ectomicorrizógenos	89
3.10 Justificación	90
3.11 Objetivo general	91
3.11.1 Objetivos particulares	91
3.12 Materiales y métodos	92
3.12.1 Recolección del material biológico	92
3.12.2 Aislamiento y cultivo puro de hongos ectomicorrizógenos	92
3.12.3 Cultivos en diferentes concentraciones de glucosa	93
3.12.4 Evaluación de variables de crecimiento	93
3.13 Resultados y discusión	95
3.13.1 Recolección y aislamiento del material biológico	95
3.13.2 Pruebas de crecimiento de cepas de hongos ectomicorrizógenos en cinco concentraciones de glucosa	96
3.13.3 Caracterización macro y microscópica de las cepas estudiadas	97
3.13.4 Evaluación de la tasa media de crecimiento, crecimiento radial, biomasa y relación biomasa/área	112
3.14 Conclusiones	126
CAPÍTULO IV. MICORRIZACIÓN DE PLÁNTULAS DE <i>Pseudotsuga macrolepis</i> FLOUS EN CONDICIONES DE VIVERO	128
4.1 Introducción	128
4.2 Aislamiento y cultivo <i>in vitro</i> de hongos ectomicorrizógenos	129
4.2.1 Selección de hongos	129
4.3 Micorrización en los viveros	130
4.4 Tipos de inóculo y métodos de micorrización en vivero	131
4.5 Estado de conocimiento del uso de la inoculación con hongos ectomicorrizógenos	133
4.5.1 Estado de conocimiento sobre la producción de inoculante y micorrización de especies forestales en México y Tlaxcala	135
4.6 Estudios sobre ectomicorriza del género <i>Pseudotsuga</i> y problemática de <i>P. macrolepis</i>	137
4.7 Justificación	140
4.8 Objetivo general	141
4.8.1 Objetivos particulares	141
4.9 Materiales y Métodos	142
4.9.1 Preparación de inóculo miceliar	142

10. Procedencia de los brotes adventicios de *Pseudotsuga macrolepis* y tratamientos de enraizamiento a los que fueron sometidos.
11. Tipos de micorrizas.
12. Cepas de hongos aislados asociados a *P. macrolepis* que se mantienen en el Cepario del CICB, UAT.
13. Tasa media de crecimiento (mm/día) y crecimiento radial (mm) de dos cepas de *Amanita* en cinco concentraciones de glucosa evaluados durante 30 días.
14. Biomasa (mg) y la relación biomasa/área (mg/mm²) de dos cepas de *Amanita* en cinco concentraciones de glucosa evaluados durante 30 días
15. Tasa media de crecimiento (mm/día) obtenida en diferentes concentraciones de glucosa de ocho cepas de *Suillus* asociados con *P. macrolepis* evaluados durante 30 días.
16. Crecimiento radial (mm) obtenido en diferentes concentraciones de glucosa de ocho cepas de *Suillus* asociados con *P. macrolepis* evaluados durante 30 días.
17. Biomasa (mg) obtenida en diferentes concentraciones de glucosa de ocho cepas de *Suillus* asociados con *P. macrolepis* evaluados durante 30 días.
18. Relación biomasa/área (mg/mm²) obtenida en diferentes concentraciones de glucosa de ocho cepas de *Suillus* asociados con *P. macrolepis* evaluados durante 30 días.
19. Porcentaje de supervivencia, altura y diámetro de la corona foliar de plántulas de *P. macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos ectomicorrizógenos evaluados durante 12 meses.
20. Biomasa aérea y porcentaje de colonización micorrízica de plántulas de *P. macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos ectomicorrizógenos evaluados durante 12 meses.

ÍNDICE DE GRÁFICAS

1. Tasa media de crecimiento de las colonias de dos cepas de *Amanita* en cinco concentraciones de glucosa.
2. Crecimiento radial de las colonias de dos cepas de *Amanita* en cinco concentraciones de glucosa.
3. Biomasa de las colonias de dos cepas de *Amanita* en cinco concentraciones de glucosa.
4. Relación biomasa/área de dos cepas de *Amanita* en cinco concentraciones de glucosa.
5. Tasa media de crecimiento de las colonias de ocho cepas de *Suillus* en cinco concentraciones de glucosa.
6. Crecimiento radial las colonias de ocho cepas de *Suillus* en cinco concentraciones de glucosa.
7. Biomasa de las colonias de ocho cepas de *Suillus* en cinco concentraciones de glucosa.
8. Relación biomasa/área (mg/mm²) de las colonias de ocho cepas de *Suillus* en cinco concentraciones de glucosa.
9. Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos micorrizógenos.
10. Altura de plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos micorrizógenos.
11. Diámetro (cm) de plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos micorrizógenos.
12. Biomasa aérea (mg) de plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos micorrizógenos.
13. Porcentaje de colonización micorrízica de plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos micorrizógenos.

4.9.2 Micorrización de <i>Pseudotsuga macrolepis</i> en condiciones de vivero	143
4.9.3 Evaluación de variables	143
4.10 Resultados y discusión	145
4.10.1 Supervivencia	145
4.10.2 Altura, diámetro de la corona foliar y biomasa aérea de plántulas de <i>P. macrolepis</i>	146
4.10.3 Porcentaje de colonización micorrízica	150
4.11 Conclusiones	152
5. CONCLUSIÓN GENERAL	154
ANEXOS	157
LITERATURA CITADA	167

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Distribución del género *Pseudotsuga* en Norteamérica.
2. Ciclo de vida de una conífera.
3. Distribución de *Pseudotsuga macrolepis* en el estado de Tlaxcala.
4. Esquema de algunas características morfológicas de *Pseudotsuga macrolepis*.
5. a) Bosque de *Pseudotsuga macrolepis* ubicado en el Mpio. de Terrenate, b) árbol adulto de *P. macrolepis*.
6. Métodos de propagación *in vitro* a través del cultivo de tejidos vegetales.
7. Concentraciones relativas de auxinas y citocininas requeridas para el desarrollo y morfogénesis.
8. Corte longitudinal de una semilla madura de gimnosperma.
9. Desarrollo morfogenético de *Pseudotsuga macrolepis*.
10. Desarrollo morfogenético de *Pseudotsuga macrolepis*.
11. Estructura de una ectomicorriza.
12. Carpóforos y crecimiento micelial de las cepas de hongos estudiadas.
13. Cepas de *Suillus* spp. a los treinta días de crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa.

ÍNDICE DE CUADROS

1. Especies de gimnospermas que se han regenerado *in vitro*, explante utilizado y respuesta morfogenética obtenida.
2. Sumario de los estudios sobre el cultivo *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii*.
3. Tratamientos de enraizamiento usados en la propagación de *Pseudotsuga menziesii*.
4. Ubicación y características de las localidades estudiadas.
5. Procedencia de las semillas cultivadas en los diferentes medios de cultivo.
6. Combinaciones de reguladores de crecimiento en las que se cultivaron megagametofitos y embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* en las seis procedencias.
7. Comparación de semillas recolectadas, embriones cultivados y la respuesta morfogenética.
8. Comparación de las semillas recolectadas, cultivadas *in vitro* y la respuesta morfogenética de los embriones en las diferentes fases de desarrollo.
9. Cambios morfogenéticos que presentaron los embriones de diferentes procedencias y tratamientos con reguladores de crecimiento.

RESUMEN

Los bosques de *Pseudotsuga macrolepis* se encuentran restringidos a cuatro localidades del estado de Tlaxcala, éstas constituyen las zonas más sureñas de su distribución en México. Desafortunadamente, estos bosques están en peligro de ser erradicados debido al alto grado de deforestación que sufren. Una alternativa para propagar esta conífera es el uso de técnicas de cultivos de tejidos y su inoculación con cepas de hongos ectomicorrizógenos para favorecer su supervivencia y crecimiento. Por tal motivo, en el presente trabajo se planteó inducir la regeneración de plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous mediante el cultivo *in vitro* de embriones maduros, evaluar la influencia de la glucosa en el crecimiento micelial de diez cepas de hongos micorrizógenos y promover la micorrización de esta conífera con dos cepas de hongos ectomicorrizógenos en condiciones de vivero.

Para promover la formación de brotes adventicios se cultivaron megagametofitos y embriones maduros en los medios nutritivos Murashige-Skoog, B5 modificado por Litz y Shenck-Hildebrandt contemplando 24 combinaciones de dos reguladores de crecimiento BA (0, 0.5, 1, 2, 3 y 5 g/l) y ANA (0,0.1, 0.5, 1 y 3 g/l). Para inducir el enraizamiento los brotes fueron tratados con ANA (1 mg/l), ANA/BA (0.1/1 mg/l) y AIB (3 y 5 mg/l). Con respecto a los resultados tenemos que sólo el 24.6% de los embriones mostró una respuesta morfogénica, dando lugar a callos, éstos formaron de 5 a 9 brotes adventicios por embrión vía organogénesis indirecta. Inicialmente los brotes dieron lugar a hojas periféricas y posteriormente a hojas centrales, éstas se agruparon densamente formando rosetas que se alongaron. Los brotes fueron individualizados cuando alcanzaron una talla de 1.5 a 2.5 cm. Aunque no hubo un patrón definido de respuesta morfogénica con respecto a los tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento (BA/ANA), fue necesaria su aplicación exógena para inducir el desarrollo de los brotes. No se logró el enraizamiento debido a que el número de brotes obtenidos fue bajo y no permitió realizar más experimentos para la inducción de raíces. Asimismo, se obtuvo un mayor número de brotes en las semillas procedentes del Mpio. de Terrenate, debido a que presentaron un mayor porcentaje de viabilidad con respecto a las del Mpio. de Tlaxco.

Por otra parte, diez cepas de hongos micorrizógenos, ocho del género *Suillus* y dos de *Amanita*, fueron sometidas a pruebas de crecimiento en cinco concentraciones de glucosa (5,10, 20, 30 y 40 g/l) adicionadas al medio BAF. Se efectuó la caracterización macro y microscópica del crecimiento colonial de cada una de las cepas estudiadas. También se evaluó la tasa media de crecimiento, crecimiento radial, biomasa y relación biomasa/área. En cuanto a caracterización macroscópica, las cepas pertenecientes al género *Amanita* presentaron coloración blanquecina con ligeros tono grisáceos, la textura aterciopelada, densa con una superficie plana y una de ellas cambio de coloración al medio a rosa violáceo. Algunas cepas de *Suillus* presentaron coloraciones que van desde amarillo pálido a color café amarillento, presentando pliegues radiales, zonaciones concéntricas debidas a los cambios de coloración, textura

aterciopelada, de laxa a algodonosa compacta; otras presentaron coloraciones homogéneas y escasos pliegues radiales. Microscópicamente, las cepas de *Amanita* presentaron hifas septadas de menor diámetro que las de *Suillus*, de pared delgada, con ramificaciones, algunas vesículas, gúttulas y fibulas; las ocho cepas de *Suillus* presentaron hifas septadas y poco ramificadas, de pared gruesa, con vesículas intercalares, gúttulas e incrustaciones. Los resultados obtenidos en las pruebas de crecimiento, indican las cepas de *Amanita* y *Suillus* presentaron cuatro patrones de crecimiento de acuerdo con sus requerimientos de carbohidratos: 1) Cepas que tienen sus valores máximos de crecimiento en concentraciones bajas de glucosa (TLAX 44 y TLAX 40), 2) Cepas que se desarrollan bien en altas concentraciones de glucosa (TLAX 41, TLAX 48 y TLAX 55), 3) Cepas que crecen indistintamente en cualquier concentración con excepción de 5 g/l de glucosa (TLAX 42, TLAX 53 y TLAX 51) y 4) Cepas que crecen bien en cualquier concentración (TLAX 4 y TLAX 49). Lo anterior es indicativo de que las cepas estudiadas tienen diferentes estrategias de crecimiento, las cuales están determinadas por la capacidad del hongo para explorar, explotar y optimizar los recursos disponibles en el medio donde se desarrollan.

Finalmente, se indujo la micorrización de *P. macrolepis* con dos cepas de hongos: *Suillus lakeii* (TLAX 40) y *S. glandulosipes* (TLAX 49) en condiciones de vivero; para lo cual se produjo inóculo de ambas cepas en frascos lecheros con una mezcla de turba y vermiculita y el medio nutritivo BAF. Se inocularon plántulas de 25-30 días con 33 ml del inóculo adicionado al suelo forestal estéril, las plantas fueron sometidas a las labores normales de invernadero. Durante un año, trimestralmente se evaluó el porcentaje de supervivencia y de colonización micorrízica, así como el crecimiento de la planta expresando en altura, diámetro de la corona foliar y biomasa de la parte aérea. Con respecto a los resultados, se encontró que para la supervivencia los valores fluctuaron entre el 67 y 80 % al final del ensayo, no habiendo diferencias entre las plántulas inoculadas y las no inoculadas. Al evaluar el porcentaje de colonización, al año se observaron valores de 49 a 57% en las plantas inoculadas, lo cual es considerado como buena. Con respecto a la altura y la biomasa de la parte aérea, las plantas inoculadas alcanzaron un mayor tamaño y peso con respecto a las no inoculadas. En cuanto al diámetro de la corona foliar, no se presentaron diferencias entre las plantas inoculadas y las no inoculadas, lo cual es indicativo que un año no fue suficiente para evaluar esta variable en especies de lento crecimiento como *P. macrolepis*. Como se puede observar la inoculación con cualquiera de las dos cepas favoreció el crecimiento con respecto a las plantas no inoculadas.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La ubicación de México entre dos regiones biogeográficas (Neártica y Neotropical), así como la gran variedad de climas, topografía y geología, dan como resultado que nuestro país presente una gran diversidad biológica, así como distintos tipos de vegetación (Cairns *et al.*, 1995). Estos últimos incluyen a los desiertos, bosques tropicales, zonas de alta montaña y bosques de coníferas (Rzedowski, 1978).

Entre los ecosistemas más representativos de México están los bosques de coníferas, los cuales son propios de zonas de clima templado y de clima frío, ocupan vastas extensiones del territorio nacional, éstos se distribuyen desde el nivel del mar hasta las porciones más elevadas del país (Rzedowski, 1978).

Como comunidad, los bosques de coníferas contribuyen a la regulación del ciclo hidrológico, a mantener un microclima propicio para el crecimiento de diversas especies vegetales y animales, a purificar la atmósfera y el agua; desde el punto de vista económico a muchas especies se les ha dado una gran variedad de usos, que considera desde árboles de Navidad hasta su explotación para satisfacer las demandas de la industria mueblera, constructora, papelera y química (Villalobos *et al.*, 1983; Cronquist, 1984).

Esa variedad de usos y la falta de planeación para la conservación de los recursos naturales ha ocasionado una progresiva deforestación que se ha venido realizando desde tiempos inmemoriales, provocada principalmente por una tala desmedida, las actividades ganaderas y agrícolas que se realizan en suelos inadecuados para tales fines, además de un uso incontrolado de las escasas reservas hídricas, estos factores han contribuido significativamente al incremento de la desertificación, que conjuntamente con los procesos erosivos conforman uno de los principales problemas que afectan no sólo a este tipo de vegetación, sino a alrededor del 80% del territorio mexicano (Valdés *et al.*, 1983).

En 1983, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales (INIF) estimó que en el país existían 49.7 millones de hectáreas de bosques que constituían el 26% de los 191 millones de ha de la superficie total del país, de los cuales 21 millones comprendían bosques de coníferas (Styles, 1993; Cairns *et al.*, 1995). Estos bosques han sido reducidos de sus áreas originales, particularmente a partir de los 60's. Se ha estimado que el intervalo de deforestación anual va de 365 000 a 1 500 000 ha, con un promedio de 1.3% anual que varía de acuerdo con el tipo de bosque: 1.9% en bosque decíduo, 2.0% en bosque tropical siempre verde, 0.64% para coníferas templadas y 0.67% para bosques templados de hoja ancha. También se ha calculado que la tasa anual de deforestación total sobrepasa la cantidad de áreas reforestadas, estimadas en 50 000 ha, que constituyen menos del 8 % del área deforestada (Masera *et al.*, 1992).

Los bosques de México conforman un recurso en decline que tiene un efecto a nivel local, regional y global, incluyendo la pérdida de la biodiversidad. En la actualidad, el manejo de algunos ecosistemas forestales se dirige a beneficios inmediatos que los bosques proveen para la sociedad, tales como alimento, combustible, madera, productos comerciales y recreación. La aplicación de prácticas de manejo integral sustentable que consideren factores ecológicos y socioeconómicos puede revertir los efectos negativos de la deforestación (Cairns *et al.*, 1995).

Debido a la destrucción acelerada de los bosques es necesario tomar medidas tendientes a conservar, restaurar, proteger y aprovechar racionalmente la riqueza forestal, prestando especial atención al aprovechamiento racional de los recursos naturales contenidos en los ecosistemas forestales, además de proponer un aprovechamiento adecuado para el beneficio económico, sin comprometer la capacidad de regeneración de la naturaleza y proveer beneficios a futuro (SEDESOL, 1993).

Los esfuerzos prioritarios de conservación deberán estar encaminados a aquellas regiones donde la biodiversidad y el número de especies endémicas sean elevados o estén amenazados. El manejo de los recursos debe quedar vinculado y condicionado a sistemas de conservación de vegetación, de suelo y agua, para asegurar un aprovechamiento adecuado (SEDESOL, 1993).

1.1 SITUACIÓN FORESTAL EN EL ESTADO DE TLAXCALA

El estado de Tlaxcala carece de una tradición en actividades forestales, es hasta la década de los 80's cuando se establecen métodos de aprovechamiento de los bosques en algunas regiones. La producción maderable del estado ocupa el 17° lugar a nivel nacional con 50 940 m³ de madera en rollo (SEMARNAT, 2000). De acuerdo con el Inventario Forestal Periódico de la entidad, Tlaxcala tiene dos tipos de ecosistemas; zonas áridas (árido y semiárido) y templado-frío (SARH, 1994).

El ecosistema de zonas áridas presenta un tipo de vegetación de matorral xerófito. Las especies vegetales que destacan son *Agave* spp., *Opuntia* spp., *Stipa* spp. y *Yuca* spp. La vegetación de las zonas áridas es muy diversa debido a la variación de microambientes derivados de la oscilación térmica y la escasa precipitación. Aunque por las características del suelo y clima no son convenientes las prácticas agropecuarias, con frecuencia se realizan cambios del uso del suelo para la agricultura de baja producción y se presenta el sobrepastoreo, dando como resultado la alteración de las condiciones de la vegetación y provocando erosión de los suelos (SARH, 1994).

En el ecosistema de zonas templadas, los tipos de vegetación presentes son bosques de pino, pino-encino, oyamel, encino y bosque fragmentado. Dentro de esta asociación se incluyen comunidades arbóreas propias de un clima templado-frío que se conforman por *Abies religiosa*, *Pinus ayacahuite*, *P. leiophylla*, *P. montezumae*, *P. hartwegii*, *P. patula*, *P. pseudostrabus*, *Pseudotsuga macrolepis*, *Quercus candicans*, *Q. crassifolia*, *Q. obtusata*, *Q. rugosa*, *Arbutus* spp., *Crupessus benthamii* y *Juniperus deppeana* (SARH, 1994).

Actualmente, estos bosques presentan evidencias de disturbio, debido a los cambios de uso de suelo, a los incendios forestales, al pastoreo intensivo y a las talas clandestinas (SAGAR, 1994).

Un ejemplo de ello son los bosques de *Pseudotsuga macrolepis*, que a pesar de ser uno de los tipos de vegetación más importantes, se han visto gravemente dañados debido a factores bióticos y abióticos lo cual los ha colocado en la categoría de especie amenazada (DOF, 2001).

1.2 EL GÉNERO *Pseudotsuga*

Los árboles de este género se distribuyen de manera natural en el continente Americano y el sureste asiático (Farjon, 1990). A pesar de su amplia distribución; aún se mantienen controversias sobre la ubicación taxonómica, de acuerdo con Flous se conocen 22 especies y 2 variedades (Martínez, 1953), pero algunos autores consideran que esta clasificación se basó en diferencias mínimas y poco constantes por lo que no es aceptada. Por su parte El-Kassaby *et al.* (citado por Goldfarb y Zaerr, 1989) y la mayoría de los botánicos norteamericanos reconocen de ocho a once especies según los diferentes autores, seis de ellas están en Asia Oriental: *Pseudotsuga japonica* (Shiras) Beissn en Japón, *P. wilsoniana* Hayata en Taiwán, *P. forrestii* Craib., *P. sinensis* Dode, *P. gaussenii* Flous y *P. brevifolia* Chang et L.K. Fu en China. Las dos restantes se ubican en Norteamérica: *P. macrocarpa* (Torr.) Mayr, que se distribuye a lo largo de la porción montañosa del Sur de California y *P. menziesii* (Mirb.) Franco, la cual se localiza en el Oeste de Norteamérica, y que presenta dos variedades: *P. menziesii* var. *menziesii* en la de la costa y *P. menziesii* var. *glauca* en el interior (Figura 1).

En la República Mexicana, su ubicación taxonómica es tema de discusión debido a que los botánicos estadounidenses han considerado que la especie que se distribuye en el país corresponde a *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Hermann y Lavender, 1990; Debreczy y Rácz, 1995); sin embargo, los botánicos mexicanos y franceses la han considerado como cuatro taxa distintos denominados *P. macrolepis* Flous, *P. flahuati* Flous, *P. guinieri* Flous y *P. rehderi* Flous, debido a que presentan algunas diferencias morfológicas (Martínez, 1953; Acosta-Pérez, 1992; Pérez-Rodríguez, 2000).

Para efectos de este trabajo, se considerará la nomenclatura propuesta por los botánicos mexicanos y franceses, que contempla a la especie que se localiza en el estado de Tlaxcala como *Pseudotsuga macrolepis*, comúnmente conocida como “pinabete”, “abeto ayacahuite”, “ayarín”, “romerillo” o “guayame” (Acosta-Pérez, 1992).

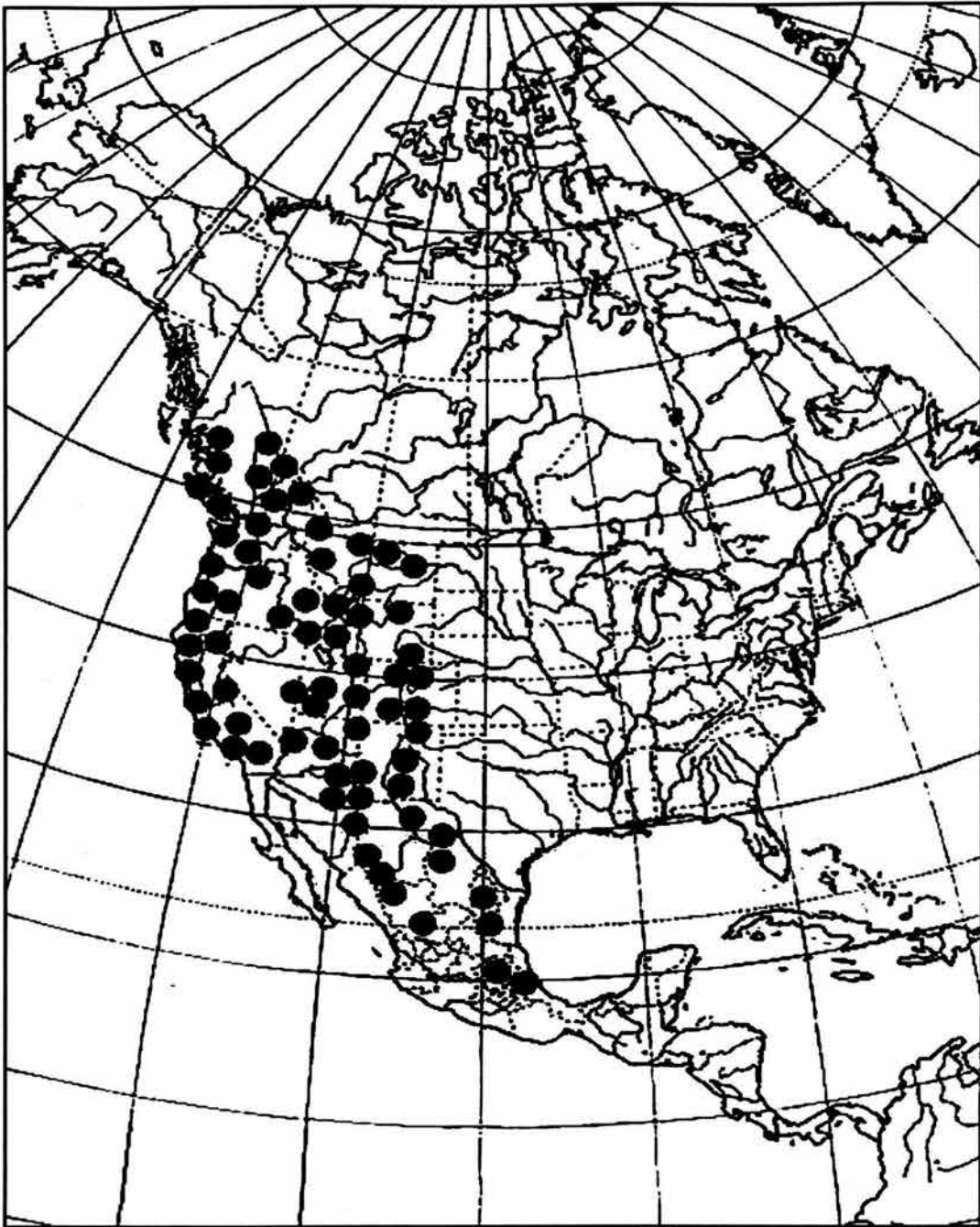


Figura 1. Distribución del género *Pseudotsuga* en Norteamérica (fuente: Hermann y Lavender, 1990).

1.2.1 REPRODUCCIÓN Y DESARROLLO

Hermann y Lavender (1990) señalan que las especies del género *Pseudotsuga* tienden a producir frecuentemente estróbilos (conos) entre los 12 y los 15 años de edad, por otra parte, Silen (1978 citado por Pérez-Sánchez) y Niembro (1979) reportan que los conos se producen entre los 20 y 40 años y rara vez antes de los 12 años.

El cono masculino de *Pseudotsuga* es relativamente pequeño, de 1 a 2 cm de longitud y están constituidos por microsporófilos que se encuentran arreglados en forma de espiral y son más o menos membranosos, cada uno sostiene dos microsporangios. Un microstróbilo joven contiene muchos microsporocitos o células madre de las microsporas, cuando se acerca la primavera los microsporocitos experimentan meiosis, dando lugar a cuatro microsporas haploides. Cada microspora desarrolla dentro a un grano de polen alado, el cual consiste de dos células protaliales, una célula generativa y una célula del tubo. El grano de polen tetracelular comprende el gametofito masculino inmaduro. Es en esta etapa cuando los granos de polen son vertidos en enormes cantidades, algunos son acarreados por el viento a los conos femeninos (Raven *et al.*, 2000, Figura 2).

Los megastróbilos (conos femeninos) son mucho más grandes y más complejos en su estructura que los microstróbilos. Las escamas ovulíferas, las cuales sostienen a los óvulos, no son magasporofilos; en su lugar, están completamente modificadas determinando sistemas de ramas propiamente conocidas como complejo escama-semilla. Cada complejo de escama-semilla consiste de escamas ovulíferas que sostienen dos óvulos y una bráctea estéril joven. Las escamas están arregladas espiralmente alrededor del eje del cono. Cada óvulo contiene una nucela multicelular (megasporangio) que está rodeada por un integumento masivo (Figura 2). Cada megasporangio contiene un solo megasporocito o célula megaspora-madre, la cual finalmente experimenta meiosis, y da lugar a una serie lineal de cuatro megasporas. Sólo una de estas megasporas es funcional y las tres restantes cercanas al micrópilo, rápidamente se degeneran (Raven *et al.*, 2000).

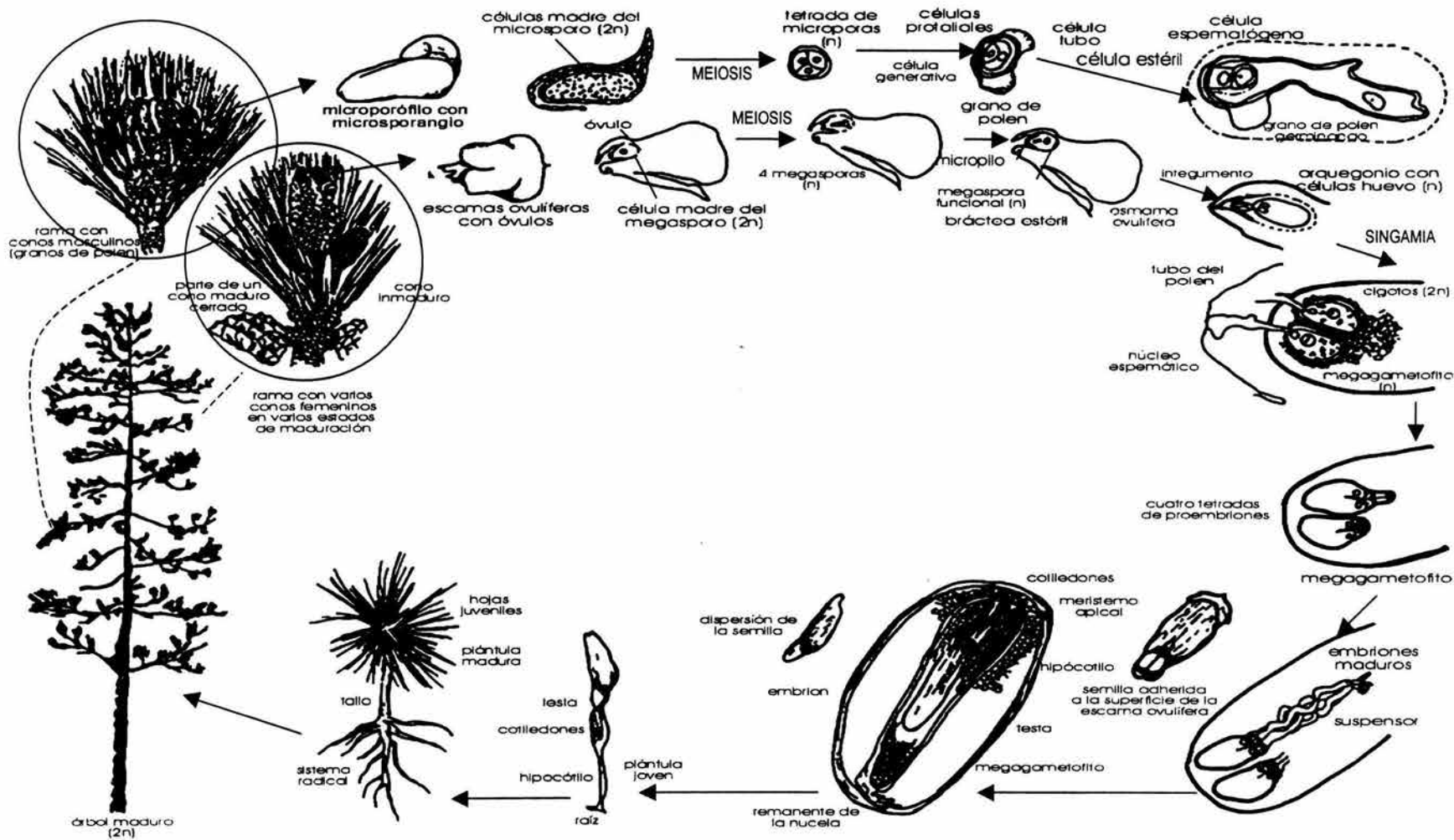


Figura 2. Ciclo de vida de una conifera (fuente: Raven et al., 2000)

El ciclo reproductivo de *Pseudotsuga* tarda 18 meses en promedio, desde que se forman los primordios de estróbilos (femeninos y masculinos) en la primavera y finaliza con la dispersión de la semilla madura durante el otoño del siguiente año (Hermann y Lavender, 1990; Allen y Owens, 1972 citado por Pérez-Sánchez, 1996, Williams, 2000).

De acuerdo con Allen y Owens (1972), el ciclo inicia con la formación de primordios o yemas laterales durante el mes de abril, éstos pueden tomar cinco cursos: 1) abortar prematuramente y desaparecer, 2) Desarrollarse parcialmente y permanecer como yemas latentes, 3) desarrollarse como yemas vegetativas, 4) Desarrollarse como yemas reproductivas de conos de semillas, localizándose en la parte apical del brote emergente y 5) desarrollarse como yemas reproductivas de conos polínicos, ubicándose cerca de la base del brote emergente. Las yemas se encuentran formadas para octubre o noviembre y entran en latencia a inicios de diciembre.

La polinización ocurre en primavera (marzo-abril en zonas cálidas y mayo-junio en zonas frías), en esta etapa las escamas del cono femenino se abren y crecen conjuntamente con el óvulo para protegerlo durante su desarrollo. Después de un mes de la polinización se origina un megagametofito que permanece inactivo durante un periodo de seis meses y requiere de otros seis meses para que alcance su desarrollo completo. Entre agosto y septiembre se desarrollan los embriones, esto inicia con la formación del arquegonio, usualmente en número de dos ó tres; esta etapa es la apropiada para la fertilización. (Hermann y Lavender, 1990) (Figura 2). Comúnmente todos los arquegonios son fertilizados y comienzan a desarrollarse (fenómeno de poliembrionía). Sin embargo sólo un embrión se desarrolla completamente, el cual consiste de un eje hipocótilo-radícula, con una capa protectora de la radícula, un meristemo apical y varios cotiledones (generalmente ocho). El integumento consiste de tres capas de las cuales, la media se endurece y sirve como la capa de la semilla y el gametofito sirve como reserva de alimento y tejido nutritivo (Raven *et al.*, 2000).

Las semillas frecuentemente son liberadas de los conos durante el otoño (septiembre, octubre y noviembre del segundo año siguiente a la aparición original o inicial de los conos y la

polinización. Al madurar, las escamas del cono se separan, las semillas aladas de muchas especies se transportan a través del aire y algunas veces son acarreadas a distancias considerables por el viento. La diseminación de semillas ocurre después de la maduración de los conos y generalmente dos tercios del total de la cosecha quedan en el suelo a finales de octubre, el remanente de las semillas cae durante los meses de invierno y primavera (Allen y Owens, 1972; Hermann y Lavender, 1990; Raven *et al.*, 2000).

1.2.2 PRODUCCIÓN Y DINÁMICA DE CONOS Y SEMILLAS

La producción de semillas en *Pseudotsuga* varía año con año, esto es se presenta una cierta periodicidad cíclica: una producción abundante y una mediana o baja cada cinco años en promedio, pero puede variar entre dos y siete años (Allen y Owens, 1972 citado por Pérez-Sánchez, 1996); sin embargo, durante el año de la producción abundante, solamente el 25% de los árboles produce un número apreciable de conos (Hermann y Lavender, 1990).

La germinación es epigea y se presenta de mediados de marzo a abril en las zonas cálidas y a mediados de mayo en las localidades frías. Ésta suele dificultarse debido principalmente a una polinización ineficiente y al ataque de insectos, lo cual provoca una disminución de la cantidad de semillas potenciales, lo que tiene como consecuencia la baja regeneración natural de las poblaciones (Aboel-Nil, 1987; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996).

El crecimiento de las plántulas en el primer año es relativamente lento y está limitado por la humedad del campo. Las plántulas de un año sobreviven y crecen mejor bajo una ligera sombra, pero las mayores de un año requieren de luz solar abundante (Hermann y Lavender, *op. cit.*). Los principales factores que impiden la regeneración natural de las poblaciones son el consumo de las semillas por insectos, aves y otros animales, la competencia con plantas de otras especies y las condiciones ambientales desfavorables. Asimismo, la dispersión de las semillas de la mayoría de los árboles del género *Pseudotsuga* es, en promedio, de 100 m de radio (Hermann y Lavender, 1990).

1.2.3 DISTRIBUCIÓN Y ECOLOGÍA

En Estados Unidos de Norteamérica, el género *Pseudotsuga* crece bajo una amplia variedad de condiciones climáticas, que van desde los climas húmedos y fríos, hasta los continentales con vientos severos y una precipitación anual elevada.

En nuestro país, *P. macrolepis* se distribuye entre los 2000 y los 3200 m.s.n.m. en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León, Zacatecas, Hidalgo, Puebla y Tlaxcala (Rzedowski, 1978; Acosta Pérez, 1992). Se desarrolla en zonas húmedas y sombrías en laderas de cañadas y barrancas o en valles muy protegidos, ocupa superficies muy reducidas y discontinuas mezcladas con planicies y en ocasiones se presenta como pequeños manchones aislados o como masas mixtas con árboles de los géneros *Pinus* y *Abies* (Rzedowski, 1978; Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996).

En Tlaxcala, *Pseudotsuga macrolepis* se asocia con comunidades de *Abies religiosa* en el municipio de Terrenate, así como con *Pinus* y *Abies* en los municipios de Tlaxco, Emiliano Zapata y Alzayanca (Figura 3). Estas localidades constituyen las zonas más sureñas de su distribución en el país; desafortunadamente corren el peligro de ser erradicados debido al alto grado de deforestación que sufren (Acosta-Pérez, *op. cit.*). En la actualidad *P. macrolepis*, ha sido clasificada dentro de la categoría de especie bajo protección especial, por lo que debe ser conservada (DOF, 2001).



Figura 3. Distribución de *Pseudotsuga macrolepis* en el estado de Tlaxcala (modificado de Acosta-Pérez, 1992).

Su escasa y dispersa presencia en ciertas regiones de México, es también indicativo de su importancia ambiental, evolutiva y fitogeográfica (Hermann y Lavender, 1990). Desafortunadamente, estos bosques han sido ignorados debido a lo pequeño de sus poblaciones.

Por lo anteriormente señalado, es importante realizar y sistematizar investigaciones sobre diferentes aspectos ecológicos, silvícolas y de propagación de esta conífera, especialmente en aquellas regiones donde su presencia está fuertemente amenazada.

1.2.4 IMPORTANCIA ECONÓMICA

Desde el punto de vista económico, el género *Pseudotsuga* constituye un grupo de coníferas de gran importancia a nivel mundial, ya sea como ornamental o en la producción de madera (Hermann y Lavender, 1990). De estos árboles se obtiene madera para la construcción de casas, muebles, artículos decorativos, fabricación de vigas, novopán, trabes y pisos; la pulpa se utiliza para la elaboración de papel y también son cultivados como árboles de navidad (Goldfarb y Zaerr, 1989).

Debido a la alta calidad de su madera, plántulas de las especies de este género se han cultivado de manera extensiva tanto en sus áreas de distribución natural, como en nuevas regiones donde ha sido exportada, destacando Nueva Zelanda, Europa Central y Occidental, Argentina y Chile. En el oeste de Norteamérica, el aprovechamiento forestal de los bosques de *Pseudotsuga* contribuye de manera importante con la economía porque representan una fuente de trabajo en la región, especialmente en Oregon, Washington y Columbia Británica. (Goldfarb y Zaerr, *op. cit.*).

Sin embargo, en México no se ha aprovechado el gran potencial maderable e industrial de las especies de este género. El principal uso que se le ha dado a *P. macrolepis* en Tlaxcala ha sido sólo con fines de construcción en el medio rural, fundamentándose en la tala clandestina (Acosta-Pérez, 1992).

1.3 DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA DE *Pseudotsuga macrolepis* FLOUS

De acuerdo con Martínez (1953), Acosta-Pérez (1992) y Mápula *et al.* (1996), dicha especie está representada por árboles de 12 a 40 m de altura, tronco con un diámetro (D.A.P.) de 35 a 70 cm (Figura 4B), con corteza de color grisáceo, delgada en los árboles jóvenes, pero gruesa y áspera en los adultos, dividida en placas escamosas. Las ramas están dispuestas irregularmente o algo verticiladas y extendidas; las hojas lineares, rectas o algo falcadas alcanzan una longitud de 15 a 30 mm (Figura 4C). El ápice es redondeado, truncado o algo agudo, con el margen entero y la base parcialmente torcida, el nervio central está hundido en el haz y es prominente en el envés. Presenta yemas ovoides delgadas y persistentes, agudas y sin protección de resina.

Son árboles monoicos con los estróbilos masculinos en forma de pequeños conos axilares cilíndrico-oblongos, caedizos, de color rosado, de unos 10 mm de largo, protegidos por brácteas translúcidas de color castaño. Los conos están formados por numerosos sacos polínicos que se abren por hendiduras longitudinales. Los estróbilos femeninos en forma de conillos terminales o axilares están constituidas por escamas provistas de grandes brácteas; los conos femeninos maduros de forma ovoide más o menos atenuados en la extremidad, son solitarios, colgantes y caedizos, y están provistos de pedúnculos cortos, los conos miden en total de 3.5 a 18 cm de largo por 3 a 4 cm de ancho (Figura 4A), inmaduros presentan un color verdoso que posteriormente se torna café amarillento. Los conos están formados por un eje central en el que se disponen en espiral numerosas escamas delgadas, de ápice redondeado y ensanchadas a los lados, provistas de brácteas (Figura 4A,D), al desprenderse los conos caen íntegros, ya que las escamas y las brácteas son persistentes; cada escama lleva dos semillas triangular-ovoides, de color café brillante, cubiertas en su parte externa por la base del ala que es de color café claro, algo translúcida, la cual mide incluyendo la semilla de 10 a 15 mm de largo (Figura 4Db).

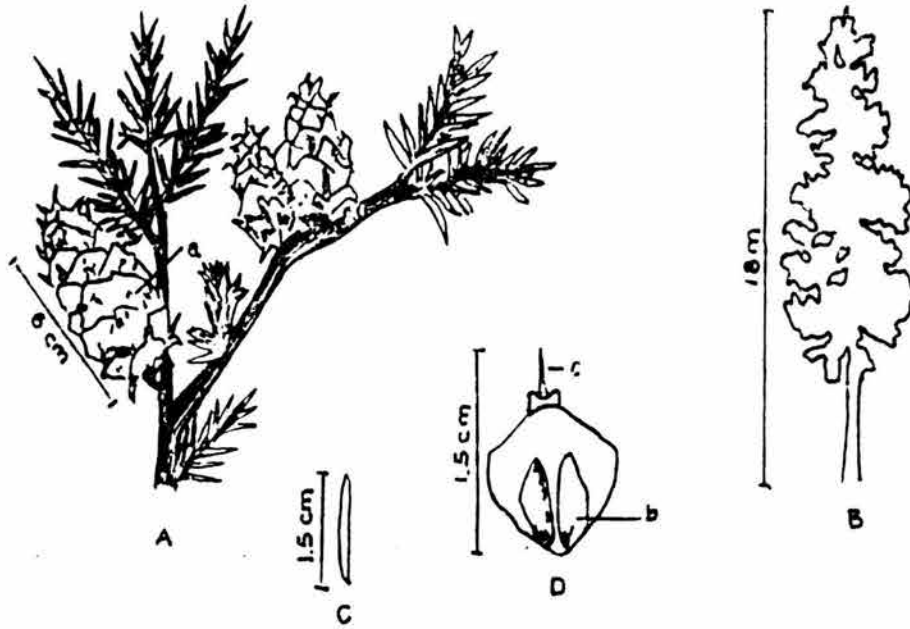


Figura 4. Esquema de algunas características morfológicas de *Pseudotsuga macrolepis*: A) ramas con conos masculinos, B) forma de un árbol adulto, C) hoja, D) escama con brácteas (fuente: Acosta-Pérez, 1992).



Figura 5. a) Bosque de *Pseudotsuga macrolepis* ubicado en el Municipio de Terrenate, Tlaxcala b) árbol adulto de *P. macrolepis*.

1.4 ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO Y PROBLEMÁTICA DE LOS BOSQUES DE *Pseudotsuga* EN MÉXICO.

El conocimiento alcanzado acerca de los rodales de *Pseudotsuga* que se distribuyen en la República Mexicana, se ha encausado a la descripción de las condiciones del medio físico-biótico donde prosperan tales poblaciones, principalmente en las localidades del Norte del país, en comparación con las localidades del centro de México, donde la mayor parte de éstas permanecen sin ser descritas. No obstante, la búsqueda bibliográfica reveló la existencia de un cierto número de trabajos realizados en el centro del país.

Domínguez Álvarez (1986) realizó un estudio ecológico en la región de Huayacocotla, Ver., donde pudo reconocer que los sitios que presentan mayor cobertura del estrato arbóreo tuvieron una menor densidad de renuevos. La exposición al Noreste y las pendientes de 55 a 70% en un intervalo altitudinal de 2540 a 2580 m.s.n.m. favorecen la regeneración natural de *Pseudotsuga macrolepis*.

Cornejo (1987) y Franco (1990) estudiaron aspectos ecológicos, dasonómicos y la dinámica de la regeneración natural de *Pseudotsuga flahaulti* Flous en un bosque de *Pseudotsuga-Pinus-Abies* en la Sierra de la Marta, Arteaga, Coahuila. En ambos trabajos se determinó que la densidad en esta localidad va de 540 a 4 370 individuos por hectárea; con un promedio de 1990 renuevos por ha y la regeneración natural superó en densidad absoluta a la de *Pinus hartwegii*, *P. ayacahuite*, *Cupressus arizonica* y *Abies vejari*. Dada la buena regeneración natural de renuevos de *P. flahaulti*, ésta puede favorecer el aumento del área de su distribución. Finalmente, la tasa de natalidad promedio fue de 39.07% y la de mortalidad de renuevos del 24.57%.

Nájera (1990) reportó algunos patógenos para los rodales naturales de *Pseudotsuga* en Tepehuanes, Durango, entre los que destacan *Phellinus pini* que causa la pudrición blanca del centro del fuste; *Agrobacterium tumefaciens* que ocasiona tumoraciones en los fustes del arbolado; *Fomitopsis cajanderi* que provoca la pudrición café del centro del fuste; *Phaeolus schweinitzii* que infesta al arbolado joven inhibiendo la regeneración natural; *Arceuthobium douglasii* conocido comúnmente como muérdago enano que causa estragos en las ramas y troncos de los árboles y *Dendroctonus pseudotsugae*, que es un parásito descortezador.

Para el caso particular de *P. macrolepis*, Contreras (1992) reportó que los insectos han causado hasta el 60% de mortandad en árboles producidos en vivero en el estado de Hidalgo. Asimismo, Yáñez (1991) analizó la producción de semillas de *P. macrolepis* en una población de la Sierra de Pachuca, y destacó que el 18.67% de la semilla llena es atacada por un escarabajo (*Megastigmus* sp.).

Al evaluar los métodos para la protección de conos de *P. macrolepis* contra insectos en la Sierra de Pachuca, Hidalgo, Méndez-Montiel y Zavala-Chávez (1996) encontraron que los principales insectos que atacan a los conillos durante la etapa de polinización fueron *Chirothrips fesus*, *Frankliniella chamulae*, *F. fallaciosa* y *F. adusta*; su ataque ocasionó "muerte temprana". De igual forma, las larvas de la mosquita *Contarinia* sp., que se alimentan de las escamas del cono en desarrollo, causaron la resinación y muerte de algunas escamas y cuando el ataque es intenso, la muerte tardía de todo el cono. El estado larvario de *Megastigmus spermatrophus* penetra a las semillas y se alimenta de éstas hasta consumirlas totalmente. En general, los daños causados por estos parásitos alcanzan hasta el 38.87% de las semillas por cono.

En cuanto a la viabilidad y germinación de las semillas, así como a los factores que la afectan, Mapula *et al.* (1996) determinaron la morfología y anatomía de la semilla de *P. macrolepis* procedente de las localidades de El Chico, Tlaxco y Terrenate. Asimismo, evaluaron la germinación y crecimiento inicial de las semillas provenientes de las tres localidades en condiciones de invernadero, encontrando el mayor porcentaje de germinación en las localidades de Terrenate y Tlaxco (27 y 24%, respectivamente) en comparación con la de El Chico (8%).

Zavala-Chávez y Méndez-Montiel (1996) encontraron que en una localidad de la Sierra de Pachuca, Hidalgo, la polinización ineficiente y el ataque de insectos pueden disminuir la cantidad y calidad de semillas potenciales y producidas, lo cual influye en la baja capacidad de regeneración natural de *P. macrolepis*.

Para Tlaxcala, Pérez-Sánchez (1996) señaló que la baja regeneración natural de los bosques de *P. macrolepis* en el estado se debe en gran medida al bajo porcentaje de viabilidad y de

germinación de las semillas. Para la región de Tlaxco y Terrenate encontró un porcentaje de viabilidad del 11.64 y 45.32%, respectivamente, mientras que la germinación fue de 7.96 y 35.48% para cada localidad. Asimismo, encontró una proporción alta de semillas vanas (86.9% para Tlaxco y 54.9% para Terrenate), lo cual es indicativo de problemas de infertilidad de las semillas producidas en condiciones naturales.

1.5 ALTERNATIVAS DE PROPAGACIÓN Y PERSPECTIVAS DE CONSERVACIÓN DE LOS BOSQUES DE *Pseudotsuga* EN MÉXICO.

La tala imoderada, el cambio de uso de los suelos boscosos para la apertura de nuevas zonas de cultivo agrícola de baja producción y para zonas ganaderas, además del sobrepastoreo y de los incendios naturales y provocados, han dado lugar a la disminución de los bosques de *Pseudotsuga* en el país.

Aunado a lo anterior, factores intrínsecos de la especie como la baja producción de semillas viables debido tanto a problemas de infertilidad y polinización ineficiente así como al ataque por patógenos, han dado como resultado una germinación muy reducida de las semillas y, por consecuencia, una escasa regeneración natural de *P. macrolepis*, la cual es una sujeta a protección y susceptible de ser erradicada y (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996; DOF, 2001).

1.6 JUSTIFICACIÓN

Considerando que las especies de *Pseudotsuga* no se reproducen vegetativamente de forma natural, las reforestaciones se han venido realizando mediante el uso de semillas. No obstante, la irregularidad anual de producción de semilla dificulta su propagación, además de que limita las posibilidades de su mejoramiento genético. Este método de propagación contempla la selección de los árboles fenotípicamente superiores (árboles padre) a partir de los cuales se eligen las semillas de polinización natural y son sembradas en plantaciones comerciales. Una vez que han alcanzado su madurez se escogen algunos individuos para formar una segunda generación de progenitores ya mejorados. Este procedimiento requiere de un periodo muy largo, ya que la

producción de conos en plantaciones forestales de *P. macrolepis* se inicia a partir de los 10 a los 15 años de vida del árbol.

Se han utilizado otras vías como la reproducción asexual, utilizando métodos hortícolas como el enraizamiento de estacas; sin embargo, han sido poco exitosos puesto que para poder enraizar una estaca, ésta debe provenir de un árbol joven (menor de diez años). Particularmente, las de *P. macrolepis* tienden a crecer plagiotrópicamente por lo que el uso de esta técnica resulta poco efectiva.

Una alternativa que ha cobrado gran relevancia en las últimas décadas para propagar a *P. macrolepis* es el uso de técnicas de cultivos de tejidos. Entre sus principales ventajas en la silvicultura destacan la propagación masiva de plantas a partir de un individuo y la promoción del mejoramiento genético.

Como sucede en todas las coníferas de la familia Pinaceae, para que las plántulas obtenidas mediante las técnicas de cultivo de tejidos vegetales tengan mayor capacidad de supervivencia en su fase de aclimatización, en el paso a vivero y posteriormente a campo, es necesaria la asociación simbiótica denominada ectomicorriza, que se establece entre sus raíces y algunos hongos; a través de esta asociación ambos organismos obtienen beneficios, principalmente de intercambio y absorción de nutrimentos.

Por lo anterior, se ha planteado la regeneración mediante el cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous y la micorrización de plántulas de esta conífera con dos cepas de hongos ectomicorrizógenos. Para ello se planteó un objetivo general del trabajo así como objetivos generales y específicos para cada capítulo que integra la tesis.

1.7 OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS

Inducir la regeneración de plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous mediante el cultivo *in vitro* de embriones maduros, evaluar la influencia de la glucosa en el crecimiento miceliar de diez cepas de hongos micorrizógenos y promover la micorrización de esta conífera con dos cepas de hongos ectomicorrizógenos en condiciones de vivero.

1.7.1 OBJETIVOS GENERALES DE LOS CAPÍTULO

Inducir la formación de brotes adventicios de *Pseudotsuga macrolepis* y su enraizamiento a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros.

Evaluar la influencia de diferentes concentraciones de glucosa en el crecimiento miceliar de diez cepas de hongos ectomicorrizógenos provenientes de los bosques de *Pseudotsuga macrolepis*.

Inducir la micorrización de plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous con dos cepas de hongos ectomicorrizógenos en condiciones de vivero.

CAPÍTULO II. REGENERACIÓN *in vitro* DE *Pseudotsuga macrolepis* FLOUS

2.1 INTRODUCCIÓN

Con frecuencia se ha mencionado que la demanda mundial de productos forestales se incrementará considerablemente en las próximas décadas, tanto en los aspectos de producción (industria maderera, fabricación de muebles, de la construcción, química, elaboración de papel y subproductos, etc.), como en las necesidades ecológicas de reforestación y propagación de especies en peligro de extinción, como el caso de *Pseudotsuga macrolepis* (SEDESOL, 1994).

De igual forma, es importante considerar los estragos causados por enfermedades, parásitos, incendios forestales, tala y manejo inadecuado de los bosques, los cuales limitan drásticamente su existencia (Zavala-Chávez y Méndez-Montiel, 1996). Ante este panorama, es necesario producir árboles que respondan a las demandas actuales, así como la aplicación de técnicas que permitan la multiplicación masiva de los individuos con las características deseadas como: madera de buena calidad, rápido crecimiento, ciclos de vida cortos, alto rendimiento del tronco con relación a la biomasa, resistencia a enfermedades y plagas; árboles que puedan adaptarse a diversos climas y a variaciones ambientales, que respondan eficientemente a las prácticas silvícolas, etc. (Villalobos *et al.*, 1983).

El mejoramiento genético así como la propagación masiva de especies forestales no han sido tan rápidos y eficientes si se les compara con especies de importancia agrícola; por lo que una alternativa para poder solventar los problemas de índole forestal es el uso de técnicas de regeneración basadas en el cultivo de tejidos, que se realizan en condiciones *in vitro*.

El cultivo de tejidos vegetales y la micropropagación derivada de éste se basan en el concepto de totipotencialidad de la célula, la cual plantea que todas las células tienen la capacidad de regenerar a un individuo completo puesto que contienen toda la información genética necesaria para ello (Burgues, 1985). La micropropagación consiste en regenerar y propagar asépticamente plantas *in vitro* a partir de porciones muy pequeñas de ellas, células, tejidos, órganos, embriones o plántulas, en condiciones físicas y químicas controladas como son el medio nutritivo, pH, luz, temperatura, atmósfera, etc. (AboEl-Neil, 1987).

En los últimos años, las técnicas para el cultivo de tejidos vegetales han tenido un enorme desarrollo que permite en la actualidad aplicarlas a un gran número de especies. Asimismo, se ha generado un gran avance en el conocimiento básico de la morfogénesis de las plantas y ha tenido una amplia aplicación para la solución de problemas en las industrias químico-farmacéutica, agrícola, hortícola, en la industria forestal y en la conservación de especies (Chávez-Ávila y Roubluo, 1995).

La micropropagación de especies forestales contribuye en gran medida a la domesticación y el mejoramiento, además de presentar las siguientes ventajas: 1) es una forma alternativa de propagar árboles que por su edad no puede reproducirse por medio de las técnicas convencionales, puesto que se ha observado para muchas especies de interés forestal una relación inversa entre la edad de la planta madre y la capacidad del tejido para formar brotes o enraizar, 2) representa la opción para la multiplicación de genotipos deseados así como de plantas exóticas y amenazadas en un periodo relativamente corto si se le compara con el largo tiempo que las especies de *Pseudotsuga* requieren para alcanzar su capacidad reproductiva, 3) es la base de los trabajos de mejoramiento genético de especies para la resistencia a patógenos o condiciones ambientales adversas, y hace posible la selección de individuos con las características genotípicas deseadas, 4) permite obtener, mantener y propagar masivamente plantas libres de patógenos, 5) favorece la conservación de bancos de germoplasma, 6) se logra la reducción de los ciclos de vida de las especies forestales (Villalobos *et al.*, 1983, Thorpe *et al.*, 1991).

Los explantes que se utilizan en la micropropagación pueden ser de tejido vegetativo como porciones de hoja, fascículos de hojas jóvenes, ápices de tallo, etc.; estructuras reproductivas como anteras, óvulos, polen o embriones (Hartman, 1987). No obstante, los embriones son los explantes más ampliamente usados puesto que tienen una mayor capacidad de respuesta en el cultivo *in vitro*, así como una gran variabilidad en sus rutas de desarrollo, lo que da origen a una amplia gama de trabajos como el cultivo de protoplastos, suspensiones celulares y cultivos embriogénicos u organogénicos (Goldfarb y Zaerr, 1989; Bonga y von Aderkas, 1992) (Cuadro 1).

La capacidad de desarrollo del explante, así como la ruta morfogénica están influenciados por varios factores como: 1) el órgano que servirá como fuente de explante, 2) la edad fisiológica y ontogénica del órgano, 3) la estación del año durante la cual es recolectado, 4) el tamaño del explante, 5) la calidad general de la planta madre, 6) el pretratamiento al que es sometido, 7) las condiciones de cultivo (medio nutritivo, temperatura, intensidad lumínica, etc.) (Thorpe y Patel, 1984).

2.2 MÉTODOS DE REGENERACIÓN *IN VITRO*

Las tres formas principales de propagación clonal de plantas leñosas a través del cultivo de tejidos son la elongación de brotes axilares, la producción de brotes adventicios mediante la organogénesis y la embriogénesis somática (Figura 6).

a) Elongación de brotes axilares

Es un método directo que utiliza meristemos con primordios foliares, brotes laterales o esquejes nodales, involucra la manipulación de brotes preformados, los cuales mediante la adición de tratamientos con reguladores de crecimiento y las condiciones adecuadas de cultivo dan lugar a plantas completas mediante la formación y elongación de hojas y tallo y la formación de raíces (Bonga y von Aderkas, 1992).

Este método es poco usado en la propagación de coníferas pues ha resultado poco exitoso y sólo en algunas especies como *Pinus caribea*, *P. oocarpa* y *Picea abies* se han obtenido un número pequeño de plántulas, pero su enraizamiento ha resultado difícil (Bonga y von Aderkas, 1992) (Cuadro 1).

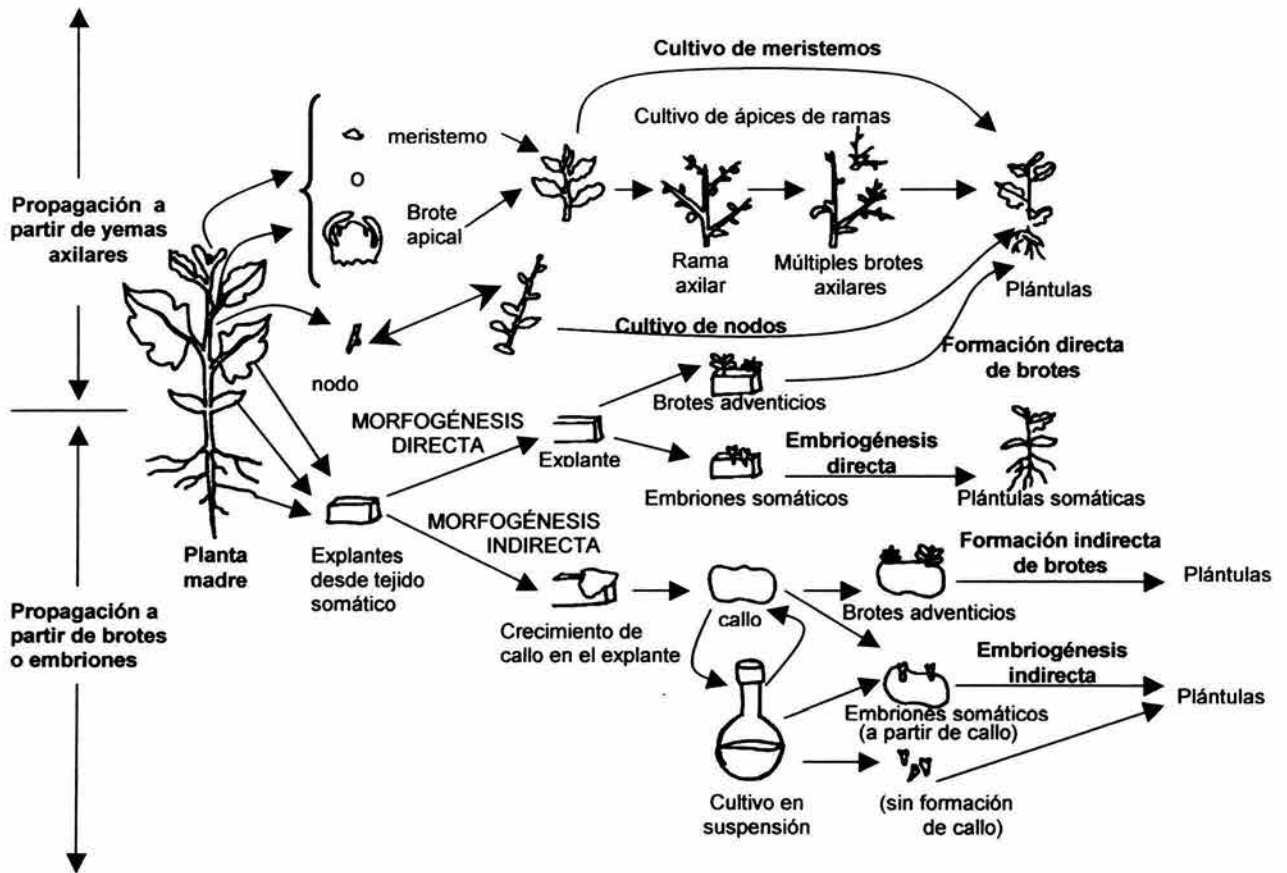


Figura 6. Métodos de micropropagación *in vitro* a través del cultivo de tejidos vegetales (Fuente: Bonga y von Aderkas, 1992)

a) Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el desarrollo de un embrión a partir de células somáticas (no sexuales), dicho embrión posee meristemos para la formación de raíz y del vástago, por lo tanto es capaz de formar una planta completa. Las etapas de desarrollo son similares a la embriogénesis cigótica que ocurre en las semillas (Tulecke, 1987; Attree y Fowke, 1991; Thorpe, *et al.*, *op.cit.*; Bonga y von Aderkas, 1992).

La embriogénesis se puede llevar a cabo por dos vías: la directa y la indirecta. La embriogénesis somática directa consiste en la formación de embriones somáticos a partir del explante original sin pasar por una fase intermedia de proliferación de tejido denominado callo y se refiere al desarrollo de un embrión directamente del tejido del explante original. La segunda vía es la proliferación del tejido del explante inicial, el cual se dividió varias veces y formó un tejido indiferenciado (callo), posteriormente este vuelve a diferenciarse y de él se generan embriones somáticos. Otro tipo de embriogénesis no sexual es aquella que implica la formación de embriones a partir de otros tejidos, tales como el megagametofito de las coníferas o de las cícadas, proceso que se conoce como embriogénesis gametofítica (Ho, 1987; Bonga y Von Aderkas, *op. cit.*).

La embriogénesis somática se ha obtenido en varias especies de coníferas como *Picea abies*, *P. engelmannii*, *P. glauca*, *P. mariana*, *Pinus caribea*, *P. elliotti* y *P. radiata* por citar algunos (Attree y Fowke, 1991) (Cuadro 1). Sin embargo, aunque el número de especies en las que se ha obtenido embriogénesis somática se ha incrementado notablemente, el porcentaje de plantas obtenidas es mínimo.

Los explantes más utilizados para este tipo de desarrollo son los embriones inmaduros y explantes de plántulas muy jóvenes (Gupta *et al.*, 1993). Actualmente, se han presentado grandes avances en la propagación de coníferas mediante el uso de esta técnica, puesto que por lo menos catorce especies de distintas coníferas han sido inducidas para producir embriones somáticos, entre las que destacan varias pertenecientes a los géneros *Pinus*, *Picea*, *Larix* y *Sequoia*, así como también *Pseudotsuga menziesii*. Sin embargo, para la mayoría de los casos, la eficiencia del uso de la embriogénesis en cuanto a la producción de plántulas es muy baja, lo que impide su utilización comercial. Debido a lo anterior, la embriogénesis es una vía de regeneración menos frecuente que la organogénesis (Attree y Fowke, 1991; Thorpe *et al.*, 1991) (Cuadro 1).

b) Organogénesis

Consiste en inducir la formación de brotes adventicios, tallos y raíces adventicias, a partir de células de callo (organogénesis indirecta) o directamente sobre el explante (organogénesis directa). La organogénesis permite la formación de una planta completa mediante el desarrollo

de brotes adventicios a los cuales se les induce el enraizamiento por diversos procesos multietapas (Thorpe *et al.*, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992, Phillips y Hubstenberger, 1995).

La propagación de plantas a través de organogénesis constituye la técnica que se aplica con mayor frecuencia para la regeneración de especies ornamentales y leñosas con fines comerciales. Esta técnica es la más empleada en coníferas aunque el enraizamiento es una etapa complicada (Thorpe *et al.*, 1991). Algunas gimnospermas en las que se ha promovido la regeneración de brotes adventicios vía organogénesis son *Pinus palustris* (Sommer *et al.*, 1975), *P. banksiana* (Harry y Thorpe, 1994), *P. contorta* (Patel y Thorpe, 1984) *P. omorika* (Kolevska y Buturović, 1995), *P. pinaster* (Calixto y Pais, 1997), *P. ponderosa* (Ellis y Bilderback, 1989), *P. radiata* (Relly y Washer, 1977 citado por Thorpe y Biondi 1984), *Picea abies* (von Arnold y Eriksson, 1978,1979,1985), *P. chihuahuana* (López Escamilla, 2000), *P. glauca* (Campbell y Durzan, 1975; Rumary y Thorpe, 1984 citado por Thorpe y Biondi 1984), *P. mariana* (Rumary y Thorpe citado por Thorpe y Biondi 1984), *P. sitchensis* (Webb y Street, 1978 citado por Thorpe y Biondi 1984) (Cuadro 1).

La regeneración masiva de plantas leñosas *in vitro* mediante organogénesis cuenta con protocolos para un gran número de especies. Es un proceso multietapas que consiste de cuatro pasos básicos que se describen a continuación:

- 1) **Establecimiento del cultivo y/o inducción de brotes.** Consiste en la selección de un medio nutritivo adecuado para el establecimiento del cultivo, que permita sostener y estimular el desarrollo del explante. En este proceso, los explantes se cultivan sobre un medio nutritivo adicionado con reguladores de crecimiento, usualmente auxinas y citocininas, ya sea en forma de pulsos de altas concentraciones por un tiempo reducido o integrados al medio en concentraciones bajas. Esta fase dura de tres a cuatro semanas. La formación de vástagos es el resultado de la interacción entre el explante, el medio de cultivo y las condiciones de incubación (Aitken-Christie y Thorpe, 1984; Thorpe *et al.*, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992).

En coníferas se ha observado que la formación de vástagos mediante organogénesis directa se facilita cuando éstos se forman de tejido inmaduro, por lo general sobre los hipocótilos y

cotiledones de embriones, y sobre las acículas de plántulas jóvenes. Cuando se cultivan explantes provenientes de tejido más maduro, la formación de brotes adventicios ocurre principalmente sobre un callo inicial o uno subcultivado (Bonga y von Aderkas, 1992) (Cuadro 1).

- 2) Desarrollo y multiplicación del vástago (brote adventicio).** El objetivo de esta fase es la producción masiva de brotes susceptibles de ser enraizados. En coníferas implica el desarrollo de vástagos con hojas primarias y su elongación. Para esta fase se requiere que el explante sea subcultivado en un medio nutritivo distinto al de la fase de inducción y diferente en su contenido nutrimental y de reguladores de crecimiento. Los últimos son eliminados y las concentraciones de macro y micronutrientes, así como de sacarosa son reducidas. Durante la elongación de los brotes puede ser necesario subcultivarlos en medio fresco cada dos a seis semanas hasta que formen grupos de brotes que puedan ser individualizados.

En esta fase se puede dar la remultiplicación de los vástagos, la criopreservación o se pueden someter al enraizamiento. Para lo último, el brote debe alcanzar una talla de 10 a 15 mm, puesto que se ha observado que para varias especies de coníferas ésta es la altura mínima necesaria para un enraizamiento exitoso (Villalobos *et al.*, 1983; Aitken Christie y Thorpe, 1984; Thorpe *et al.*, 1991).

- 3) Enraizamiento de los vástagos (brotes adventicios) obtenidos.** Es un proceso mediante el cual se induce la formación de primordios radicales y su crecimiento, dando por resultado la formación de una plántula completa. Para lograrlo, se combinan una variedad de factores químicos y ambientales, el más importante de los cuales es el uso de auxinas. En coníferas, el enraizamiento es lento y complicado que rara vez se obtiene espontáneamente, no obstante, es una fase indispensable para realizar el paso de las condiciones *in vitro* a *ex vitro* (von Arnold, 1988).

Cuadro 1. Especies de gimnospermas que se han regenerado *in vitro*, explante utilizado y respuesta morfo genética obtenida
(Fuente: Thorpe *et al.*, 1991)

Especie	Explante utilizado	Respuesta morfo genética	Referencia
<i>Abies alba</i>	Embriones	Embriogénesis somática	Shuller <i>et al.</i> 1989
<i>A. balsamea</i>	Brotos	Brotos axilares	Bonga, 1977
<i>A. fraseri</i>	Embriones, cotiledones, hipocotilo	Brotos adventicios (vía directa)	Saravitz <i>et al.</i> , 1987
<i>Agathis robusta</i>	Segmentos de estambres	Brotos axilares	Burrows <i>et al.</i> , 1988
<i>Araucaria balansae</i>	Segmentos de estambres	Brotos axilares	Burrows <i>et al.</i> , 1988
<i>A. bidwilli</i>	Segmentos de estambres	Brotos axilares	Burrows <i>et al.</i> , 1988
<i>A. columnaris</i>	Segmentos de estambres	Brotos axilares	Burrows <i>et al.</i> , 1988
<i>A. cunninghamii</i>	Yemas apicales	Brotos axilares	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986 Burrows <i>et al.</i> , 1988
<i>A. hunsteinii</i>	Segmentos de estambres	Brotos axilares	Burrows <i>et al.</i> , 1988
<i>A. luxurians</i>	Segmentos de estambres	Brotos axilares	Burrows <i>et al.</i> , 1988
<i>A. montana</i>	Segmentos de estambres	Brotos axilares	Burrows <i>et al.</i> , 1988
<i>A. rulei</i>	Segmentos de estambres	Brotos axilares	Burrows <i>et al.</i> , 1988
<i>A. scopulorum</i>	Segmentos de estambres	Brotos axilares	Burrows <i>et al.</i> , 1988
<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Plántulas (completas)	Brotos adventicios (vía directa)	Ishii, 1986
<i>Cryptomeria japonica</i>	Hipocotilo	Brotos adventicios (vía directa)	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>Cupressus arizonica</i>	Ápice de plántulas con cotiledones y porciones de hipocotilo	Brotos adventicios (vía directa)	Thomas <i>et al.</i> , 1977
<i>C. lusitanica</i>	Hipocotilo	Brotos adventicios (vía directa)	Franco y Schwarz, 1985
<i>C. macrocarpa</i>	Apice de plántulas con cotiledones y porciones de hipocotilo	Brotos adventicios (vía directa)	Thomas <i>et al.</i> , 1977
<i>C. sempervirens</i>	Apice de plántulas con cotiledones y porciones de hipocotilo	Brotos adventicios (vía directa)	Thomas <i>et al.</i> , 1977
<i>Larix decidua</i>	Megagametofito	Embriogénesis somática	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>L. laricina</i>	Embriones	Brotos adventicios (vía directa)	Bonga y McInnis, 1983
<i>L. occidentalis</i>	Embriones	Brotos adventicios (vía directa)	Harry, Thompson y Thorpe (No Pub)
<i>L. glehnii</i> X <i>L. leptolepis</i>	Cotiledones, epicotilo	Brotos adventicios (vía directa)	Kuromaru y Takao, 1987
<i>Picea abies</i>	Embriones, brotes, primordios inmaduros	Brotos axilares, brotes adventicios (vía directa), embriones somáticos	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>P. chihuahuana</i>	Embriones	Brotos adventicios (vía directa)	López Escamilla, 2000

Cuadro 1. Continuación

Especie	Explante utilizado	Respuesta morfogénica	Referencia
<i>P. engelmannii</i>	Embriones	Brotos adventicios (vía directa), organogénesis vía callo, embriones somáticos	Patel y Thorpe, 1986 Lu y Thorpe, 1988
<i>P. glauca</i>	Hipocotilo, epicotilo, cotiledones, protoplastos	Brotos adventicios (vía directa), embriones somáticos	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>P. mariana</i>	Epicotilo	Brotos adventicios (vía directa)	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>P. rubens</i>	Embriones, cotiledones	Brotos adventicios (vía directa)	Lu, Harry, Thompson y Thorpe (datos no publicados)
<i>P. sitchensis</i>	Yemas apicales, embriones	Brotos adventicios (vía directa), embriones somáticos	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986 Krogstrup <i>et al.</i> , 1988
<i>Pinus banksiana</i>	Embriones	Brotos adventicios (vía directa)	Harry y Thorpe (No publicado)
<i>P. brutia</i>	Embriones, cotiledones, primordios inmaduros, yemas apicales de plántulas.	Brotos axilares, brotes adventicios (vía directa)	Abdullah <i>et al.</i> , 1985; Abdullah <i>et al.</i> , 1986; Abdullah y Grace, 1987
<i>P. canariensis</i>	Embriones, cotiledones	Brotos adventicios (vía directa), organogénesis vía callo	Martínez, Harry y Thorpe (Datos no publicados)
<i>P. caribea</i>	Yemas apicales, embriones, primordios inmaduros	Brotos adventicios (vía directa)	Skindimore <i>et al.</i> , 1988; Berlyn <i>et al.</i> , 1987
<i>P. contorta</i>	Embriones, cotiledones, hipocotilo	Brotos adventicios (vía directa)	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>Pinus densiflora</i>	Brotos axilares	Brotos axilares	Kim y Park, 1987
<i>P. eldarica</i>	Brotos axilares, cotiledones, hipocotilo	Organogénesis vía callo	Gladfelter y Philips, 1987
<i>P. elliottii</i>	Embriones	Brotos adventicios vía directa	Pérez-Bermudez y Sommer, 1987
<i>P. lambertiana</i>	Brotos axilares, cotiledones	Brotos axilares, brotes adventicios vía directa	Gupta y Durzan, 1985
<i>P. monticola</i>	Embriones, cotiledones	Brotos adventicios vía directa	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>P. oocarpa</i>	Cotiledones	Brotos adventicios vía directa	Franco y Schwarz, 1985
<i>P. palustris</i>	Embriones	Brotos adventicios vía directa	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>P. pinaster</i>	Brotos axilares, cotiledones	Brotos axilares, brotes adventicios vía directa	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>P. poderosa</i>	Embriones, cotiledones	Brotos adventicios vía directa	Ellis y Judd, 1987

Cuadro 1. Continuación

Especie	Explantado utilizado	Respuesta morfogénica	Referencia
<i>P. radiata</i>	Embriones, cotiledones	Brotos adventicios vía directa	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>P. resinosa</i>	Embriones, cotiledones, polen	Brotos adventicios vía directa	Noh <i>et al.</i> , 1988;
<i>P. rigida</i>	Embriones, cotiledones	Brotos adventicios vía directa	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>P. rigida</i> X <i>P. taeda</i>	Embriones	Brotos adventicios vía directa	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>P. sabiniana</i>	Cotiledones	Brotos adventicios vía directa	<i>In</i> George y Sherrington, 1984
<i>P. strabus</i>	Embriones	Brotos adventicios vía directa	Schwarz <i>et al.</i> , 1988
<i>P. sylvestris</i>	Brotos axilares, brotes inmaduros	Brotos axilares, brotes adventicios vía directa	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>P. taeda</i>	Cotiledones, protoplastos	Embriogénesis somática	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986; Gupta y Durzan; 1987
<i>P. thunbergii</i>	Embriones	Brotos adventicios vía directa	Ishii, 1988
<i>P. virginiana</i>	Cotiledones	Brotos adventicios vía directa	<i>In</i> George y Sherrington, 1984
<i>P. wallichiana</i>	Embriones, hipocotilo	Brotos adventicios vía directa, organogénesis vía callo	Konar y Singh, 1980
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Embriones, cotiledones, brotes	Brotos axilares, brotes adventicios vía directa, organogénesis vía callo, embriogénesis somática	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986
<i>Sequoia sempervirens</i>	Segmentos de estambres, embriones, cotiledones hipocotilo	Brotos axilares, brotes adventicios vía directa, embriogénesis somática	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986; Bourgkard y Favre, 1988
<i>Taiwania cryptomerioides</i>	Brotos axilares	Brotos axilares	<i>In</i> George y Sherrington, 1984
<i>Taxus</i> sp.	Brotos axilares	Brotos axilares	Amos y McCown, 1981
<i>Thuja occidentalis</i>	Embriones	Brotos adventicios vía directa	Harry <i>et al.</i> , 1987
<i>Thuja (=Biota) orientalis</i>	Brotos inmaduros de plántulas, cotiledones	Brotos adventicios vía directa	Thomas <i>et al.</i> , 1977
<i>Thuja plicata</i>	Yemas axilares, estambres, cotiledones	Brotos axilares, brotes adventicios vía directa	<i>In</i> Dustan y Thorpe, 1986; Mission, 1988
<i>Tsuga heterophylla</i>	Embriones, cotiledones	Brotos adventicios vía directa	Harry y Thorpe (No publicado)

4) **Robustecimiento, aclimatización y transferencia al suelo de la plántula.** Es una fase de gran importancia que requiere del mejoramiento tanto de la porción aérea de la plántula como de su raíz. La mayoría de las plántulas producidas *in vitro* son muy susceptibles a un choque por el trasplante, debido a que frecuentemente presentan estomas anormales, lo cual repercute en un pobre control del intercambio gaseoso; asimismo, son deficientes en cera epicuticular y con regularidad presentan una epidermis y cutícula más delgadas, lo cual tiende a provocar una deshidratación excesiva. Por ello deben ser aclimatizadas antes de ser transferidas al suelo, por lo cual son sometidas a un ambiente con una alta humedad relativa (cerca del 100%, similar a las condiciones *in vitro*) que disminuya paulatinamente hasta alcanzar las condiciones de invernadero, vivero y campo. Además, la mayoría de las plántulas formadas *in vitro*, a pesar de presentar una coloración verde, no son del todo fotosintéticas, por lo que es necesario que se active esta capacidad para que de esta forma las plántulas tengan una mayor capacidad de sobrevivir (von Arnold, 1988; Bonga y von Aderkas, 1992; Ahuja, 1993).

2.3 REQUERIMIENTOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO *IN VITRO*

Para establecer un cultivo organogénico o embriogénico, es necesario determinar el medio de cultivo pues éste proporciona los nutrimentos básicos para el crecimiento de los explantes y los propágulos subsecuentes; también es necesario dirigir su crecimiento y desarrollo mediante el uso controlado de reguladores de crecimiento y condiciones de incubación (Hartman, 1987).

Medios nutritivos

En la literatura se han reportado una gran cantidad de metodologías para la obtención de plantas leñosas; no obstante, éstas no son adecuadas para todos los genotipos, tipo de tejido o de especies, puesto que las concentraciones óptimas y aún los componentes de los medios nutritivos varían dependiendo de sus requerimientos, los cuales están en función de sus características intraespecíficas (Bonga y von Aderkas, 1992; George, 1993). Sin embargo, todos los medios presentan los mismos constituyentes generales: nutrimentos inorgánicos o elementos minerales, nutrimentos orgánicos, vitaminas y carbohidratos.

Para la propagación de coníferas se han utilizados numerosos tipos de medios nutritivos; particularmente para *P. menziesii* se ha optado por medios con bajas concentraciones de compuestos inorgánicos, principalmente de nitrógeno. En el cultivo de embriones y brotes apicales se ha encontrado que altas concentraciones de amonio y nitrato inhiben la formación y el desarrollo de brotes adventicios. Por ello, se han utilizado medios como el Murashige & Skoog (MS) y el Schenk & Hildebrandt (SH) reducidos a $\frac{1}{2}$ ó $\frac{1}{4}$ de su concentración original de compuestos inorgánicos, con lo que se han obtenido buenos resultados en la formación de brotes adventicios (Bonga y von Aderkas, 1983; Thompson y Zaerr, 1981 citado por AboEl-Nil, 1987; Mapes *et al.*, 1981 citado por Golfarb y Zaerr, 1989).

Reguladores de crecimiento

Para inducir la organogénesis o embriogénesis somática es necesario la adición de reguladores de crecimiento, pues tales sustancias regulan los procesos fisiológicos de las plantas superiores, como son el crecimiento celular, la elongación, la diferenciación de tejidos y la inducción de síntesis de proteínas (Darnell *et al.*, 1990; Davies, 1990). Los reguladores de crecimiento se han agrupado en cinco: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno, aunque conforme avanzan las investigaciones, el número de éstos se ha incrementado.

Los reguladores de crecimiento más usados son las auxinas y las citocininas; la formación de brotes adventicios es promovida por las citocininas, en tanto que la inducción de raíces se atribuye a las auxinas. No obstante, aunque los reguladores de crecimiento dirigen la diferenciación y el desarrollo de los explantes, estos procesos están influenciados por la acción conjunta de dos ó más reguladores, los cuales pueden presentar relaciones sinérgicas o antagónicas, favoreciendo o inhibiendo algún tipo de respuesta (Hartman, 1987; Minocha, 1987; Darnell *et al.*, 1990, Hopkins, 1995; Bonga y von Aderkas, 1992).

Para algunas especies vegetales, el uso de un tipo de regulador de crecimiento para obtener la respuesta deseada implica la exclusión del otro (Gyulai *et al.*, 1995); no obstante, este aspecto no se puede generalizar debido a que no se consideran las concentraciones endógenas de reguladores de crecimiento, ni como éstas pueden interactuar con las que se están adicionando (Minocha, 1987).

Las **auxinas** constituyen el primer grupo de reguladores de crecimiento que se describieron, siendo el ácido indol acético (AIA) el que se encuentra de forma natural en las plantas superiores. Actualmente se conoce una gran variedad de auxinas sintéticas más estables como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido indol butírico (AIB) y el ácido 1-naftalenacético (ANA) (Burguess, 1985; Davies, 1990; Arteca, 1996).

Los diferentes tipos de auxinas tienen distinto efecto en el desarrollo de los explantes, así, el 2,4-D promueve la formación de callo y su crecimiento, por lo que es utilizado para la inducción de células en suspensión y para la inducción de embriogénesis. El ANA y el AIB son usados para la inducción de brotes y raíces, con frecuencia se le combina con citocininas (Bonga y von Aderkas, 1992; Hopkins, 1995).

Las **citocininas** son otro grupo de reguladores de crecimiento que cuando se aplican *ex vitro* no producen un gran efecto, pero en condiciones *in vitro* provocan distintas repuestas muy notorias como la división celular en los meristemas y la morfogénesis, alargamiento celular, desarrollo de brotes axilares y vástagos. Se conocen al menos 25 tipos de citocininas, entre las que destacan la zeatina y la 2-isopentiladenina (2-iP) que son de origen natural; y la 6-bencilaminopurina (BA o BAP) y la kinetina (K), las cuales son sintéticas (Minocha, 1987; Darnell *et al.*, 1990; Davies, 1990; Bonga y von Aderkas, 1992, Arteca, 1996).

Cabe señalar que los tipos de repuestas ya mencionadas se deben principalmente a la interacción de las citocininas con las auxinas. La concentración y el tipo de cada una difieren de acuerdo con la planta y el órgano que se pretenda desarrollar; de esta forma, para obtener raíces en estacas, la formación de callo en monocotiledóneas o la primera fase de la embriogénesis, se requiere de la adición de auxinas en mayor proporción que las citocininas. Por otro lado, la proliferación de brotes axilares *in vitro*, formación de brotes adventicios o iniciación de callo en dicotiledóneas, demanda de mayor cantidad de citocininas con respecto a las auxinas. Para inducir el enraizamiento es necesario de una concentración elevada de auxinas y muy baja de citocininas, y en algunos casos su ausencia (Minocha, 1987; Bonga y von Aderkas, 1992; George, 1993; Hopkins, 1995; Arteca, 1996) (Figura 7).

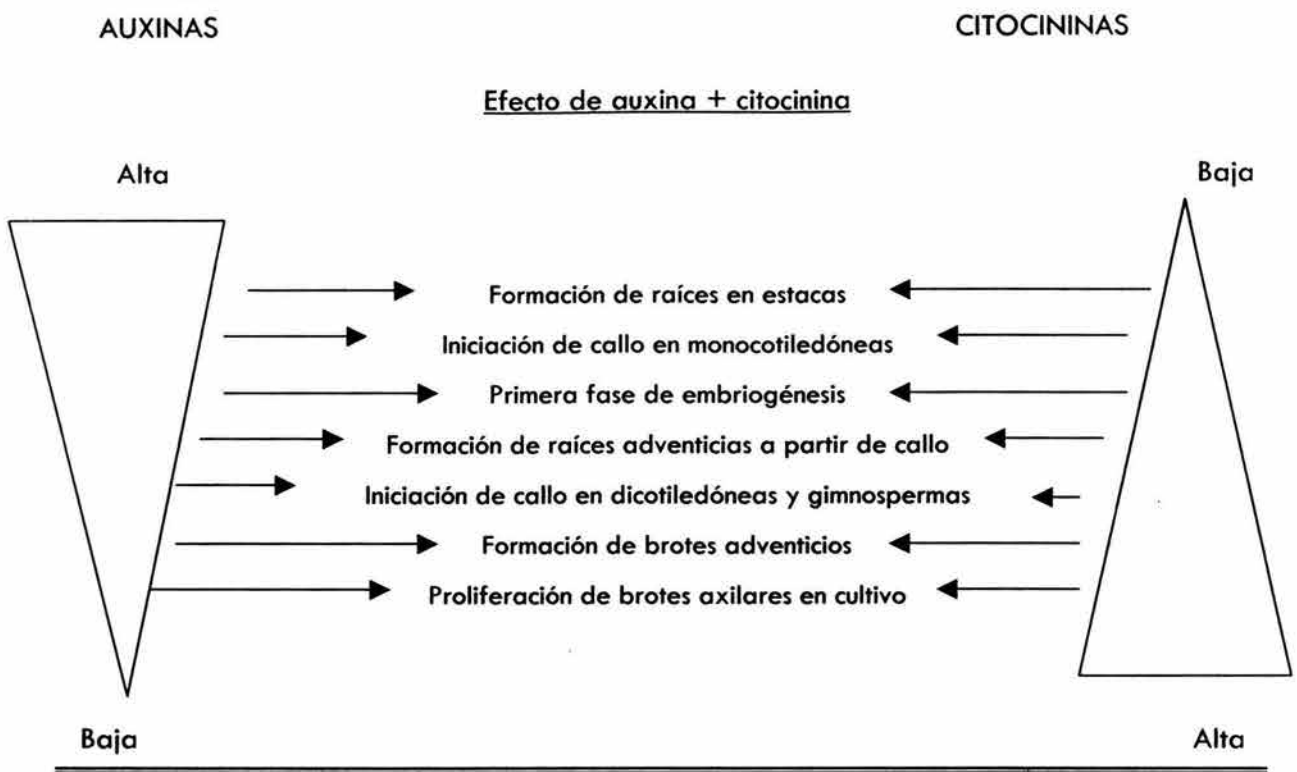


Figura 7. Concentraciones relativas de auxinas y citoquininas requeridas para el desarrollo y la morfogénesis (Fuente: George, 1993).

Soporte físico del explante

Además de los componentes ya mencionados, los medios de cultivo contienen algún tipo de soporte físico para el explante. Los medios pueden ser sólidos o líquidos; en el primer caso, se utiliza algún tipo de agente gelificante como el **agar** que es el usado con mayor frecuencia debido a sus propiedades gelificantes, estabilidad y resistencia al metabolismo (Battacharya *et al.*, 1994). Otros agentes gelificantes utilizados son el **Gelrite®** y el **Phytigel®**, la poliacrilamida, extractos tisulares mucilaginosos, agarosa y almidones (Hurtado y Merino, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992, Battacharya *et al.*, 1994).

Los medios líquidos presentan varias ventajas sobre los sólidos ya que permiten una mejor absorción de nutrientes, una mayor disponibilidad de oxígeno disuelto, un mejor manejo del explante, etc. Sin embargo, necesitan de un soporte que generalmente son puentes de papel filtro, perlas de vidrio, vermiculita, agrolita y turba (Hurtado y Merino, 1991; Battacharya *et al.*,

1994).

El **pH** es de gran importancia debido a que valores altos o bajos pueden frenar el crecimiento y desarrollo *in vitro* de especies forestales, además de que interviene en la disponibilidad de los componentes del medio y en el proceso de solidificación. El pH que generalmente se usa está entre 5.0 y 6.6 (Thorpe y Patel, 1984, Bonga y von Aderkas, 1992).

La **temperatura** también es de gran relevancia en la morfogénesis de los explantes, puesto que influye en las reacciones químicas de las plantas y, consecuentemente, en sus procesos fisiológicos. En general, los cultivos *in vitro* de coníferas se mantienen a temperaturas entre 20 y 27°C (Ellis y Webb, 1993 citado por Ahuja, 1993). Se ha encontrado que para algunas especies se mantienen temperaturas constantes para el día y la noche (Bonga y von Aderkas, 1992). Asimismo, se ha señalado que la temperatura puede variar de acuerdo con el fotoperiodo (menor en la noche); sin embargo, para el cultivo de embriones y cotiledones de algunas coníferas, incluyendo *P. menziesii*, se ha observado que una temperatura constante produce un mayor número de brotes adventicios, y que alrededor de los 20°C se favorece el enraizamiento (Chalupa, 1987; Ellis y Webb, 1993).

La **luz** es el principal factor físico del ambiente del cultivo *in vitro* puesto que tiene un efecto sobre el desarrollo organizado de un tejido (Thorpe y Patel, 1984). Es indispensable durante el proceso de fotosíntesis o influye sobre la latencia y la germinación (Bonga y von Aderkas, 1992). Es importante considerar la intensidad, la calidad y la duración de fotoperiodo (Murashige, 1974; Biding y Krumbiegel-Schoeren, 1984). Desafortunadamente este factor depende en gran medida de otros componentes ajenos a las necesidades del cultivo, como son las instalaciones disponibles. Para la micropropagación de coníferas, entre ellas *P. menziesii*, se recomienda luz fluorescente blanca y fría, con 10 a 20 W/m², con un fotoperiodo de 16 h luz y una temperatura constante (Bonga y von Aderkas, 1992; Ellis y Webb, 1993).

2.4 PROBLEMAS ASOCIADOS CON EL USO DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES EN LA PROPAGACIÓN DE ESPECIES FORESTALES

A pesar de que se han tenido grandes avances en el desarrollo y morfogénesis de plantas vasculares, la micropropagación *in vitro* de gimnospermas, resulta difícil y en la mayoría de los casos requiere de largos periodos. Algunos de estos problemas se deben principalmente a las características de los explantes. En general, las especies forestales presentan una gran variabilidad genética debido a su tipo de reproducción, lo propicia poca uniformidad genética de los explantes. Además, se ha observado que de un periodo a otro de recolección éstos presentan diferencias fisiológicas debido a la influencia de las fluctuaciones en el ambiente, lo cual repercute en el experimento y consecuentemente en la variabilidad estadística de los resultados (Bonga y von Aderkas, 1992).

Otro problema es la edad del árbol del cual se obtiene el explante, así como su estado de madurez; para las especies forestales se ha observado que el éxito de la micropropagación está relacionado con el uso de material muy joven, como embriones o porciones de plántulas jóvenes. El problema que esto causa, es que cuando una conífera ha demostrado su calidad ya no es apta para su cultivo *in vitro*, por lo que el material que se termina utilizando en la micropropagación no está probado (Thorpe *et al.*, 1991; Bonga y von Aderkas, 1992).

Una fase del desarrollo *in vitro* de especies forestales que también se ha dificultado es el enraizamiento, debido a que no se logra de forma espontánea y los porcentajes inducidos son bajos; además, el proceso frecuentemente es lento, las raíces formadas no siempre son funcionales y los problemas de mortalidad por oxidación son muy frecuentes (Villalobos *et al.*, 1983; Thorpe *et al.*, 1991).

Otros problemas que se presentan en el cultivo de tejidos son: la oxidación debida a la liberación de compuestos fenólicos, hiperhidratación de los tejidos y dificultades en la aclimatización, entre otros. Todo lo anterior repercute en el número de propágulos obtenidos por explante, que para el caso de las coníferas es bajo, así como en el costo total ya que se requiere de mucho tiempo y manejo, lo cual implica altos costos de infraestructura y de mano de obra (Bonga y von Aderkas, 1992). Sin embargo, a pesar de todas las dificultades, los trabajos de micropropagación de

especies forestales son necesarios, para el caso de las especies amenazadas son urgentes y funcionan como una alternativa para aquellas coníferas cuya propagación por regeneración natural o por otras vías se ve limitada.

2.5 MICROPROPAGACIÓN MEDIANTE EL CULTIVO DE TEJIDOS DEL GÉNERO *PSEUDOTSUGA*

2.5.1 INDUCCIÓN Y FORMACIÓN DE BROTES ADVENTICIOS

Los primeros trabajos en cultivo de tejidos de especies forestales fueron realizados por Gautheret, quien en 1934 cultivó cambium de *Pinus pinaster* y de *Abies alba* (Villalobos et al., 1983); en 1950, Ball desarrolló el primer proceso organogénico de una conífera, al lograr la formación de brotes en cultivos de callos de *Sequoia sempervirens* (Thorpe et al., 1991), pero fue hasta 1975 que Sommer et al. obtuvieron la primera plántula completa de *Pinus palustris in vitro* (Aitken-Christie y Thorpe, 1984). Desde entonces, se han producido plántulas de más de cien especies forestales, treinta de las cuales son gimnospermas, pertenecientes en su mayoría al género *Pinus* (Thorpe et al., 1991).

Del género *Pseudotsuga* únicamente se han realizado trabajos de cultivo de tejidos con *P. menziesii* (Mirb) Franco. En 1935, La Rue (citado por AboEl-Nil, 1987) cultivó de embriones que generaron plántulas. En 1958, Blakely (citado por AboEl-Nil, 1987) experimentó con callos de *P. menziesii* originados a partir de cambium, del floema y de la corteza del tallo de un árbol maduro; al siguiente año Al-Talib y Torrey (citado por AboEl-Nil, op. cit.) trabajaron con yemas de *P. menziesii* obteniendo la formación de callo.

A continuación se enlistan los trabajos más relevantes que han propuesto metodologías para la regeneración de *Pseudotsuga menziesii* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Sumario de los estudios sobre el cultivo *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii* (Modificado de Goldfarb y Zaerr, 1989).

REFERENCIA	EXPLANTE	TRATAMIENTO		RESPUESTA
		Medio	Reg. de crecimiento	
Al-Taib y Torrey (1959)	Yemas	AT	Sin reguladores de crecimiento	Desarrollo de hojas y callo
Harvey y Grasham (1969)	Corteza	HG	0.1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l K	Callo
Winton (1972)	Cambium	BL modif.	25 mg/l AIA + 0.5 mg/l K	Callo y células en suspensión
Chalupa y Durzan (1973)	Yemas	AT, CD	Ninguno	Desarrollo de hojas y tallo
Cheng (1975)	Embriones y cotiledones	MS modifi.	5 µM c/u. AIA, AIB, 2iP, BAP	Callo
	Callo	¼ MS	0.5 a 1 mM BAP	Yemas
	Yemas	½ MS	Ninguno	Brotos
Sommer (1975)	Embriones	SO	0.1 a 4 mg/l BAP + 0.01 mg/l ANA	Yemas
Boulay y Franclet (1977)	Yemas	MS	0.1 mg/l GA ₃ o 1 mg/l AIB	Desarrollo de las yemas
	Yemas	MS	10 ⁻² a 10 ⁻⁵ mg/l AIA	Brotos
	Brotos	1/3 a ½ MS	10 a 20 mg/l AIA	Plántulas
Chalupa (1977a)	Yemas	½ MS	Ninguna	Brotos
	Brotos	No especific.	0.05 a 0.2 mg/l ANA o 2 mg/l AIB ó enraizador comercial auxinas + perlita	Plántulas
Chalupa (1977b)	Embriones	LS	1 a 2 mg/l ANA + 1 mg/l BAP	Callo, brotes y elongación
	Yemas	LS	Ninguno	Brotos
	Cotiledones	½ LS	1mg/l BAP + 0.01 mg/l ANA	Yemas
	Yemas Brotos	½ LS ½ LS	Ninguno 1mg/l AIB ó enraizador comercial con de auxinas + perlita	Brotos Plántulas
Cheng (1977b)	Cotiledones	CH (MS modif.)	5 µM BAP + 0.5 a 5 nM ANA	Yemas

Cuadro 2. Continuación

REFERENCIA	EXPLANTE	TRATAMIENTO		RESPUESTA
		Medio	Reg. de crecimiento	
Cheng y Voqui (1977)	Cotiledones	CH	5 μ M BAP + 0.5 μ M ANA	Yemas
	Yemas Brotos	CH CH 0.5 % sacarosa	Ninguno 0.25 μ M ANA	Brotos Plántulas
Winton a Verhagen (1977a)	Embriones	BL Modif.	0.1 a 0.5 mg/l BAP	Yemas
	Yemas Brotos	BL Modif. BL Modif.	Ninguno 0.1 mg/l BAP + 5 mg/l NOAA	Brotos Callo, yemas y brotes Plántulas
Winton a Verhagen (1977a)	Brotos	BL Modif.	10 mg/l AIB	Callo
	Plántulas	BL Modif.	5 mg/l ANOA + 0.1 mg/l BAP	Células en suspensión y pro-embrioides
	Callo	½ BL con NH ₄ bajo	No especificado	
Kirby y Cheng (1979)	Cotiledones	½ CH + glutamina + 0.6 M sorbitol	5 μ M BAP + 15 μ M ANA	Protoplastos y colonias.
	Colonias	Mismo medio	No especificado	Callo
AboEl- Nil (1980)	Cotiledones	½ MS	1 mg/l ANA ó 2,4-D	Callo y embrioides
Mapes y Zaerr (1981)	Embriones	½ MS + extracto de gametófitos femeninos	Ninguno	Estimulación del crecimiento
Mapes <i>et al.</i> , (1981)	Epicotilos	SH	1mg/l BAP + 0.25 mg/l ANA o 2,4-D	Yemas
	Yemas Brotos	SH SH + 3% sacarosa	Ninguno 0.1 mg/l ANA + 0.1 mg/l 2iP	Brotos Plántulas
Thompson y Zaerr (1981)	Yemas	MS con ¼ NH ₄ NO ₃ , KNO ₃	10 ⁻⁴ M BAP + 10 ⁻⁷ M ANA	Yemas adventicias
	Yemas	Mismo medio	Ninguno	Brotos

Cuadro 2. Continuación

REFERENCIA	EXPLANTE	TRATAMIENTO		RESPUESTA
		Medio	Reg. de crecimiento	
Durzan (1982)	Yemas	MS	5 mg/l NOAA + 0.1 mg/l BAP	Callo, células en suspensión y proembrioides
Institute of Paper Chemistry (1982)	Embriones	¼ MS con poca sacarosa y NH ₄	Ninguno	Estimulación del crecimiento
Kirby (1982)	Cotiledones, ápices de plántulas	MS	2.5 mg/l 2,4-D + 0.1 mg/l BAP	Callo y células en suspensión
Thompson (1982)	Cotiledones Callo	½ CH ½ CH + glutamina	15 µM ANA 15 µM ANA + 500 nM BAP	Callo Células en suspensión
Chalupa (1983)	Embriones Callo	½ MS ½ MS bajo en N	10 ⁻⁵ M ANA + 10 ⁻⁶ BAP 10 ⁻⁷ ANA + 10 ⁻⁵ M BAP	Callo Brotos
Timmis y Ritchie (1984)	Cotiledones	MS bajo en N ó WPM	1 a 2 mg/l BAP + 0.005 a 0.01 mg/l ANA Ninguno	Yemas Brotos
Gupta y Durzan (1985a)	Yemas Brotos Yemas	Los mismos ½ WPM Basal, 5 g/l de sacarosa	2 mg/l AIB + 2 mg/l ANA, perlita 0.05 mg/l ANA Ninguno	Plántulas Formación de raíz, Plántulas completas Numerosas yemas Elongación
Gupta y Durzan (1985b)	Yemas Yemas Yemas Brotos Plántulas Yemas Brotos	DCR ½ CDR + AC DCR ½ DCR DCR ½ DCR ½ DCR	Ninguno 0.2 mg/l BAP 2mg/l ANA 2mg/l BAP + 0.1 mg/l ANA ANA Ninguna 2 mg/l ANA	Brotos axilares Plántulas Yemas Brotos Plántulas

Fuentes: Cheng, 1977; Mohammed y Vidaver, 1988; AboEl Nil, 1987; Goldfarb y Zaerr, 1989; Thorpe *et al.*, 1991. Abreviaturas de los Medios Nutritivos: AT=Al-Talib y Torrey, 1959; BL= Brown y Lawrence, 1968; CD=Chalupa y Durzan, 1973; CH=Cheng, 1977; DCR=Gupta y Durzan, 1985; HG=Harvey y Grasham, 1969; LS=Linsmaier y Skoog, 1965; MS=Murashige & Skoog, 1962; SH=Schenk y Hildebrandt, 1972; SO=Sommer, 1975; WH=White, 1934; WPM=Lloyd y McCown, 1981. Abreviaturas de los Reguladores de Crecimiento: BAP=N⁶ Benzilaminopurina; GA₃=Ác. giberélico; AIA=Ácido Indol acético; AIB=Ácido Indol butírico; K=kinetina; ANA=Ác. Naftalen acético; ANOA= Ác.β-naftoxiacético; 2iP=Ác. 2-isopentiladenina; 2,4-D=Ác. 2-4 Diclorofenoxiacético.

Como se puede observar, el refinamiento de las formulaciones de los medios y la manipulación del cultivo han dado lugar a un gran número de tecnologías que han conducido sólo a la regeneración ocasional de *Pseudotsuga menziesii*. Varias rutas de organogénesis y embriogénesis se han reportado usando diferentes tipos de explantes, de especímenes maduros y juveniles. No obstante, los logros tan importantes ya mencionados aún son erráticos, por lo que la aplicación de técnicas de cultivos de tejidos para la producción comercial a gran escala de *P. menziesii* no se ha logrado (AboEl-Nil, 1987).

Para las especies de *Pseudotsuga* que se distribuyen en la República Mexicana, son escasos los trabajos de micropropagación. Montes-Rivera (1993) describió un método para regenerar a gran escala plántulas de *Picea chihuahuana* y *Pseudotsuga menziesii* a partir de embriones maduros vía organogénesis. Para la inducción de brotes ensayó con los medios Murashige y Skoog y Gresshoff y Doy reducidos al 50% en sus concentraciones de compuestos inorgánicos; no obstante, no menciona el tipo de reguladores que utilizó, así como sus concentraciones y aún cuando se han repetido dichos tratamientos, no se han logrado obtener resultados similares a los descritos por dicho autor, adicionalmente no proporciona suficientes evidencias que soporten sus hallazgos.

García Campusano (1999) indujo la formación de brotes vía organogénesis a partir del cultivo de embriones maduros de *P. macrolepis* en el medio Schenk y Hildebrandt, y consideró contemplando 16 combinaciones de reguladores de crecimiento: BA (0,3 y 5 mg/l) con ANA (0, 0,1, y 0.5 mg/l) y la K (0,3 y 5 mg/l) con 2,4-D (0,0.1 y 0.5 mg/l) durante un periodo de inducción de 30 días. Entre sus resultados destaca que hubo una mayor formación de brotes por embrión en los tratamientos con ANA/BA con respecto a los de 2,4-D/K; no obstante, el desarrollo en las combinaciones ANA/BA fue más lento por lo que no alcanzaba a desarrollarse para ser individualizados.

Monjarás González (2001) probó seis tratamientos con reguladores de crecimiento, dos con ANA/BA (0.5/3, 0.1/3 mg/l) y cuatro con 2,4-D/K (0.1/5 mg/l y 0/5, 0.1/3 y 0.5 /5 mg/l) y concluyó que en las combinaciones de 2,4-D/K hubo mayor formación de brotes individualizados en un menor periodo con respecto a las combinaciones de ANA/BA, que fue de 2 hasta 18 por embrión. Asimismo, observó que la fragmentación del embrión en 2 ó 4 piezas favoreció la

producción de estas estructuras.

2.5.2 INDUCCIÓN DEL ENRAIZAMIENTO *IN VITRO*.

En los últimos 10 años se ha incrementado la información sobre los procesos de enraizamiento y aclimatización de coníferas por medio del cultivo de tejidos. El porcentaje de enraizamiento espontáneo es generalmente bajo y se tiene un éxito del 1 al 5% (von Arnold, 1988; Patel y Thorpe, 1984).

Para el enraizamiento *in vitro* frecuentemente se ha utilizado como sustrato medio nutritivo solidificado con agar. Las ventajas que este método tiene son la distribución uniforme de auxinas y nutrimentos, y un buen contacto entre los brotes y el sustrato, lo cual puede dar como resultado un enraizamiento sincronizado. Las mezclas de suelos de turba, perlita, vermiculita o arena han presentado algunos problemas con el control de las mezclas y el mantenimiento de un buen estado del brote (Patel y Thorpe, 1984; Bonga y von Aderkas, 1992). Sin embargo, la calidad de las raíces producidas en agar no es siempre muy aceptable. El agar probablemente impide el intercambio de gases e inhibe el desarrollo de un sistema vascular en las raíces así como una buena producción de pelos radiculares. Sustratos más permeables como mezclas de turba:perlita o turba:vermiculita se ha recomendado, particularmente para el crecimiento subsecuente de la raíz (Cheng, 1976; Rancillac *et al.*, 1982).

Para inducir el enraizamiento, los reguladores del crecimiento pueden ser aplicados por tres vías: 1) por incorporación al medio de cultivo, 2) mediante pulsos en tiempos cortos y 3) como enraizadores comerciales en polvo, aplicándolas de manera directa en la base de los brotes. De los tres métodos, la segunda modalidad ha resultado la más efectiva. En coníferas se han proporcionado pulsos de 12 horas hasta varios días, en los cuales los brotes han sido expuestos a altas concentraciones de auxinas ya sea en medio líquido, agar o vermiculita; posteriormente los brotes son cultivados en medio nutritivo libre de hormonas (Mohammed y Vidaver, 1988).

Cuadro 3. Tratamientos de enraizamiento *in vitro* usados en la propagación de *Pesudotsuga menziesii*

REFERENCIA	TRATAMIENTO		CONDICIONES	RESPUESTA
	Medio	Reg. de crecimiento	DE CULTIVO	
Boulay y Francllet (1977)	½ ó 1/3 MS	10 a 20 mg/l AIA		Enraizamiento
Chalupa (1977a)	No especific.	0.05 a 2.0 mg/l ANA ó 0.1 a 2.0 mg/l IBA ó auxina en polvo * perlita		Enraizamiento
Chalupa (1977b)	½ LS	1 mg/l IBA ó auxina en polvo + perlita		Enraizamiento
Cheng (1977)	CH (MS modific.)	5.0 µM ANA 2iP	19 ó 24° C	72% enraizamiento
	CH	0.5 µM ANA+ 5 µM 2iP	19 ó 24° C	75%
	CH	0.5 µM ANA + 2.5 µM 2iP	19 ó 24° C	71%
	CH	0.5 µM ANA + 0.5 µM 2iP	19 ó 24° C	82%
Cheng y Voqui (1977)	CH + 0.5 % de sacarosa	0.25 µM ANA	18 °C aire/ 24 °C suelo	80 % de enraizamiento cuatro semanas
Winton y Verhagen (1977)	BL modific.	10 mg/l IBA		Enraizamiento
Boulay (1979)	MS ½ + 5 g/l sacarosa + agar MS ½ + 5 g/l de sacarosa + agar	10 ⁻³ a 10 mg/l AIA + 10 ⁻² a 1 mg/l ANA	25/18 °C (día/noche) 16/8 h	30-40 % de enraizamiento 3-4 semanas
Mapes <i>et al.</i> , (1981)	SH + 3% de sacarosa	10-20 mg/l AIA + 1-5 mg/l ANA	25/18 °C (día/noche) 16/8 h	10 – 20 % de enraizamiento en plántulas de 6 meses a 4 años de edad

Cuadro 3. Continuación

REFERENCIA	TRATAMIENTO		CONDICIONES	RESPUESTA
	Medio	Reg. de crecimiento	DE CULTIVO	
Chalupa (1983)	½ WPM	0.1 mg/l ANA + 0.1 mg/l 2iP		37.5 % enraizamiento
Timmis y Ritchie (1984)	No especific. + 0.5 % de sacarosa	1 mg/l AIB + 2 mg ANA, perlita	18° C/ aire 24° C/suelo	36 a 60 % de enraizamiento, 25 días
Gupta y Durzan (1985)	½ DCR	0.05 mg/l ANA		50 % de enraizamiento
Montes-Rivera (1995)	½ MS	3 mg/l ANA 2 mg/l ANA	16 h/luz 8 h/osc 20 ± 2 ° C	2 % enraizamiento 40 % enraizamiento
		0.1 mg/l ANA + 1 mg/l BAP		60 % enraizamiento

Fuentes: Cheng, 1977; Mohammed y Vidaver, 1988; AboEl Nil, 1989; Goldfarb y Zaer, 1989; Thorpe *et al.*, 1991. Abreviaturas de los Medios Nutritivos: BL=Brown y Lawrence, 1968; CH=Cheng, 1977; DCR=Gupta y Durzan, 1985; LS=Linsmaier y Skoog, 1965; MS=Murashige & Skoog, 1962; SH=Schenk y Hildebrandt, 1972; WPM=Lloyd y McCown, 1981. Abreviaturas de los Reguladores de Crecimiento: BAP=N⁶ Benzilaminopurina; GA₃=Ác. Giberélico; AIA=Ácido Indol Acético; AIB=Ácido Indol Butírico; K=kinetina; ANA=Ác. Naftalen acético; NOAA= Ác. β-Naftoxiacético; 2iP=Ác. 2-isopentiladenina; 2,4-D=Ác. 2-4 Diclorofenoxiacético.

Existen otros factores que intervienen en el enraizamiento como son la edad y origen del explante, la hiperhidratación y el proceso de aclimatización. Asimismo, la temperatura y la luz juegan un papel importante en la formación de raíces (Dustan y Thorpe, 1984).

En cuanto al enraizamiento *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii*, en el Cuadro 3 se citan algunas de las técnicas establecidas y los factores que intervienen en la formación de raíces.

Para *Pseudotsuga macrolepis*, García Campusano (1999) probó el medio Senck y Hildebrandt (SH) reducido al 50% de sus compuestos inorgánicos, combinado con uno de los siguientes tratamientos: 40 mg/l de ANA, 40 mg/l de AIB, 20 mg/l de ANA + 20 mg/l de AIA, todos proporcionados en un pulso de 20 h para promover el enraizamiento de los brotes generados; además utilizó el medio Murashige y Skoog (MS) reducido al 50% con 10 mg/l de AIB en pulso de 72 h. Los

sustratos utilizados fueron solidificados con Phytigel, también se uso medio líquido teniendo con puentes de papel filtro y perlitas de vidrio. Los brotes se incubaron a 22°C con un fotoperiodo de 16 h/luz y 8 h/osc. La formación de primordios radicales se obtuvo en 3 brotes sometidos al tratamiento de 10 mg/l de AIB.

Monjarás González (2001) utilizó 23 tratamientos de enraizamiento con tres reguladores de crecimiento: ANA, AIB y 2iP, así como dos enraizadores comerciales (Citowin 500® y Radix 10,000®), además de una cepa de un hongo ectomicorrizógeno; dos medios de cultivo: MCM y SH, dos sustratos: turba-vermiculita y puentes de papel filtro, así como dos niveles de temperatura: 19 y 22°C. No obstante, sólo en cuatro tratamientos (ANA 0.25 µM, ANA 0.4 mg/l, Citowin 500® al 6% y ANA 0.05 mg/l) obtuvo la formación de primordios radiculares.

2.6 JUSTIFICACIÓN

Los bosques de *Pseudotsuga macrolepis* Flous, árbol conocido en el estado de Tlaxcala como pinabete, están limitados únicamente a cuatro municipios: Alzayanca, Emiliano Zapata, Terrenate y Tlaxco; estas localidades constituyen los límites más sureños de su distribución en el país. No obstante, tales poblaciones se han reducido drásticamente debido a su baja capacidad de regeneración natural, una baja producción de semillas y consecuentemente un bajo porcentaje de germinación de la semilla; así como por la depredación de conos y semillas por insectos, la tala inmoderada, el sobrepastoreo, los incendios y la apertura de nuevas tierras para cultivos agrícolas. Por todo ello, esta conífera ha sido catalogada por la Norma Oficial Mexicana emitida en el 2001, como especie sujeta a protección especial.

Para tratar de incrementar las poblaciones de esta conífera se han propuesto técnicas alternativas como su propagación mediante el uso de estacas; sin embargo, ha resultado poco efectivo debido a que su enraizamiento es casi nulo, además de que las plántulas presentan un desarrollo plagiotrópico. Otra opción es el uso de técnicas de cultivos de tejidos vegetales, porque permitirá obtener individuos a partir de pequeñas porciones de tejidos, lo que favorece la reducción de los ciclos de vida de especies forestales, además del mantenimiento de bancos de germoplasma por largos periodos. Dado lo anterior, el cultivo de tejidos vegetales resultaría

ser la técnica más adecuada para la propagación y rescate de *Pseudotsuga macrolepis*. Los resultados previos citados en literatura y particularmente los desarrollados con esta especie demuestran que esto es posible, pero aún no se han generado experimentos suficientes que lleven al establecimiento de un proceso efectivo de regeneración *in vitro*; por lo tanto es necesario realizar un estudio como el que se describe a continuación que permitirá identificar y optimizar condiciones de cultivo específicas para la regeneración de plántulas completas de *P. macrolepis*.

2.7 OBJETIVO GENERAL

Inducir la formación de brotes adventicios de *Pseudotsuga macrolepis* y su enraizamiento a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros.

2.7.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Ensayar diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento (ANA y BA) que permitan inducir la formación de brotes adventicios a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros.

Inducir la elongación de los brotes adventicios de *P. macrolepis*, así como la proliferación de hojas.

Inducir el enraizamiento de los brotes adventicios utilizando diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores de crecimiento (ANA o AIB).

2.8 MATERIALES Y MÉTODOS

2.8.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se obtuvieron semillas maduras por dos vías:

1) Se recolectaron conos maduros de *Pseudotsuga macrolepis* en las zonas boscosas de tres localidades del estado de Tlaxcala: Tlaxco, Mpio. de Tlaxco; Villarreal, Mpio. de Terrenate y el Rancho El Pozo, Mpio. de Emiliano Zapata (Cuadro 4). Las recolecciones se realizaron quincenalmente durante el periodo de septiembre de 1994 a febrero de 1995.

Cuadro 4. Ubicación y características de las localidades estudiadas.

Localidad	Tipo de Vegetación
Tlaxco , Barranca del Río Zahuapan, Mpio. de Tlaxco, Tlaxcala.	Bosque mixto con <i>Pinus</i> , <i>Quercus</i> , <i>Abies</i> y <i>Pseudotsuga</i> . 2900 msnm.
Villarreal , Barranca El Conejo, al N del poblado de Villarreal, Mpio. de Terrenate, Tlaxcala.	Bosque mixto con <i>Pseudotsuga</i> , <i>Quercus</i> , <i>Pinus</i> , <i>Arbutus</i> y <i>Abies</i> . 2850 msnm
El Pozo , Barranca del Río Tepetzintla, 3 km al sur de Emiliano Zapata, Mpio. de Emiliano Zapata, Tlaxcala.	Bosque mixto con <i>Pinus</i> , <i>Quercus</i> , <i>Abies</i> , <i>Juniperus</i> y <i>Pseudotsuga</i> . 2850 msnm

Los conos se colocaron en charolas de plástico y se expusieron al sol diariamente durante quince días para su secado, procurando que todos los conos se secaran homogéneamente. Posteriormente los conos se golpearon suavemente para que las semillas sueltas salieran sin dañarse, para la extracción de las semillas restantes, se removió la base del cono con unas pinzas y se abrió sobre su eje central (Carrillo *et al.*, 1970; Niembro, 1987). Puesto que la cantidad de semillas por árbol fue muy poca, el número total utilizado se obtuvo de una mezcla de árboles en cada localidad. Dichas semillas se utilizaron en cuatro ensayos, denominándose a cada uno como procedencia (Cuadro 5). Otros dos lotes de semillas fueron donados por el Centro de Investigaciones en Genética y Ambiente (CIGyA) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, éstas fueron recolectadas durante julio a octubre de 1993 y provenían de dos árboles ubicados en el Mpio. de Terrenate, Tlax. En el ensayo o procedencia 5 se utilizaron las semillas del árbol "J" y

en el 6 las del árbol "K" (Cuadro 5).

Cuadro 5. Procedencias de semillas cultivadas en los diferentes medios de cultivo.

Procedencia	Localidad y año de recolección	Medio de cultivo
1	Barraca El Conejo, Terrenate (1994)	MS
2	Barranca del Río Zahuapan, Tlaxco (1994)	MS
3	Barranca del Río Zahuapan, Tlaxco (1994)	B5 modificado por Litz
4	Rancho El Pozo, Emiliano Zapata (1995)	B5 modificado por Litz
5	Barranca El Conejo (árbol seleccionado "J"), Terrenate (1993)	SH
6	Barranca El Conejo (árbol seleccionado "K"), Terrenate (1993)	SH

MS: Murashige-Skoog (Murashige & Skoog, 1962); B5 modificado por Litz (Chávez *et al.*, 1992a,b,c); SH: Schenk y Hildebrandt (Gamborg y Phillips, 1995)

Las semillas se colocaron en frascos de vidrio cerrados herméticamente, etiquetados con la fecha y lugar de recolección, y almacenadas a 4 °C hasta su uso.

2.8.2 PRETRATAMIENTO DE LAS SEMILLAS: ESCARIFICACIÓN, DESINFECCIÓN Y SELECCIÓN.

Inicialmente se eliminaron los restos de alas, polvo, resinas y enseguida las semillas fueron sometidas a uno de los dos procesos de desinfección que a continuación se describen:

1) Las semillas se colocaron en agitación durante 15 minutos en una solución de blanqueador doméstico (Clorox®) al 50% (v/v), enseguida se procedió a la eliminación de la testa en una campana de flujo laminar. Los megagametofitos disectados fueron lavados durante cinco segundos en blanqueador doméstico (Clorox®) al 33% (v/v), posteriormente el embrión fue disectado y lavado durante 10 segundos en blanqueador doméstico (Clorox®) al 6% (v/v), todo esto bajo condiciones de asepsia. Entre cada proceso de desinfección, se realizaron lavados por triplicado con agua destilada esterilizada para eliminar la solución de blanqueador doméstico (Kyte, 1987).

2) Las semillas se sometieron aun tratamiento de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% (v/v) en agitación durante 1 hora; posteriormente se colocaron en una solución fungicida (Captán 1 g/l) durante 24 horas. Al término de este tiempo, las semillas se transfirieron a una solución bactericida (Amikacina 20 mg/l) en agitación durante 45 minutos y luego en una solución de blanqueador doméstico (Clorox®) al 50% (v/v) durante media hora. Para romper la latencia, las semillas se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 1% (v/v) por 48 horas (modificado de Montes Rivera, 1993; Honrrubia y Torres, 1993).

Se seleccionaron aquellas semillas que presentaron megagametofito y en condiciones asépticas se les eliminó la testa para exponer los megagametofitos a una segunda desinfección con blanqueador doméstico (Clorox®) 15% (v/v) durante 5 minutos Finalmente los embriones fueron disectados y enjuagados con blanqueador doméstico (Clorox®) 3% (v/v) durante 60 segundos. Después de cada uno de los procesos de desinfección, las semillas, megagametofitos o embriones se lavaron tres veces en agua destilada esterilizada para eliminar los restos del desinfectante (modificado de Montes Rivera, 1993).

2.8.3 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios nutritivos que se utilizaron para el establecimiento del cultivo, la inducción de brotes y el enraizamiento fueron el Murashige & Skoog (MS)(1962), el B5 modificado por Litz (Chávez *et al.*, 1992a,b,c) y el Schenk y Hildebrandt (SH) (1972 citado por Gamborg y Phillips, 1995) (Anexo 1), a los cuales se les adicionaron una de 24 combinaciones de reguladores de crecimiento: ácido naftalén acético (ANA) y 6-bencil aminopurina (BA), contemplando 23 tratamientos más el testigo sin reguladores de crecimiento (Cuadro 6).

Cuadro 6. Combinaciones de reguladores de crecimiento en las que se cultivaron los megagametofitos y los embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* en las seis procedencias.

		BA mg/l					
		0.0	0.5	1	2	3	5
ANA mg/l	0.0	0/0	0.5/0	1/0	2/0	3/0	5/0
	0.1	0/0.1	0.5/0.1	1/0.1	2/0.1	3/0.1	5/0.1
	0.5	0/0.5	0.5/0.5	0.5/1	0.5/2	0.5/3	0.5/5
	1.0	0/1	0.5/1	1/1	2/1	3/1	5/1

Los tres medios utilizados para el desarrollo de los brotes, la proliferación de hojas, elongación de tallos y enraizamiento; se redujeron al 50% de la concentración de sus compuestos inorgánicos, se adicionó 5 g/l de sacarosa, y se eliminaron los reguladores de crecimiento. También se probaron diversos agentes antioxidantes como el carbón activado (1 g/l), el pirogalol (62 mg/l) y una solución de ácido ascórbico y ácido cítrico (250 y 300 mg/l, respectivamente, esterilizados mediante filtración). El pH de los medios utilizados se estabilizó entre 5.7 y 5.8 con HCl y NaOH 0.1 y 0.5 N, antes de ser esterilizado.

2.8.4 CULTIVO DE MEGAGAMETOFITOS Y EMBRIONES

Se realizaron seis ensayos a diferentes tiempos, por lo que a cada uno se le denominó como procedencia, en los dos primeros se utilizó el medio MS, en los dos siguientes se usó el B5 modificado y en los dos últimos el SH (Cuadro 5).

La metodología consistió de tres fases básicas:

- 1) **Establecimiento del cultivo e inducción de callo y/o brotes:** Los embriones y los megagametofitos se cultivaron por separado (5 a 10 por contenedor); los primeros en cajas de Petri y los segundos en frascos de boca ancha (frascos Gerber®); en ambos casos se adicionaron 30 ml de medio con uno de los diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento (tabla 6), las replicas estuvieron en función de los embriones que se obtuvieron en cada procedencia. Las cajas se sellaron con película plástica y se

incubaron durante 30 días en oscuridad a una temperatura de 22 °C.

- 2) **Desarrollo de callo, formación de brotes y elongación de tallo y hojas:** Los callos formados durante el periodo de inducción y los embriones, se subcultivaron en el medio MS, B5 modificado o SH, todos reducidos al 50%; se incubaron bajo luz blanca fría a 1 500 lux, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 22°C. En caso de oxidación, los callos y los embriones se enjuagaron en una solución de ácido ascórbico y ácido cítrico (250 y 300 mg/l, respectivamente) durante 45 minutos antes de cultivarlos en los medios reducidos al 50%. Se realizaron subcultivos cada quince días.

Los brotes que alcanzaron de 5 a 7 mm de altura se individualizaron y subcultivaron sobre el medio MS, B5 modificado o SH reducidos al 50% de su concentración de sus componentes inorgánicos y 5 g/l desacarosa, en frascos de boca ancha (frascos Gerber®), los subcultivos se realizaron mensualmente.

- 3) **Enraizamiento de los brotes obtenidos:** A los brotes que alcanzaron de 10 a 20 mm de altura se les realizó una incisión en la base del tallo y se sometieron a uno de los tratamientos que a continuación se describen por un periodo de inducción de un mes.

- 1 mg/l de ANA
- 0.1 mg/l de ANA +1 mg/l BA
- 3 mg/l AIB
- 5 mg/l AIB

Se usaron los medios mencionados en la fase anterior con la misma concentración de componentes inorgánicos y sacarosa, a éstos se les adicionó una solución de ácido ascórbico (250 mg/l) y ácido cítrico (300 mg/l) para tratar de reducir la oxidación de los tejidos. Para todas las fases las condiciones de incubación fueron las mismas.

En cada una de las tres fases se realizaron observaciones periódicas cada 10 a 15 días bajo el microscopio estereoscópico, para registrar los cambios morfogénéticos que presentaron los

megagametofitos y los embriones. Se realizaron mediciones del crecimiento de los explantes con un vernier; los cambios de coloración se registraron con base en la tabla de colores Methuen (Kornerup y Wanscher 1984), el color se indicó por un número (página)/una sigla (columna)/un número(fila). Asimismo, se llevó el registro fotográfico de los cambios morfogénéticos.

A pesar del seguimiento de dichos cambios, no se llevó a cabo realizó un análisis estadístico debido a la baja respuesta que se obtuvo y la gran variabilidad de los datos.

Cabe señalar que también se realizaron otras metodologías como el cultivo de embriones en el medios MS adicionado con 5 mg/l BA para evaluar distintos tiempos de exposición; cultivo de embriones y megagametofitos en el medio MS adicionado con agua de coco; enraizamiento *in vitro* de yemas jóvenes en el medio MS adicionado con combinaciones de diferentes de IBA y ANA o con enraizador comercial; sin embargo, en ninguno de ellos se observó algún tipo de respuesta morfogénética.

2.9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.9.1 PROCEDENCIA DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Como se ha mencionado en la literatura (Thorpe y Patel, 1984; Bonga y von Aderkas, 1992), la capacidad morfogénica (capacidad de formar un tejido o un órgano) de los explantes utilizados en las técnicas de micropropagación está estrechamente relacionada con factores intrínsecos tales como la edad, el estado fisiológico de la planta madre y el genotipo, así como con factores ambientales. En cuanto a las procedencias, al realizar el cultivo, se analizaron por separado los embriones de cada uno de los seis ensayos, los cuales se denominaron procedencias, con la finalidad de observar si existían diferencias en cuanto al número de semillas que presentaron embrión y en su capacidad de responder morfogénicamente a los tratamientos a los que fueron sometidos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Comparación de las semillas recolectadas, embriones cultivadas *in vitro* y la respuesta morfogénica

Procedencia	Procedencia de las semillas y año de recolección	No. de semillas recolectadas	Semillas con embrión cultivadas <i>in vitro</i> No. (%)	Embriones con Respuesta No. (%)
P1	Barranca El Conejo, Terrenate (1994)	1139	144 (12.6)	0
P2	Barranca del Río Zahuapan, Tlaxco (1994)	1340	103 (7.6)	17 (16.5)
P3	Barranca del Río Zahuapan, Tlaxco (1994)	2091	288 (13.7)	0
P4	Rancho El Pozo, Emiliano Zapata (1995)	1493	96 (6.4)	38 (39.5)
P5	Barranca El Conejo, Terrenate (1993) (árbol seleccionado "J")	936	290 (30.9)	73 (25.8)
P6	Barranca El Conejo; Terrenate (1993) (árbol seleccionado "K")	1085	144 (13.2)	60 (41.6)
	TOTAL	8084	1065	188

En general, los porcentajes de semillas con embrión fueron bajos. Pérez-Sánchez (1996) cita un porcentaje de 11.6 para la zona de Tlaxco, lo cual coincide con los valores de este experimento, que variaron de 7.6 a 13.7. Para la zona de Terrenate, dicho autor reportó valores de 45.8%, pero los porcentajes obtenidos en este trabajo van de 12.6 hasta 30.9% (Cuadro 7).

Al parecer, los bajos porcentajes de semillas con embrión constituyen un problema común para el género e inclusive este fenómeno se presenta en los huertos semilleros. En Tlaxcala, las poblaciones de *P. macrolepis* son muy pequeñas y se distribuyen en rodales con un número bajo de individuos que crecen como árboles aislados, lo cual repercute en los bajos porcentajes de viabilidad y de semillas con embrión debido posiblemente a la interfertilización con la descendencia y la autopolinización. Además, el grado de perturbación ecológica que sufren estos bosques debido a factores antropocéntricos, como la tala, el sobrepastoreo, la apertura de nuevas zonas agrícolas y los incendios provocados, influyen negativamente en la regeneración natural de esta conífera.

Como se observa en el cuadro 7, en las cuatro primeras procedencias las semillas provienen de una mezcla de árboles y fueron recolectadas durante 1994 y 1995; en ellos se obtuvieron bajos porcentajes de semillas con embrión; lo cual además de los factores ya señalados, también pudo haber influencia de los ciclos de producción de semilla. Para el género *Pseudotsuga* se ha señalado que la producción de semilla ocurre en intervalos irregulares, una producción abundante y una mediana cada cinco años en promedio, variando entre dos y siete años (Allen y Owens, 1972 citado por Pérez Sánchez, 1996). Probablemente, los años de recolección de la semilla usada coincidieron con años de baja producción lo cual repercutió en los bajos porcentajes reportados.

Las semillas de las procedencias 5 y 6 (Cuadro 7) provenían de árboles seleccionados de la zona de Terrenate, árbol J para la 5 y K para la 6, en ambos casos se sometieron a los tratamientos de inducción de respuesta morfogenética después de un año y medio de almacenamiento. En la procedencia 5 se observaron los mayores porcentajes de semillas con embrión (28.8%) lo cual coincide con lo encontrado por García Campusano (1999), quien en su evaluación de procedencias de las semillas también contempló al árbol J, siendo también el que tuvo mayor número de semillas con embrión (Cuadro 7).

2.9.2 INFLUENCIA DEL PROCESO DE DESINFECCIÓN Y LOS MEDIOS DE CULTIVO EN LAS RESPUESTAS MORFOGENÉTICAS

Para inducir las respuestas morfogénicas a partir del cultivo *in vitro* de los embriones cigóticos, así como la optimización en la formación de brotes adventicios, se realizaron modificaciones en los procedimientos de desinfección y de cultivo de las seis procedencias, esto con el fin de favorecer la formación de un mayor número de brotes en periodos cortos.

I) Escarificación y desinfección de la semilla. En las cuatro primeras procedencias (Cuadro 7) se utilizó la metodología de desinfección propuesta por Kyte (1987), en la cual no hay un proceso previo de escarificación con peróxido de hidrógeno ni desinfección de la testa con solución fungicida ni bactericida. Las soluciones de blanqueador doméstico al 33 y al 6% (v/v) resultaron muy agresivas causando la muerte del tejido de todos los explantes para las P1 y P3. En las P2 y P4, los megagametofitos no presentaron respuesta, en tanto que los embriones que resistieron el proceso de desinfección experimentaron algunos cambios morfogénicos como la formación de callo; no obstante, después del primer subcultivo, el tejido tendió a oxidarse y a morir y sólo en un embrión de la P4 se formaron dos brotes que se oxidaron durante su desarrollo.

En la P5 y P6, el proceso de desinfección se cambió por el citado por Montes Rivera (1993) al cual se le realizaron algunas modificaciones que resultaron ser favorables, pues los embriones dieron lugar a un callo que originó a numerosos brotes. En el caso de los megagametofitos no se presentó ningún tipo de respuesta.

II) Composición del medio nutritivo

En el medio MS, la respuesta morfogénica de la P1 fue nula y en la segunda fue muy baja (16.5%, Cuadro 7), pero posiblemente en gran medida se debió al efecto de los agentes desinfectantes que causaron la necrosis del tejido. En la P2, los pocos embriones que soportaron este proceso de desinfección presentaron respuesta morfogénica, sin embargo, en las primeras semanas se oxidaron.

El medio B5 modificado por Litz se usó en las procedencias tres y cuatro. En la P3 no se observó respuesta morfogénica debido al proceso de desinfección. En la P4, a partir de la cual se

cambió dicho proceso, la respuesta morfogénica de los embriones se elevó notablemente (39.5%, Cuadro 7) pues predominó la formación de callo en los distintos tratamientos. Con excepción de un embrión que formó brotes, todos los callos de la P4 tendieron a oxidarse durante los primeros subcultivos, lo que pudo obedecer al alto contenido de sacarosa en el medio (60 g/l), puesto que se ha encontrado que el tejido de algunas coníferas, como *Pseudotsuga menziesii*, se oxidan a altas concentraciones de esta fuente de carbono (Evers, 1981 citado por Bonga y von Aderkas, 1992).

En las dos últimas procedencias se usó el medio SH, aunado al cambio en el proceso de desinfección de los explantes, favoreció notablemente el incremento del número de embriones que presentaron algún tipo de respuesta morfogénica. Ésta se incrementó al 25.8 y 41.6%, respectivamente (Cuadro 7). El medio SH en comparación con el medio B5 modificado por Litz, es pobre en sus compuestos orgánicos, aminoácidos y fuente de carbono (Anexo 1).

Cabe mencionar que después del periodo de inducción de un mes con reguladores de crecimiento y a partir del primer subcultivo a medio MS, B5 modificado por Litz o SH, la sacarosa se redujo a 5 g/l. Algunos autores señalan que la disminución de la concentración de sacarosa, particularmente en la fase de elongación, se debe a que durante este periodo se intenta preparar al vástago para ser sometido al proceso de enraizamiento y aclimatización, estimulando de esta manera su capacidad fotosintética; se ha encontrado que altas concentraciones de este carbohidrato inhiben la síntesis de clorofila en condiciones *in vitro* (Thompson y Thorpe, 1987; George, 1993). Varios autores han disminuido la concentración de sacarosa durante la fase de elongación para algunas especies de coníferas. Harry *et al.* (1995) encontraron que la disminución de 30 a 20 g/l de sacarosa permitía una mejor elongación de brotes de *Juniperus cedrus*; Kolevska-Pletikapic´ y Buturovic´-Deric´(1995) observaron que disminuir la sacarosa de 30 a 15 g/l fue apropiado para el desarrollo de brotes de *Picea omorika*. Contrario a estos trabajos, Harry y Thorpe (1994) señalaron que mantener una concentración de 30 g/l de sacarosa favorecía la producción de un mayor número de brotes de *Pinus banksiana* de mejor calidad. Lo anterior sugiere que cada especie arbórea tiene requerimientos específicos de carbohidratos para el desarrollo y elongación de brotes, por lo que no se puede generalizar una técnica para la propagación de determinada especie; no obstante,

la tendencia es disminuir la concentración de sacarosa. Aunque en la literatura no se ha encontrado una concentración similar a la utilizada en este trabajo para la elongación de brotes, ésta dio buenos resultados durante dicho proceso y coincide con la utilizada por Cheng y Voqui (1977) durante el enraizamiento de brotes de *Pseudotsuga menziesii*.

La oxidación fue un factor limitante en el desarrollo morfo genético que se presentó frecuentemente en todos los ensayos, para evitarla se probó la adición de compuestos como carbón activado (1 g/l), pirogalol (62 mg/l) o soluciones de ácido cítrico (300 mg/l) y ácido ascórbico (250 mg/l); éstos últimos fueron los más efectivos pues redujeron notablemente la oxidación del tejido.

2.9.3 RESPUESTA MORFOGENÉTICA

2.9.3.1 PROCESO DE FORMACIÓN DE BROTES ADVENTICIOS

La descripción del desarrollo morfo genético se basó en la representación de una semilla de gimnosperma hecha por Raven *et al.* (2000), quienes señalan que el embrión se divide en tres partes: cotiledones, hipocótilo y radícula (Figura 8). Esta se realizó contemplando los cambios que los embriones cigóticos presentaron al ser sometidos a los tratamientos de inducción con los reguladores de crecimiento, medios nutritivos y condiciones de incubación.

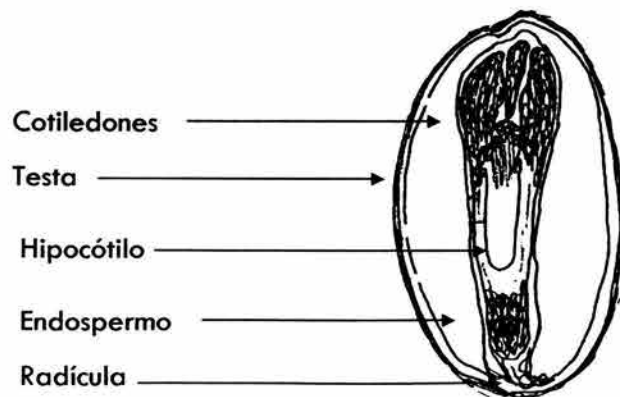


Figura 8. Corte longitudinal de una semilla madura de gimnosperma (Fuente: Raven *et al.*, 2000).

Día 0: inició el cultivo de los embriones, éstos midieron de 2.5 a 3 mm de longitud y de 0.3 a 0.6 mm de la porción más ancha de los cotiledones, presentando de 6 a 8 cotiledones y una coloración amarillo pálido (3A4/5 Kornerup y Wanscher, 1984; Figura 9a).

Días 4-9: los primeros cambios se hicieron evidentes durante este periodo: aumento de la longitud, el embrión que alcanzó una talla de 3 hasta 4.5 mm, así como un cambio en la coloración a amarillo verdoso brillante (3A-B7, Kornerup y Wanscher, *op cit.*; Figura 9b,c).

Días 13-30: en los embriones se observó un engrosamiento de la porción media y basal del hipocótilo (0.35 a 2.3 mm) así como la elongación y ensanchamiento de los cotiledones (5 a 6.42 mm), debido a la proliferación celular, su forma se hizo ligeramente globosa y el tejido presentó una textura granulosa, brillante e hidratada. La coloración se tornó verde brillante (1B7/8 Kornerup y Wanscher, *op cit.*) (Figura 9c). Otro grupo de embriones sólo presentó engrosamiento del hipocótilo.

Días 30-45: en aquellos embriones que presentaron crecimiento tanto en el hipocótilo como en los cotiledones, ambas estructuras se conjugaron paulatinamente dando lugar a una masa amorfa de tejido celular indiferenciado, compacto, denominado **callo**, el cual presentaba una textura sumamente granulosa, hidratada, de color verde brillante (27D-F8, 28B8, Kornerup y Wanscher, 1984); en algunas partes de su superficie el tejido era más laxo, de color verde pálido translúcido a hialino (30A5/6, Kornerup y Wanscher, *op cit.*). Los callos tuvieron un diámetro aproximado de 7 a 15 mm (Figura 9d). Los brotes que sólo crecieron del hipocótilo tendieron a oxidarse, pues el tejido cambió a una coloración café claro y paulatinamente a color café oscuro o casi negrozco, esto ocurrió en casi todos los embriones de la procedencia 2, pero fue ocasionado por el proceso de desinfección utilizado (Figura 10d).

Días 50-90: a partir del tejido celular indiferenciado (callo), se observó la formación de numerosas protuberancias nodulares o **meristemoides** (5-9 por embrión) (Figura 9e), cada una compuesta por un nódulo central rodeado de varias hojas en forma de pequeñas prolongaciones que al cabo de una semana se diferenciaron en **primordios de brotes adventicios** que se distribuyeron indistintamente sobre el callo. Estos primordios continuaron su crecimiento y las hojas

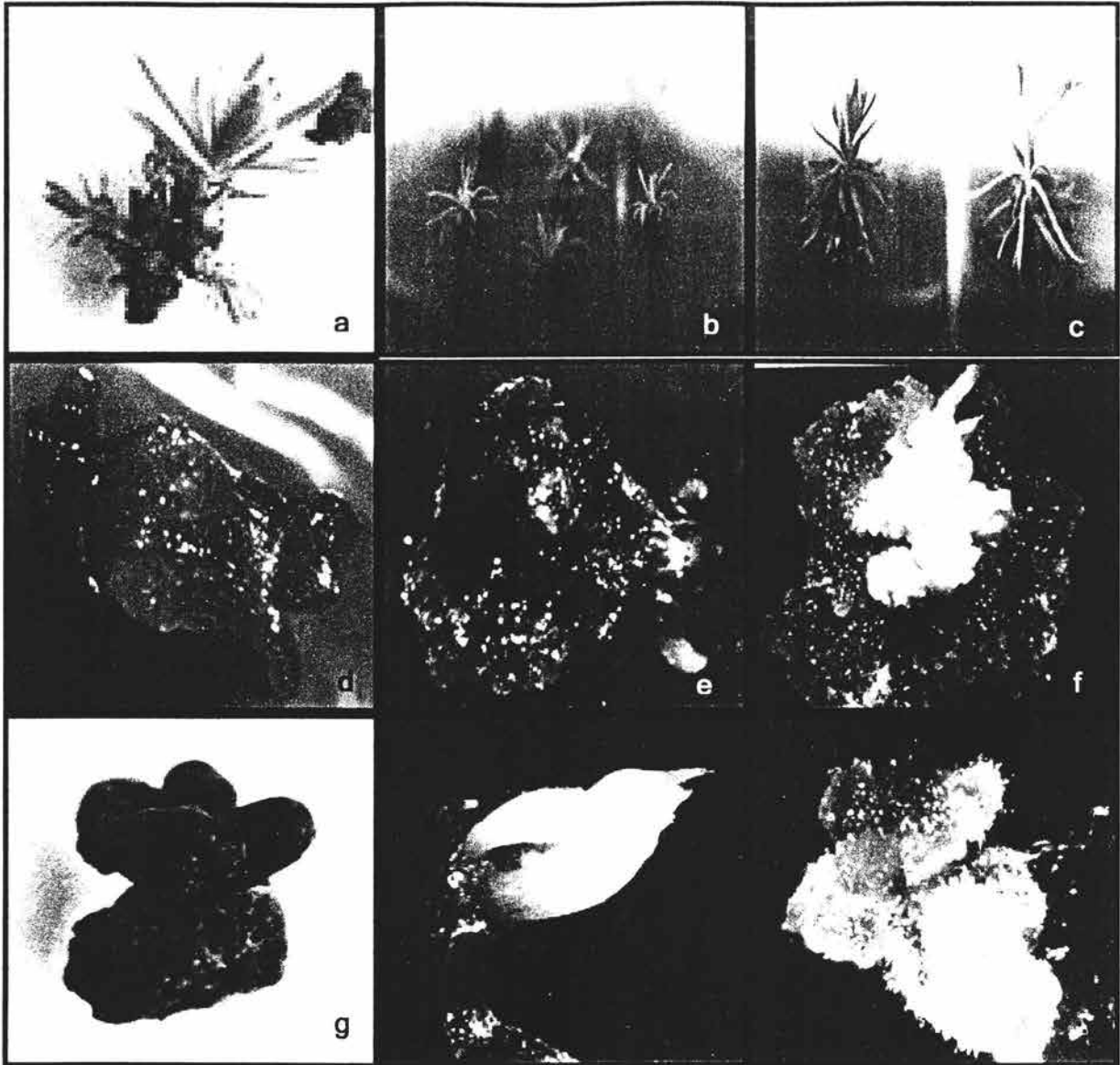


Figura 10. Desarrollo morfogénico de *Pseudotsuga macrolepis*: a. Inicó de la elongación de hojas y tallo alcanzando una altura de 10 mm, con un eje bien diferenciado (tallo) y de 13 a 20 hojas. b. Individualización de vástagos para lograr su robustecimiento. c. Brotes en diferentes tratamientos de enraizamiento. Los embriones también presentaron otras formas de respuesta. d. Engrosamiento del embrión y su posterior oxidación que inició por el hipocotilo. e. Formación de callo que no originó brotes adventicios y que al cabo de un tiempo se oxidó. f. Oxidación paulatina de callos que formaron brotes adventicios densamente agrupados y que no lograron desarrollarse. g. Necrosis total del tejido. h. Hojas solitarias que no formaron brotes adventicios o vástagos y que después de un tiempo se oxidaron. i. Callo de textura algodonosa debido a la hiperhidratación.

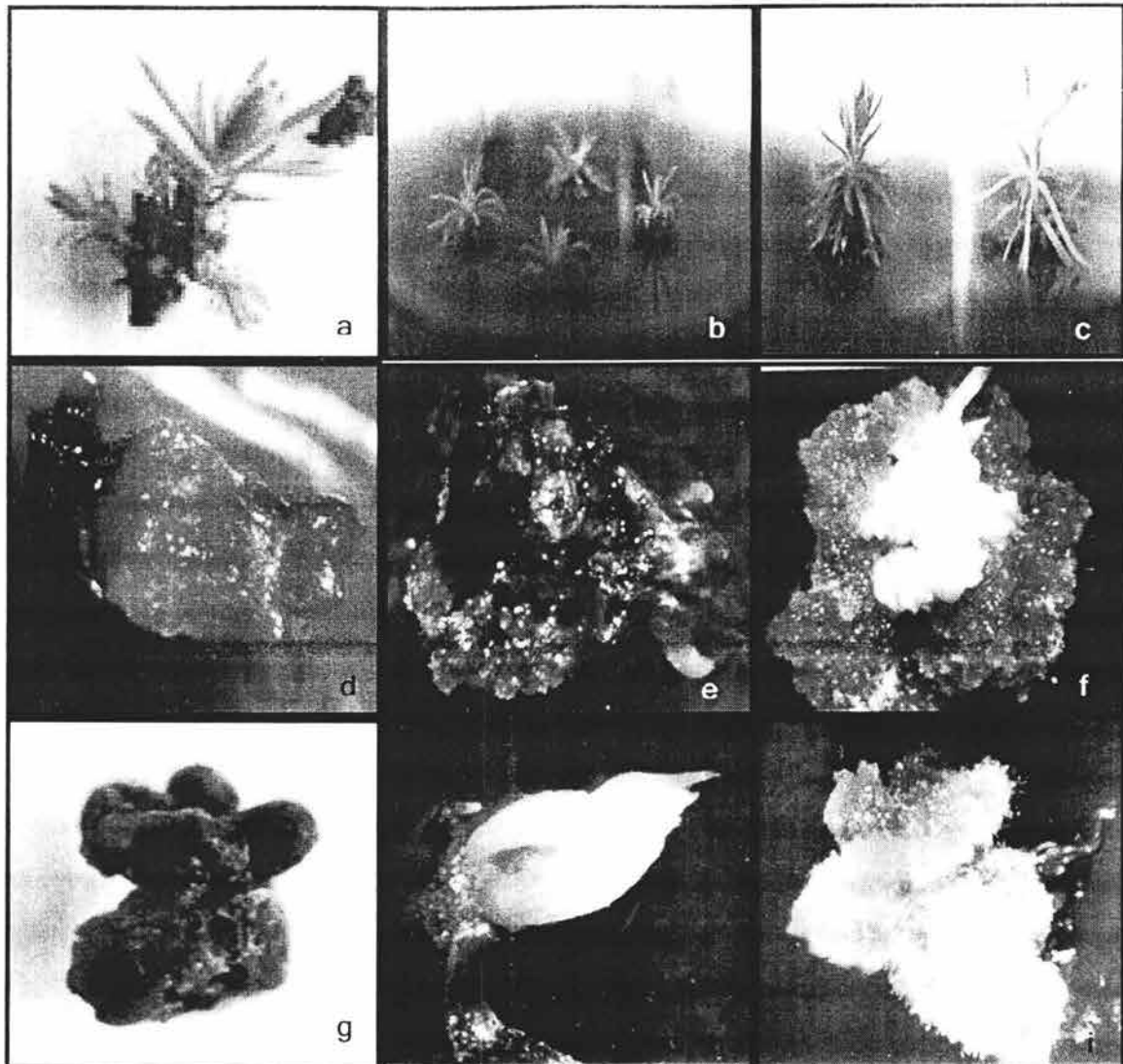


Figura 10. Desarrollo morfogénico de *Pseudotsuga macrolepis*: a. Inicó de la elongación de hojas y tallo alcanzando una altura de 10 mm, con un eje bien diferenciado (tallo) y de 13 a 20 hojas. b. Individualización de vástagos para lograr su robustecimiento. c. Brotes en diferentes tratamientos de enraizamiento. Los embriones también presentaron otras formas de respuesta. d. Engrosamiento del embrión y su posterior oxidación que inició por el hipocotilo. e. Formación de callo que no originó brotes adventicios y que al cabo de un tiempo se oxidó. f. Oxidación paulatina de callos que formaron brotes adventicios densamente agrupados y que no lograron desarrollarse. g. Necrosis total del tejido. h. Hojas solitarias que no formaron brotes adventicios o vástagos y que después de un tiempo se oxidaron. i. Callo de textura algodonosa debido a la hiperhidratación.

se arreglaron en forma de roseta (Figura 9f,g), pero también hubo otras sin un arreglo definido, solitarias y dispersas. Cabe mencionar que estas estructuras se manifestaron únicamente sobre el superficie del callo (Figura 10h).

A los 75 días, las hojas que crecieron en forma de roseta continuaron desarrollándose, las exteriores alcanzaron una longitud de 2 a 3.5 mm y las interiores de 1 a 2 mm, dando lugar a **brotos adventicios en etapa temprana** (Figura 9h, i). Éstas fueron de color verde claro (29C7/8, Kornerup y Wanscher, 1984) con los ápices tono verde limón (29A6/7, Kornerup y Wanscher, 1984), de consistencia compacta y continuaron su crecimiento hasta los 90 días (Figura 9j,k). Las hojas solitarias y dispersas se tornaron amarillentas y murieron (Figura 10 h).

Días 95-120: se inicio la elongación de las hojas y el tallo, hasta una talla de 5 a 10 mm y presentaron un eje bien diferenciado (tallo), por lo que en esta fase los **brotos adventicios** o **vástagos** ya estaban bien diferenciados (Figura 9l). Éstos presentaron de 13 hasta 20 hojas, las se cercanas a la base con una mayor longitud y una coloración verdosa (27C-D8, Kornerup y Wanscher, 1984) (Figura 10a).

En este periodo, los brotes adventicios con talla superior a los 10 mm de longitud y que presentaron un tallo bien definido fueron individualizados (Figura 10b, c), puesto que se observó que si eran más pequeños se inhibía su crecimiento y frecuentemente se oxidaban; esto coincide con lo reportado por Kolevska-Pleitikapic´y Buturovic´-Deric´(1995) para *Picea omorika*. Después de que los brotes fueron disectados ya no se advirtió la formación de otros en el mismo explante, lo que se puede deber a que los centros morfogenéticos que dan origen a los brotes se desarrollan a partir de una porción reducida (población morfogenética) del total de las células del explante (George,1993). Lo anterior puede atribuirse a varias razones: 1) a que sólo un número reducido de células es competente; 2) a que los meristemas que primero se desarrollan absorben metabolitos y nutrimentos de las células circunvecinas, limitando su capacidad de formar otros, o 3) a que el desarrollo de nuevos meristemas se inhibe por algunos metabolitos que liberan aquellos que inicialmente se formaron. Con respecto a lo anterior, sería conveniente someter nuevamente a los explantes (callos, de los cuales ya fueron disectados los brotes iniciales), a tratamientos con reguladores de crecimiento para inducir nuevos centros

meristemáticos. Sin embargo, se ha demostrado que la capacidad de las células para regenerar otros meristemas se reduce considerablemente a lo largo del cultivo (Ellis y Bilderback, 1989).

Al igual que Ellis y Judd (1987) y Ellis y Bilderback (1989), quienes detectaron una tendencia de la capacidad morfogenética de los cotiledones de acuerdo con su posición respecto al medio para *Pinus ponderosa*, en este trabajo se observó que los cotiledones que se encontraron directamente expuestos al medio nutritivo presentaron un mayor crecimiento, siendo más robustos en comparación con los que no lo estaban; esto probablemente se deba a que los cotiledones de las coníferas tienden a competir en respuesta a la inducción organogénica para la formación de brotes debido a la exposición a los reguladores de crecimiento. También es probable que se hayan establecido distintos gradientes en la absorción de los componentes del medio de cultivo; por lo tanto, los que estaban en contacto con el medio tenía mayor cantidad de nutrimentos disponibles, lo que influyó en una mejor respuesta. Al someter a los embriones a los tratamientos con reguladores de crecimiento, se formaron de primordios foliares tanto en la superficie en contacto con el medio nutritivo como en la parte más alejada de él, lo cual coincide con lo encontrado por García-Campusano (1999) en ensayos realizados para la misma especie.

Por otra parte, en los callos donde se dio una proliferación masiva de brotes, aquellos que no alcanzaban a desarrollarse tendían a tomar una coloración amarillenta, oxidarse y necrosarse (Figura 10e, f, g). Este hecho puede indicar que existe un cierto grado de competencia por nutrimentos entre los brotes de un mismo explante, y que una fragmentación del callo en dos ó tres partes y una individualización oportuna de los brotes más avanzados puede favorecer que un mayor número de éstos se desarrollen exitosamente.

Los brotes adventicios se formaron sobre la superficie del callo; este hecho coincide con las observaciones histológicas de diversos autores, quienes señalan que la mayor parte de la diferenciación celular necesaria para originar meristemas y consecuentemente brotes ocurren en las porciones externas del explante (Cheng, 1977; Aitken-Christie *et al.*, 1982; Thorpe y Kumar, 1993).

Asimismo, Cheah y Cheng (1978) y von Arnold y Eriksson (1979) que estudiaron la ontogenia de los brotes adventicios por medio de cortes histológicos de cotiledones de *Picea abies* y

Pseudotsuga menziesii, respectivamente, también describen distintas fases de desarrollo que van desde la generación de meristemoides, primordios de brote, brotes adventicios en etapa temprana y brotes adventicios, lo que también se observó en este trabajo (Fig. 9).

En general, se encontró que generación de brotes adventicios se dio mediante organogénesis indirecta, es decir, con el desarrollo de callo a partir del cual se surgieron los brotes adventicios, que estuvo integrada de cuatro etapas básicas:

- 1) **Formación de callo:** se presentó entre los 30 y 40 días (4-5 semanas), lo cual coincide con lo reportado por Montes-Rivera (1993) para *Pseudotsuga menziesii*; no obstante, Patel y Berlyn (1983) señalan que el callo se inicia a partir del día 14 de inducción y su desarrollo a los 21 días.
- 2) **Formación de meristemoides:** para *Pseudotsuga macrolepis*, los meristemoides se evidenciaron entre los 60 y 75 días; estos tiempos concuerdan con los señalados para *P. menziesii* por Montes-Rivera (1993) quien determinó 63 días para el desarrollo de meristemoides. Sin embargo, este lapso de tiempo fue más largo que el señalado por Patel y Berlyn (1983) para *Pinus coulteri*; Campbell y Durzan (1975) y Yeung et al. (1981) para *Picea glauca*; von Arnold y Eriksson (1985) para *P. abies* y López-Escamilla (2000) para *P. chihuahuana*, quienes señalan que en un periodo de 21 a 24 días se inicia la formación de meristemoides en las especies forestales que respectivamente estudiaron.
- 3) **Formación y desarrollo de primordios de brote:** éstos se observaron entre los 75 y 90 días, este tiempo fue semejante al encontrado por Montes-Rivera (1993) para *P. menziesii*, quien señaló un periodo de 12 semanas (84 días); no sucede lo mismo con las especies señaladas en el párrafo anterior, en las cuales el periodo de formación y desarrollo de brotes fue de 30 días.
- 4) **Obtención de brotes adventicios o vástagos:** para *P. macrolepis*, este proceso se obtuvo después de 90 días (13 semanas) y en algunos casos hasta 120 días (17 semanas); el mismo patrón también fue reportado para *P. menziesii* (Montes-Rivera, 1993). No ocurrió así para

Picea glauca (Campbell y Durzan, 1975; Yeung *et al.*, 1981), *Pinus coulteri* (Berlyn y Beck (1980; Patel y Berlyn, 1983), *Picea abies* (von Arnold y Eriksson, 1985) y *Picea chihuahuana* (López-Escamilla, 2000), en donde esta fase se presentó después de la cuarta semana de cultivo.

Cabe mencionar que el crecimiento de los brotes de *Pseudotsuga macrolepis* fue asincrónico, es decir, a diferentes tiempos. Este fenómeno también fue reportado por Schwarz *et al.* (1991), quienes mencionan que la elongación de los brotes de *Pinus oocarpa* se dio entre la sexta y la séptima semana y por López-Escamilla (2000) para *Picea chihuahuana*.

Por otra parte, en cada embrión se formaron de 5 a 9 primordios de brote; no obstante, no todos se desarrollaron debido probablemente a que se presentó un fenómeno de competencia entre ellos por el espacio y la asimilación de los nutrimentos y sólo aquellos que fueron más aptos lograron desarrollarse en brotes adventicios. Debido a lo anterior, el número de brotes que lograron individualizarse fue de 1 a 3 por embrión, lo cual coincide con lo reportado por Thorpe y Biondi (1984) para *Pinus radiata*. Dichos autores señalan que inicialmente se formaron de 10 a 30 primordios de brote por embrión pero sólo 2 ó 3 de ellos lograban elongarse.

La diferencia entre tiempos para la formación de callo, meristemoides, primordios foliares y brotes adventicios para *Pseudotsuga macrolepis* y para *P. menziesii* (Montes-Rivera, 1993), en comparación con el resto de las coníferas ya estudiadas, puede deberse a las características intraespecíficas, a las concentraciones endógenas de reguladores de crecimiento y su balance interior, las cuales determinan el tiempo y el tipo de respuesta al ser sometida al cultivo *in vitro*. Considerando que el presente trabajo y el de Montes Rivera (1993) se realizaron con especies mexicanas cuyas poblaciones se encuentran restringidas y con escasa regeneración natural, es probable que ambas especies enfoquen su energía al mantenimiento de los individuos ya existentes y no a la producción de semillas para su propagación, por lo que es escasa y de muy baja calidad. Asimismo, la edad de los árboles es determinante en la cantidad y calidad de la semilla, pues tiende a disminuir conforme el árbol se hace más viejo; para el caso de los bosques de *Pseudotsuga macrolepis*, éstos se encuentran constituidos en su mayoría por árboles maduros.

Otro factor importante a considerar son los ciclos de producción de semillas, para el caso de *P. macrolepis* cada 5-7 años se presenta un año semillero, por lo que es probable que en los años en que se recolectó no hayan sido los semilleros.

Para *P. macrolepis*, el periodo para formación de brotes adventicios fue más largo con respecto a *Picea glauca* (Campbell y Durzan, 1975; Yeung et al. 1981), *Pinus coultery* (Berlín y Beck, 1980; Patel y Berlyn, 1983), *Picea abies* (von Arnold y Eriksson, 1985), debido a que en esta especie los brotes adventicios se obtuvieron mediante organogénesis indirecta, es decir, hubo una fase inicial de formación de callo a partir del cual se formaron los primordios de brote, en tanto en los otros estudios citados este proceso se dio mediante organogénesis directa.

La hipehidratación se presentó frecuentemente en los callos poco compactos, dándole una apariencia mucilaginosa; este fenómeno se redujo considerablemente al adicionar un compuesto antivitrificante® (1 g/l Sigma).

Los embriones sin reguladores de crecimiento, mostraron un patrón de desarrollo muy similar a los que fueron sometidos a los tratamientos con reguladores de crecimiento durante los cinco primeros días; no obstante, a partir del séptimo día comenzaron a elongarse rápidamente, siguiendo un patrón semejante al de la germinación. Sin embargo, este no se completó debido a que el meristemo apical y la radícula se oxidaron. Esto sugiere que las concentraciones endógenas de hormonas no fueron suficientes para mantener una actividad celular y permitir el desarrollo normal hasta la formación de la plántula. Aunado a esto, con la eliminación del megagametofito también se perdieron diferentes compuestos (almidones, lípidos, aminoácidos y vitaminas) que el embrión requiere para su desarrollo, pero también puede ser un reflejo de los bajos índices de germinación, lo cual es un hecho que se presenta frecuentemente en *Pseudotsuga macrolepis*.

2.9.3.2 EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON REGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA RESPUESTA MORFOGENÉTICA DE LOS EMBRIONES.

Los reguladores de crecimiento constituyen uno de los factores principales que intervienen en la división y diferenciación celular, así como en la organogénesis; esto se hizo evidente con la aplicación exógena de tales compuestos para inducir la formación de callo y brotes. No obstante, la morfogénesis también está influenciada por las características genotípicas del explante y por sus condiciones fisiológicas (Németh, 1986; Ahuja, 1993; Bergmann y Stomp, 1994; Sul y Korban, 1994). Ambos factores pueden jugar un papel importante en el tipo de respuesta de los embriones, puesto que determinan la sensibilidad del tejido (células) para responder a la aplicación de los reguladores de crecimiento (Trewavas, 1981 citado por Firn, 1986; Thorpe y Kumar, 1993), sensibilidad que refleja la capacidad de una sustancia a interactuar con un receptor a nivel celular para producir una respuesta. Entonces, la respuesta morfo genética estará en función de: 1) el tipo y concentración del regulador de crecimiento, 2) el receptor y su número, 3) la afinidad del receptor al tipo de regulador, 4) la capacidad del sistema completo a reaccionar a un gran número de reguladores y 5) la capacidad del sistema de absorción del tejido (Firn, 1986). También es importante considerar las interacciones que se presentan entre los compuestos aplicados exógenamente con los presentes en el tejido mismo (Minocha, 1987).

Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento en los cambios morfo genéticos que se obtuvieron en los embriones, éstos se dividieron en cuatro fases de acuerdo con el grado de desarrollo: 1) embriones que presentaron algún tipo de respuesta morfo genética (AR) como cambio de coloración y/o proliferación celular, 2) embriones que formaron callo (EC), 3) callos que dieron lugar a primordios de brotes (EB) vía organogénesis indirecta y 4) brotes individualizados (BI), se consideraron a aquellos que fueron disectados, que se elongaron, que presentaron una coloración verdosa oscura y en general un buen aspecto (vigorosos); susceptibles de ser enraizados.

Cuadro 8. Comparación de las semillas recolectadas, cultivadas *in vitro* y la respuesta morfogénica de los embriones en las diferentes fases de desarrollo.

Procedencia	Procedencia de las semillas y año de recolección	Embriones con Respuesta (AR)	Embriones que formaron callo (EC)	Embriones con Brotes (EB)	Brotes Individualizados (BI)
P1	Barranca El Conejo, Terrenate (1994)	0	0	0	0
P2	Barranca del Río Zahuapan, Tlaxco (1994)	17 (16.5%)	4(23.5%)	0	0
P3	Barranca del Río Zahuapan, Tlaxco (1994)	0	0	0	0
P4	Rancho El Pozo, Emiliano Zapata (1995)	38 (39.5%)	1 (2.6%)	1 (2.6%)	1
P5	Barranca El Conejo, Terrenate (1993) (árbol seleccionado "J")	73 (25.8%)	44 (60.2%)	25 (34.2%)	14
P6	Barranca El Conejo; Terrenate (1993) (árbol seleccionado "K")	60 (41.6%)	31 (51.6%)	7 (11.6%)	0
	TOTAL	188 (24.6 %)	80(34.5%)	33 (8.1%)	15

Los datos de las cuatro procedencias en donde se obtuvo respuesta morfogénica (denominados como P2, P4, P5 y P6) no pudieron ser evaluados estadísticamente debido a la escasa respuesta y, consecuentemente, a la gran variabilidad que presentaron, por lo que sólo se da una descripción de los resultados.

1) Algún tipo de respuesta morfogénica (AR)

De la procedencia 2 solamente 17 embriones (16.5%) sufrieron algún tipo de respuesta (AR), básicamente en la coloración y proliferación celular; en las procedencias 4, 5 y 6, el porcentaje de respuesta morfogénica aumentó de forma considerable siendo de 38 (39.5%), 73 (25.8%) y 60 (41.6%) embriones respectivamente (Cuadro 8).

Con estos resultados se observó que conforme se fueron realizando las modificaciones el porcentaje de respuesta también se incrementó, lo que se puede atribuir a las modificaciones que se fueron realizando en el proceso de desinfección y a las condiciones de cultivo que favorecieron que un mayor número de embriones respondiera.

Debido a la gran variabilidad de respuestas, tanto entre procedencias como entre tratamientos, no hubo un patrón definido de respuesta con respecto a las concentraciones de reguladores de crecimiento, sobre todo en la fase de inducción. En la P2 se observó algún tipo de respuesta (AR) en ocho tratamientos, en tanto que en la P4, se presentó en 17 (Cuadro 9); no obstante, en las primeras cuatro semanas ocurrió la oxidación parcial o total del tejido. En la P5 y P6, la respuesta morfogénica ocurrió en tres direcciones 1) embriones que no presentaron ningún tipo de respuesta (2/0.5, 0/1, 1/0, 0/0.1, 0.5/0.1, 0.5/0.5, 0/1, 0.5/1 mg/l de BA/ANA); 2) embriones que se elongaron y ensancharon debido a la diferenciación celular, pero que al poco tiempo se oxidaron totalmente en forma paulatina (5/0.5, 0.5/1, 2/1, 3/1, 5/1, 2/0.1 mg/l de BA/ANA) y 3) embriones que formaron callo (0.5/0, 1/0, 3/0, 1/0.1, 3/0.1, 1/0.1, 0/0.5, 1/0.5, 3/0.5 mg/l BA/ANA) (Cuadro 9).

En los embriones testigo se observó una germinación normal; no obstante, al cabo de las dos primeras semanas se detuvo el desarrollo por lo que no se generó una plántula.

Otro factor importante que limitó la respuesta de los embriones en esta fase, en las P4 y P5, fue su oxidación, esto se pudo deber a una excesiva hidratación del tejido, que aunado con la presencia de altas concentraciones de auxinas y citocininas pudieron causar la degeneración del tejido (Cheng, 1977; Kevers *et al.*, 1984).

2) Embriones que formaron callo (EC)

En esta fase, sólo 4 embriones de la P2 respondieron (23.5%), en la P4 se formó un callo (2.6%), y en las P5 y P6 se originaron 44 (60.2%) y 28 (47.4%) callos respectivamente (Cuadro 8).

En la P2, se obtuvo la formación de callo en las combinaciones 2/0.1, 0/0.5 y 5/0.5 mg/l de reguladores de crecimiento (BA/ANA), en tanto que en la P4 sólo en la concentración de 1/0 mg/l de BA/ANA se logró el desarrollo de tejido indiferenciado. El hecho de que en ambos ensayos se presentara una escasa respuesta en la formación de callo posiblemente se debió a que el proceso de desinfección utilizado resultó muy agresivo, y causó la muerte de la mayoría de los embriones. De aquellos que resistieron, sólo cinco embriones generaron callo; sin embargo, cuatro callos de la P2 se oxidaron después del tercer subcultivo y sólo uno de la P4 formó un

brote (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cambios morfológicos que presentaron los embriones de diferentes procedencias y tratamientos con reguladores de crecimiento.

BA /ANA mg/l	Procedencia 2				Procedencia 4				Procedencia 5				Procedencia 6				TOTAL			
	AR	EC	EB	BI	AR	EC	EB	BI	AR	EC	EB	BI	AR	EC	EB	BI	AR	EC	EB	BI
0/0	0	0	0	0	3	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	7	1	0	0
0.5/0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	3	1	1	5	1	1	0	11	4	2	1
1/0	0	0	0	0	1	1	1	1	6	5	4	2	5	1	1	0	12	7	6	3
2/0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	5	2	0	0
3/0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	1	0	5	1	1	0	10	3	2	0
5/0	2	0	0	0	0	0	0	0	5	1	0	0	5	4	0	0	12	5	0	0
0/0.1	0	0	0	0	2	0	0	0	6	1	0	0	0	0	0	0	8	1	0	0
0.5/0.1	0	0	0	0	2	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	4	2	0	0
1/0.1	0	0	0	0	2	0	0	0	5	5	3	1	5	1	1	0	12	6	4	1
2/0.1	1	1	0	0	3	0	0	0	1	1	1	0	2	0	0	0	7	2	1	0
3/0.1	1	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	0	4	1	1	0	9	5	5	0
5/0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	3	1	5	3	0	0	6	6	3	1
0/0.5	3	1	0	0	4	0	0	0	2	1	0	0	1	1	1	0	10	3	1	0
0.5/0.5	4	0	0	0	2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	7	1	1	0
1/0.5	2	0	0	0	2	0	0	0	4	3	2	0	4	2	1	0	12	5	3	0
2/0.5	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	4	1	0	0
3/0.5	1	0	0	0	0	0	0	0	5	5	3	5	3	3	0	0	9	8	3	5
5/0.5	3	2	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	4	3	0	0	11	5	0	0
0/1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
0.5/1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
1/1	0	0	0	0	2	0	0	0	4	4	2	4	3	1	0	0	9	5	2	4
2/1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2	2	0	0	5	2	0	0
3/1	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	3	3	0	0	7	3	0	0
5/1	0	0	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	3	3	0	0	6	3	0	0
TOTAL	17	4	0	0	38	1	1	1	73	44	25	14	60	31	17	0	188	80	33	15
%	16.5	23.5	0	0	39.5	2.6	2.6	2.6	25.8	60.2	34.2	56	41.6	51.6	11.6	0	42.8	43.0	17.7	

AR: algún tipo de respuesta, EC: Embriones que formaron callo, EB: Embriones que formaron primordios de brotes, BI: Brotes individualizados.

En la P5, diecisiete tratamientos de se desarrollaron callos; sin embargo, en las combinaciones 0.5/0, 1/0, 1/0.1/1, 3/0.1, 5/0.1, 1/0.5, 3/0.5, 1/1mg/l de BA/ANA se presentaron un mayor número de embriones que formaron callo. Con respecto a la P6, en los tratamientos 5/0, 5/0.1, 3/0.5, 5/0.5, 3/1 y 5/1 mg/l de BA/ANA se obtuvieron numerosos callos, sin embargo, en éstos no se formaron brotes y paulatinamente se oxidaron. Aunque sólo un embrión formó un callo en cada uno de los tratamientos 0.5/0, 1/0, 3/0, 1/0.1, 3/0.1, 0/0.5 y 1/0.5 mg/l de BA/ANA, en éstos si se obtuvieron brotes adventicios (Cuadro 9).

Como se puede apreciar, no hay una tendencia en cuanto a la formación de callo con respecto a los diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento a los que fueron sometidos los embriones, pues se originó callo en algunos tratamientos que carecían de auxinas, así como en otros en los que la adición de auxinas en bajas concentraciones fue necesaria para dar lugar a tejido indiferenciado. Este hecho pudo deberse a que la presencia de auxinas endógenas que contenían los embriones fue suficiente para inducir la formación de callo en aquellos tratamientos sin auxinas exógenas (ANA), pero no sucedió lo mismo para los embriones que necesitaron de la adición de auxinas para iniciar el proceso.

3) Embriones que formaron brotes (EB) vía organogénesis indirecta

En la P4, un embrión sometido a la concentración 1/0 mg/l de BA/ANA de formó brotes. En la P5, veinticinco de ellos (34.2%) desarrollaron numerosos brotes, siendo los tratamientos 1/0, 1/0.1, 3/0.1, 5/0.1, 1/0.5, 3/0.5 y 1/1 mg/l de BA/ANA en donde se originaron más de dos brotes por embrión (Cuadro 9). En la P6 siete embriones (11.6%) formaron brotes, en los tratamientos 3/0 y 0/0.5 de BA/ANA se formaron dos y cinco por embrión, respectivamente.

4) Brotes individualizados (BI)

De todos los brotes generados, sólo uno de la P4 y catorce de la P5 (Cuadro 9) alcanzaron una talla superior a los 10 mm, por lo que se individualizaron y continuaron su crecimiento hasta llegar a tener entre 25 y 30 mm de altura, etapa en la cual fueron sometidos a un tratamiento de enraizamiento.

Skoog y Miller (1957 citado por Villalobos *et al.*, 1984) y Thorpe *et al.* (1991) han mencionado que para inducir los procesos organogénicos es necesaria la adición de reguladores de crecimiento, debiendo haber un balance entre las citocininas y las auxinas ya que es determinante en el patrón de diferenciación. La respuesta en algunos de los tratamientos utilizados en este trabajo coincide con lo citado por dichos autores, puesto los brotes adventicios se formaron en tratamientos que contenían altas concentraciones de citocininas (3 y 5 mg/l de BA) y auxinas en menor concentración (0.1 mg/l de ANA); este hecho coincide con lo reportado por López Escamilla (2000), quien obtuvo los valores más altos de brotes obtenidos en las concentraciones de 2/1, 3/0, 3/1, y 5/0 mg/l de BA/ANA (de 62 hasta 107 brotes adventicios) para *Picea chihuahuana*. Sin embargo también se formaron brotes adventicios en bajas concentraciones de BA (Cuadro 9).

Por otra parte, Thorpe (1980 citado por Villalobos *et al.* 1984) y Biondi y Thorpe (1982 citado por Villalobos *et al.*, 1984) observaron que sólo la citocinina exógena fue suficiente para promover la formación de brotes; tal es el caso de *Pinus radiata*, que con sólo la adición de BA se indujo tejido meristemático, el cual posteriormente dio lugar a brotes adventicios (Aitken-Christie *et al.*, 1982). A su vez, López Escamilla (2000) obtuvo un gran número de brotes en concentraciones de 3 y 5 mg/l de BA. En este trabajo se lograron estas estructuras en las concentraciones 0.5, 1 y 3 mg/l de BA, este hecho se puede deber a que la cantidad de auxinas aplicadas exógenamente, modificó de tal grado el radio endógeno auxinas-citocininas que estimulan esta respuesta morfogénica.

En cuanto al número de brotes formados por embrión, Kolevska-Pletikapic´ y Buturovic´ Deric (1995) reportaron para *Picea omorika* un promedio de 4.2 a 9.5 en los tratamientos de BA; Montes Rivera (1996) señaló la obtención de 6 brotes en promedio por embrión para *Pseudotsuga menziesii* y López Escamilla (2000) de 1 a 8 brotes individualizados. En el presente trabajo, aunque hubo una gran variabilidad en cuanto a la respuesta morfogénica, se obtuvieron de 1 a 5 brotes individualizados por embrión, lo cual se ubica dentro del intervalo de los autores citados anteriormente.

De manera general, se puede decir que no se observó una tendencia en los tratamientos con respecto a la inducción de una respuesta morfogénica en los embriones, en el número de embriones que formaron brotes ni en el número de brotes individualizados que pudiera indicar diferencias claras entre algunos de ellos. Al parecer, existe un intervalo relativamente amplio de concentraciones de auxinas y citocininas entre las cuales los embriones son capaces de responder. Sin embargo, por el comportamiento de los embriones testigo se hace evidente que la aplicación exógena de reguladores de crecimiento es indispensable para dirigir el desarrollo morfogénico del explante hacia la formación de estructuras adventicias en sistemas *in vitro*. Además, en este trabajo se confirmó que factores intrínsecos al explante, como su genotipo y estado fisiológico así como las características de la planta madre, definen la capacidad del embrión para responder al estímulo externo así como el tipo de respuesta inducida.

Adicionalmente, se corroboró que a pesar de que existe una gran variedad de protocolos para la regeneración *in vitro* de *Pseudotsuga menziesii*, y de otras coníferas, éstos sólo dan pauta para el establecimiento de una metodología que permita la micropropagación de *P. macrolepis*, puesto que cada especie y aún cada individuo y lote de semillas tienen requerimientos específicos para su desarrollo *in vitro* (George, 1993).

2.9.4 ENRAIZAMIENTO

El enraizamiento espontáneo *in vitro* en coníferas es muy raro y difícil de obtener comparado con las angiospermas. Se ha reportado que menos del 5% de aciculares regeneradas *in vitro* desarrollaron raíces de forma espontánea (Mohammed y Vidaver, 1988). Calixto y Pais (1977) reportaron la formación de raíces espontáneas en vástagos de *Pinus pinaster* después de 5 a 6 meses de cultivo en el medio de elongación sin reguladores de crecimiento. Con base en estos resultados, se concluye que el enraizamiento *in vitro* se debe promover con la adición de auxinas, contemplando diferentes concentraciones y combinaciones ya sea en pulsos (en diferentes tiempos de exposición) o directamente en el medio.

El objetivo final en esta fase del trabajo fue obtener la formación de raíces en los brotes o vástagos que se produjeron. Para ello, los quince brotes obtenidos (Cuadro 9) que presentaron un tallo bien diferenciado, abundantes hojas y alcanzaron una altura de 25 a 30 mm, fueron sometidos a uno de los cuatro ensayos de enraizamiento (Cuadro 10) permaneciendo durante cuatro semanas en medio de inducción con los reguladores de crecimiento y posteriormente subcultivados en medio libre de fitorreguladores.

Cuadro 10. Procedencia de los brotes adventicios de *Pseudotsuga macrolepis* y tratamientos de enraizamiento a los que fueron sometidos.

Procedencia	mg/l BA/ANA	No. de brotes	Tratamiento de enraizamiento
P4	1/0	1	
P5	5/0.1	1	1 mg/l ANA
P5	3/0.5	1	
P5	3/0.5	4	0.1 mg/l ANA + 1 mg/l AIB
P5	1/0.1	1	
P5	5/0	1	3 mg/l AIB
P5	1/0	2	
P5	1/1	4	5 mg/l AIB

En los brotes obtenidos se observó que el tratamiento inductor estimuló su crecimiento longitudinal, lo cual coincide con el comportamiento mostrado por *Pinus canarensis* (Martínez-Pulido *et al.*, 1994) y *Pseudotsuga macrolepis* (García Campusano, 1999; Monjarás González, 2000). También se hizo evidente el desarrollo plagiotrópico de cuatro brotes, así como el debilitamiento de la porción apical de la mayoría de ellos con el paso del tiempo (cambio de color de verde brillante a amarillento, deshidratación, de yemas y hojas circundantes).

En los brotes sometidos a 1 mg/l de ANA, se detectó un callo muy pequeño en la base de los mismos. Sin embargo, en ningún de los cuatro tratamientos ensayados se observó la formación de primordios radiculares. El hecho de que no se generaran raíces puede deberse a varios factores, entre los que destacan: 1) que la concentración de auxinas no fue apropiada para la inducción

de raíces, es decir, que pudo ser demasiado baja para inducir la dediferenciación celular necesaria para iniciar la formación de raíces, o demasiado alta para el tiempo durante el cual fue aplicada e inhibió el desarrollo; 2) que el tiempo de exposición de la auxina fue inadecuado, es decir, pudo ser muy corto para permitir la absorción de una cantidad de auxinas que desencadenara los proceso de enraizamiento, o demasiado largo para que las cantidades absorbidas se hayan vuelto inhibitorias y 3) que otros factores como el crecimiento de estructuras alternativas como prolongaciones de traqueidas (Grönroos y von Arnold 1985, 1987) que inhibieran la formación normal de raíces; un estudio histológico posiblemente pondría en evidencia tal situación.

La necrosis durante el enraizamiento y la aclimatización de los brotes es un fenómeno común para muchos géneros de coníferas (Bonga y von Aderkas, 1992); en este caso, los brotes se mantuvieron hasta por 32 semanas, periodo después del cual se inició la necrosis apical y el amarillamiento de las hojas hasta que murieron. Existen varias condiciones que pudieron haber influido en este proceso, tales como el rápido crecimiento de los brotes durante las primeras semanas después del tratamiento inductor; al respecto, Horgan y Aitken-Christie (1981) señalan que los vástagos de *Pinus radiata* en fase de crecimiento rápido presentan tejidos más suaves y succulentos, por lo cual son más susceptibles a no soportar las condiciones del medio enraizador ni la disección de la base del tallo. Aunado a esto, el estrés al que es sometido el vástago es por si solo un factor que pudiera estar relacionado con la necrosis, ya que se ha documentado que una de las respuestas de una planta al estrés es la producción de etileno, así como fenoles y taninos, que al acumularse en un ambiente cerrado se vuelven tóxicos para la planta provocando la necrosis del tejido (Bonga y von Aderkas, 1992).

2.10 CONCLUSIONES

La procedencia de la semilla parece ser de gran importancia en la capacidad de respuesta morfogénica de la semilla puesto que las condiciones fisiológicas y genéticas de la planta madre, determinadas por el ambiente, influyen tanto en su viabilidad, así como en la capacidad competitiva de los embriones. Este hecho se vio reflejado en que la semilla procedente del Mpio. de Terrenate que presentó un mayor porcentaje de respuesta morfogénica (25.86-41.66%) con respecto a la del Mpio. de Tlaxco (16.5%)

El proceso de desinfección propuesto por Kyte (1987) no fue adecuado para *Pseudotsuga macrolepis*, porque ocasionó la muerte del tejido de un gran número de embriones. Las modificaciones a la metodología para desinfección de la semilla propuestas por Montes-Rivera (1993) como el aumento de la concentración de la solución bactericida y la disminución de la concentración de blanqueador comercial del 30% al 15% (v/v), favorecieron el aumento en el porcentaje de embriones que presentaron algún tipo de respuesta morfogénica.

En los megagametofitos no se obtuvo ningún tipo de respuesta morfogénica.

La adición de reguladores de crecimiento a los medios nutritivos estimuló el desarrollo de estructuras adventicias en los embriones, puesto que los testigos se desarrollaron de igual forma que en una germinación normal, sin que se observara la formación de brotes.

La implementación de un periodo de inducción bajo condiciones de oscuridad ocasionó la formación de estructuras adventicias (brotes) por medio de organogénesis indirecta.

Se observó una gran variabilidad en el tipo de respuesta morfogénica de los embriones, lo cual además del estímulo externo, también estuvo influenciada por las condiciones intrínsecas de los embriones como son sus características genéticas y fisiológicas.

La formación de brotes se obtuvo mediante organogénesis indirecta y, aunque no hubo un patrón definido de respuesta morfogénica con respecto a los tratamientos con diferentes

concentraciones de reguladores de crecimiento (BA/ANA), es necesaria su aplicación exógena para inducir el desarrollo de los brotes.

La formación y elongación de brotes adventicios se obtuvo después de tres a cuatro meses de iniciada la fase de inducción con los reguladores de crecimiento.

La oxidación fue un factor que limitó la respuesta de los embriones, un factor que pudo influir fue la excesiva hidratación de tejido que dio como consecuencia su degeneración.

La fase de enraizamiento sigue siendo una de las más difíciles de alcanzar, no sólo para *P. macrolepis*, sino también para muchas especies forestales. En este trabajo no se logró el enraizamiento debido a que como el número de brotes adventicios obtenidos fue bajo y no permitió realizar más experimentos para la inducción de raíces. Aunado a lo anterior, probablemente los brotes no fueron suficientemente vigorosos para lograr sobrevivir durante los largos periodos que se requieren para el enraizamiento.

Aunque se han establecido diversos protocolos para la regeneración *in vitro* de gimnospermas, particularmente para *P. menziesii*, éstos no puede aplicarse para la regeneración de *P. macrolepis* debido a que la capacidad de respuesta al cultivo *in vitro* de cada planta depende de diversos factores como la edad fisiológica y su carga genética que se encuentran determinadas por el hábitat donde se desarrollan (clima, condiciones topográficas y ecológicas; además de las condiciones físicas y químicas empleadas en el cultivo *in vitro*.

A pesar de que se han hecho varios intentos para lograr la regeneración *in vitro* de plántulas completas de *P. macrolepis*, aún faltan muchos problemas por resolver para alcanzar resultados exitosos si se compara con otras coníferas. Sin embargo, dada su situación actual de especie amenazada, los resultados del presente trabajote gran relevancia, ya que pueden dar pauta para el establecimiento de nuevos protocolos de propagación *in vitro* encaminados a la obtención de plantas y rescate de esta especie.

CAPÍTULO III. PRUEBAS DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS ASOCIADOS CON *Pseudotsuga macrolepis* FLOUS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA

3.1 INTRODUCCIÓN

Los bosques de coníferas ocupan vastas extensiones en México; sin embargo, la desertificación conjuntamente con los procesos erosivos, se encuentran entre los principales problemas que afectaban alrededor del 80% del territorio mexicano (Valdés *et al.*, 1983) en la década de los ochentas. Pese a los esfuerzos gubernamentales y sociales del país, se estima que, de la superficie forestal original el 50% ha desaparecido o se ha deteriorado en las últimas décadas calculándose una tasa de deforestación entre 370 000 y 1 500 000 ha/año (Masera, 1996). Las sucesivas deforestaciones realizadas desde tiempos inmemoriales, los altos índices de agostadero sobre la vegetación existente, así como las actividades agrícolas en suelos inapropiados para este fin y el uso incontrolado de las escasas reservas hídricas, son algunas de las razones responsables del incremento de la desertificación.

Entre los bosques más afectados por los factores ya mencionados se encuentran los de *Pseudotsuga* spp., éstos árboles son de gran interés forestal en nuestro país, particularmente *P. macrolepis*. Su importancia radica en su escasa y dispersa presencia en ciertas regiones de México. Debido a que tiene un gran potencial desde el punto de vista maderable o como árbol de navidad, esta conífera se sitúa entre las de mayor importancia a nivel mundial (Hermann y Lavender, 1990).

En algunas regiones del país, los bosques de *Pseudotsuga* han sido ignorados, principalmente por lo pequeño de sus poblaciones. Particularmente para el estado de Tlaxcala, *P. macrolepis* está restringida a localidades que corresponden a las zonas más sureñas de su distribución; desafortunadamente estos bosques corren el peligro de ser erradicados debido a que sufren un alto grado de deforestación (Acosta-Pérez, 1992).

Todo lo ya mencionado es indicativo de la importancia de realizar y sistematizar las investigaciones sobre diferentes aspectos ecológicos, silvícolas y de propagación de esta conífera, en particular en aquellas regiones donde su presencia está fuertemente amenazada.

Pseudotsuga macrolepis requiere condiciones especiales de sitio para su germinación y desarrollo, en virtud de que es una especie de tolerancia intermedia y crecimiento lento. Una alternativa para poder propagar esta especie es el uso de técnicas de cultivos de tejidos, pues mediante éstas se puede obtener la propagación masiva de plantas a partir de una pequeña sección de individuo (Villalobos *et al.*, 1983). Para que las plántulas obtenidas mediante estas técnicas tengan mayor probabilidad de supervivencia en su fase de aclimatización y paso a vivero y a campo es necesaria la asociación simbiótica, denominada ectomicorriza, que se establece entre sus raíces y algunos hongos; a través de ésta, ambos organismos obtienen beneficios, principalmente de intercambio de nutrimentos. Esta asociación sólo se presenta en el 10% de la flora del mundo (Molina *et al.*, 1992a).

Los hongos ayudan al crecimiento de las diferentes coníferas y son indispensables bajo condiciones naturales (Marx, 1980). Las plantas que presentan abundantes micorrizas son más activas fisiológicamente, por aumentar el área de absorción de nutrimentos y agua comparados con plantas con pocas o sin micorrizas (Marx y Cordell, 1989).

Por otra parte, se ha comprobado que las ectomicorrizas impiden la colonización de las raíces por patógenos tales como *Phytophthora* (Marx y Davey, 1969) a la vez que inducen una mayor producción de hormonas que incrementan la actividad fisiológica de las raíces (Ek *et al.*, 1983). Sin embargo, no todas las especies de hongos forman ectomicorrizas ni dan el mismo beneficio a sus hospederos bajo condiciones específicas, ya que algunas son más activas que otras (Marx y Cordell, 1989).

Por lo anteriormente mencionado, es necesario conocer las cualidades de las especies nativas de hongos ectomicorrizógenos que existen en las zonas forestales del país, sobretodo de las que se asocian con especies en peligro de extinción. De igual forma es importante definir las condiciones de crecimiento en que pueden reproducirse y su potencial en los programas de reforestación, ya que éstas están mejor adaptadas a las condiciones edáficas, vegetacionales y climáticas de nuestro país;

por lo tanto, su uso en la producción de inoculantes permitirá aumentar la probabilidad de éxito en el establecimiento de los árboles que sean trasplantados en el campo.

Una forma de conocer la biología de los hongos es por medio de los cultivos puros de las cepas aisladas de los cuerpos fructíferos (Torres, 1992); con ellos se puede conocer la capacidad fisiológica o bioquímica de cada cepa en la forma de degradar los compuestos de carbono y nitrógeno, o su resistencia a crecer en condiciones extremas como las de pH o temperatura. Aún cuando se han realizado numerosas descripciones de los cultivos de muchas especies de hongos saprófitos, son muy pocas las de hongos ectomicorrizógenos.

3.2 CONCEPTO DE MICORRIZA

La micorriza es la asociación mutualista entre el micelio de un hongo y las raíces de una planta y está basada en el intercambio nutricional entre ambos, lo cual implica una serie de interacciones celulares a diferentes niveles (Anderson, 1991).

Este tipo de mutualismo está extendido en la naturaleza y parece ser el estado normal de los vegetales, mientras que la condición no micorrízica parece ser la excepción (Harley y Smith, 1983). Más del 95% de las plantas de todo el mundo establecen algún tipo de micorriza en condiciones naturales (Honrubia *et al.*, 1992).

La acción benéfica de la simbiosis micorrízica se refleja en varios sentidos: absorción de agua y nutrición mineral, así como crecimiento y supervivencia en el campo de las plantas. La micorriza favorece la captación de agua y nutrimentos minerales, especialmente fósforo y nitrógeno del suelo, pero también se ha confirmado que elementos como potasio, calcio, azufre, zinc, cobre, etc. son absorbidos por las células fúngicas y translocados a la planta simbiote (Bowen, 1973). Asimismo la producción de fitohormonas (AIB, AIA) por parte de los hongos mejora la estructura del suelo y ofrece cierta protección frente a patógenos (Honrubia *et al.*, 1992).

3.3 CLASIFICACIÓN DE LA MICORRIZA

A medida que se amplían los conocimientos sobre la simbiosis micorrízica, se distingue un mayor número de tipos de micorrizas. Harley y Smith (1983) y Harley y Harley (1987) reconocieron hasta siete tipos: ectomicorrizas, arbusculares, ectendomicorrizas, arbutoides, ericoides, monotropoides y orquidáceas (Cuadro 11).

Cuadro 11. Tipos de micorrizas (Fuente: Harley y Harley, 1987)

	Tipos de micorriza						
	Arbuscular	Ectomico.	Ectendom.	Arbutide	Monotrop.	Ericoide	De orquideas
Hongos septados	-	+	+	+	+	+	+
Hongos aseptados	+	(+)	-	-	-	-	-
Hifas en el interior de las células corticales	+	-	+	+	+	+	+
Presencia de manto fúngico	-	+	+ ó -	+	+	-	-
Red de Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Hifas en forma de tirabuzón (coils) en el interior de las células	+	-	+	+	+	+	+
Haustorios dicotómicos	+	-	-	-	-	-	-
Haustorios no dicotómicos	-	-	-	-	-	-	+ ó -
Vesículas en el interior de las células	+(o no)	-	-	-	-	-	-
Hongos simbioses	Glomeromicetos	Basidiom. Ascomicet. Zigomicet.	Basidiom. Ascomicet.	Basidiom.	Basidiom	Ascomic. (Basidiom)	Basidiom.
Hospederos	Briofitos Pteridófitos Gimnosper. Angiosperm.	Gimnosper Angiosperm	Gimnosper Angiosper	Ericales	Monotropaceae	Ericales	Orchidaceae

Todas las plantas de interés forestal, arbustivo, agrícola, hortícola y muchas ornamentales establecen alguno de los tipos de simbiosis micorrízica de las mencionadas anteriormente. Sólo algunas familias botánicamente significativas (crucíferas, chenopodáceas y ciperáceas) incluyen especies que se han descrito como no micorrízicas.

A pesar de que un gran número de plantas forman algún tipo de micorriza en condiciones naturales, el 3% de las fanerógamas presentan ectomicorriza, destacando familias de importancia económica como Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Ulmaceae, Myrtaceae, Tiliaceae, Aceraceae, Dipterocarpaceae y Rosaceae, por mencionar algunas. Existen plantas ectomicorrízicas obligadas que pertenecen a los géneros *Abies*, *Carpinus*, *Fagus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* y *Quercus*, las cuales no se

desarrollan sin sus respectivos simbiontes; y plantas ectomicorrízicas facultativas típicas de los géneros *Acer*, *Alnus*, *Betula*, *Corylus*, *Cupressus*, *Eucalyptus*, *Juniperus*, *Pyrus*, *Salix* y *Ulmus*, las cuales son capaces de vivir en ausencia del hongo simbionte o que se asocian en sus primeras etapas con hongos que forman micorriza arbuscular (Meyer, 1973).

En condiciones naturales, existen hongos simbiontes obligados que son difíciles de aislar y mantener en cultivos puros, sin embargo, también existen organismos que son fáciles de aislar y que crecen bien en laboratorio. Este grupo tienen una amplia gama de hospederos y algunos pueden llegar a crecer saprofiticamente (Jackson y Mason, 1984).

3.4 BENEFICIOS DE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA

Una función de gran relevancia de las micorrizas es la de proveer a la planta de resistencia a condiciones adversas como heladas (Cromer, 1935; Harley, 1940) o sequías (Amaranthus *et al.*, 1987 a,b). De igual forma, aumenta la superficie de absorción de las plantas ya que incrementa el número de raíces con conexiones de micelio, por lo que ocupan un gran volumen de suelo. Además, las raíces que presentan micorriza son menos susceptibles a la infección por patógenos radicales como *Phytophthora cinnamomi*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* (Marx, 1973), debido a los mecanismos de protección que incluyen barreras físicas contra la penetración de dichos patógenos (Zak y Marx, 1964; Marx y Davey, 1967, 1969).

Por otra parte, el hongo produce hormonas mediante la conversión del triptofano que se encuentra en forma exógena a ácido indol acético (AIA), lo cual promueve la formación de raíces secundarias, estimulando su crecimiento y ramificación (Gay, 1990; Bonga y von Aderkas, 1992); en compensación, obtiene los azúcares y otros productos de la fotosíntesis, principalmente a partir de los exudados radicales vertidos por la planta en la rizósfera (Marks y Foster, 1973; Jackson y Mason, 1984).

3.5 ESTRUCTURA DE LA ECTOMICORRIZA

La ectomicorriza (Figura 11) se distingue fácilmente por una trama de células fúngicas denominada **manto**, que el hongo desarrolla alrededor de las raíces secundarias y cortas, y puede ser variable en cuanto a la forma como cubre a la raíz (Ingleby *et al.*, 1990). Bajo el manto se encuentra una capa de células de la planta de tonalidad café oscuro llamada capa de taninos, que puede inhibir el crecimiento de la micorriza o del hongo. El micelio fúngico penetra a la raíz entre las células corticales formando una red de hifas interconectadas denominada **Red de Hartig**. En esta zona se establece el contacto con las células de la raíz para llevar a cabo el intercambio de nutrimentos; el micelio jamás penetra la endodermis ni el interior de las células corticales (Foster y Marks, 1967). En ocasiones se pueden presentar estructuras como pelos, cistidios y rizomorfos (Marks y Foster, 1973; Jackson y Mason, 1984).

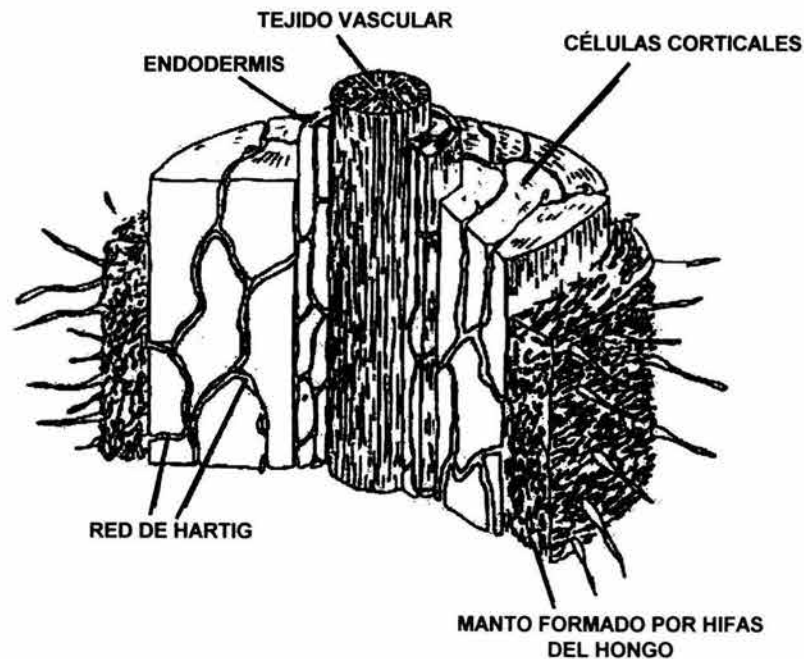


Figura 11. Estructura de una ectomicorriza (Fuente: Jackson y Mason, 1984)

Las raíces micorrizadas se reconoce porque tienen ápices redondeados y crecimiento limitado. La morfología que la raíz adopta puede ser dicotómica, coraloide, cilíndrica con constricciones, tuberculada, etc. (Ingleby *et al.*, 1990).

Las hifas intrarradicales son aseptadas, a pesar de que la mayoría de los hongos ectomicorrizógenos pertenecen a las subdivisiones Ascomycotina y Basidiomycotina (*Amanita*, *Boletus*, *Hebeloma*, *Lactarius*, *Paxillus*, *Russula*, *Suillus*) y por lo tanto su micelio presenta septos más o menos complejos. Este hecho se considera como una estrategia del hongo que le permite un más rápido transporte de nutrimentos a este nivel intrarradical. El micelio externo se prolonga desde el manto hacia el suelo rizosférico, se desarrolla de forma expansiva y se aleja de éste en busca de agua y nutrimentos minerales que incorpora a su citoplasma y que transloca a la planta (Marks y Foster, 1973; Jackson y Mason, 1984).

3.6 CAPTACIÓN DE NUTRIMENTOS

Se considera que la función primaria de las hifas micorrizógenas es la absorción de nutrimentos del suelo, donde la eficiencia relativa de la micorriza en tomar y translocar agua y nutrimentos, es resultado tanto de transporte activo, como pasivo (Miller y Allen, 1992). Dicha translocación se da en ambas direcciones, ya que compuestos de carbono derivados de los hospederos son translocados para el crecimiento de las hifas y cuerpos fructíferos (Harley y Smith, 1983).

El nitrógeno y el fósforo son los dos elementos más importantes en la nutrición fúngica, están presentes en los hábitats naturales en muchas formas como nitratos de amonio y proteínas en el primer caso, y como fosfatos orgánicos e inorgánicos en el segundo. Además, se puede esperar que el aprovechamiento de las diversas formas influye selectivamente en la presencia de especies particulares en un hábitat. Se argumenta también que los elementos menores como el zinc o el calcio, pueden ser igual o más importantes en determinados nichos ecológicos (Jennings, 1989).

Por otra parte, se ha observado que los metales pesados pueden reducir la colonización micorrízica porque influyen negativamente en el crecimiento de la planta, pero también se tiene evidencia de

que las ectomicorrizas pueden proteger al hospedero contra altas concentraciones de zinc (Stribley, 1987).

3.7 IMPORTANCIA DEL CARBONO EN EL METABOLISMO DEL HONGO

El carbono ocupa una posición única entre los elementos esenciales de todos los organismos vivos. Casi la mitad del peso seco de las células fungales consisten de carbono. Protoplasma, enzimas, pared celular y reservas de nutrimentos almacenados dentro de las células son compuestos de carbono. Éstos son igualmente importantes en la nutrición de los hongos. Los hongos obtienen la energía por la acción de compuestos orgánicos. Además, constituyen el principal elemento estructural y juegan un papel importante desde el punto de vista fisiológico (Miller y Allen, 1992).

Los hongos, como organismos heterótrofos, requieren de una fuente exógena de carbohidratos, la cual juega un papel importante en la asociación simbiótica que los hongos ectomicorrizógenos establecen con las plantas (HacsKaylo, 1973). En los primeros intentos para cuantificar el movimiento del carbono, se ha mencionado que los compuestos producidos durante la fotosíntesis son transportados al manto e hifas extramatriciales. Se ha calculado que 15 % de la producción de las plantas es consumida por los hongos, sin embargo, en ocasiones las mismas especies de micobiontes bajo diferentes condiciones fisiológicas inducen el movimiento del carbono, y las mismas especies de plantas experimentan diferencias con varias especies de micobiontes (Miller y Allen, 1992).

En cultivo puro, los hongos ectomicorrizógenos pueden usar una amplia gama de fuentes de carbono para su desarrollo, desde simples monosacáridos, disacáridos y trisacáridos, hasta carbohidratos poliméricos más complejos y ácidos orgánicos. Se conoce que el crecimiento óptimo de los hongos ectomicorrizógenos se obtiene en presencia de hexosas como glucosa, manosa, y fructosa; disacáridos homogéneos como celobiosa, sacarosa, maltosa, xilosa, arabinosa y trealosa, así como ciertos glicanos como almidones, pectina y dextrinas (France y Reid, 1983). La glucosa la convierten a trealosa y glicógeno y la fructosa a manitol (Werner, 1992).

Se ha demostrado que algunos hongos ectomicorrizógenos que se asocian con especies de *Fagus* absorben y asimilan la sacarosa, la glucosa y la fructosa más fácilmente con respecto a otras fuentes de carbono como trealosa y manitol (Lewis y Harley, 1965a, b).

Los hongos ectomicorrizógenos dependen de los árboles para obtener carbohidratos, los cuales son transferidos al hongo a través de hifas que engloban y penetran intercelularmente a la raíz (Frank, 1885 citado por Hacskaylo, 1973). También se ha determinado que la relación del hongo hospedero en condiciones naturales es muy importante para que se propicie el desarrollo de la fructificación de los hongos ectomicorrizógenos. Algunos estudios han demostrado una interdependencia entre el hongo y la planta, fenómeno que se ha verificado en experimentos con árboles de *Abies* sp., alrededor de los cuales se colocaron barreras para demostrar que estos hongos no completan su ciclo de vida en ausencia de la planta (Rommell, 1938 citado por Hacskaylo, 1973).

El D-manitol es el poliol más común en los hongos ectomicorrizógenos, además de ser una fuente de carbono y energía; la acumulación de manitol coadyuva a la resistencia del hongo a la escasez agua y al estrés por calor, además de generar un potencial osmótico en el crecimiento de los cuerpos fructíferos (Wingler *et al.*, 1993).

3.8 ESTUDIOS REALIZADOS CON RELACIÓN A LOS CARBOHIDRATOS INVOLUCRADOS EN LA ASOCIACIÓN PLANTA-HONGO ECTOMICORRIZÓGENO

Para los hongos ectomicorrizógenos, la fuente de carbono es de gran relevancia en el sistema simbiótico y ha sido sujeta de varios estudios; debido a su complejidad, se han abordado de forma separada a las raíces y a los hongos más que como una unidad fisiológica. El resultado ha sido un conjunto de información que se ha correlacionado.

En 1885, Frank (citado por Hacskaylo, 1973) sugirió que el hongo ectomicorrizógeno depende de los carbohidratos producidos por la planta hospedera, los que son captados al hongo a través de las redes de hifas que envuelven y penetran en las raíces.

A pesar del papel de los carbohidratos en el metabolismo de los hongos ectomicorrizógenos, son escasos los trabajos que se han enfocado hacia el conocimiento de los diferentes tipos de azúcares que son secretados por las especies forestales y asimilados por los hongos. Björkman (1942 citado por Hacskaylo, 1973) concluyó que cuando hay deficiencia o altas concentraciones de nutrimentos disponibles, particularmente nitrógeno, la concentración de carbohidratos en la planta se reduce. Sin embargo, una deficiencia moderada, no influye en la asimilación y concentración de éstos. Lewis y Harley (1965 citado por Hacskaylo, 1973) evaluaron el movimiento de los azúcares en micorrizas aisladas y concluyeron que el tejido del hospedero tiene principalmente sacarosa, que grandes cantidades de ésta son translocadas al interior del hongo, y se acumulan como manitol, trealosa y glicógeno. Asimismo, se conoce que el movimiento de los carbohidratos puede ocurrir del hospedero al hongo o viceversa; sin embargo, las condiciones que dominan la dirección aún no están claramente definidas.

Mediante análisis cromatográficos, Lister *et al.*, (1968 citado por Hacskaylo, 1973) identificaron glucosa y arabinosa en exudados de raíces de *Pinus pseudostrobus*. Smith (1969) encontró glucosa, ramnosa, sacarosa y fructosa en exudados de raíces de cinco especies arbóreas y señaló además que los compuestos de carbono disponibles para el hongo están en la superficie de la raíz y son proporcionados a través de los exudados de la planta. Estos compuestos de carbono están en concentraciones suficientes para mantener al hongo durante la colonización de las raíces receptoras.

Palmer y Hacskaylo (1970) estudiaron la respuesta del micelio de seis especies de hongos ectomicorrizógenos expuestos a 39 fuentes solubles de carbono y 13 insolubles. Dichos autores evaluaron la biomasa micelial expresada en peso seco, y reconocieron que las fuentes de carbono influyen de forma diferencial en el crecimiento micelial de las especies de hongos ectomicorrizógenos, puesto que algunas lo favorecieron e inhibieron el desarrollo en otras. En el caso de la D-glucosa y D-manosa, éstas incrementaron la biomasa en todos los aislamientos de especies micorrizógenas, en tanto que el sorbitol y el manitol provocaron lo contrario. Los autores citados concluyeron que los carbohidratos solubles son mejor asimilados por los hongos ectomicorrizógenos que los insolubles.

La capacidad de la micorriza y los sistemas hifales asociados para el transporte de material entre plántulas de pinos fueron estudiados por Reid (1973), quien enfatizó que el movimiento de los compuestos de carbono ocurre por tres vías: 1) del sistema de raíces micorrizadas a las hifas externas, 2) de las hifas externas a los sistemas de raíces micorrizadas y 3) de un sistema de raíces a otro vía hifas de un hongo micorrizógeno mutualista hacia ambos sistemas.

Nylud y Wallander (1989) evaluaron el efecto de la micorriza en el crecimiento de *Pinus sylvestris* y el balance de carbono en un sistema de cultivo semihidropónico. Los autores cultivaron plántulas no micorrizadas y micorrizadas con cuatro especies de hongos ectomicorrizógenos (*Suillus bovinus*, *S. variegatus*, *Laccaria laccata* y *Hebeloma crustuliniforme*); observaron una gran variación en su crecimiento después de la inoculación con las diferentes especies de hongos, demostrando así que los micobiontes influyen substancialmente sobre las proporciones de fotosintatos traslocados del hospedero para el mantenimiento de la simbiosis. Los análisis con ^{14}C demostraron que la fotosíntesis fue mejor en plántulas con micorrizas, aunque las concentraciones de N y Mg fueron similares en las plántulas inoculadas y las no inoculadas. Aunque la traslocación del carbono y respiración fue altamente variable, ésta fue superior en algunas plántulas micorrizadas. El tipo de nutrición tampoco tuvo efecto en el contenido de carbohidratos en brotes y raíces de plántulas micorrizadas y no micorrizadas, pero los tratamientos con auxinas (AIB y AIA) incrementaron las concentraciones de carbohidrato, aceleraron la traslocación y respiración, pero su efecto sobre la fotosíntesis fue variable.

Ineichen y Wiemken (1992) indujeron la síntesis *in vitro* de la micorriza de *Pisolithus tinctorius* y *Picea abies*, evaluando el tipo y cantidad de azúcares (trealosa, arabitol, manitol) que se producían a lo largo de la formación de la micorriza. También se midió el crecimiento radial de *Pisolithus tinctorius* en diferentes concentraciones de glucosa y extracto de malta (20/3; 7/1; 2/0.3 g/l así como 700/0.1; 200/30; 70/10; 20/3; 7/1 mg/l respectivamente) adicionadas en el medio Melin y Norkans Modificado. En la concentración de 200 mg/l y 30 mg/l de glucosa y extracto de malta, respectivamente, se obtuvo el mayor crecimiento radial en menor tiempo.

Wingler *et al.* (1993) propusieron dos métodos enzimáticos para la determinación de manitol, los cuales pueden ser aplicados a hongos ectomicorrizógenos. Estos métodos están basados en la oxidación de manitol por la manitol deshidrogenasa de *Agaricus hortensis* y la determinación fluorimétrica del NADPH producida en esta reacción. Estos autores trabajaron con el micelio de *Amanita muscaria* y *Cenococcum geophilum* y la micorriza formada por estos hongos en las raíces de *Picea abies*; el resultado fue que el contenido de manitol en el ascomicete *C. geophilum* fue mucho más alto que en el basidiomicete *Amanita muscaria*. Asimismo, encontraron que el manitol es directamente sintetizado por la manitol deshidrogenasa y no por la manitol-1-fosfato deshidrogenasa. Esto implica que en esta asociación simbiótica el hongo toma la fructosa posiblemente derivada de la sacarosa que es suministrada por el hospedero.

Bâ *et al.* (1994) determinaron los efectos de una excisión total y parcial de los cotiledones en plántulas de *Azelaia africana* sobre la formación de la micorriza, al ser inoculadas con hongos ectomicorrizógenos de etapas tempranas y tardías. Tales autores encontraron que la excisión parcial y total de los cotiledones disminuye drásticamente el crecimiento de las raíces y por consecuencia disminuye la concentración de azúcar en *A. africana*, lo que repercute en la capacidad del hongo micorrizógeno para colonizar a la plántula. También mencionaron que las cepas de etapas tempranas tienen bajos requerimientos de carbohidratos proporcionados por el sistema radical de la planta con respecto a las cepas de etapas tardías.

Olsson (1995) evaluó la capacidad de traslocación de nutrimentos minerales y glucosa del micelio de 62 especies de hongos pertenecientes a diferentes grupos, entre ellos dos micorrizógenos. Lo hizo por medio del análisis de los patrones de crecimiento a través de gradientes de carbono (glucosa) y nutrimentos minerales, cuantificando la biomasa y densidad micelial mediante análisis de imagen en computadora. Identificó tres perfiles de crecimiento: el tipo I en el que se presentaron picos muy altos en densidades de biomasa hacia el centro de la colonia disminuyendo progresivamente en todas direcciones lo que indica que no hay traslocación, sino difusión en cualquier dirección. El tipo II caracterizado porque en una mitad de la colonia la densidad de biomasa fue similar entre los tratamientos con diferentes gradientes y en los testigos (sin gradientes) y progresivamente decreció desde el centro; es indicó que hubo una traslocación activa de carbono (glucosa) o minerales en una

dirección y una traslocación difusiva de minerales y carbono en la otra. El tipo III se caracterizó porque sobre la colonia completa los perfiles de densidad de biomasa fueron similares a las del testigo lo que señala una traslocación activa de los nutrimentos en ambas direcciones. Con base en estos resultados, el autor propone tres tipos de estrategias de supervivencia del micelio de las diferentes especies de hongos: 1) explotación del recurso; 2) explotación y transmigración para usar todos los recursos disponibles en un área; 3) explotación y transmigración para buscar más recursos en diferentes puntos, y traslocación de los nutrimentos desde los diferentes puntos.

3.9 ESTUDIOS EN MÉXICO SOBRE AISLAMIENTO Y DESARROLLO DE CEPAS DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS

Para el país han sido pocos los trabajos que han contemplado aspectos de la fisiología de hongos ectomicorrizógenos. Se han realizado aislamientos y caracterizaciones de cepas mexicanas de este tipo de hongos obtenidos de micorrizas de *Abies* (Peña-Cabriales y Valdés, 1974). También se han obtenido aislamientos a partir de cuerpos fructíferos de hongos ectomicorrizógenos, los cuales han sido objeto de diferentes estudios: caracterización de los micelios (Ávila, 1988; Cruz-Ulloa, 1990 y 1991; Pérez-Moreno y Ferrera-Cerrato, 1991), optimización del crecimiento de las colonias en diferentes medios nutritivos (Aquihuatl *et al.*, 2000); pruebas fisiológicas (Vázquez-Marrufo *et al.*, 1998), efecto de la glucosa en el crecimiento de cepas de hongos (Aquihuatl *et al.*, 1998a), efecto de la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno (Aquihuatl *et al.*, 1998b), obtención y manejo de germoplasma para la síntesis de micorrizas (Tejocote *et al.*, 2000) y métodos de conservación de colonias de hongos (Carranza *et al.*, 1998).

Para el estado de Tlaxcala, los trabajos de esta índole son aún más escasos, se han realizado estudios acerca del crecimiento de varias cepas nativas de hongos ectomicorrizógenos como *Laccaria bicolor* (Cuaxilo, 1991; Santiago-Martínez *et al.*, 2003) y *Pisolithus tinctorius* (Santiago-Martínez *et al.*, 1995) en diferentes medios nutritivos; también se evaluó la influencia del pH en el crecimiento de nueve cepas de hongos ectomicorrizógenos (Vázquez García *et al.*, 2002) y el efecto de compuestos fungistáticos sobre el crecimiento de algunas cepas de *Amanita* (Santiago-Martínez *et al.*, 1997) y *Suillus* (Santiago-Martínez *et al.*, 2001).

3.10 JUSTIFICACIÓN

Aunque el estado de Tlaxcala tiene zonas de vegetación importantes, sufre un alto grado de deforestación. Tal es el caso de los bosques de *Pseudotsuga macrolepis*, localizados en la región de Tlaxco, Terrenate, Emiliano Zapata y Alzayanca, que están en riesgo de desaparecer debido a una explotación desmesurada. Una alternativa para tratar de recuperar estas áreas es implementar programas de reforestación con plántulas de *P. macrolepis* inoculadas con cepas de hongos nativos, es decir, provenientes de los lugares donde se va a reforestar o zonas aledañas, ya que éstos podrían incrementar la supervivencia de las plántulas porque estarán mejor adaptados al sitio.

El conocimiento de las especies de hongos ectomicorrizógenos existentes en los bosques de *P. macrolepis* es aún precario, ya que se ignoran las condiciones de crecimiento bajo las cuales pueden reproducirse, así como su potencialidad para la producción de planta empleada en los programas de reforestación. Por ello, es necesario validar las cualidades de los hongos nativos y con ello aumentar la probabilidad de éxito en el establecimiento de las plantaciones forestales. Una forma de aproximarse a la biología de estos hongos, es por medio de estudios que revelen sus necesidades nutricionales al probar su crecimiento en diferentes medios de cultivo; su capacidad de utilización de diversas fuentes de carbono, los pH's a los cuales crecen mejor, la resistencia a compuestos tóxicos y su compatibilidad con algunos hospederos. Con estos resultados se espera poder hacer recomendaciones acerca del uso y manejo de algunas cepas de hongos ectomicorrizógenos mexicanos en condiciones de vivero y de campo.

Debido a que el tipo y la concentración de la fuente de carbono son factores determinantes para el crecimiento de los hongos ectomicorrizógenos, es de gran importancia tratar de esclarecer cuales son las concentraciones de glucosa que favorecen el desarrollo óptimo de diferentes cepas de hongos ectomicorrizógenos provenientes de los bosques de *Pseudotsuga macrolepis*.

3.11 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia de diferentes concentraciones de glucosa en el crecimiento miceliar de diez cepas de hongos ectomicorrizógenos provenientes de los bosques de *Pseudotsuga macrolepis*.

3.11.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Recolectar y aislar diferentes cepas de hongos ectomicorrizógenos presentes en los bosques de *Pseudotsuga macrolepis*.

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre la morfología macro y microscópica de diez cepas de hongos ectomicorrizógenos.

Evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de glucosa sobre la producción de biomasa, crecimiento radial y tasa media de crecimiento en diez cepas de hongos ectomicorrizógenos.

3.12 MATERIALES Y MÉTODOS

3.12.1 RECOLECCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO

Se realizaron salidas quincenales a los bosques de *Pseudotsuga macrolepis* localizados en los municipios de Villarreal, Emiliano Zapata y Tlaxco (Cuadro 4, Capítulo II) durante los meses de mayo a septiembre del 1994 y 1995, con la finalidad de recolectar cuerpos fructíferos de hongos ectomicorrizógenos.

3.12.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO PURO DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS

Para el aislamiento del material fúngico se seleccionaron los carpóforos preferiblemente inmaduros, que no presentaron algún daño mecánico. Para su transporte al laboratorio, los ejemplares fueron colocados en bolsas de papel encerado.

Los aislamientos se hicieron en condiciones asépticas de acuerdo con el procedimiento descrito por Molina y Palmer (1982). La zona más adecuada del tejido para realizar el aislamiento fue la que está inmediatamente por encima de himenóforo, extrayendo aproximadamente 4 mm del tejido que se colocó en cajas Petri con los medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Biotina-Aneurina-Ác. Fólico (Moser, 1960), se incubaron a una temperatura de 25°C en condiciones de oscuridad. Para el mantenimiento de las cepas se realizaron subcultivos mensuales a medio fresco.

Una vez que se llevaron a cabo los aislamientos, el resto de los ejemplares se caracterizó con base en los criterios de Cifuentes *et al.* (1986) y se herborizaron para su posterior determinación.

Las cepas se depositaron en el Cepario de Hongos Ectomicorrizógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

3.12.3 CULTIVOS EN DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA

De las cepas aisladas se seleccionaron ocho del género *Suillus* y dos de *Amanita* para realizar las pruebas en las diferentes concentraciones de glucosa. El micelio crecido durante cuatro semanas fue cortado en fragmentos de 4-6 mm por lado y transferido a cajas Petri de 100 x 20 mm con el medio nutritivo BAF con alguna de las siguientes concentraciones de glucosa: 5, 10, 20, 30 y 40 g/l. En total fueron cinco tratamientos y quince repeticiones para cada tratamiento. Las cajas se incubaron a una temperatura de 25 °C en condiciones de oscuridad por un periodo de 30 días para la evaluación de algunas variables e crecimiento (tasa medio de crecimiento, biomasa, crecimiento radial y relación biomasa/área).

Se describió el crecimiento de las cepas para cada una de las cinco concentraciones de glucosa siguiendo con base en los criterios de Pantidou (1961), Nobles (1965) y Pantidou y Groves (1966). La caracterización macroscópica de las cepas consistió en tomar el color del micelio, textura, forma, margen de la colonia, presencia de exudados, reverso y cambio de color del medio que circunda la colonia (Agerer, 1986). La caracterización microscópica se llevó a cabo mediante cortes radiales de las colonias y su observación en microscopía de campo claro, de contraste de fases y de contraste interferencial de Nomarski. Las estructuras de interés fueron las hifas en lo correspondiente al diámetro, color, grosor de la pared, ornamentación, tipo de ramificación, presencia de vesículas intercalares, fíbulas, cristales, forma de las terminaciones, etc. Los colores fueron caracterizados mediante la comparación del micelio y el medio con las tablas de colores de Munsell (1975) y Komerup y Wanscher (1984), en lo sucesivo se hará referencia a ellas con una nomenclatura alfanumérica, Mn para la primera y Mt para la segunda.

3.12.4 EVALUACIÓN DE VARIABLES DE CRECIMIENTO

Para la evaluación de crecimiento de las cepas se consideraron cuatro variables:

- 1) La tasa media de crecimiento (mm/día); que se obtuvo con los valores de las mediciones del diámetro de la colonia realizadas cada tercer día durante 30 días. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de regresión lineal para calcular el valor de la pendiente, que fue

considerada la tasa media de crecimiento.

- 2) El crecimiento radial (mm), se determinó al final del ensayo mediante la medición, con un vernier, del diámetro de la colonia en cada uno de los tratamientos.
- 3) La biomasa (mg), se evaluó al final del periodo de crecimiento establecido y consistió en el peso seco del micelio de las colonias en cada uno de los tratamientos.
- 4) La relación biomasa/área (mg/mm^2), que se obtuvo del cociente de la biomasa entre el área de la colonia de cada tratamiento

Estas cuatro variables se analizaron por separado mediante un Análisis de Varianza de Una Vía por cepa para determinar si hubo diferencias entre las cinco concentraciones de glucosa. Asimismo se les aplicó la Prueba de Intervalos Múltiples de Tukey para identificar cuáles fueron los tratamientos diferentes, ambos con un nivel de significancia del 95% (Zar, 1994; SAS-JMP4, 2002).

3.13 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.13.1 RECOLECCIÓN Y AISLAMIENTO DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se realizó un total de cinco salidas quincenales para la recolección de cuerpos fructíferos de hongos potencialmente ectomicorrizógenos asociados con *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Durante 1994 se recolectaron seis hongos potencialmente ectomicorrizógenos: tres del género *Suillus* (GF1852, KL2650 y KL2740), dos de *Amanita* (SM134 y GF1851) y uno de *Hebeloma* (GF1853). En la época lluviosa de 1995, se recolectaron 17 hongos potencialmente ectomicorrizógenos: ocho pertenecientes al género *Suillus* (GF1862, GF1863, GF1867, GF1868, GF1869, GF1882, GF1883 y ME1534), dos hipogeos (GF1884 y ME1537), dos de *Amanita* (GF1872, GF1880) y uno de cada uno de los géneros *Hebeloma* (GF1866), *Boletopsis* (GF1870), *Xerocomus* (GF1871), *Inocybe* (GF1805) y *Russula* (GF1876). Todos fueron caracterizados y herborizados para su posterior identificación taxonómica. Asimismo, se realizaron sus respectivos aislamientos, pero debido a que algunos hongos ectomicorrizógenos no logran sobrevivir únicamente lograron mantenerse 17 cepas: nueve del género *Suillus*, cuatro de *Amanita*, una de *Hebeloma* y una de *Trappea*; a cada uno se le asignó un número de registro para ser incluidos dentro del cepario de hongos ectomicorrizógenos del Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la UAT (Cuadro 12).

Cuadro 12. Cepas de hongos aislados asociados a *P. macrolepis* que se mantienen en el Cepario del CICB, UAT.

No. De Cepa	Taxa	Material de referencia	Procedencia
Tlax 4	* <i>Amanita barrowsii</i> A.H. SM. Ex Tulloss	Santiago Martínez 134	Villarreal
Tlax 41	* <i>A. muscaria</i> (L.) Hook .	Galindo Flores 1851	Tlaxco
Tlax 52	<i>A. muscaria</i> var. <i>flavivolvata</i> (Singer) Jenkins	Galindo Flores 1872	El Pozo
Tlax 57	<i>A. novinupta</i> Tulloss & Lindgren	Galindo Flores 1878	El Pozo
Tlax 58	<i>A. nishidae</i> Tullos	Galindo Flores 1880	El Pozo
Tlax 43	<i>A. xylinivolve</i> Tulloss, Ovrevo & Halling	Galindo Flores 1858	Villarreal
Tlax 49	* <i>Suillus glandulosipes</i> Thiers & A.H. Sm.	Galindo Flores 1863	El Pozo
Tlax 40	* <i>S. lakeii</i> (Murr.) A. H. Sm. & Thiers	Kong Luz 2740	Villarreal
Tlax 48	* <i>S. pseudogranulatus</i> (Murr.) A. H. Sm. & Thiers	Galindo Flores 1862	El Pozo
Tlax 42	* <i>S. subaureus</i> (Pk.) Snell	Galindo Flores 1852	Tlaxco
Tlax 53	* <i>S. subaureus</i> (Pk.) Snell	Galindo Flores 1883	Tlaxco
Tlax 51	* <i>Suillus</i> sp.	Galindo Flores 1869	Tlaxco
Tlax 55	* <i>Suillus</i> sp.	Montoya Esquivel 1534	El Pozo
Tlax 56	<i>Suillus</i> sp.	Montoya Esquivel 1537	El Pozo
Tlax 44	* <i>Suillus</i> sp.	Kong Luz 2650	Villarreal
Tlax 50	<i>Hebeloma</i> sp.	Galindo Flores 1866	El Pozo
Tlax 54	<i>Trappea darkerii</i> (Zeller) Castellano	Galindo Flores 1884	El Pozo

* Cepas seleccionadas para las pruebas de crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa. Identificación taxonómica realizada por Ortiz González (2000).

3.13.2 PRUEBAS DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS EN CINCO CONCENTRACIONES DE GLUCOSA.

De las 17 cepas que se lograron aislar y mantener en cultivo *in vitro* se seleccionaron ocho pertenecientes al género *Suillus* y dos a *Amanita* para someterlas a las pruebas de crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa (Cuadro 12). De dichas cepas se realizó la caracterización macro y microscópica así como la evaluación de biomasa, diámetro de la colonia y velocidad media de crecimiento.

Se seleccionó el género *Amanita* debido a que es uno de los géneros más grandes de los basidiomicetos, cosmopolita con más de 400 especies descritas para el mundo, algunas de las cuales son comestibles como *A. caesarea*, pero también hay especies altamente venenosas como *A. virosa*; muchas especies de este género son ectomicorrizógenas que se asocian con varias especies de coníferas. Una de las especies más representativas es *Amanita muscaria* (hongo de la mosca) puesto que ha sido objeto de estudio en el arte, en la mitología y desde el punto de vista científico (Yang *et al.*, 1999).

También se seleccionaron cepas de *Suillus* porque es uno de los géneros de hongos ectomicorrizógenos más estudiados. El género está integrado por especies conspicuas, epigeas, con himenóforo tubular y con gran producción de esporocarpos en bosques de coníferas. Las especies de *Suillus* tienen una amplia gama de hospederos y su distribución coincide con la distribución natural de las pináceas en el hemisferio norte (Dahlberg y Finlay, 1999). En contraste con muchas especies de hongos ectomicorrizógenos, el micelio de *Suillus* es fácil de cultivar por lo que es utilizado con frecuencia en estudios sobre fisiología, síntesis *in vitro* y de poblaciones; siendo el cuarto más estudiado después de *Pisolithus*, *Tuber* y *Laccaria* (Klironomos y Kendrick, 1993; Dahlberg y Finlay, 1999; WWW.MYCOLIT.COM).

3.13.3 CARACTERIZACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS ESTUDIADAS

A continuación se muestran en cuadros las características macro y microscópicas observadas en cada una de las cepas estudiadas. Cabe señalar que no se presentaron diferencias morfológicas entre las colonias de las cinco concentraciones de glucosa por lo que se da una descripción general.

TLAX 4 *Amanita barrowsii* A.H.SM. ex Tulloss (Santiago Martínez 134) Figura 12e

macroscópicas	Crecimiento de la colonia	Margen	Superficie	Textura	Micelio	Pliegues radiales	Color	Exudados	Reverso	Color del medio
		irregular	irregular-festoneado-lobulado	plana	aterciopelada	postrado, compacto	no	blanco en toda la superficie	no presenta	café grisáceo Mt: 5E3 a amarillento oscuro Mt: 5D4, margen blanquecino, sin pliegues radiales
microscópicas	Diámetro De hifas	Terminación de la hifa	Color	Morfología	Pared celular	Densidad de hifas	Vesículas intercalares	Fibulas	Cristales	Otros
	(0.8-)1.2-2.7(-3.9) μm	puntas redondas	hialinas	septadas, filamentosas, con ramificaciones bifurcadas, lisas, sinuosas	delgada, raramente gruesa	compactadas o anastomosadas	sí, de 3.2-5.1 μm de diámetro	no hay	no hay	

Tlax 41 *Amanita muscaria* (L.) Hook (Galindo Flores 1851) Figura 12f

macroscópicas	Crecimiento de la colonia	Margen	Superficie	Textura	Micelio	Pliegues radiales	Color	Exudados	Reverso	Color del medio
	irregular	Festoneado, finamente fimbriado, Lobulado en concentración 10 g/l de glucosa	irregular	aterciopelada	compacto	Sólo en las concentraciones 20,30 y 40 g/l de glucosa	blanco en toda la superficie	no presenta	color café amarillento Mt: 5E-F4, a veces presenta una anillo irregular café oscuro Mt:6F5, a veces color naranja café Mt:5C4 a blanco amarillento Mt:4A2, margen blanco naranja Mt:5A2 con pocos pliegues radiales	no hay cambio
microscópicas	Diámetro De hifas	Terminación de la hifa	Color	Morfología	Pared celular	Densidad de hifas	Vesículas intercalares	Fibulas	Cristales	Otros
	(1.8-)1.6-3.1(-3.5) μm	puntas redondas, globosas, 3.3-7.8 μm	Amarillo pálido Mt: 2A2	septadas, filamentosas, con ramificaciones bifurcadas, lisas, sinuosas	delgada, raramente gruesa	compactadas	sí, de 3.1-4.3 μm de diámetro	no hay	no hay	

TLAX 49 *Suillus glandulosipes* Thiers & A.H. Sm. (Galindo Flores 1863) Figura 13d

	Crecimiento de la colonia	Margen	Superficie	Textura	Micelio	Pliegues radiales	Color	Exudados	Reverso	Color del medio
macroscópicas	Circular homogéneo, ligeramente circular en 40 g/l de glucosa	fimbriado	Plana en 5 g/l Convexa en 10, 20,30 g/l de glucosa	Aterciopelada, algodonosa en el centro de la colonia	Denso, ligeramente algodonoso en la parte central de la colonia	Sí, en la parte central y zonación concéntrica debido a los cambios de color	Centro naranja grisáceo Mt: 5B2 con tonos crema cambiando hacia el margen a rojizo pálido Mt:5C3, después a naranja gris pálido Mt:5B2 y finalmente a naranja pálido Mt:5A3	Café amarillento	Café rojizo oscuro Mt:7F6 en el centro, cambiando a café rojizo amarillento pálido Mt:5B6 y finalmente a amarillo rojizo pálido Mt:5A3	Café amarillento Mt:4B5 cambiando a amarillo Mt:5A5 y finalmente a amarillo pálido Mt:5A4
	Diámetro De hifas	Terminación de la hifa	Color	Morfología	Pared Celular	Densidad de hifas	Vesículas Intercalares	Fibulas	Cristales	Otros
microscópicas	(1.2-2.4-3.5(-3.9) μm	Redondeadas 3.9-7.9 μm	Amarillo claro Mt: 2A2 a café rojizo pálido	Septadas, filamentosas, con ramificaciones bifurcadas, sinuosas, de lisas a finamente incrustadas	Pared gruesa en 5 y 10 g/l de glucosa, delgada en 20, 30 y 40 g/l de glucosa	Compactas	sí, de 4.8–6.3 μm de diámetro	no	Cristales tetrahédricos	gúttulas y contenido citoplasmático birrefringente

Tlax 40 *Suillus lakeii* (Murr.) A.H. Sm. & Thiers (Kong Luz 2740) Figura 13h

macroscópicas	Crecimiento de la colonia	Margen	Superficie	Textura	Micelio	Pliegues radiales	Color	Exudados	Reverso	Color del medio
	irregular	Irregular a finamente fimbriado en 10 g/l de glucosa, festoneado en 20 g/l de glucosa	Lisa, plana	Algodonosa sobre el inóculo. Aterciopelado sobre el agar	Denso, compactado	Escasos pliegues radiales	Gris anaranjado Mt: 5B2 en toda la superficie a veces blanquecino Mt:5A1, en ocasiones color café amarillento Mt: 5E4	no	En el centro de la colonia café oscuro Mt:6F8 cambiando a gris naranja Mt: 5B2 en el margen	Café amarillento Mt:5E8
microscópicas	Diámetro De hifas	Terminacion de la hifa	Color	Morfología	Pared celular	Densidad de hifas	Vesículas intercalares	Fíbulas	Cristales	Otros
	(0.8-)1.2-3.5(-4.3) μm en la concentración 5 g/l de glucosa se presentó un diámetro de hasta 5.9 μm	Redondeadas, ensanchadas de 2.7-1.1 μm	Amarillento claro Mt:2A2	Septadas, filamentosas con ramificaciones bi y trifurcadas. Sinuosas. Lisas, en 10 g/l de glucosa se presentaron hifas dendríticas	Pared delgada raramente gruesa	compactas	sí, de 3.1-5.1 μm de diámetro	no	no	

TLAX 48 *Suillus pseudogranulatus* (Murr.) A.H.Sm. & Thiers (Galindo Flores 1862) Figura 13c

macroscópicas	Crecimiento de la colonia	Margen	Superficie	Textura	Micelio	Pliegues radiales	Color	Exudados	Reverso	Color del medio
	Circular, ligeramente lobulado	Finamente fimbriado, finamente lobulado en 20 g/l de glucosa	Plana, el centro de la colonia es convexo	aterciopelada	Algodonoso, denso, zonación concéntrica debido a los cambios de color	escasos	Café pálido sobre el inóculo Mt:5B2 cambiando a café amarillento pálido Mt:4B-C3, luego a café amarillento con tintes rojizos Mt:5C3 y el margen amarillo pálido Mt: 3A3	Si, escasos	Centro color café rojizo oscuro Mt: 7F5 cambiando a café rojizo Mt: 6F8 y el margen café amarillento Mt:5B6-5, con numerosos pliegues radiales	Café naranja pálido en el centro Mt:5B6 cambiando
microscópicas	Diámetro De hifas	Terminación de la hifa	Color	Morfología	Pared celular	Densidad de hifas	Vesículas intercalares	Fíbulas	Cristales	Otros
	(2.0-)2.4-3.9(-4.8) μm	Globosas de 3.5-7.1 μm de diámetro, ocasionalmente alantoides de 5.5 de diámetro	Café amarillento	Septadas, filamentosas, sinuosas, lisas en ocasiones con constricciones ramificaciones bifurcadas	Gruesa, escasamente de pared delgada	compactas	no	no	Numerosos en todas las concentraciones de formas estrelladas y romboides, a veces amorfos	Gúttulas y contendo citoplasmático birrefringente

Tlax 42 *Suillus subaureus* (Pk.) Snell (Galindo Flores 1852) Figura 13b

macroscópicas	Crecimiento de la colonia	Margen	Superficie	Textura	Micelio	Pliegues radiales	Color	Exudados	Reverso	Color del medio
	Circular, ligeramente irregular a lobulado en 10, 20 y 30g/l de glucosa. Ligeramente festoneado en 40 g/l de glucosa	fimbriado	plana	aterciopelada	Denso, compacto	numerosos	centro naranja grisáceo Mt:5B3 a gris naranja Mt:5B2, cambiando a amarillo grisáceo Mt:4B4 y luego a amarillo grisáceo Mt:1B3, margen naranja grisáceo Mt:6B3 a gris anaranjado Mt:6B2, raramente blanco amarillento Mt:4A2	exudados naranja café Mt:5C5 a hialinos en 20 y 30 g/l no se presentan	café oscuro Mt:7F8 en el centro, cambiando a naranja grisáceo Mt:5B), raramente amarillo dorado Mt:5B7, margen naranja pálido Mt:5A3, con pliegues radiales	color café Mt:6-7E8 cambian do a amarillo claro Mt:4A5 hacia el margen
microscópicas	Diámetro De hifas	Terminación de la hifa	Color	Morfología	Pared celular	Densidad de hifas	Vesículas intercalares	Fíbulas	Cristales	Otros
	(1.2-)1.6-3.1(-3.9) μm	redondas, ensanchadas de 2.74 μm de diámetro, a veces en punta	color amarillento claro Mt:2A2	septadas, filamentosas con pocas ramificaciones bifurcadas y raramente trifurcadas, lisas, sinuosas	delgada y raramente gruesa	densas	sí, de 5.48-5.88 μm de diámetro	no	no	

TLAX 53 *Suillus subaureus* (Pk.) Snell (Galindo Flores 1883) Figura 13f

macroscópicas	Crecimiento de la colonia	Margen	Superficie	Textura	Micelio	Pliegues radiales	Color	Exudados	Reverso	Color del medio
	Circular, ligeramente lobulado en 10, 30 y 40 g/l	fimbriado	plana	aterciopelada	laxo	Sólo en 10 g/l de glucosa se presentan muy escasos	gris con tonos café Mt:5C2 con tonos blanquecinos hacia el margen y tonos color café grisáceo Mt:5E3 en el centro, zonación concéntrica en 20, 30 y 40 g/l de glucosa	no	café amarillento Mt:5D6 en el centro, cambiando hacia el margen a naranja pálido Mt:5A3 y finalmente a blanco amarillento Mt:4A2	naranja grisáceo Mt:5B4 cambiando a amarillo pálido Mt:4A3
microscópicas	Diámetro De hifas	Terminación de la hifa	Color	Morfología	Pared celular	Densidad de hifas	Vesículas intercalares	Fibulas	Cristales	Otros
	(1.2)1.6-2.7(-3.1) μ m de diámetro	en puntas, raramente con terminaciones alantoideas	color amarillento pálido Mt:2A2	septadas, anastomosadas, filamentosas, raramente con ramificaciones bifurcadas; sinuosas, lisas	gruesa	compacto	no	no	no	con gúttulas sólo en 5 y 10 g/l, presentan contenido citoplasmático birrefringente

TLAX 51 *Suillus* sp. (Galindo Flores1869) Figura 13e

macroscópicas	Crecimiento de la colonia	Margen	Superficie	Textura	Micelio	Pliegues radiales	Color	Exudados	Reverso	Color del medio
	Irregular, ligeramente lobulado	Finamente fimbriado	plana	aterciopelada	laxo	escasos	amarillo pálido Mt:4A2 con ligeros tonos amarillo grisáceos Mt:4B3	Sólo en 20 g/l, hialinos	amarillo pálido Mt:4A2 con ligeros tonos amarillo grisáceos Mt:4B3	amarillo pálido Mt:4A2 con ligeros tonos amarillo grisáceo Mt:4B3
microscópicas	Diámetro De hifas	Terminacion de la hifa	Color	Morfología	Pared celular	Densidad de hifas	Vesículas intercalares	Fíbulas	Cristales	Otros
	amarillo pálido Mt:4A2 con ligeros tonos amarillo grisáceos Mt:4B3	puntas redondeadas de 4.70-5.88 μ m de diámetro, raramente con terminaciones parietales o alantoideas de 4.70 μ m.	color amarillento claro Mt:2A2 en polivinil alcohol	septadas, filamentosas con ramificaciones bifurcadas, sinuosas, lisas	gruesa y raramente de pared delgada	compacta	pocas vesículas intercalares de 3.92-5.88 μ m de diámetro	no	no	contenido citoplasmático birrefringente

TLAX 55 *Suillus* sp. (Montoya Esquivel 1534) Figura 13a

macroscópicas	Crecimiento de la colonia	Margen	Superficie	Textura	Micelio	Pliegues radiales	Color	Exudados	Reverso	Color del medio
	Circular, irregular a ligeramente lobulado en 40 g/l de glucosa	estriado	Plana, convexa en 10 g/l de glucosa	Algodonosa, aterciopelada en 30 g/l de glucosa	Laxo, denso	no	café grisáceo oscuro Mn:2.5Y 4/2 sobre el inóculo, cambiando a amarillo pálido Mn:2.5Y 7/3, margen blanquecino Mn:2.5Y 8/1	no	café amarillento Mn:10YR 5/6 en el centro de la colonia, cambiando a amarillo café Mn:2.5Y 7/8, margen amarillo pálido Mn:2.5Y 8/6	sólo en la zona cercana al margen de la colonia hay cambio de color a amarillo café pálido Mn:2.5Y 8/8
microscópicas	Diámetro De hifas	Terminación de la hifa	Color	Morfología	Pared celular	Densidad de hifas	Vesículas intercalares	Fíbulas	Cristales	Otros
	(1.6-)2.0-3.5 (-3.9) μm de diámetro	globosas de 3.1-3.9 μm de diámetro, terminaciones alantoideas de 4.7-7.1 μm ; se observaron prolongaciones parietales	amarillo pálido Mt:2A2	septadas, lisas, filamentosas, con ramificaciones bifurcadas; algunas sinuosas y raramente tortuosas, otras con constricciones	delgada y en 5 y 40 g/l se observaron hifas con pared gruesa	compactas	sí, 2.74-3.92 μm de diámetro	no	cristales incrustados	Incrustaciones nodulares, gúttulas, pústulas en 5, 10 y 20 g/l y contenidos birrefringentes en 10 g/l

TLAX 44 *Suillus* sp. (Kong Luz 2650) Figura 13g

Macroscópicas	Crecimiento de la colonia	Margen	Superficie	Textura	Micelio	Pliegues radiales	Color	Exudados	Reverso	Color del medio
	Circular, irregular en 10, 30 40 g/l de glucosa	Regular, ligeramente fimbriado	plana	Aterciopelada, en el centro es algodonoso	denso	si	homogéneo en toda la colonia, blanco amarillento Mt:3A2 a amarillo pálido Mt:4A3, margen blanco amarillento Mt:2A2	Escasos, color café claro y hialino	centro color café oscuro Mt:7F8 cambiando a color café Mt:7E6 y en el margen rojo pastel Mt:7A4	entre amarillo café Mt:5C7 y color naranja café Mt:5C6
Microscópicas	Diámetro De hifas	Terminación de la hifa	Color	Morfología	Pared celular	Densidad de hifas	Vesículas intercalares	Fíbulas	Cristales	Otros
	1.6-3.9 μm de diámetro, en 40 g/l de glucosa se presentó un diámetro hasta de 4.3 μm	globosas de 3.1-4.3 μm de diámetro	amarillo pálido Mt:3A2	Septadas, lisas, filamentosas, con escasas ramificaciones bifurcadas, sinuosas hasta tortuosas, a veces con constricciones	delgada y en algunas ocasiones gruesa	compactas	de 3.13-3.52 μm de diámetro	no	no	gúttulas y prolongaciones parietales. En 30 y 40 g/l se observan pústulas

Para los hongos filamentosos como los ascomicetos y deuteromicetos, la morfología macro y microscópica de las colonias cuando se cultivan *in vitro*, se ha considerado como un carácter taxonómico importante. Sin embargo, para el caso de los hongos ectomicorrizógenos, su clasificación depende tradicionalmente de los caracteres de los carpóforos sin contemplar la descripción morfológica colonial debido a que aún es limitado el número de especies estudiadas desde este punto de vista (Hutchinson, 1991).

No obstante, el estudio de las características morfológicas de los hongos ectomicorrizógenos resulta ser de gran relevancia para evaluar las respuestas en estudios fisiológicos pesar de la gran variabilidad que se ha reportado en este tipo de hongos (Hutchinson, 1991; Santiago-Martínez, 1992).

En este estudio se observó que en las dos cepas de *Amanita*, presentaron una coloración blanquecina en toda su superficie con ligeros tonos amarillentos-grisáceos, con un margen de circular a irregular debido a pequeños lóbulos, en ocasiones márgenes lobulado-festoneados o lobulado-fimbriados. La textura fue aterciopelada, con micelio denso y una superficie plana. Únicamente la cepa TLAX 41 originó cambio de coloración en el medio, el cual fue de rosa violáceo a rosado pálido. Microscópicamente se presentaron hifas septadas, con fibulas (Figura 12d), hialinas, de pared delgada, con un diámetro de (0.8-)1.2-3.5(-3.9) μm , siendo menor que las cepas de *Suillus*, con ramificaciones bifurcadas, lisas, en ocasiones sinuosas, con algunas vesículas intercalares (Figura 12e) con un diámetro de 3.1-4.3(-5.9) μm , con hifas con terminaciones globosas de 3.1-5.1(-7.8) μm . Los resultados obtenidos coinciden con la morfología obtenida para varias especies de *Amanita* por Cruz-Ulloa (1990), Santiago-Martínez (1992) y Vázquez García *et al.* (2002).

En las cepas de *Suillus*, hubo una gran variación macroscópica en la coloración, textura y grado de compactación. Con respecto a la coloración, todas presentaron tonos que van desde los amarillos pálidos a los cafés amarillentos y cafés rosado pálido. En algunas se evidenciaron zonaciones concéntricas debido a los cambios de coloración y numerosos pliegues radiales (TLAX 44, TLAX 42, TLAX 48 y TLAX 49, Figura 13), en tanto otras mostraron coloraciones homogéneas sobre toda su superficie y escasos pliegues radiales (TLAX 40, TLAX 51, TLAX 53 y TLAX 55) (Figura 13). La forma de la colonia fue de circular a irregular lobulada, con un margen finamente fimbriado, de superficie plana a ligeramente convexa. La textura se observó de aterciopelada

con micelio creciendo muy laxo a algodonosa con micelio muy denso y compacto. Asimismo, en el medio ocurrieron cambios de coloración, los cuales fueron de color café amarillento a color café rojizo en el margen de la colonia, con una gradación hacia tonos más claros conforme el margen se aleja. También se observaron exudados de color amarillento a color café oscuro en algunas de las cepas. Microscópicamente, las cepas de *Suillus* presentaron hifas septadas, sin fibulas, con pared generalmente gruesa, color amarillo pálido, con ramificaciones bifurcadas, sinuosas hasta tortuosas, a veces con constricciones, con un diámetro de (1.2-)1.6-3.9(-4.3) μm , con vesículas intercalares con un diámetro de (2.7-) 3.5-6.3(-7.4) μm , en la mayoría de las cepas se presentaron hifas con terminaciones globosas de 3.1-3.9(-4.4) μm , también se observaron gúttulas e incrustaciones. Características macro y microscópicas similares fueron reportadas por Pantidou y Groves (1966), Cruz-Ulloa (1990), Santiago-Martínez (1992), Vázquez García *et al.* (2002) y Aquiahuatl (2003).

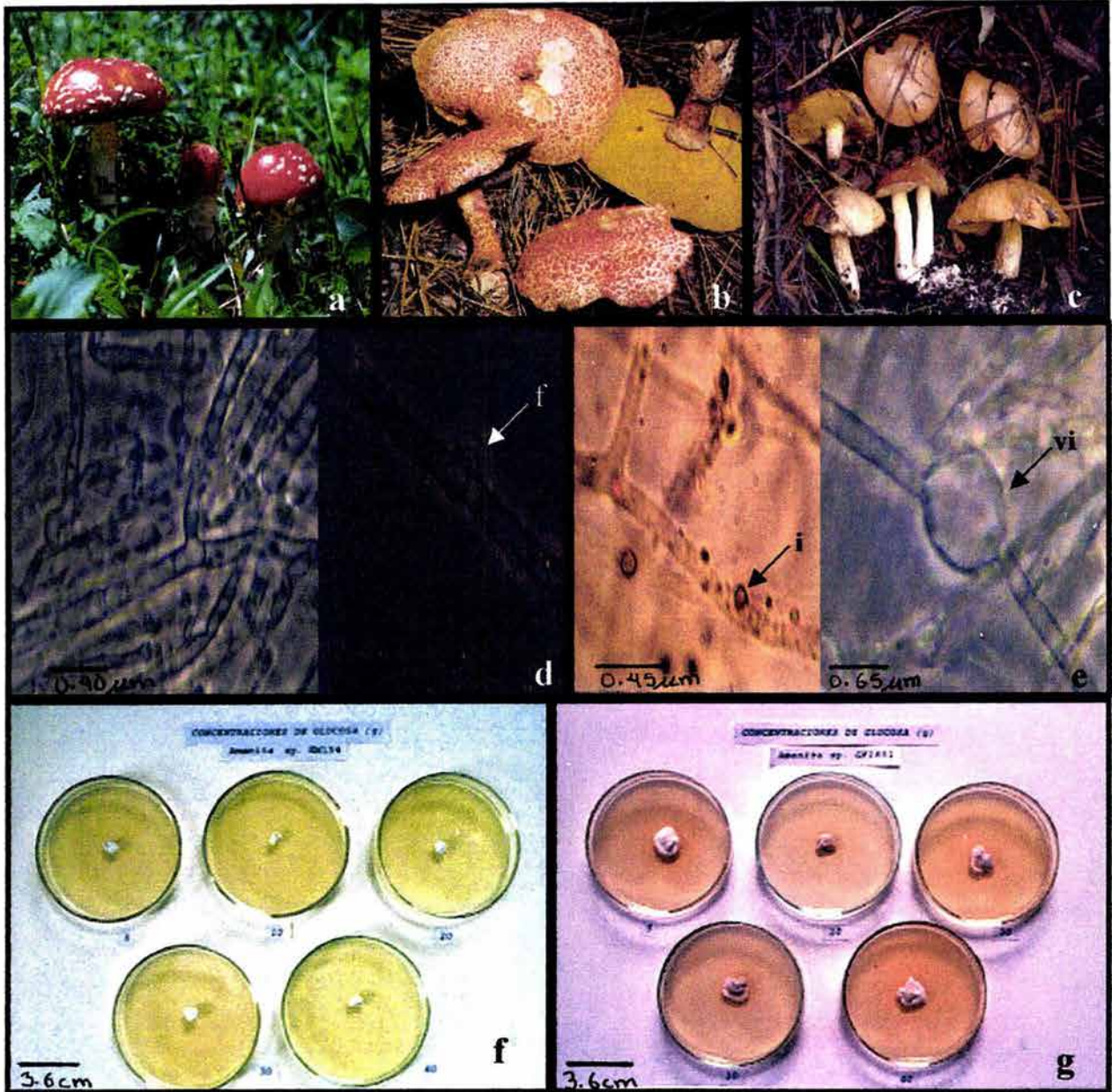


Figura 12. Carpóforos y crecimiento micelial de las cepas estudiadas a los 30 días. a. *Amanita muscaria*, b. *Suillus lakei*, c. *Suillus* sp., d. Micelio de *Amanita muscaria* mostrando fíbulas (f), e. Micelio de *Suillus* sp. mostrando incrustaciones (i) y vesículas intercalares (vi), f. Cepa TLAX 4 (*Amanita barrowsii*) creciendo en cinco concentraciones de glucosa, g) Cepa TLAX 41 (*Amanita muscaria*) creciendo en cinco concentraciones de glucosa.

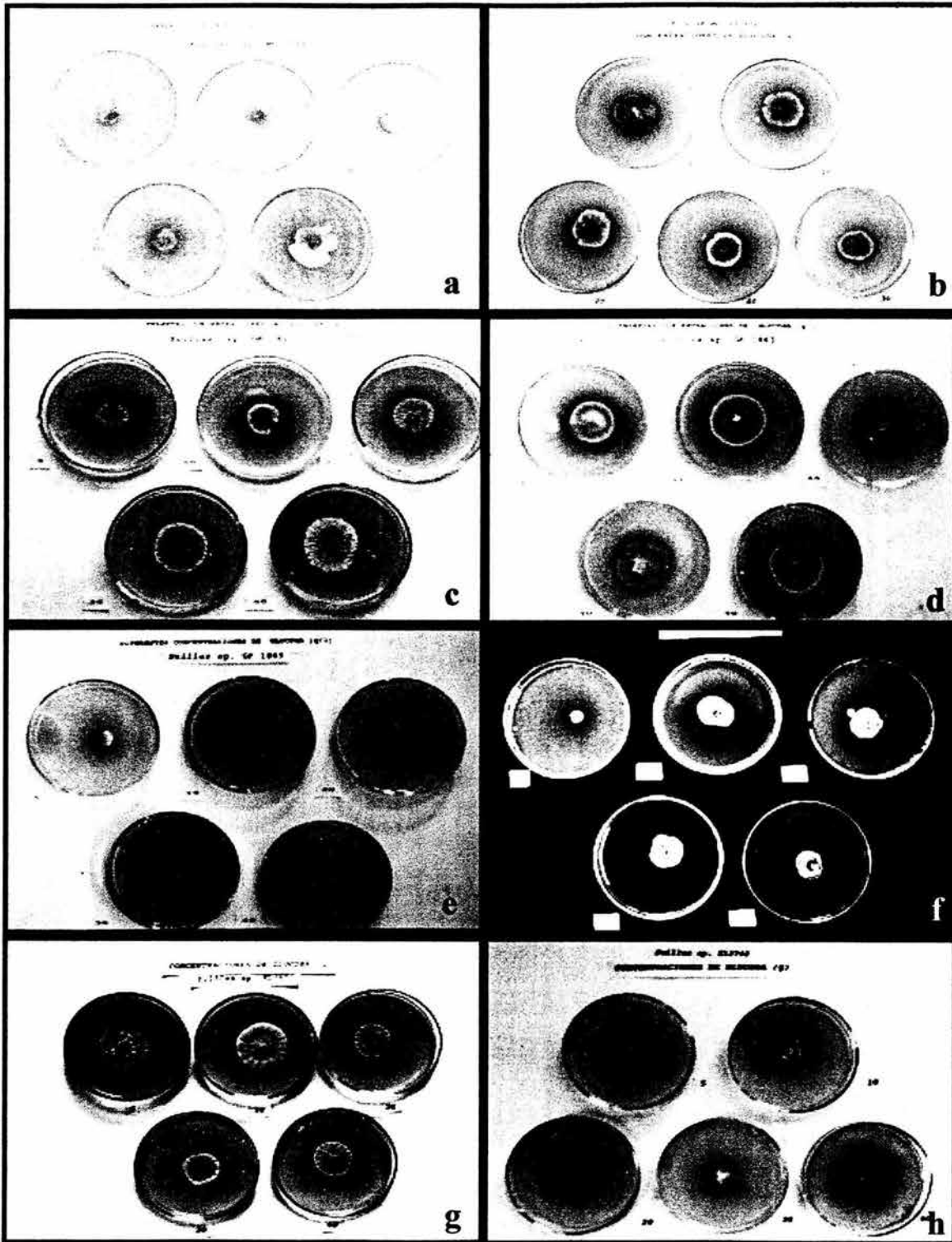


Figura 13. Cepas de *Suillus* spp. a los treinta días de crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa. a. TLAX55 (*Suillus* sp.), b. TLAX 42 (*S. subaureus*), c. TLAX 48 (*S. pseudogranulatus*), d. TLAX 49 (*S. glandulosipes*), e. TLAX 51 (*Suillus* sp.), f. TLAX 53 (*S. subaureus*), g. TLAX 44 (*Suillus* sp.), h. TLAX 40 (*S. lakei*).

3.13.4 EVALUACIÓN DE LA TASA MEDIA DE CRECIMIENTO, CRECIMIENTO RADIAL, BIOMASA Y RELACIÓN BIOMASA/ÁREA.

CEPAS DE AMANITA

Tasa media de crecimiento

Al comparar los resultados obtenidos en las cinco concentraciones para cada una de las cepas, se observó que para la cepa TLAX 4 no hubo diferencias estadísticas significativas entre las cinco concentraciones; para la cepa TLAX 41 el valor más alto se observó en 40 g/l de glucosa, los valores medios se presentaron en las concentraciones 5, 20 y 30 g/l y el más bajo en 10 g/l de glucosa (Gráfica 1, Anexo: Cuadro 13).

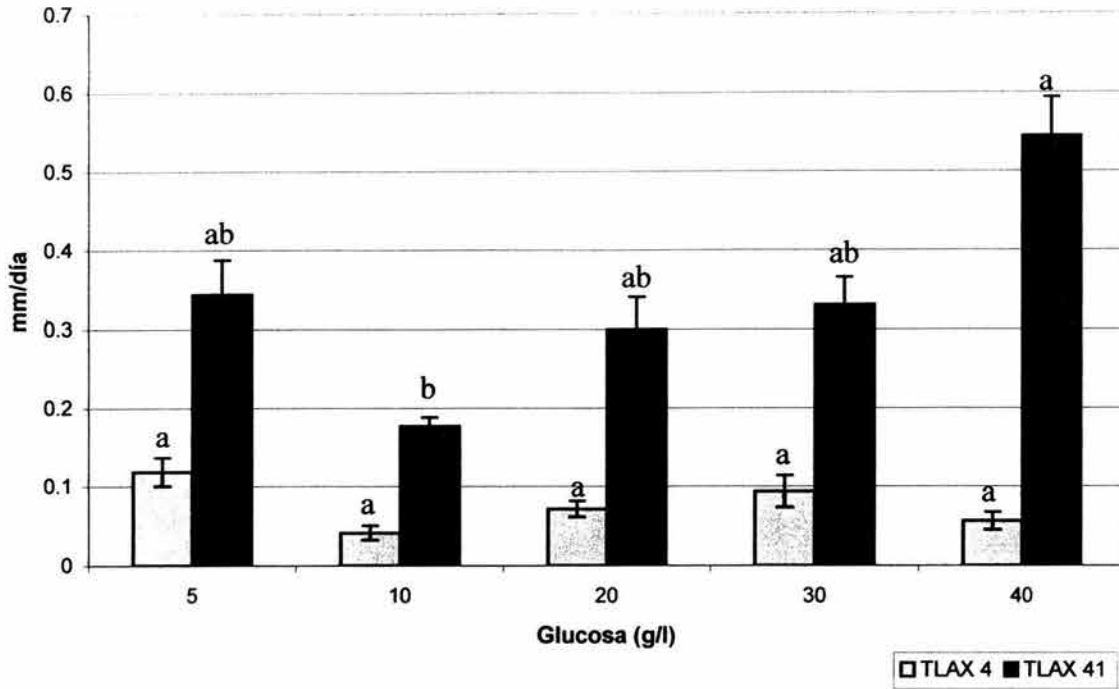
Crecimiento radial

Con base en los resultados obtenidos con el análisis de varianza simple y la prueba de intervalos múltiples de Tukey, al comparar las cinco concentraciones de glucosa por cepa se encontró que para la cepa TLAX 4 no hubo diferencias estadísticas significativas. No obstante para la TLAX 41 el valor mas alto de crecimiento se manifestó en las concentraciones 5 y 40 g/l de glucosa, aunque esta última no tuvo diferencias estadísticas con los valores obtenidos en las concentraciones 20 y 30 g/l, los cuales fueron intermedios, y en la concentración de 10 g/l de glucosa se alcanzó el valor más bajo (Gráfica 2, Anexo: Tabla 13).

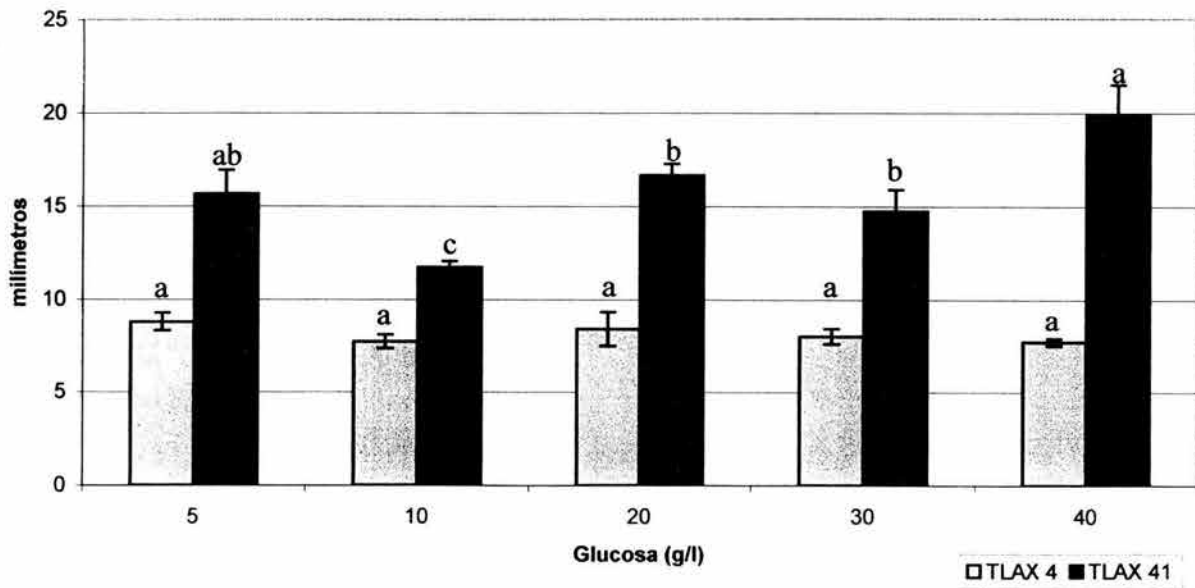
Biomasa

En cuanto a esta variable, al evaluar el efecto de la concentración para cada una de las cepas, se encontró que la TLAX 4 no tuvo diferencias estadísticamente significativas entre las cinco concentraciones. Sin embargo, la cepa TLAX 41 presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos, siendo la concentración de 40 g/l de glucosa en donde se observó el valor más alto con respecto a la concentración de 5 g/l, que mostró el valor más bajo; en las concentraciones restantes los valores fueron más homogéneos, por lo que no hubo diferencias estadísticamente significativas, (Gráfica 3, Anexo: Cuadro 14).

Gráfica 1. TASA MEDIA DE CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS DE DOS CEPAS DE AMANITA EN CINCO CONCENTRACIONES DE GLUCOSA

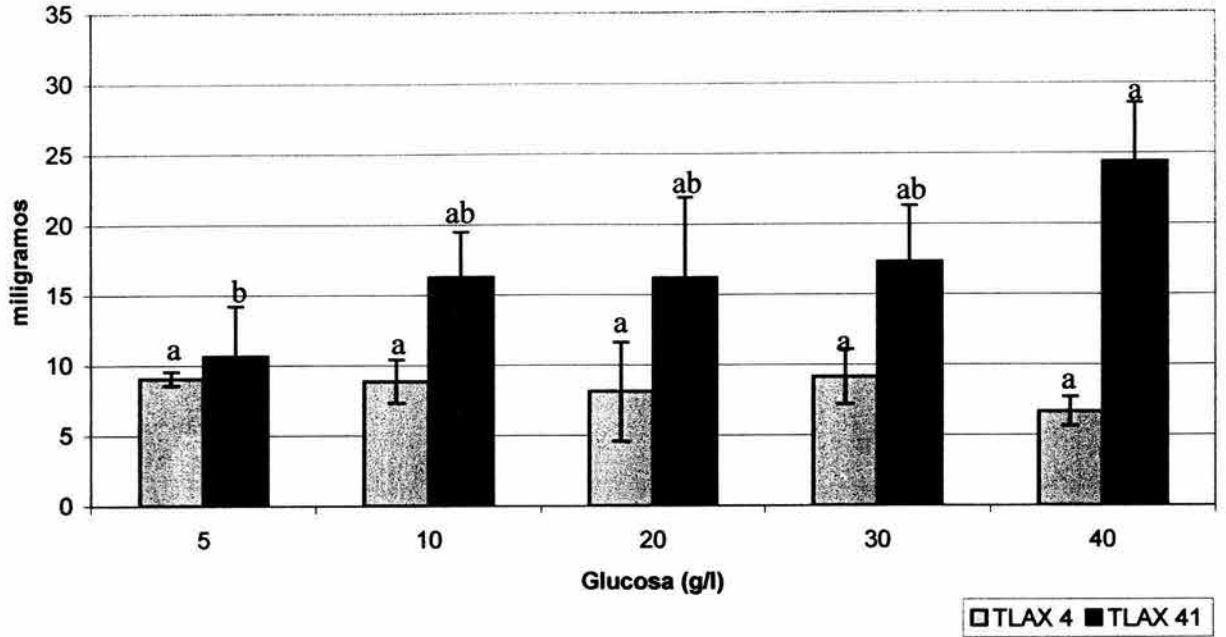


Gráfica 2. CRECIMIENTO RADIAL DE LAS COLONIAS DE DOS CEPAS DE AMANITA EN CINCO CONCENTRACIONES DE GLUCOSA

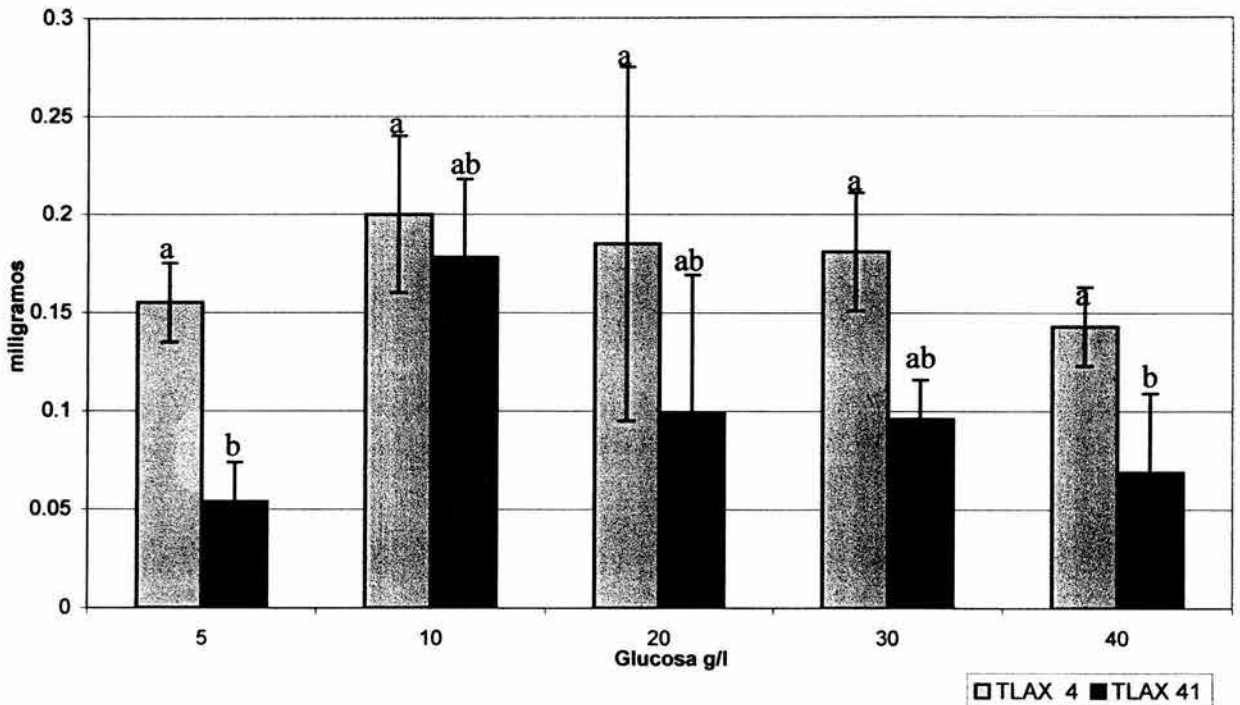


x: Valor promedio de quince repeticiones δ: Error estándar
 Letras iguales por cepa no hay diferencias estadísticamente significativas

Gráfica 3. BIOMASA DE LAS COLONIAS DE DOS CEPAS DE AMANITA EN CINCO CONCENTRACIONES DE GLUCOSA



Gráfica 4. RELACIÓN BIOMASA/ÁREA DE DOS CEPAS DE AMANITA EN CINCO CONCENTRACIONES DE GLUCOSA



x: Valor promedio de quince repeticiones δ: Error estándar
 Letras iguales por cepa no hay diferencias estadísticamente significativas

Relación biomasa/área

Al comparar los valores obtenidos en las cinco concentraciones de la cepa TLAX 4, se determinó que éstas no presentaron diferencias estadísticas. Para la cepa TLAX 41, en la concentración de 10 g/l de glucosa se obtuvo el valor más alto estadísticamente significativo con respecto a las concentraciones 5 y 40 g/l, y en las concentraciones restantes no se presentaron diferencias significativas (Gráfica 4, Anexo: Cuadro 14).

En general se puede observar que la cepa TLAX 4 presentó los valores más bajos en la tasa media de crecimiento, el diámetro final y la biomasa con respecto a la cepa TLAX 41, sin diferencias estadísticas entre los cinco tratamientos. Sin embargo en la relación biomasa/área obtuvo valores más altos que la cepa TLAX 41, pero sin diferencias entre las cinco concentraciones.

Contrario a esto, en las cuatro variables de la cepa TLAX 41, se encontraron diferencias estadísticas, siendo en la concentración de 40 g/l de glucosa en donde se evidenciaron los valores más altos en la tasa media de crecimiento, el crecimiento radial y la biomasa. No obstante, para la relación biomasa/área máximo valor se obtuvo en la concentración 10 g/l de glucosa, es decir que el micelio creció más denso. Todo lo anterior es indicativo de que los requerimientos de carbohidratos son elevados y que pueden estar relacionados con el tipo de estrategia del hongo, es decir, si forma asociación micorrízica con árboles juveniles o maduros.

CEPAS DE SULLUS

Tasa media de crecimiento

Al evaluar el efecto de las concentraciones sobre la tasa media de crecimiento por cepa, resultó que las cepas TLAX 40 y 49 no presentaron diferencias estadísticas entre los valores obtenidos en las cinco concentraciones de glucosa. Para la cepa TLAX 44 los valores más altos se reunieron en las concentraciones de 5 y 10 g/l de glucosa; contrario a esto, para la cepa TLAX 48 los valores más altos, estadísticamente significativos, se obtuvieron en las concentraciones de 30 y 40 g/l y para la cepa TLAX 55 en 40 g/l. Asimismo, hubo dos cepas que manifestaron un crecimiento indistinto a excepción de concentraciones extremas, tal es el caso de la cepa TLAX 53 que tuvo la menor tasa de crecimiento en 5 g/l de glucosa y la cepa TLAX 42 que presentó su menor crecimiento en 40 g/l. Finalmente la cepa TLAX 51 presentó los valores más altos de crecimiento

en las concentraciones 10,30 y 40 g/l de glucosa siendo estadísticamente diferentes de 5 y 20 g/l (Gráfica 5, Anexo: Cuadro 15).

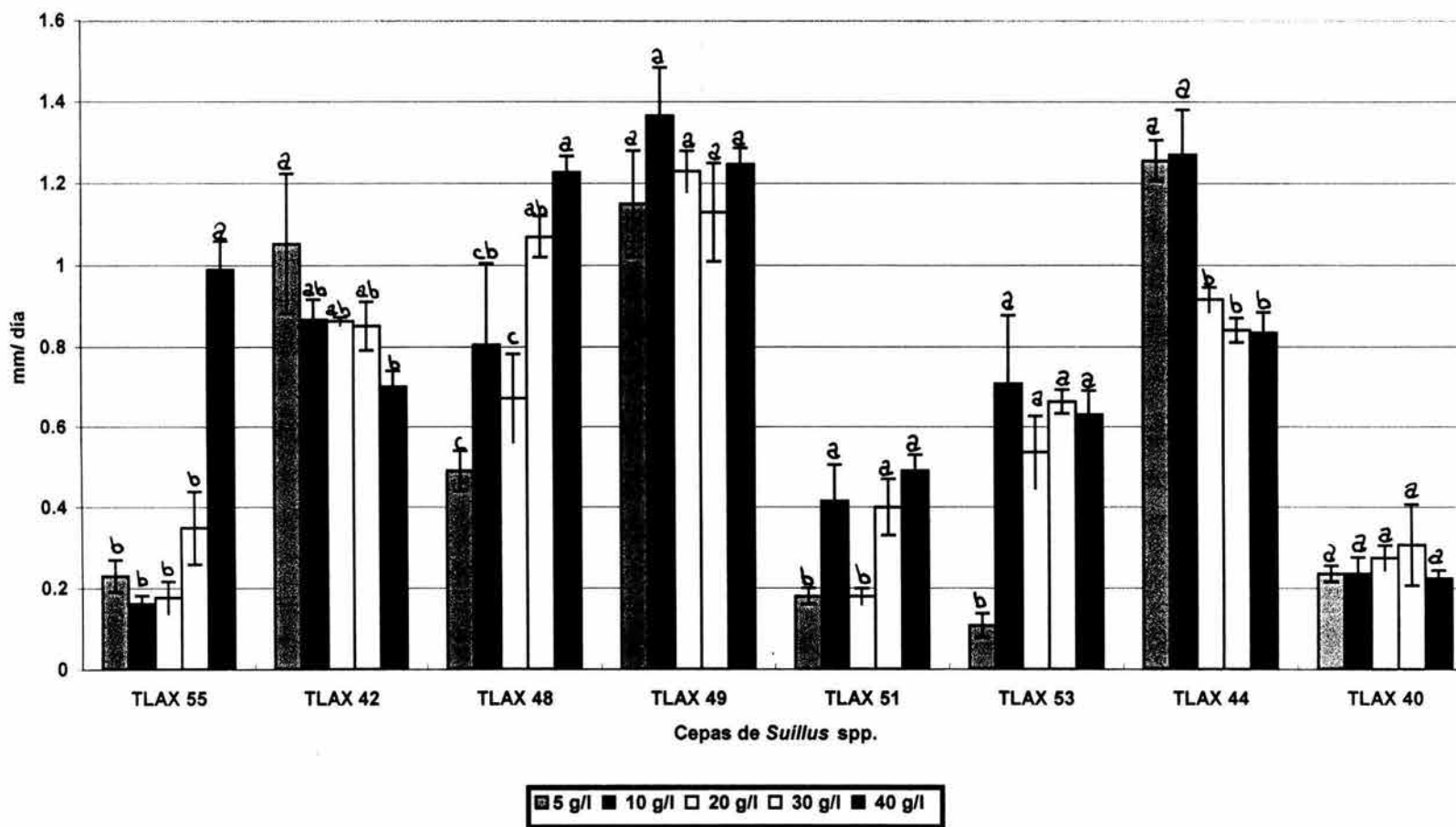
Crecimiento radial

Al evaluar el efecto de las concentraciones de glucosa por cepa, la TLAX 49 presentó los valores más altos pero sin diferencias estadísticas entre las cinco concentraciones de glucosa. La cepa TLAX 48 obtuvo sus máximos valores de crecimiento radial en las concentraciones 30 y 40 g/l de glucosa conjuntamente con la cepa TLAX 55 que alcanzó el valor más alto de crecimiento en la concentración de 40g/l, siendo estadísticamente significativo con respecto a las concentraciones 5, 10, 20 y 30 g/l de glucosa. La cepa TLAX 44 tuvo los valores máximos de crecimiento en las concentraciones 5 y 10 g/l de glucosa siendo estadísticamente significativos de las concentraciones restantes. Asimismo, la cepa TLAX 53 presentó un crecimiento indistinto, a excepción de la concentración en 5 g/l de glucosa, en donde obtuvo su valor más bajo crecimiento. Finalmente las cepas TLAX 40, TLAX 42 y TLAX 51 mostraron un crecimiento indistinto en las cinco concentraciones (Gráfica 6, Anexo: Cuadro 16).

Biomasa

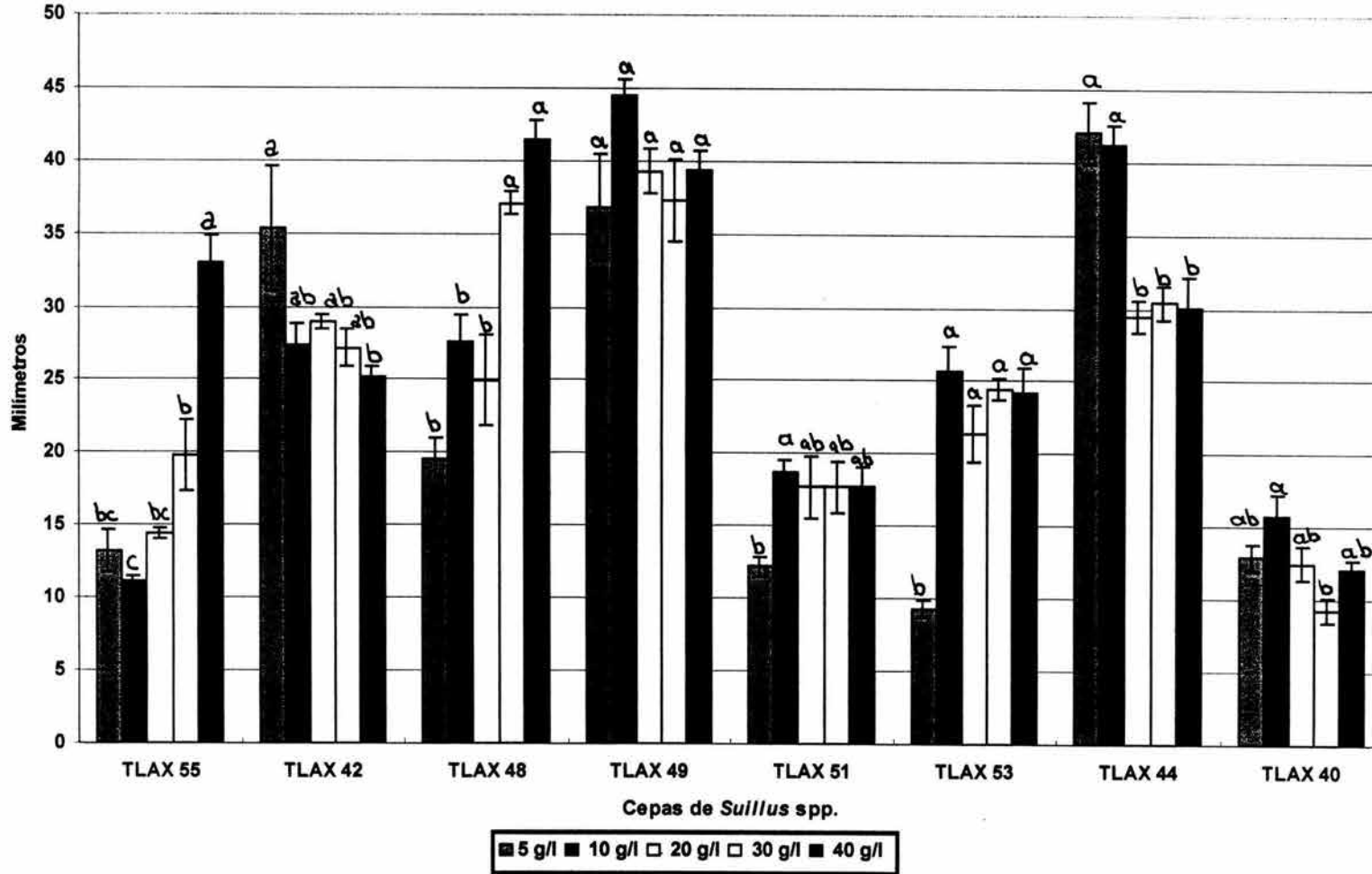
Al comparar el efecto de las concentraciones por cepa resultó que la TLAX 48 y TLAX 55 tuvieron sus valores máximos de crecimiento en concentraciones altas de glucosa (30 y 40 g/l), no habiendo diferencias estadísticas entre el resto de las concentraciones. Las cepas TLAX 51 y TLAX 53 presentaron los valores más bajos de biomasa en la concentración de 5 g/l de glucosa, siendo estadísticamente significativos con respecto a las cuatro concentraciones restantes. La cepa TLAX 44 presentó su mayor biomasa en la concentración de 10 g/l de glucosa y entre las demás concentraciones no presentó diferencias estadísticas. Finalmente las cepas TLAX 40, TLAX 42 y TLAX 49 presentaron un crecimiento indistinto en las cinco concentraciones de glucosa (Gráfica 7, Anexo: Cuadro 17).

Gráfica 5. TASA MEDIA DE CRECIMIENTO DE LAS COLONIAS DE OCHO CEPAS DE *SUILLUS* EN CINCO CONCENTRACIONES DE GLUCOSA



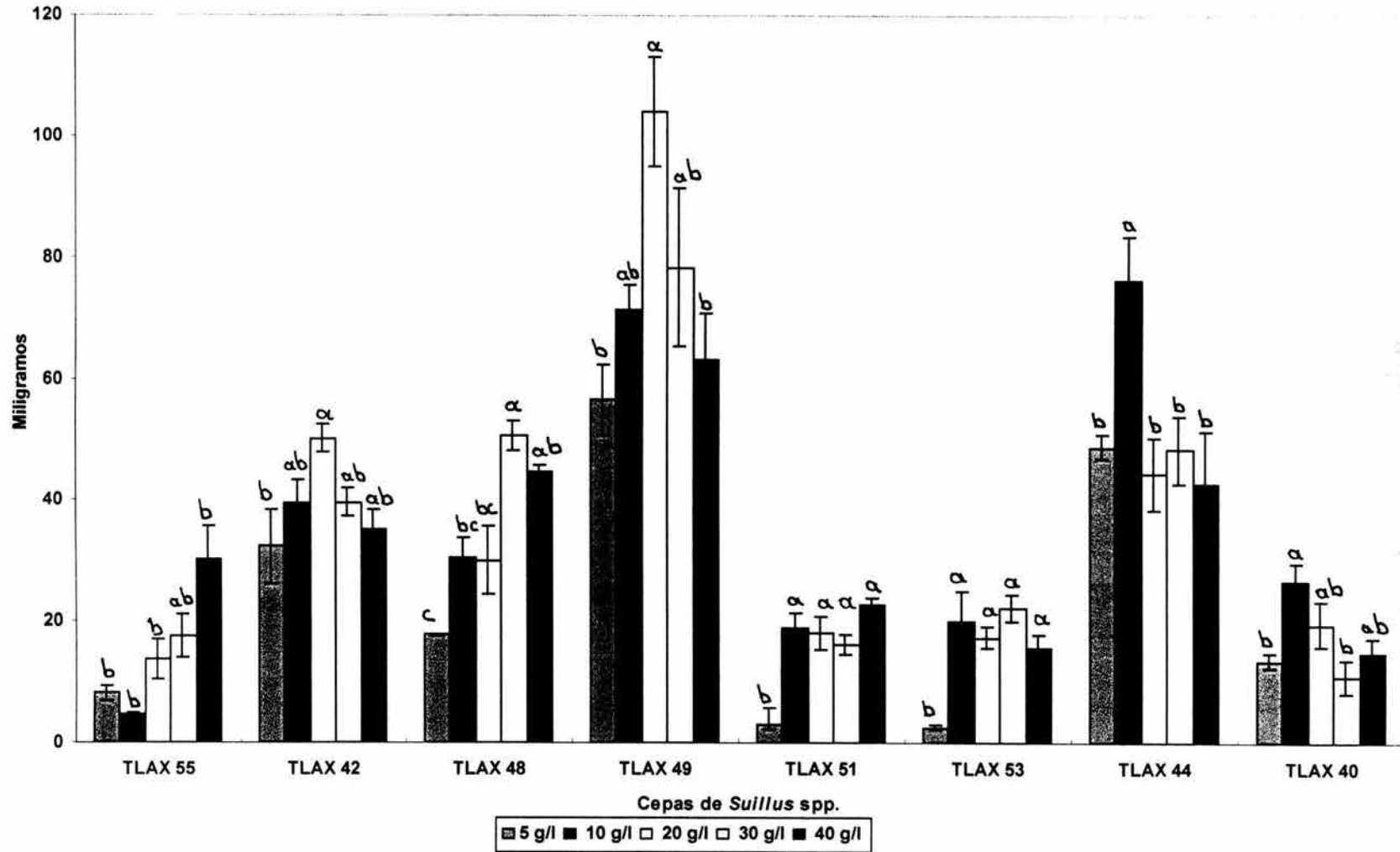
x: Valor promedio de quince repeticiones δ: Error estándar
 Letras iguales por cepa no hay diferencias estadísticamente significativas

Gráfica 6. CRECIMIENTO RADIAL DE LAS COLONIAS DE OCHO CEPAS DE *SUILLUS* EN CINCO CONCENTRACIONES DE GLUCOSA



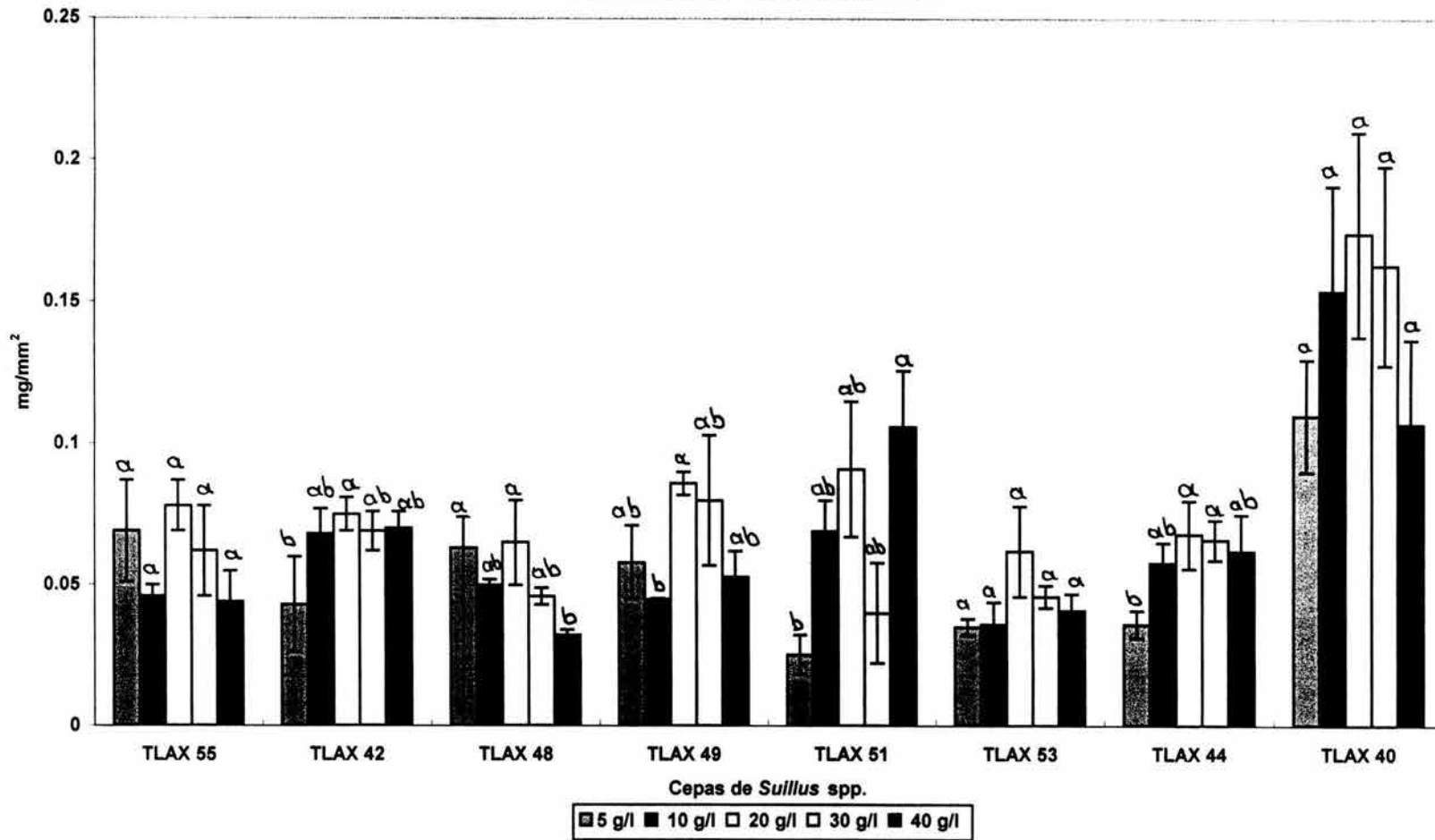
x: Valor promedio de quince repeticiones δ : Error estándar
 Letras iguales por cepa no hay diferencias estadísticamente significativas

Gráfica 7. BIOMASA DE LAS COLONIAS DE OCHO CEPAS DE *SUILLUS* EN CINCO CONCENTRACIONES DE GLUCOSA



x: Valor promedio de quince repeticiones δ: Error estándar
 Letras iguales por cepa no hay diferencias estadísticamente significativas

Gráfica 8. RELACIÓN BIOMASA/ÁREA (mg/mm²) DE LAS COLONIAS DE OCHO CEPAS DE *SULLUS* EN CINCO CONCENTRACIONES DE GLUCOSA



x: Valor promedio de quince repeticiones δ: Error estándar
 Letras iguales por cepa no hay diferencias estadísticamente significativas

Relación biomasa/área

Al evaluar el efecto de la concentración por cepa reveló que las cepas TLAX 40, TLAX 53 y TLAX 55 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las cinco concentraciones de glucosa. Por otra parte, en las cepas restantes (TLAX 42, TLAX 44, TLAX 48, TLAX 49 y TLAX 51), aunque existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, no hubo un patrón definido en cuanto a preferencias de crecimiento en alguna de ellas (Gráfica 8, Anexo: Cuadro 18).

Con los resultados obtenidos en las diferencias en biomasa, crecimiento radial, tasa media de crecimiento y relación biomasa/área, tanto para las cepas de *Suillus* como las de *Amanita*, conforman cuatro grupos.

- 1) Cepas que tienen sus valores máximos de crecimiento en concentraciones bajas de glucosa; en este caso se ubicó a la cepa TLAX 44, que registró sus valores máximos de crecimiento en las concentraciones de 5 y 10 g/l de glucosa para biomasa, crecimiento radial y tasa media de crecimiento; aunque para la relación biomasa/área no tuvo preferencias hacia cierta concentración de glucosa.
- 2) Cepas que se desarrollan bien en altas concentraciones de glucosa, como la cepa TLAX 48 que tuvo los valores máximos de crecimiento en las concentraciones 30 y 40 g/l de glucosa, y la cepa TLAX 55, que aunque en general presentó valores bajos con respecto a las demás cepas, obtuvo su máximo crecimiento en la concentración 40 g/l. Sin embargo para la relación biomasa/área no se definió un patrón de crecimiento entre las cinco concentraciones de glucosa.
- 3) Cepas que crecen indistintamente en cualquier concentración de glucosa utilizadas, con excepción de 5 g/l, como la cepa TLAX 53 que mostró esta forma de crecimiento para la tasa media de crecimiento, crecimiento radial y biomasa. No obstante, para la relación biomasa/área no hubo diferencias estadísticas entre las cinco concentraciones de glucosa.
- 4) Cepas que crecen bien en cualquier concentración de glucosa como la TLAX 4, TLAX 41, TLAX 42, TLAX 49, TLAX 40, y TLAX 51.

Lo anterior es indicativo de que las cepas estudiadas tienen diferentes estrategias de crecimiento, las cuales están determinadas por la capacidad que tiene el hongo por explorar, explotar y optimizar los recursos disponibles en el medio donde se desarrollan.

El hecho de que se observen diferentes requerimientos de glucosa (fuente de carbono) de las distintas cepas estudiadas se puede explicar considerando dos factores:

I. Las fases sucesionales de los hongos con respecto a la edad de la planta, esta es una de las interacciones más importantes que se da entre las distintas especies de hongos durante el crecimiento de la planta hospedera (edad). Se basa en la presencia de cuerpos fructíferos de diferentes especies de hongos a lo largo del desarrollo de los árboles en condiciones naturales (Miller, 1983), por lo que se considera que hay hongos que se asocian con árboles maduros y otros que lo hacen con árboles juveniles, denominándose a este proceso como etapas tardías y tempranas, respectivamente (Deacon y Fleming, 1992). Algunos autores han observado que la aparición de los hongos ectomicorrizógenos en un bosque, se da en secuencias tanto en espacio como en tiempo durante la conformación del sistema radical de un árbol (Thomas *et al.*, 1983; Dighton *et al.*, 1986). Este tipo de estudios sugiere una clara distinción entre hongos micorrizógenos de etapas tempranas y de etapas tardías. Estos términos están en función del tiempo durante el cual aparecen cuerpos fructíferos con relación a la edad del árbol, sin embargo, algunos hongos de etapas tempranas no se asocian exclusivamente con árboles jóvenes (Deacon y Fleming, 1992).

Los hongos de etapas tempranas se caracterizan porque los cuerpos fructíferos se desarrollan al mismo tiempo sus hospederos. Tanto los cuerpos fructíferos y micorrizas se localizan cerca de la periferia del sistema radical; colonizan a partir de inóculo esporal o micelial adicionado en suelo no estéril; persisten cuando las plántulas inoculadas asépticamente son trasplantadas al suelo; tienen una baja demanda de azúcar para su crecimiento y colonización en condiciones *in vitro*, y esta última no se ve afectada por bajos contenidos de fósforo *in vitro*. Las esporas de estos hongos germinan en cultivo *in vitro* sin la necesidad del hospedero o también con la presencia de las raíces de una planta (Deacon y Fleming, 1992).

Los hongos de etapas tardías, por su parte, se caracterizan porque los cuerpos fructíferos aparecen cuando los árboles son maduros, las esporas o el micelio no colonizan a la planta cuando son adicionados al suelo en condiciones *ex vitro*, también es difícil que persistan cuando son inoculados a plántulas en condiciones asépticas ya que tienen una alta demanda de azúcar para su crecimiento y colonización en ambas condiciones (Deacon y Fleming, 1992).

Con respecto a la capacidad de colonización, Bâ y colaboradores (1994) señalaron que las cepas de etapas tempranas tienen bajos requerimientos de carbohidratos con respecto a las cepas de etapas tardías, los cuales son proporcionados por el sistema radical de la planta juvenil. Esto lo corroboraron al evaluar el efecto de una excisión total y parcial de los cotiledones en plántulas de *Azelia africana* sobre la formación de la micorriza al ser inoculadas con hongos ectomicorrizógenos de etapas tempranas y tardías de la planta. Tales autores encontraron que la excisión parcial y total de los cotiledones disminuyó drásticamente el crecimiento de las raíces y consecuentemente disminuyó la concentración de azúcar en *A. africana*. Esto repercutió en la capacidad del hongo micorrizógeno para colonizar a la plántula. Asimismo, concluyeron que una planta en fase juvenil presenta un área foliar pequeña; consecuentemente, la cantidad de carbohidratos producidos mediante la fotosíntesis es mínima, y debido a esto es poca la cantidad de carbono disponible para el hongo ectomicorrizógeno asociado, por lo que adapta su crecimiento a estas condiciones.

En este sentido, la dependencia de carbohidratos de los hongos ectomicorrizógenos ha sido probada por su capacidad para crecer en medios conteniendo fuentes de carbono específicos que como la glucosa y fructosa (Jennings, 1995). Un ejemplo de ello lo constituye *Amanita muscaria*, que no puede hacer uso directo de la sacarosa, más bien se da un proceso de hidrólisis del azúcar para producir glucosa y fructosa, las cuales son utilizadas por el hongo en diferentes tiempos (Salzer y Hager, 1991; Chen y Hampp, 1993). También se ha demostrado que la adición de glucosa exógena induce la micorrización en un gran número de especies fúngicas (Theodorou y Reddell, 1991).

Todo lo anterior está relacionado con las diferentes interacciones que se dan entre los hongos ectomicorrizógenos y las plantas hospederas. Tales interacciones están influenciadas por numerosos factores como el genotipo de los hongos y plantas, edad y vigor de árbol hospedero, el suelo y las condiciones ambientales, la disponibilidad de inóculos y las actividades metabólicas

de la microflora, microfauna y bacterias que se dan en el suelo, además con la interacción con otros hongos (Marx y Cordell, 1989).

Al igual que en algunas cepas estudiadas en este trabajo, que mostraron su máximo crecimiento en concentraciones bajas de glucosa, Tosh *et al.* (1993) observaron un mejor crecimiento de tres cepas de hongos ectomicorrizógenos, *Laccaria proxima*, *Hebeloma crustuliniforme* y *Paxillus involutus* en bajas concentraciones de glucosa (0.4 y 4 g/l) al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de este azúcar. Los hongos que crecieron mejor a concentraciones bajas posiblemente pertenecen a las fases tempranas, es decir, que se asocian con plantas jóvenes. En esta fase, sus requerimientos de carbono son bajos y los carbohidratos están proporcionados por plántulas cuya área foliar es pequeña, aunado a que su sistema radical es escaso.

En cuanto a las cepas que obtuvieron su valores máximos de crecimiento a concentraciones altas, probablemente pertenezcan a hongos de fases tardías, es decir, que se asocian con árboles maduros puesto que sus requerimientos de carbohidratos son mayores y son proporcionados por dichos árboles (Deacon y Fleming, 1992).

II. Las diferentes estrategias de crecimiento que tienen los hongos de acuerdo con su capacidad de adaptación, exploración, explotación y optimización de los nutrimentos en un hábitat determinado. Este hecho lo observó Olsson (1995) al evaluar cómo se lleva a cabo la translocación de nutrimentos en 62 cepas de hongos. Posteriormente señaló que la translocación puede ocurrir de forma pasiva o activa y que repercute en los patrones de crecimiento miceliar, es decir, en la densidad de biomasa (Olsson, 1999). Dicho autor propuso tres tipos de estrategias de sobrevivencia del micelio:

- a) **Explotación del recurso disponible.** En este caso la tasa de extensión radial del micelio es baja, el micelio es denso y las colonias presentan un diámetro reducido. Aquí se pueden ubicar a la cepa TLAX 4 del género *Amanita* y las cepas TLAX 55 y TLAX 40 del género *Suillus* que presentaron tasas medias de crecimiento bajas en todas las concentraciones de glucosa (Gráfica 1 y 5), al igual que el crecimiento radial (Gráfica 2 y 6), aunque los valores de biomasa no fueron bajos debido a su micelio denso y compacto (Gráfica 3 y 7). En cuanto a la relación biomasa/área, dichas cepas presentaron una mayor densidad de biomasa por unidad de área (mg/mm^2) (Gráfica 4 y

8).

- b) **Trasmigración exploratoria para usar todos los recursos en un área grande.** El micelio se caracteriza ser laxo y tener una tasa de extensión radial alta, sus colonias desarrollan diámetros grandes. En este caso se ubica la cepa TLAX 41 del género *Amanita*, la TLAX 49 y TLAX 44 del género *Suillus* cuyas tasas medias de crecimiento y crecimiento radial fueron altas en todas las concentraciones (Gráficas 1, 2, 5 y 6). La biomasa también tuvo los valores más elevados debido a la presencia de micelio compacto y denso, y de micelio muy laxo (Gráficas 3 y 7). Los valores obtenidos de la relación biomasa/área fueron muy heterogéneos ocasionado por las características del micelio, por lo cual no se pudo establecer una relación entre ambas variables (Gráficas 4 y 8).
- c) **Trasmigración exploratoria para buscar más allá de donde se encuentra el recurso.** Translocando los nutrimentos tomados de diferentes puntos, el micelio se caracteriza por tener unas tasas de extensión radial altas o bajas y presentarse denso o laxo, a veces formando cordones miceliares (para búsqueda y translocación de nutrimentos), además de tener grandes periodos de vida. En este tipo se ubican las cepas TLAX 42, TLAX 48, TLAX 51 y TLAX 53 que tuvieron tasas medias de crecimiento muy heterogéneas (altas y bajas) dependiendo de la concentración de glucosa en la que crecían al igual que el crecimiento radial, biomasa y relación biomasa/área (Gráfica 5, 6, 7 y 8). Estas cepas se caracterizaron por presentar tanto micelio denso como laxo en la colonia.

Aquihuatl (2003) encontró resultados parecidos a los obtenidos en este trabajo con respecto a la relación biomasa/área; dicha autora señaló que las colonias de textura más algodonosa presentaron densidades menores, mientras que los de textura aterciopelada o pegada al medio tuvieron de mayor densidad.

Estas estrategias de crecimiento también pueden estar relacionadas con las etapas de desarrollo del hospedero con el cual se asocia. El hecho de que se presentaran cepas de hongos ectomicorrizógenos que crecieron indistintamente en concentraciones bajas y altas de glucosa, se puede explicar por su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones de hábitat, es decir, que se pueden desarrollar tanto en condiciones adversas u óptimas, así como por su facultad de asociarse tanto con árboles jóvenes y árboles maduros. Este mismo hecho lo observó Aquihuatl

et al. (1998a) y Aquiahuatl (2003), quienes al evaluar tres cepas de *Suillus* (*S. granulatus*, *S. tomentosus* y *S. collinitus*) en cinco concentraciones de glucosa (0, 1, 19, 30 y 50 g/l) establecieron que tales cepas fueron capaces de crecer en un intervalo amplio de concentraciones de glucosa (10-50 g/l). En ambos casos las cepas tuvieron la capacidad de explorar el medio donde se desarrollan, además de que explotaron y optimizaron los recursos disponibles.

3.14 CONCLUSIONES

Se recolectaron 23 ejemplares de hongos ectomicorrizógenos que crecen en los bosques de *Pseudotsuga macrolepis*, los géneros mejor representados fueron *Suillus* y *Amanita* con once y cuatro ejemplares, respectivamente; aunque también se identificaron ejemplares pertenecientes a los géneros *Hebeloma*, *Boletopsis*, *Xerocomus*, *Inocybe*, *Russula* y *Trappea*. Con respecto a los aislamientos, se obtuvieron 17 cepas, nueve de género *Suillus*, seis de *Amanita*, una de *Hebeloma* y una de *Trappea*.

Las características macro y microscópicas tanto de las cepas de *Amanita* como las de *Suillus* coinciden con las que ya se han reportado en literatura para cada uno de los géneros. Las concentraciones de glucosa probadas no tuvieron ningún efecto en la morfología microscópica de ambas cepas. En cuanto a caracterización macroscópica, se evidenció que en aquellas concentraciones donde las cepas de *Amanita* y *Suillus* presentaron su mayor crecimiento radial el micelio de la colonia fue más laxo y algodonoso; sin embargo, los demás rasgos morfológicos fueron similares.

Las cepas de *Amanita* y *Suillus* presentaron cuatro patrones de crecimiento: 1) Cepas que tienen sus valores máximos de crecimiento en concentraciones bajas de glucosa (TLAX 44 y TLAX 40), 2) Cepas que se desarrollan bien en altas concentraciones de glucosa (TLAX 41, TLAX 48 y TLAX 55), 3) Cepas que crecen indistintamente en cualquier concentración con excepción de 5 g/l de glucosa (TLAX 42, TLAX 53 y TLAX 51) y 4) Cepas que crecen bien en cualquier concentración (TLAX 4 y TLAX 49).

El hecho de que se observen diferentes requerimientos de glucosa (fuente de carbono) en las distintas cepas estudiadas se puede explicar considerando tres factores: 1) las fases sucesionales de los hongos con respecto a la edad de la planta (etapas tardías y etapas tempranas), 2) el estado de madurez de la planta y 3) la tasa fotosintética de la planta.

Es posible que los hongos que crecieron mejor en concentraciones bajas, pertenezcan a las fases tempranas, debido a sus requerimientos de carbono fueron bajos y los carbohidratos fueron proporcionados por las plántulas cuya área foliar fue pequeña, y con un escaso desarrollo del sistema radical.

En cuanto a las cepas que obtuvieron sus valores máximos de crecimiento a concentraciones altas, probablemente pertenezcan a hongos de fases tardías, es decir, que se asocian con árboles maduros puesto que sus requerimientos de carbohidratos son mayores.

El hecho de que algunas cepas crecieron indistintamente en concentraciones bajas y altas de glucosa, se puede explicar por la capacidad que éstas tienen para adaptarse a diferentes condiciones de hábitat, aunado con la facultad para asociarse con árboles en diferentes fases de desarrollo.

Finalmente, los diferentes tipos de crecimiento tanto de las cepas de *Amanita* como las de *Suillus*, son indicativos de que las cepas estudiadas tienen diferentes estrategias de crecimiento, las cuales están determinadas por la capacidad que tienen el hongo por explorar, explotar y optimizar los recursos disponibles en el medio donde se desarrollan.

CAPÍTULO IV. MICORRIZACIÓN DE PLÁNTULAS DE *Pseudotsuga macrolepis* FLOUS EN CONDICIONES DE VIVERO

4.1 INTRODUCCIÓN

En México, las áreas que requieren reforestación están severamente erosionadas y el subsuelo expuesto es compacto, seco, rocoso y de baja fertilidad. Por el contrario, las prácticas de vivero de uso común favorecen el desarrollo de hongos simbiotes que son capaces de crecer en suelos con alta humedad y fertilidad, pero cuando la planta de este vivero se pasa al campo, el hongo es incapaz de sobrevivir y crecer en los sitios severamente perturbados, provocando fracasos en las reforestaciones (Valdés, 1986).

En el establecimiento de plantaciones forestales se deben considerar prácticas que incluyan la inoculación con hongos ectomicorrizógenos, ya que se tienen evidencias que demuestran que éstos mejoran la supervivencia de los árboles (Dodd y Thomson, 1994). En numerosos estudios se ha observado la capacidad que tienen algunas especies de hongos para colonizar raíces y para mejorar el crecimiento de especies seleccionadas de coníferas tanto en vivero como en campo, estos estudios se han debido a su importancia económica, pero también porque han demostrado su dependencia de los hongos simbiotes (Castellano y Molina, 1989; Castellano y Bougher, 1994; Grove y Malajczuk, 1994). Esta simbiosis tiene potencial para la restauración de suelos, control de la erosión, así como en el incremento en la formación de agregados de partículas de suelos por las hifas extramatriciales e incremento en la diversidad (Dodd y Thomson, 1994).

Desde hace varias décadas, se ha corroborado que el uso de hongos específicos ha mejorado el rendimiento de plántulas de pino en vivero y en campo en varias partes del mundo, ya que el desarrollo de la micorriza en el sistema radical de los árboles es esencial para el establecimiento exitoso de especies arbóreas en áreas desforestadas (Vozzo y HacsKaylo, 1971; Mikola, 1973).

Además, el empleo de hongos ectomicorrizógenos para producir plántulas micorrizadas en viveros forestales es más accesible que otros sistemas de producción de árboles debido a la facilidad de producción de los hongos, ya que se pueden tener aislamientos a partir de cuerpos fructíferos y prepararse en cultivos puros; alternatively, se pueden utilizar esporas o basidiomas como inóculo, principalmente en hongos con fructificación profusa (Grove y Malajczuk, 1994).

4.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO *IN VITRO* DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS

El aislamiento y cultivo puro de estos hongos es parte fundamental de cualquier trabajo de investigación sobre ectomicorrizas. Estudios sobre la biología y fisiología de las especies fúngicas, la compatibilidad y especificidad con determinados hospederos, la selección de especies o cepas de hongos específicos para la inoculación en vivero, las interacciones con microorganismos, incluidos patógenos, etc., precisan del aislamiento y cultivo de las especies fúngicas con las que se desea trabajar (Torres, 1992).

4.2.1 SELECCIÓN DE HONGOS

El estudio de la simbiosis establecida en las raíces de coníferas, especialmente cuando se trata de mejorar el desarrollo de plántulas tanto en vivero como en el campo es de gran importancia. Por lo tanto, es necesario conocer la biota fúngica que se asocia con una especie forestal determinada para poder iniciar la selección de las especies de hongos más adecuadas y plantear un programa efectivo de inoculación (Torres, 1992).

Un factor primordial en cualquier programa de inoculación de plántulas es la selección de los hongos utilizando sus diferencias fisiológicas y ecológicas. Además, se deben considerar factores como condiciones extremas del suelo y clima, los antagonistas del suelo incluyendo otros hongos ectomicorrizógenos, la aplicación de pesticidas y el brusco ajuste fisiológico de la planta cuando pasa del vivero (en donde tuvo una buena fertilización e irrigación) al campo (en donde se puede enfrentar condiciones ambientales adversas y bajar su fertilidad) (Dodd y Thomson, 1994; Marx y Cordell, 1994).

El inóculo obtenido a partir de micelio de un hongo ha sido recomendado como el mejor material biológico para inoculación (Marx y Kenney, 1982); la selección de la cepa del hongo que se va a utilizar debe ser hecha minuciosamente teniendo en cuenta los siguientes criterios: i) la facilidad de aislamiento; ii) la capacidad de crecimiento en cultivo puro y resistencia a las manipulaciones a las que se verá sometida en el proceso de inoculación; iii) la capacidad de formación de simbiosis con varios hospederos; iv) la adaptación a las condiciones ecológicas de la localidad donde serán transplantados, así como su adaptación a las condiciones existentes en los viveros; v) la producción de rizomorfos (debido a que se cree que incrementan la capacidad del hongo de

absorber agua y nutrimentos) o producción de esclerocios; vi) la agresividad y competitividad con otros hongos existentes en los viveros; vii) la capacidad de resistencia a hongos patógenos específicos y viii) la capacidad de tolerar compuestos tóxicos existentes en el suelo (Molina y Trappe 1984; Álvarez, 1985).

Cuando se reforesta con plantas que dependen de las micorrizas para desarrollarse correctamente y carecen de ellas, el fracaso es inminente; por lo tanto, es necesario dotarlas de los hongos simbioses adecuados, ya que se persigue incrementar su vigor, que se ve reflejado en la producción de biomasa vegetal, en el incremento en altura, grosor de los tallos y número de ramificaciones; resultados que son deseables en los procesos de revegetación. En este sentido, numerosos trabajos en Argentina, Australia, Canadá, Francia, España y Estados Unidos, entre otros, han evidenciado la importancia de las inoculaciones controladas en vivero con el fin de mejorar la respuesta de las plántulas en campo (Vozzo y Hacskeylo, 1971; Mikola, 1973; Theodorou y Bowen, 1973; Trappe, 1977; Dixon *et al.* 1981; Valdés, 1986; Laiho, 1988; Marx y Hatchell, 1986; Marx *et al.*, 1991; Honrubia *et al.*, 1992).

4.3 MICORRIZACIÓN EN LOS VIVEROS

Bokor en 1954 (Marx *et al.*, 1991) usó hongos ecológica y fisiológicamente adaptados a los lugares de trasplante para producción de planta en los viveros. Con esto se obtuvo una mejora en el rendimiento del campo; posteriormente los procedimientos fueron refinados por Theodorou y Bowen (1973) y por Vozzo y Hacskeylo (1971). Estas investigaciones demostraron que las plántulas con ectomicorrizas específicas rebasan el rendimiento en el campo respecto a las que tuvieron pocos hongos en el trasplante.

En condiciones de vivero y de campo, la mayoría de las plantas necesitan de la asociación con los hongos ectomicorrizógenos, por lo que es primordial optimizar el estado de micorrización y consecuentemente el estado de vigorosidad de las plantas; esto se puede lograr controlando a los hongos simbioses de interés con el objetivo de reintroducirlos en zonas determinadas (Honrubia *et al.*, 1992).

En algunos países, la inoculación en vivero con hongos ectomicorrizógenos es usada ampliamente ya que incrementa la eficiencia de las prácticas culturales así como la higiene por fumigación o pasteurización (Jasper, 1994); sin embargo, aún existen muchos productores de planta que temen incorporar hongos a sus cultivos porque los consideran nocivos ya que los relacionan con los que causan daños como el "damping-off" (Honrubia *et al*, 1992).

Se han realizado estudios sobre los efectos de la inoculación de árboles jóvenes con más de 500 hongos específicos, donde casi la mitad han mostrado tener un efecto positivo a la inoculación, aunque, en algunos casos ha resultado lo contrario. Con la inoculación controlada en vivero se acortan los tiempos en que se lleva a cabo la colonización de las raíces, mejorando la supervivencia y crecimiento de la planta, hecho que es más favorable en regiones donde el periodo de establecimiento está limitado por la sequía de verano o el frío de invierno (Grove y Malajczuk, 1994).

Los sistemas de vivero están diseñados generalmente para minimizar espacio, costos de labor y materiales, además de proveer plantas con características uniformes y adecuadas para las plantaciones; así como de manipular factores como tipo de suelo, pH, contenido de humedad, fumigaciones y pasteurizaciones, uso de plaguicidas (Marx *et al.*, 1982; Cordell *et al.*, 1991). Por ello se sugiere seleccionar inoculantes de hongos ectomicorrizógenos que sean efectivos en la colonización, que persistan en las raíces, que incrementen el crecimiento de los árboles, que estén adaptados a condiciones extremas y que sean capaces de soportar los cambios ambientales desde el paso por el vivero hasta el campo (Dodd y Thomson, 1994; Grove y Malajczuk, 1994).

4.4 TIPOS DE INÓCULO Y MÉTODOS DE MICORRIZACIÓN EN VIVERO.

Hay gran flexibilidad para seleccionar el hongo que se va a inocular, el tipo de inóculo, la forma de aplicación y las condiciones culturales más adecuadas para la formación de las ectomicorrizas y crecimiento de las plántulas; la elección depende del grado de sofisticación de los viveros (Grove y Malajczuk, 1994).

De acuerdo con Honrubia y *et al.* (1992), se distinguen tres tipos de inóculo que se basan en la forma de manipulación de los hongos ectomicorrizógenos:

- 1) **Inóculo bruto o forestal**, es decir sin depurar y que corresponde a los propágulos existentes en el suelo (micelio, rizomorfos, cordones miceliales, esporas, esclerocios, trozos de raíces micorrizadas, etc.) y del que no se conoce la cantidad y frecuencia/abundancia de las especies o de los mismos propágulos. Este método es el más simple y ampliamente usado para inocular nuevas áreas, y consiste en extraer suelo forestal y utilizarlo para la producción de planta (Marx y Cordell, 1994). Sin embargo, requiere del movimiento de grandes volúmenes de suelo con altos costos en su transporte y daños ecológicos a la zona de extracción (Honrubia *et al.*, 1992; Torres, 1992; Marx y Cordell 1994).

El mayor problema que presenta este sistema es de origen biológico ya que se pueden introducir semillas de malas hierbas y patógenos como hongos, bacterias, virus y nemátodos; además, la calidad y cantidad de inóculo micorrízico introducido son desconocidas y variables de un año al otro, dependiendo del lugar de procedencia del suelo (Honrubia *et al.*, 1992).

- 2) **Inóculo miceliar**, es producido en laboratorio y consiste de micelio aislado y cultivado en medios sintéticos. La micorrización con inóculo miceliar obtenido en cultivos puros o inoculación vegetativa es posiblemente el método más seguro, carente de riesgo de introducción de otros organismos no deseables y competidores. Es también el más efectivo y con el que se alcanza mayor porcentaje de micorrización en menos tiempo, sin embargo, es el más costoso y de manipulación más sofisticada. Su utilización en los viveros requiere de una adecuación tecnológica de las instalaciones, aunque su productividad es elevada (Honrubia *et al.*, 1992).

El punto de partida es la producción del inóculo en el laboratorio, que se puede obtener por aislamiento y cultivo del micelio extraído directamente de los esporocarpos, por la germinación de esporas *in vitro*, o por cultivo del micelio a partir de micorrizas (Honrubia *et al.*, 1992). El micelio se puede producir en mezclas de turba-vermiculita, medio líquido o gotas de alginato. (Grove y Malajczuk, 1994).

Varios investigadores en diversas partes del mundo han desarrollado procedimientos de cultivo puro para la producción de inóculo de una gran variedad de hongos, desafortunadamente, la aplicación en vivero a gran escala siempre involucra unos cuantos miles de plántulas, por la producción de cantidades insuficientes de inóculo viable, ya que es relativamente fácil producir un volumen de 30 a 40 litros de inóculo para estudios de

investigación, pero es completamente diferente producir material suficiente para comercializar y/o para inoculaciones a gran escala en viveros (Marx y Cordell, 1994).

- 3) **Inóculo esporal**, constituido por esporas maduras. La inoculación con esporas ha sido ampliamente utilizada, ya que es relativamente fácil de aplicar ya sea mezclándolas con el suelo antes de la plantación, en el riego de las camas o en los contenedores; en "pellets" de esporas, o baño de las semillas (Grove y Malajczuk, 1994). Además, no requieren de una fase de crecimiento bajo condiciones asépticas (Marx y Cordell, 1994).

Este método puede ser aplicado sin mayor problema por los viveristas pues no requiere de tecnologías sofisticadas sino de conocer las especies fúngicas adecuadas (Honrubia *et al.*, 1992). El mayor inconveniente es que algunas especies fúngicas producen pocos carpóforos, sus esporas germinan pobremente o presentan baja viabilidad, además de que se desconoce la cantidad de esporas que se requiere y faltan pruebas para determinar su viabilidad (Grove y Malajczuk, 1994; Marx y Cordell, 1994).

El inóculo esporal se prepara fácilmente con hongos que producen muchas esporas como los pertenecientes a los géneros *Suillus*, *Rhizopogon*, *Pisolithus* y *Scleroderma*. Algunos de ellos se han probado ofreciendo garantía de su uso durante unos cuantos meses después de su preparación (Honrubia *et al.*, 1992).

La dosis de aplicación puede variar según la especie hospedera, pero de manera generalizada se utiliza un total de 10^7 esporas por planta, dependiendo del estado de maduración de los carpóforos y la viabilidad de las esporas, con lo cual se asegura que éstas serán capaces de germinar en la rizosfera de las plántulas (Honrubia *et al.*, 1992).

4.5 ESTADO DE CONOCIMIENTO DEL USO DE LA INOCULACIÓN CON HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS

En Estados Unidos de América, los estudios se han realizado principalmente con *Pisolithus tinctorius*, sus técnicas de inoculación han sido desarrolladas para su uso en sistemas de producción de plántulas y su inóculo está basado en formulaciones comerciales. Desde 1980 se utilizan las basidiosporas de esta especie, cuyo inóculo esporal es recolectado cada año. Este procedimiento da un máximo desarrollo de ectomicorrizas para mejorar la supervivencia y

crecimiento de las plantas (Marx et al., 1991).

También se han utilizado hongos hipogeos con coníferas, donde las especies que produjeron numerosas micorrizas fueron *Rhizopogon vinicolor* y *R. colossus* (Marx et al., 1991). Asimismo, se ha probado el inóculo vegetativo (miceliar) de once especies de hongos (*Amanita muscaria*, *Corticium bicolor*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Lactarius rufus*, *Paxillus involutus*, *Rhizopogon roseolus*, *Scleroderma* sp., *Suillus cothurnatus*, *S. luteus*, *S. variegatus* y *Tricholoma albobrunneum*) en diferentes especies de árboles bajo diferentes condiciones experimentales, sin embargo, solamente unas pocas formulaciones vegetativas de estos hongos se han probado para su efectividad bajo condiciones operacionales (Marx et al., 1991).

Además se ha probado el inóculo esporal de 18 especies de hongos (*Hebeloma crustuliniforme*, *Rhizopogon colossus*, *R. luteolus*, *R. nigrescens*, *R. roseolus*, *R. vinicolor*, *Scleroderma auranteum*, *S. dictyosporum*, *S. flavidum*, *S. texense*, *Suillus acidus*, *S. granulatus*, *S. grevillei*, *Tuber aestivum*, *T. brumale*, *T. maculatum*, *T. magnatum* y *T. melanosporum*), las cuales se han reportado como formadoras de micorrizas con varias especies de árboles bajo condiciones experimentales (Marx et al., 1991).

En Francia, la inoculación tiene dos propósitos: mejorar el crecimiento de los árboles en las reforestaciones y mejorar la producción de hongos comestibles (Le Tacon et al., 1988). Se han realizado trabajos de inoculación de *Pinus pinaster* con *Suillus granulatus* y *Quercus* spp. con *Tuber melanosporum* o *T. uncinatum* con el fin de producir trufa. Con este sistema, las trufas se obtienen en tres ó cinco años después del trasplante. Por otro lado, *Laccaria laccata*, *L. bicolor* y *Hebeloma crustuliniforme* forman abundantes micorrizas después de ser inoculados como micelio vegetativo (Marx et al., 1991). También se ha producido micelio en fermentadores, el cual es encapsulado en alginato de calcio con turba en polvo, determinándose que de esta forma está mejor protegido para sobrevivir más tiempo y es más efectivo que la reproducción en vermiculita (Marx et al., 1991).

En Canadá, las inoculaciones están concentradas en especies de *Pinus*, *Picea* y *Larix*, con cepas de *Laccaria laccata*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Cenococcum geophilum*, *Telephora terrestris* y *Pisolithus tinctorius*, las cuales son reproducidas en medio líquido (Marx et al., 1991).

Para Filipinas, Marx *et al.* (1991) menciona que The National Institute of Biotechnology and Applied Microbiology (BIOTECH) ha elaborado tabletas de arcilla conteniendo basidiosporas de *Pisolithus tinctorius* y una especie de *Scleroderma*; éstas son adicionadas a los contenedores con la planta y a los tres meses se puede observar la formación de la micorriza.

En Venezuela, utilizaron suelo tratado con inóculo de *Telephora terrestris* para producir plantas de *Pinus caribea*. Este hongo también formó micorrizas con plantas de *Pinus oocarpa* y *Eucalyptus* spp. (Marx *et al.*, 1991)

4.5.1 ESTADO DE CONOCIMIENTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTE Y MICORRIZACIÓN DE ESPECIES FORESTALES EN MÉXICO Y TLAXCALA.

En nuestro país, los ensayos con especies forestales y hongos ectomicorrizógenos son aún escasos pero han aportado resultados prometedores. En los primeros ensayos confrontaron varias especies de *Pinus* con algunas cepas exóticas de hongos ectomicorrizógenos (Cuevas-Rangel, 1979; Valdés y Grada-Yautentzi, 1980; Valdés *et al.*, 1983; Estrada-Torres y Valdés, 1986; Valdés, 1986; Quintos y Valdés, 1987; Cigarrero *et al.*, 2002). Posteriormente, se trabajó con varias especies de pinos, con los cuales se probaron diversas especies de hongos ectomicorrizógenos nativos como *Scleroderma texense* y *S. aerolatum* (Orozco-García, 1991), *Cantharellus cibarius*, *Lepista nuda*, *S. verrucosum* y *Pisolithus tinctorius* (Arias y Garza-Ocañas, 1997a y 1997b); *P. tinctorius* (Villa, 1998); *S. glandulosipes* y *Rhizopogon* sp. (Navarro, 2000), *S. texense* y un inóculo mixto (Aguilar *et al.*, 2002); *Laccaria* sp. *P. tinctorius* y *Rhizopogon* sp. adicionando ácido fúlvico (Cuevas-Rangel y Zamora-Martínez, 2002); *P. arhizus* y *Cenococcum geophilum* (Orozco-García *et al.*, 2002). Por otro lado, Bárcenas *et al.* (2000) evaluaron el porcentaje de micorrización de plantas de vivero. Con respecto a otras especies forestales, solamente se cuenta con el estudio de un encino, en el cual se registró que la planta presentó ectomicorriza y micorriza arbuscular (Reyes y Palacios, 1998).

Por otro lado, se han realizado aislamientos de hongos a partir de micorrizas, en los que se observado el antagonismo de estos hongos contra algunos patógenos (Peña-Cabriales y Valdés, 1974).

Se ha obtenido la síntesis *in vitro* y la caracterización de las micorrizas producidas de *Rhizopogon* sp. (Torres *et al.*, 1997). También se han realizado descripciones de las micorrizas de campo (Bárceñas *et al.*, 1996; Garza *et al.*, 1996; Arias y Garza, 1997a; Burrola *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1997).

Por otra parte, se han realizado estudios en plantaciones, en los cuales se describió la morfología de algunas micorrizas y se evaluó su relación con el crecimiento de plantas de pino (López-Olivares y Fierros, 1990; López-Olivares *et al.*, 1990).

Aunque los estudios sobre hongos ectomicorrizógenos han aumentado, aún falta realizar más investigaciones en un país tan diverso como México, tal como lo mencionan Varela y Estrada-Torres (1997). Aunado a lo anterior, Zamora-Martínez *et al.* (2002) mencionan que es necesaria una normatividad para el uso de inoculantes de hongos ectomicorrizógenos de origen nacional y de importación. Esta acción se debe a que en la producción de plantas de interés forestal, en la mayoría de los viveros de México se utiliza suelo extraído de los bosques como fuente de inóculo para la formación de micorrizas, lo que propicia fuertes daños ecológicos; además el uso de inóculos extranjeros puede alterar la diversidad original por la introducción de especies exóticas.

Para el estado de Tlaxcala se han realizado varios estudios sobre hongos ectomicorrizógenos. Se llevó a cabo la caracterización de micorrizas de campo (Kong-Luz y Santiago-Martínez, 1991). Se ha obtenido la síntesis *in vitro* y caracterización de las micorrizas producidas con hongos como *Pisolithus tinctorius* (Santiago-Martínez *et al.*, 1993); *Laccaria bicolor* (Santiago-Martínez *et al.*, 1994) y *Suillus* spp (Xicohténcatl *et al.*, 1997). Se ha trabajado con especies de pino como *Pinus cembroides*, *P. montezumae*, *P. pseudostrobus*, induciendo su micorrización al inocularlos con diferentes hongos ectomicorrizógenos nativos como *S. glandulosipes* y *Rhizopogon* sp. (Navarro, 2000); *Inocybe griseovelata* y *Suillus tomentosus* (Xochitiotzin, 2000); *Inocybe dulcamara*, *I. griseovelata*, *S. pseudobrevipes* y *S. tomentosus* (Santiago Martínez, 2002; Muñoz García 2003). En éstos se han evaluado la supervivencia, crecimiento de la planta (altura, diámetro de la corona, biomasa aérea y radical) y porcentaje de colonización; con lo que se ha demostrado que la inoculación favorece la supervivencia y el crecimiento de los árboles en vivero y campo.

4.6 ESTUDIOS SOBRE ECTOMICORRIZA DEL GÉNERO *Pseudotsuga* Y PROBLEMÁTICA DE *P. macrolepis*

En otros países se han realizado numerosos trabajos con *Pseudotsuga menziesii* contemplando aspectos de aislamiento y caracterización de cepas de hongos ectomicorrizógenos asociados con este árbol, la síntesis *in vitro* y la caracterización de la micorriza, la influencia de la asociación micorrízica sobre la fisiología de la planta y de las condiciones ambientales y edafológicas sobre la micorrización. Igualmente, se han desarrollado varios estudios en campo (condiciones naturales) para evaluar las especies de hongos y tipos de micorrizas que se forman bajo estas condiciones y cómo influyen sobre la supervivencia de las plántulas. A continuación se enumeran algunos de los trabajos más relevantes realizados con *P. menziesii* :

Trappe (1967) obtuvo la síntesis *in vitro* de la micorriza de *P. menziesii* con cuatro especies de hongos (*Hebeloma crustyliniforme*, *Suillus subolivaceus*, *Rhizopogon colossus* y *Astraeus pteridis*) de las cuales describieron detalladamente las características morfológicas y anatómicas.

Zak (1971) realizó la caracterización de la micorriza de *P. menziesii* y *Rhizopogon vinicolor*, para lo cual aisló y caracterizó macro y microscópicamente los micelios provenientes de ocho aislamientos diferentes. Posteriormente indujo la síntesis *in vitro* de la micorriza caracterizándola y finalmente realizó pruebas de antagonismo entre las cepas de *Rhizopogon vinicolor* y algunos patógenos como *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium debaryanum*, *P. sylvaticum*, *P. ultimum*, *Fusarium oxysporum* f. *pinni*, *Rhizoctonia solani* y *Macrophomina phaseoli*.

Zak y Larsen (1978) realizaron la caracterización y clasificación de la micorriza de *Pseudotsuga menziesii* con *Byssoporia (Poria) terrestris* vars. *lilacinrosea*, *parksii* y *sublutea*. Cada micorriza fue macro y microscópicamente definida, incluyendo el micelio circundante y los rizomorfos. Asimismo, fue caracterizado el micelio de las tres especies crecidas en el medio nutritivo papa dextrosa agar.

Dosskey et al. (1990) evaluaron el efecto de las ectomicorrizas sobre la tasa fotosintética en plántulas de *Pseudotsuga menziesii*, las cuales respondieron de forma diferente. Con *Rhizopogon vinicolor* se observó que la mayor tasa fotosintética con respecto a las plantas testigo; sin embargo, *Hebeloma crustyliniforme* y *Laccaria laccata* no tuvieron un efecto significativo. Asimismo, evaluaron el porcentaje de colonización micorrízica de las tres especies de hongos siendo de 36% para *Rhizopogon*, 93% para *Laccaria* y 73% para *Hebeloma*.

Dosskey *et al.* (1991) inocularon plántulas de *P. menziesii* con tres especies de hongos ectomicorrizógenos (*Rhizopogon vinicolor*, *Laccaria laccata* y *Hebeloma crustyliniforme*) para determinar su efecto en la tasa fotosintética de la planta y en las relaciones de agua al ser cultivadas en suelos con estrés hídrico.

Massicotte *et al.*, (1992) evaluaron aspectos estructurales de la micorriza tuberculada de *P. menziesii*, mediante microscopía electrónica, además de contemplar algunos aspectos histoquímicos como la presencia de carbohidratos y proteínas.

Roth y Berch (1992) investigaron la colonización micorrízica por hongos nativos en plántulas de *P. menziensisii* y *Tsuga heterophylla* en condiciones de campo en dos localidades de Vancouver Island. Entre sus resultados destaca que el 99% de las plántulas presentaron micorrización, con alta variabilidad en los porcentajes de colonización, siendo los tipos de *Telephora terrestris* y *Rhizopogon vinicolor* los dominantes y el de *Cenococcum geophilum* el menos común.

Berch y Roth (1993) estudiaron la persistencia de *Rhizopogon vinicolor* en plántulas de *P. menziesii* preinoculadas y cultivadas en un bosque del Este de Vancouver Island, después de una estación de crecimiento; asimismo, dichos autores describieron la colonización por hongos nativos como *Telephora terrestris*, *Mycelium radidis atrovirens*, *Cenococcum geophilum*, *Tuber sp.* y *Endogone sp.*

Parladé y Alvarez (1993) evaluaron el efecto de la coinoculación con cuatro pares de hongos ectomicorrizógenos en el crecimiento de *Pseudotsuga menziesii* en condiciones asépticas. Las combinaciones fueron *Pisolithus arhizus*+*Rhizopogon subareolatus*, *P. arhizus*+*R. roseolus*, *Laccaria bicolor*+*P. arhizus* y *L. bicolor*+*R. Subareolatus*. Se evaluó la biomasa y el porcentaje de colonización micorrízica, encontrando que *P. arhizus* y *R. subareolatus* favorecieron el incremento en biomasa y la formación de raíces con respecto a *L. bicolor* o *R. roseolus*. *Laccaria laccata* presentó los porcentajes de colonización más altos (49-50%), en tanto que *P. arhizus* y *R. subareolatus* tuvieron 20 y 45% de raíces colonizadas respectivamente.

Colinas *et al.* (1994) revisaron las ectomicorrizas y los microorganismos de la rizósfera de plántulas de *P. menziesii* cultivadas en un sitio degradado e inoculado con suelo forestal pretratado con biocidas selectivos. Dichos autores concluyeron que la adición de suelo forestal no

tratado incrementó notablemente el número de micorrizas, entre las que destacaron las del tipo *Rhizopogon* y *Telephora*, disminuyendo el número de bacterias activas presentes en el suelo.

Cázares y Smith (1996) detectaron la presencia de micorriza arbuscular en plántulas de *P. menziesii* y *Tsuga heterophylla* crecidas en una gran variedad de suelos en Oregon. Describieron vesículas, arbuscúlos e hifas aseptadas en las células corticales de las raíces de plántulas de ambas especies, siendo de 48% para *P. menziesii* y del 25% para *T. heterophylla*. Además, señalan que la presencia de micorriza arbuscular y de ectomicorriza en la familia Pinaceae es de gran significado ecológico y parece estar relacionado con las condiciones de estrés de suelo como son el establecimiento de plántulas en suelos calcáreos o con deficiencia de nutrimentos.

Perrin *et al.* (1996) determinaron la capacidad que tienen dos tipos de suelos forestales para permitir el desarrollo de la asociación micorrízica, induciendo la micorrización entre *Laccaria bicolor* y *Pinus pinaster* o *P. menziesii*; sus resultados indican que para *P. menziesii* los porcentajes de micorrización fueron muy variables en función del sustrato, siendo los más bajos en suelo proveniente de los bosques de pino (28-82%) y los más altos en los suelos de los bosques de *Pseudotsuga* (92-98%).

Simard *et al.* (1997) valoraron la influencia de la erosión del suelo en la aparición de ectomicorrizas en plántulas de *P. menziesii* cultivadas en un bosque maduro de *Betula papyrifera* y *P. menziesii*, considerando aspectos sobre composición, riqueza y diversidad de especies de hongos ectomicorrizógenos y como éstas modifican la tasa fotosintética de la planta. Identificaron 80 morfotipos de ectomicorrizas, entre los que destacaron los de *Rhizopogon vinicolor* y *Telephora* sp.

A pesar de que ya existen numerosos trabajos que contemplan algunos aspectos sobre las micorrizas de *Pseudotsuga* spp., los trabajos sobre ectomicorriza en México han hecho énfasis en las especies de pinos debido a su gran importancia desde el punto de vista económico. Sin embargo, no han considerado aspectos de conservación de especies forestales que podrían estar en riesgo de desaparecer. Tal es el caso de *P. macrolepis*, especie forestal de la cual no existen trabajos sobre la asociación micorrízica.

4.7 JUSTIFICACIÓN

Debido a la destrucción acelerada de los bosques de *Pseudotsuga macrolepis*, es necesario realizar estudios de los organismos que se asocian con esta conífera, en particular de aquéllos que les proporcionan beneficios, como los hongos mutualistas que favorecen su buena nutrición y crecimiento.

El conocimiento de las especies de hongos ectomicorrizógenos existentes en los bosques de *P. macrolepis* es aún precario, tanto en el ámbito ecológico como a nivel de laboratorio, pues se desconocen las condiciones de crecimiento bajo las cuales pueden reproducirse, así como su potencial en los programas de reforestación. Por ello, es necesario conocer las cualidades de los hongos nativos de los bosques de *Pseudotsuga*. Aunado a esto, es importante considerar que estos hongos están bien adaptados a las condiciones ambientales de las zonas de distribución natural de esta conífera, por lo que su uso en la producción de planta de *P. macrolepis* en vivero puede aumentar la probabilidad de éxito de su establecimiento en el campo.

Así, con el fin de seleccionar los hongos para la elaboración de inoculantes, es de gran relevancia conocer la capacidad de formar micorriza de algunas cepas de hongos ectomicorrizógenos con dicha conífera, así como evaluar qué tan efectiva resulta la inoculación con respecto a la supervivencia y crecimiento de la planta.

Por estas razones, se planeó hacer un estudio de micorrización de *P. macrolepis* con dos cepas de hongos ectomicorrizógenos para poder hacer recomendar el uso y manejo de algunos hongos en vivero y campo que favorezcan la recuperación de esta especie forestal.

4.8 OBJETIVO GENERAL

Inducir la micorrización de plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* con dos cepas de hongos potencialmente ectomicorrizógenos en condiciones de vivero.

4.8.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Producir inóculo miceliar de dos cepas de hongos ectomicorrizógenos (*Suillus glandulosipes* y *S. lakeii*).

Confrontar las raíces de plántulas de *P. macrolepis* con cada una de las dos cepas de hongos ectomicorrizógenos para promover la micorrización en condiciones de vivero.

Evaluar los porcentajes de supervivencia y de micorrización de las plántulas de *P. macrolepis* en condiciones de vivero.

4.9 MATERIALES Y MÉTODOS

4.9.1 PREPARACIÓN DE INÓCULO MICELIAR

De las diez cepas de hongos ectomicorrizógenos que fueron recolectadas en los bosques de *P. macrolepis* durante el periodo de 1994-1996, aisladas y sometidas a las pruebas de crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa, se seleccionaron las cepas TLAX 40 y TLAX 49 (*Suillus lakeii* KL2740 y *Suillus* sp. GF1863, respectivamente). La primera debido a que es una especie que se asocia únicamente con árboles del género *Pseudotsuga* y la segunda porque fue una de las cepas que presentó los mejores resultados de crecimiento para la producción de micelio.

Para obtener el crecimiento activo de las cepas, se realizaron subcultivos en cajas de Petri conteniendo el medio nutritivo Biotina-Aneurina-Ac. Fólico (BAF) (Moser, 1960) adicionado con agar (15 g/l) como agente gelificante, donde se cultivaron fragmentos de 5 mm por lado. De las colonias crecidas en medio sólido, se extrajeron fragmentos de aproximadamente 5 mm de lado, que fueron sembrados en matraces Erlenmeyer de 125 ml con el medio nutritivo líquido de BAF, colocándolos en una incubadora de agitación para obtener la formación de "pellets" de micelio. En ambos casos, los dispositivos se incubaron en condiciones de oscuridad a una temperatura de 25 °C durante tres a cuatro semanas (Marx y Bryan, 1975; Miller et al., 1986).

Para la producción del inoculante se utilizaron frascos lecheros de 1 000 ml con 300 ml de vermiculita, 33.3 ml de turba y 200 ml de la solución nutritiva BAF, ajustando a un pH entre 5.5 y 6. Las botellas fueron esterilizadas a 121°C durante 2 h, posteriormente se inoculó el hongo crecido en medio líquido, incubándolo durante un periodo aproximado de cuatro semanas o hasta que el micelio cubriera por completo al sustrato. Las condiciones de incubación fueron las mismas que se citan en el párrafo anterior (Trappe 1967; Mason, 1980; Duddridge y Read, 1984; Palm y Steward, 1984; Miller et al., 1986 y Honrubia et al., 1993).

4.9.2 MICORRIZACIÓN DE *Pseudotsuga macrolepis* EN CONDICIONES DE VIVERO

Esta fase se realizó en el vivero de la SEMARNAT ubicado en el poblado de San Diego Xocoyucan, Municipio de Ixtacuixtla, Tlaxcala.

Se obtuvieron plántulas de *P. macrolepis* por los procedimientos convencionales de los viveros, es decir, se germinaron las semillas en camas de germinación que contenían una mezcla de suelo y vermiculita. Cuando las plántulas tenían de 25-30 días fueron transplantadas a los envases que contenían el sustrato con el inóculo. Como sustrato se utilizó suelo forestal que fue cernido y esterilizado con bromuro de metilo.

Se realizó un diseño en bloques al azar contemplando tres tratamientos: 1) plántulas inoculadas con la cepa de *Suillus lakeii* (TLAX 40), 2) plántulas inoculadas con la cepa de *Suillus glandulosipes* (TLAX 49) y 3) un grupo testigo sin inóculo. Se consideraron 100 plántulas para cada tratamiento por bloque con tres réplicas cada uno.

Para inducir la formación de la micorriza se mezclaron 25 ml del inóculo miceliar de cada una de las dos cepas de hongos ectomicorrizógenos pertenecientes al género *Suillus* con el sustrato para llenar los envases de polietileno negro sin fondo (10x30 cm).

Con respecto al manejo en vivero, las unidades experimentales estuvieron sujetas a las labores normales de deshierbe. Las plántulas no se movieron hasta el término del experimento (12 meses). Se aplicaron riegos cada tercer día con regadera de chorro suave al volumen que rutinariamente aplican los viveristas.

4.9.3 EVALUACIÓN DE VARIABLES

Para conocer el efecto de las dos cepas se realizaron evaluaciones trimestrales del porcentaje de supervivencia, altura y diámetro basal de todas las plántulas del experimento durante un año. El porcentaje de colonización micorrizica y la biomasa de la parte aérea también se registraron trimestralmente, por el mismo periodo, a razón de cinco plántulas por cada unidad experimental.

Para determinar si hubo diferencias en cuanto a la altura, el diámetro y la biomasa aérea entre los tres tratamientos se realizó un Análisis de Varianza de una Vía y para discriminar las medias estadísticamente significativas se aplicó la prueba de intervalos múltiples de Tukey ($p \leq 0.05$). La sobrevivencia y el porcentaje de micorrización analizaron mediante la X^2 mediante tablas de contingencia 2x2 ($p \leq 0.05$) (Zar, 1984; SAS Institute, 2001).

4.10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.10.1 SUPERVIVENCIA

Esta variable permite conocer el comportamiento de las plántulas de acuerdo con ciertas condiciones, es decir, la acción conjunta de factores bióticos y abióticos; proporciona información muy general, ya que únicamente indica el número de individuos vivos por tratamiento a determinados periodos, pero no considera las características morfológicas de las plántulas (altura, diámetro de la corona y del sistema radical, biomasa de la parte aérea y radical, vigor, arquitectura de la raíz y del tallo, relación parte aérea y raíz, índice de esbeltez y el índice de calidad de Dixon etc.) que darían más información acerca de su desarrollo (Peñuelas y Ocaña, 1995; Birchler *et al.*, 1998; Cano Pineda y Cetina Alcalá, 2004).

La supervivencia se evaluó trimestralmente por un año. Durante el primer trimestre, los valores oscilaron entre 90.32 y el 93.15%; a los seis meses los valores obtenidos variaron entre 80 y el 88% y a los nueve meses los porcentajes fueron de 74 y el 84%. A los doce meses, la supervivencia fluctuó entre el 67 y el 80% (Gráfica 9, Anexo: Cuadro 18). Aunque las plántulas no inoculadas presentaron un porcentaje de supervivencia ligeramente más alto con respecto a las plántulas inoculadas. Al someter los resultados al análisis estadístico, se observó que no hubo diferencias significativas en los porcentajes obtenidos entre las plántulas inoculadas con cualquiera de las dos cepas de hongos ectomicorrizógenos y las plántulas testigo a lo largo del experimento (Gráfica 9, Anexo: Cuadro 19).

El hecho de que no se presentaran diferencias entre las plantas inoculadas y las no inoculadas no implica que la micorriza no sea efectiva, pues además de considerar esta variable, es importante contemplar otras como el porcentaje de colonización y el crecimiento de la planta, debido a que el conjunto de éstas proporcionan más información sobre la efectividad e infectividad de las cepas de hongos ectomicorrizógenos. Sin embargo, el efecto de la inoculación se podría evidenciar cuando las plántulas inoculadas y las no inoculadas se trasplanten a condiciones de campo, ya que por literatura se sabe que la asociación micorrízica favorece el establecimiento y el desarrollo de las plantas en sus fases iniciales (Vozzo y Hacskeylo, 1971; Castellano y Molina, 1989; Grove y Malajczuk, 1994; Dodd y Thompson, 1994).

4.10.2 ALTURA, DIÁMETRO DE LA CORONA Y BIOMASA AÉREA DE PLÁNTULAS DE *P. MACROLEPIS*

Como se mencionó anteriormente, el desarrollo de una planta es la respuesta fisiológica de la misma a las condiciones ambientales y prácticas culturales a las que es sometida, y se manifiesta en sus características morfológicas. Existe un gran número de características que se pueden evaluar, sin embargo, se deben elegir aquéllas que proporcionen mayor información y que sean de medición más sencilla. Las más comunes son: a) la altura, que proporciona información del área fotosintética y de transpiración pero que ignora la arquitectura del tallo y ramificaciones; b) el diámetro foliar de la planta, que da una aproximación del área fotosintética, la cual es responsable del incremento en biomasa y c) la biomasa que es la cantidad de materia viva que el organismo posee y que va acumulando a lo largo del tiempo (Birchler *et al.*, 1998).

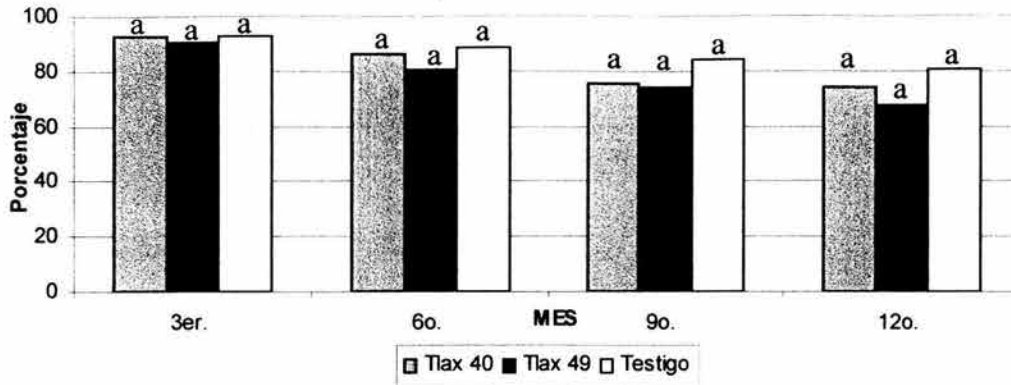
Altura de las plántulas

Con respecto a esta variable, los valores más altos al tercer y sexto mes (5.63 y 9.92 cm respectivamente) se presentaron en las plántulas inoculadas con la cepa TLAX 40, estableciendo diferencias estadísticamente significativas entre los valores observados en las plántulas inoculadas con la cepa TLAX 49 y las plántulas sin inocular (Gráfica 10, Anexo: Cuadro 18). Al noveno mes, los datos más altos se dieron en las plántulas inoculadas con la cepa TLAX 40, los intermedios en la cepa TLAX 49 y los más bajos en las plantas testigo, presentándose diferencias estadísticas entre los tres tratamientos (Gráfica 10, Anexo: Cuadro 18). Finalmente, en el 12° mes las plantas micorrizadas con la cepa TLAX 40 y la cepa TLAX 49 presentaron valores promedio de altura de 14.83 y 12.59 cm, respectivamente, sin diferencias estadísticas entre ambos tratamientos; pero si con las plantas no inoculadas que presentaron los valores más bajos (Gráfica 10, Anexo: Cuadro 19).

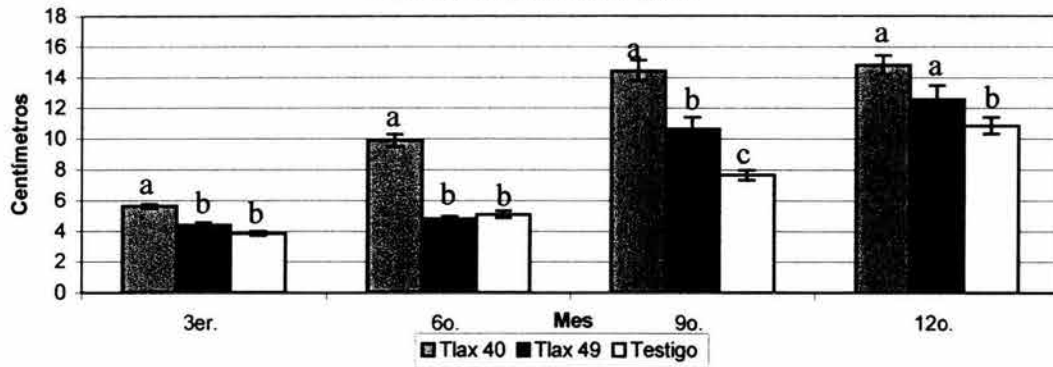
Diámetro de la corona foliar

Al evaluar esta variable se detectó que para el tercer mes los valores fluctuaron entre 2.26 y 2.60 cm y para el sexto mes entre 2.48 y 2.96 cm, sin existieran diferencias estadísticamente significativas entre las plantas inoculadas y las no inoculadas (Gráfica 11, Anexo: Cuadro 19). Para el noveno mes, las plántulas testigo presentaron los valores más altos (3.68 cm), pero no fueron estadísticamente diferentes de los valores obtenidos en las plántulas inoculadas con la

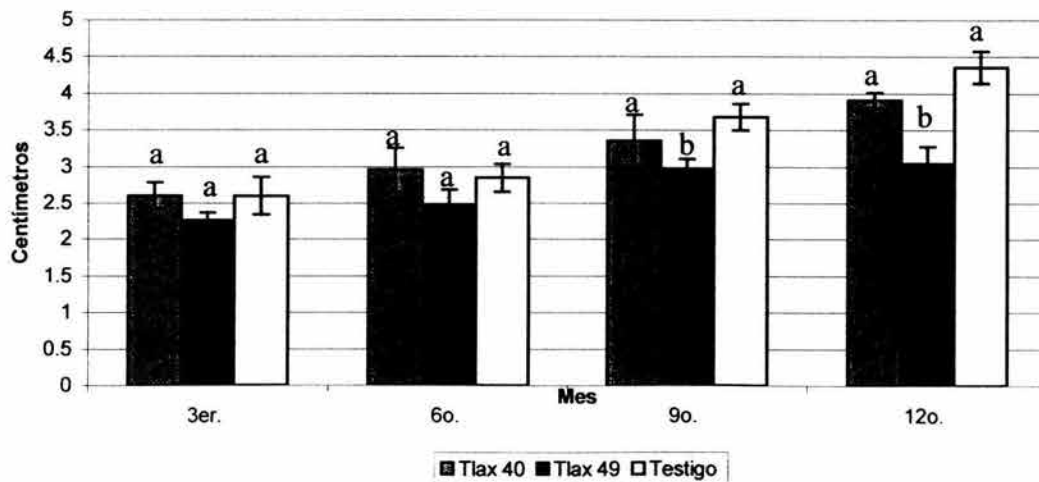
Gráfica 9. Porcentaje de sobrevivencia de plántulas de *P. macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos micorrizógenos



Gráfica 10. Altura de plántulas de *P. macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos micorrizógenos

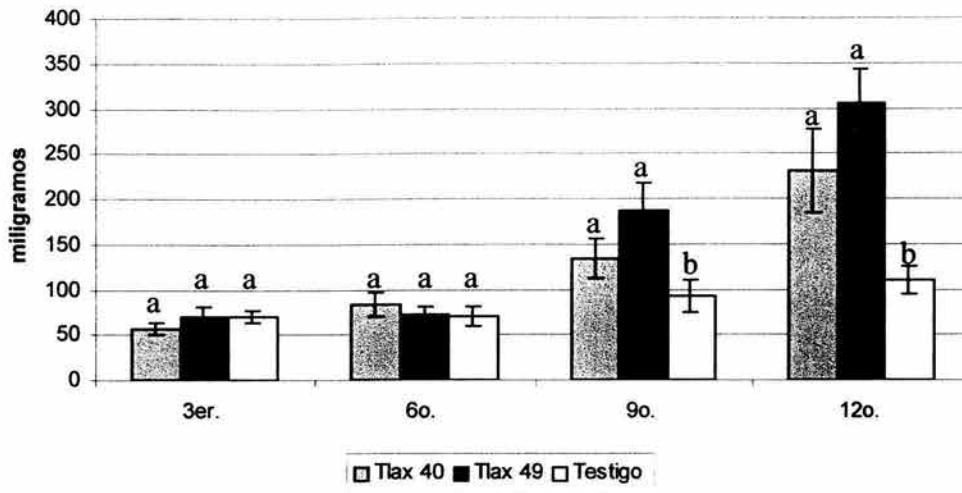


Gráfica 11. Diámetro (cm) de plántulas de *P. macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos micorrizógenos

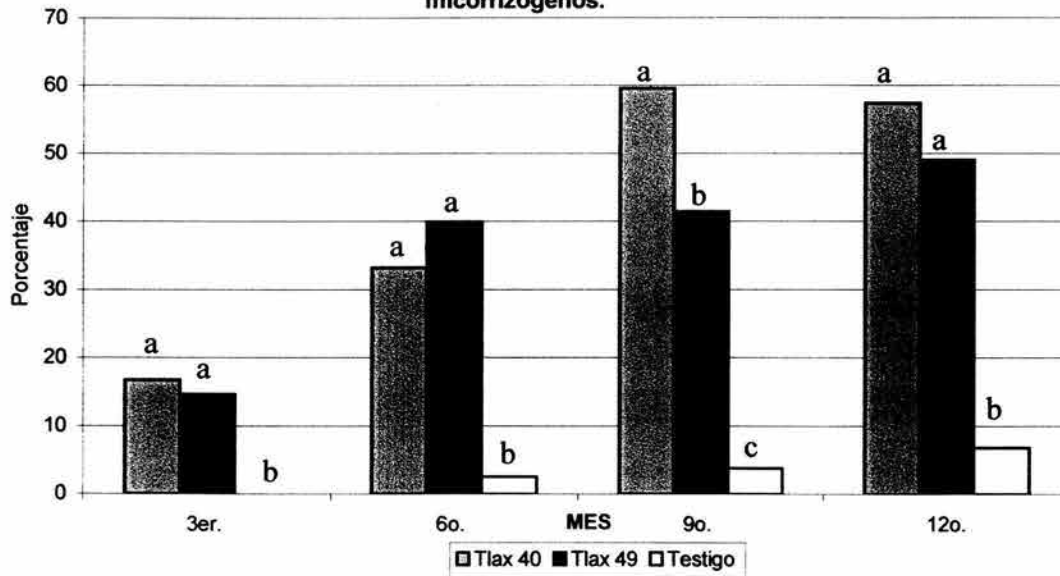


- letras iguales por trimestres no hay diferencias estadísticamente significativas, $\alpha=0.5$, error estándar
- Promedio de 45 plántulas para altura y diámetro, TLAX 40: *Suillus lakeii*, TLAX 49: *S. glandulosipes*

Gráfica 12. Biomasa aérea (mg) de plántulas de *P. macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos micorrizógenos



Gráfica 13. Porcentaje de colonización micorrizica de plántulas de *P. macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos micorrizógenos.



- letras iguales por trimestre no hay diferencias estadísticamente significativas, $\alpha=0.5$, error estándar
- Promedio de 45 plántulas para altura y diámetro
- TLAX 40: *Suillus lakeiii*, TLAX 49: *S. glandulosipes*

cepa TLAX 40; la cepa TLAX 49 presentó los valores más bajos (2.97 cm) siendo diferentes estadísticamente de los valores observados en las plántulas inoculadas con la cepa TLAX 40 y las no inoculadas. Este mismo hecho se observó al 12° mes (Gráfica 11, Anexo: Cuadro 19).

Biomasa aérea

Con relación a esta variable, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos al tercer y sexto mes en las plántulas inoculadas con alguna de las dos cepas y con las no inoculadas (Gráfica 12, Anexo: Cuadro 19). Al noveno mes, los valores obtenidos en las plántulas inoculadas con ambas cepas fueron mayores y estadísticamente diferentes con respecto a los valores de las plántulas testigo (91.8 mg), pero entre sí (134.6 y 186.6 mg) (Gráfica 12, Anexo: Cuadro 19). Al 12° mes los valores de biomasa obtenidos se comportaron de la misma forma que en el noveno mes, es decir, los valores más altos se obtuvieron en las plantas inoculadas con las cepas TLAX 40 y TLAX 49, sin que existieran diferencias estadísticas entre ellas (231.2 y 304.8 mg, respectivamente), y los valores más bajos se presentaron en las plántulas no inoculadas (110.0 mg), siendo estadísticamente diferentes con respecto a las no inoculadas (Gráfica 12, Anexo: Cuadro 20).

De acuerdo con los valores obtenidos en la altura, el diámetro de la corona foliar y la biomasa aérea, se puede establecer que la inoculación con las cepas de hongos ectomicorrizógenos favoreció el desarrollo de las plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* en comparación con las plántulas no inoculadas. Este hecho confirma que ésta es una especie que requiere de la asociación con hongos micorrizógenos para optimizar su crecimiento (Meyer, 1973).

Aunque de las dos cepas de hongos que se inocularon, la TLAX 49 corresponde a una especie generalista, es decir, que se asocia con un gran número de especies hospederas y la TLAX 40 es una especie que se asocia únicamente con especies del género *Pseudotsuga* (Molina *et al.*, 1992a, b), ambas tuvieron el mismo efecto sobre el crecimiento de las plántulas. Esto se puede explicar con el hecho de que ambas cepas provienen de los bosques de *P. macrolepis* y posiblemente forman micorriza de manera natural con esta conífera.

Por otra parte, debido a que *P. macrolepis* tiene crecimiento sumamente lento (Hermann y Lavender, 1990), el diámetro de la corona foliar no es una variable que proporcione información relevante para su crecimiento en periodos tiempos cortos.

Cabe mencionar que en México, no existen trabajos de micorrización *in vitro*, vivero o campo con especies de *Pseudotsuga*, pues la mayoría de ellos se han hecho con varias especies de pinos. En Tlaxcala se ha trabajado con inoculación de varias especies de pinos con hongos ectomicorrizógenos nativos, evaluando su efecto sobre la supervivencia, crecimiento y porcentaje de colonización (Navarro, 2000; Xochitiotzin, 2000; Santiago Martínez, 2002; Muñoz García 2003). Sin embargo, los datos obtenidos en estos trabajos no son comparables con los obtenidos para *P. macrolepis* ya que se trata de géneros distintos que tienen rasgos fisiológicos diferentes, entre ellos el ritmo de crecimiento (Hermann y Lavender, 1990).

4.10.3 PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN MICORRÍZICA

Esta variable es indicativa de la capacidad que tienen las cepas de hongos ectomicorrizógenos para colonizar y formar la asociación simbiótica con el sistema radical de la planta.

La colonización micorrízica se evaluó durante un año, en el primer trimestre se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de micorrización obtenidos con las cepas TLAX 40 y TLAX 49 (6.08 y 14.58% respectivamente). Las plántulas no inoculadas no presentaron colonización (Gráfica 13, Anexo: Cuadro 20). A los seis meses, los porcentajes fueron de 33.22% para la cepa TLAX 40 y de 39.94% para la TLAX 49, sin diferencias significativas entre éstas; no obstante, ambas tuvieron diferencias estadísticas significativas con los datos obtenidos las testigo, que presentaron un porcentaje de 2.56% (Gráfica 13, Anexo: Cuadro 19). Al noveno mes, las plántulas inoculadas con la cepa TLAX 40 mostraron el porcentaje de colonización más alto (59.54%), con respecto a los valores obtenidos con la cepa TLAX 49 (41.41%) y las plántulas testigo (3.75%), que registraron los valores más bajos. Cabe mencionar que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos tratamientos y el testigo (Gráfica 13, Anexo: Cuadro 20).

Finalmente, a los doce meses, las plántulas inoculadas con la cepa TLAX 40 presentaron 57.39% de colonización de y las inoculadas con la cepa TLAX 49, 49.05%, sin diferencias estadísticas; sin embargo, ambas fueron diferentes significativamente con respecto las plántulas no inoculadas que presentaron 6.81% de colonización (Gráfica 13, Anexo: Cuadro 20).

De acuerdo con el criterio de conteo de colonización micorrízica propuesto por Marx et al. (1991) para considerar si es adecuado o no un inóculo, el porcentaje de colonización obtenido para las plántulas inoculadas con ambas cepas al final del ensayo fue buena (49.05 a 57.39%, Gráfica 13, Anexo: Cuadro 20).

El hecho de que los porcentajes de colonización micorrízica fueran muy bajos en las plantas control (2.56-6.81%), se puede atribuir a que el vivero es un sistema abierto con condiciones semicontroladas, en donde las plantas estuvieron expuestas a varios factores como: la presencia de otras especies forestales que crecen en sustratos no fumigados y que contienen propágulos de otros hongos micorrízicos; los riegos por inundación y el viento que constituyen una forma de dispersión de propágulos de otros hongos.

Aunque en Estados Unidos se han realizado trabajos con *Pseudotsuga menziesii*, en ellos se evaluó la colonización y biomasa de las plantas en condiciones de campo y no de vivero (Dosskey et al., 1991; Roth y Berch, 1992; Berch y Roth, 1993; Parladé y Álvarez, 1993; Colinas et al., 1994; Perrin et al., 1996; Simard et al., 1997). En dichos trabajos los porcentajes de colonización fueron muy variables, dependiendo del hongo con el que se inoculó. Para especies como *Rhizopogon sp.*, *R. subareolatus* y *Pisolithus arhizus* se obtuvieron porcentajes de colonización entre 20 y 45%, en tanto que para especies como *Laccaria laccata* y *Hebeloma crustuliniforme* fue de 73 a 93%. Parladé y Álvarez (1993) señalan que para *P. menziesii* un porcentaje arriba de 50% es bueno, por lo cual los encontrados para *P. macrolepis* también se pueden ubicar dentro de esta categoría.

Con todo lo anterior se hace evidente la necesidad de realizar más estudios de micorrización controlada con *P. macrolepis*, en los que se incluyan aspectos como el uso del inóculo esporal, la caracterización de la micorriza, análisis histoquímicos que permitan dilucidar cómo influye la asociación micorrízica en la fisiología y el crecimiento de la planta, por ejemplo. Pues como se ha

observado hay una carencia de conocimientos sobre esta especie, los cuales pueden repercutir de manera decisiva en la recuperación de sus poblaciones naturales y su rescate.

4.11 CONCLUSIONES

Los porcentajes de supervivencia durante los diferentes tiempos de evaluación fueron similares entre las plántulas de *Pseudotsuga macrolepis* inoculadas y las no inoculadas. No obstante, el efecto real de la inoculación se puede evidenciar cuando las plantas sean transplantadas a condiciones de campo.

Aunque los valores obtenidos en altura y biomasa aérea fueron homogéneos entre las plántulas de *P. macrolepis* inoculadas y no inoculadas al inicio del experimento, los valores observados a los 12 meses en las plántulas inoculadas con alguna de las dos cepas fueron significativamente mayores con respecto a las no inoculadas.

Debido a que *P. macrolepis* es una conífera de lento crecimiento, un año no fue suficiente para evidenciar el efecto de la inoculación sobre el crecimiento en cuanto al diámetro de la corona foliar; por lo que esta variable no fue un buen indicador para esta conífera en periodos cortos.

El porcentaje de colonización micorrízica fue incrementándose a lo largo del periodo de evaluación, alcanzando al final del ensayo valores entre 49.05% para la cepa TLAX 49 y 57.39% para la TLAX 40 al final del ensayo, de acuerdo con los criterios existentes se puede considerar como bueno para esta conífera.

No se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los porcentajes de colonización en las plántulas inoculadas con alguna de las dos cepas durante todo el estudio. Sin embargo, estos fueron diferentes de los obtenidos en las plantas testigo que tuvieron porcentajes de colonización muy bajos debido a la presencia de otro hongo micorrizógeno contaminante.

El hecho de que se obtuvieran valores similares en las plántulas inoculadas con la cepa TLAX 40 y TLAX 49 indica que ambas tienen la capacidad de formar la asociación micorrízica en condiciones naturales, puesto que estas cepas provienen de los bosques de *Pseudotsuga macrolepis*.

Con los resultados del trabajo se puede concluir que ambas cepas tienen un gran potencial para ser utilizadas en la producción de plántula inoculada de esta especie y con ello establecer programas de reforestación en las zonas de distribución natural de *P. macrolepis*.

5. CONCLUSIÓN GENERAL

La micropropagación mediante el cultivo de tejidos vegetales permite controlar las condiciones físicas y químicas para regenerar una gran cantidad de individuos en tiempos cortos en comparación con los métodos convencionales. Además, se pueden explicar los procesos morfogénéticos que ocurren durante la regeneración y como influyen los diversos factores de cultivo.

Aunque no se logró la regeneración de plántulas completas *Pseudotsuga macrolepis*, la obtención de brotes adventicios a través del cultivo de embriones maduros representa un avance importante en el campo de la micropropagación; pues constituye una alternativa viable para tratar de conservar especies como dicha conífera, que se encuentran en peligro de extinción o en diversas categorías de riesgo debido a su difícil regeneración natural, endemismo o explotación inadecuada. A pesar de que el número de regenerantes obtenidos fue escaso (15), los resultados obtenidos fueron altamente significativos por el valor taxonómico y ecológico que la especie representa, además de que dieron la pauta para realizar modificaciones para optimizar el cultivo *in vitro* de *P. macrolepis*.

Considerando la problemática que se presentó durante la obtención de brotes adventicios, se proponen algunas recomendaciones que pueden ser útiles para optimizar la técnica de regeneración *in vitro* de *P. macrolepis*: 1) además de ANA/BA, probar otras auxinas y citocininas, como 2,4-D/k; 2) seleccionar aquellas combinaciones de concentraciones de reguladores de crecimiento en donde se obtuvo la formación de brotes; 3) realizar el seguimiento histológico e histoquímico del desarrollo morfogénético de los embriones hasta la obtención de brotes; 4) llevar a cabo pruebas fisiológicas en los brotes para determinar si son viables y están realizando adecuadamente sus procesos metabólicos y 5) probar otras técnicas de propagación como la embriogénesis somática.

El enraizamiento se considera como etapa difícil de lograr en las coníferas, para *P. macrolepis*, quizás es el aspecto aun pendiente de mayor relevancia, pues no se ha tenido éxito. Por lo que es importante realizar estudios que busquen las condiciones que estimulen la formación de raíces (reguladores de crecimiento, sustratos y el uso de hongos micorrizógenos, enraizamiento *ex vitro*), así como estudios que expliquen a nivel estructural, fisiológico o molecular las razones por las cuales se presenta o no el enraizamiento.

En cuanto a la procedencia, sería importante considerar no sólo poblaciones del estado de Tlaxcala, sino también de otros estados donde se distribuye *P. macrolepis*, con la finalidad de comparar la influencia que tiene el hábitat sobre la capacidad de respuesta morfogenética.

Con respecto a los hongos ectomicorrizógenos, el conocimiento de las especies existentes en las zonas forestales del país es aún precario, tanto en el ámbito ecológico como a nivel laboratorio, ya que se desconocen las condiciones de crecimiento bajo las cuales pueden reproducirse, así como su uso potencial en los programas de reforestación con fines de conservación o explotación. Debido a esto es necesario conocer las características fisiológicas de cepas nativas y optimizar su crecimiento *in vitro*. Para el caso particular de los hongos asociados a *P. macrolepis*, el número de cepas aisladas fue significativo (17). Las pruebas de crecimiento en diferentes concentraciones de glucosa a las que se sometieron 10 de ellas (2 de *Amanita* y 8 de *Suillus*) demostraron que éstas presentan diferentes estrategias de crecimiento, las cuales están determinadas por la capacidad que tiene el hongo por explotar, explorar y optimizar los recursos disponibles en el medio en donde se desarrollan. Estas estrategias se pueden explicar considerando las fases sucesionales de los hongos, el estado de madurez y la tasa fotosintética de la planta.

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, se proponen algunas recomendaciones que pueden ser útiles para evaluar algunos aspectos sobre la fisiología las de cepas de hongos ectomicorrizógenos: 1) Con respecto a la concentración de glucosa sería conveniente contemplar concentraciones extremas, esto con la finalidad de considerar las condiciones que se pueden encontrar en la naturaleza; 2) también sería importante probar otros tipos de azúcares como la fructuosa, sacarosa, trealosa, pues se ha observado que algunos hongos ectomicorrizógenos son capaces de utilizar otras fuentes de carbono incluyendo carbohidratos complejos; 3) asimismo, es relevante evaluar como influye la relación Carbono/Nitrógeno en el crecimiento de las cepas; 4) en cuanto a las variables evaluadas, la tasa media de crecimiento y la relación biomasa/área

son un buen indicativo del crecimiento miceliar, sin embargo, para el crecimiento radial y biomasa sería conveniente utilizar otros métodos de evaluación como la digitalización de imágenes, ya que permitiría evaluar la densidad de biomasa y la morfología de la colonia; 5) finalmente es necesario considerar otros factores que están involucrados en el crecimiento de las cepas de hongos ectomicorrizógenos como son el pH, temperatura, resistencia a compuestos tóxicos, etc. con el objetivo de determinar su tolerancia a condiciones adversas.

En cuanto a la inoculación de plantas de interés forestal con hongos ectomicorrizógenos, en diversos trabajos se ha evidenciado que su uso favorece el establecimiento, supervivencia y desarrollo de las coníferas. En este trabajo se observó que la inoculación con cualquiera de las dos cepas (*Suillus lakeii* y *S. glandulosipes*) favoreció el crecimiento de plántulas de *P. macrolepis* con respecto a las no inoculadas, por lo cual tienen un gran potencial para ser utilizadas en la producción de plántula de esta especie y con ello poder establecer programas de reforestación en las zonas de su distribución natural tratar de conservarlas.

Los resultados obtenidos en este trabajo, permitirán plantear nuevas estrategias de conservación de *P. macrolepis*, especie gravemente amenazada que corre el riesgo de desaparecer de su hábitat natural.

Finalmente todos los esfuerzos encaminados hacia la conservación aquellas especies en peligro de extinción son de gran relevancia y deben de continuar antes de éstas desaparezcan.

ANEXOS

I. Medios nutritivos: Murashigue & Skoog (Murashigue y Skoog, 1962), B5 modificado por Litz (Chávez Ávila *et al.*, 1992 a,b,c) y Schenk & Hildebrandt (Schenk y Hildebrandt, 1972).

	MS mg/l	B5 modificado	SH
Macronutrientes			
NH ₄ NO ₃	1650	134	2500
KNO ₃	1900	2500	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	400	400
KH ₂ PO ₄		170	
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	170	400	300
NH ₄ H ₂ PO ₄			
CaCl ₂ .2H ₂ O	4400	200	200
Micronutrientes			
KI	0.83	0.83	1
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	5
MnSO ₂ .H ₂ O	22.3	22.3	20
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6	1
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.2
CuSO ₄ .2H ₂ O	0.025	0.025	0.2
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.2
FeEDTA			
FeSO ₄ .7H ₂ O	37.3	37.3	15
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	27.8	27.28	20
Compuestos orgánicos			
Tiamina	0.1	0.1	5
Ac. nicotínico	0.5	0.5	5
Piridoxina	0.5	0.5	0.5
Glicina	2	2	
Mio-inositol	100	100	1000
L-Glutamina		400	
L-Arginina		100	
L-Asparagina		100	
Hidrolizado de caseína		100	
Sacarosa	30 g/l	60 g/l	30 g/l
Agar bacteriológico	8 g/l	9 g/l	7 g/l
pH	5.7-5.8	5.7-5.8	5.7-5.8

Cuadro 13. Tasa media de crecimiento (mm/día) y crecimiento radial (mm) de dos cepas de *Amanita* en cinco concentraciones de glucosa evaluados durante 30 días.

TASA MEDIA DE CRECIMIENTO

CEPAS	CONCENTRACIONES DE GLUCOSA (g/l)					
		5	10	20	30	40
TLAX 4 <i>Amanita barrowsii</i> SM 134	x	0.119	0.042	0.072	0.094	0.057
	σ	0.018	0.009	0.010	0.020	0.011
		a	a	a	a	a
TLAX 41 <i>Amanita muscaria</i> GF 1851	x	0.344	0.177	0.300	0.331	0.545
	σ	0.044	0.011	0.041	0.035	0.049
		ab	b	ab	ab	a

CRECIMIENTO RADIAL

CEPAS	CONCENTRACIONES DE GLUCOSA (g/l)					
		5	10	20	30	40
TLAX 4 <i>Amanita barrowsii</i> SM 134	x	8.80	7.70	8.40	8.00	7.70
	σ	0.489	0.374	0.927	0.418	0.200
		a	a	a	a	a
TLAX 41 <i>Amanita muscaria</i> GF 1851	x	16.30	11.00	14.70	15.50	20.70
	σ	1.28	0.310	0.624	1.151	1.593
		ab	c	b	b	a

x : Valor promedio de quince repeticiones

σ : Error estándar

Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas por fila

Cuadro 14. Biomasa (mg) y la relación biomasa/área (mg/mm²) de dos cepas de *Amanita* en cinco concentraciones de glucosa evaluadas durante 30 días.

BIOMASA

CEPAS	CONCENTRACIONES DE GLUCOSA (g/l)					
	5	10	20	30	40	
TLAX 4 <i>Amanita barrowsii</i> SM 134	x σ a	9.08 0.5 a	8.88 1.55 a	8.14 3.55 a	9.16 1.94 a	6.68 1.03 a
TLAX 41 <i>Amanita muscaria</i> GF 1851	x σ b	10.68 3.56 b	16.26 3.22 ab	16.20 5.70 ab	17.30 3.98 ab	24.38 4.20 a

BIOMASA/ÁREA (mg/mm²)

CEPAS	CONCENTRACIONES DE GLUCOSA (g/l)					
	5	10	20	30	40	
TLAX 4 <i>Amanita barrowsii</i> SM 134	x σ a	0.155 0.021 a	0.200 0.043 a	0.185 0.098 a	0.181 0.029 a	0.143 0.020 a
TLAX 41 <i>Amanita muscaria</i> GF 1851	x σ b	0.054 0.016 b	0.178 0.044 ab	0.099 0.068 ab	0.096 0.023 ab	0.069 0.004 b

x : Valor promedio de quince repeticiones

σ: Error estándar

Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas por fila

Cuadro 15. Tasa media de crecimiento (mm/día) obtenida en diferentes concentraciones de glucosa de ocho cepas de *Suillus* asociados con *P. macrolepis* evaluada durante 30 días.

CEPAS	CONCENTRACIONES DE GLUCOSA (g/l)					
		5	10	20	30	40
TLAX 55 <i>Suillus</i> sp. ME 1534	x σ	0.230 0.043 b	0.162 0.013 b	0.177 0.042 b	0.348 0.096 b	0.989 0.072 a
TLAX 42 <i>S. subaureus</i> GF 1852	x σ	1.053 0.177 a	0.867 0.026 ab	0.864 0.013 ab	0.852 0.065 ab	0.700 0.039 b
TLAX 48 <i>S. granulatus</i> GF 1862	x σ	0.490 0.057 c	0.805 0.090 cb	0.671 0.113 c	1.070 0.053 ab	1.226 0.037 a
TLAX 49 <i>S. glandulosipes</i> GF 1863	x σ	1.150 0.137 a	1.364 0.054 a	1.229 0.051 a	1.129 0.126 a	1.246 0.045 a
TLAX 51 <i>Suillus</i> sp. GF 1869	x σ	0.180 0.018 b	0.415 0.043 a	0.180 0.018 b	0.400 0.078 a	0.490 0.041 a
TLAX 53 <i>S. subaureus</i> GF 1883	x σ	0.107 0.031 b	0.708 0.079 a	0.537 0.098 a	0.663 0.034 a	0.630 0.068 a
TLAX 44 <i>Suillus</i> sp. KL 2650	x σ	1.255 0.053 a	1.270 0.049 a	0.916 0.035 b	0.841 0.028 b	0.835 0.055 b
TLAX 40 <i>S. lakei</i> KL 2740	x σ	0.236 0.019 a	0.236 0.019 a	0.275 0.035 a	0.307 0.109 a	0.224 0.20 a

x : Valor promedio de quince repeticiones

σ : Error estándar

Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas por filas

Cuadro 16. Crecimiento radial (mm) obtenido en diferentes concentraciones de glucosa de ocho cepas de *Sillus* asociados con *P. macrolepis* evaluado durante 30 días.

CEPAS	CONCENTRACIONES DE GLUCOSA (g/l)					
		5	10	20	30	40
TLAX 55 <i>Suillus</i> sp. ME 1534	x σ	13.20 1.52 bc	11.10 0.40 c	14.40 0.34 bc	19.80 2.39 b	33.00 1.89 a
TLAX 42 <i>S. subaureus</i> GF 1852	x σ	35.30 4.3 a	27.40 1.42 ab	29.00 0.50 ab	27.20 1.25 ab	25.20 0.73 b
TLAX 48 <i>S. glandulosipes</i> GF 1862	x σ	19.60 1.43 b	27.60 1.91 b	25.00 3.17 b	37.10 0.81 a	41.40 1.39 a
TLAX 49 <i>S. glandulosipes</i> GF 1863	x σ	36.80 3.70 a	44.50 1.14 a	39.30 1.57 a	37.30 2.82 a	39.40 1.36 a
TLAX 51 <i>Suillus</i> sp. GF 1869	x σ	12.20 0.68 b	18.70 0.88 a	17.70 2.14 ab	17.70 1.75 ab	17.70 1.32 ab
TLAX 53 <i>S. subaureus</i> GF 1883	x σ	9.30 0.64 b	25.70 1.66 a	21.40 1.94 a	24.40 0.74 a	21.20 1.68 a
TLAX 44 <i>Suillus</i> sp. KL 2650	x σ	42.00 2.16 a	41.20 1.40 a	29.50 1.08 b	30.4 1.18 b	30.10 2.05 b
TLAX 40 <i>S. lakei</i> KL 2740	x σ	12.90 0.96 ab	15.80 1.43 a	12.50 1.17 ab	9.30 0.83 b	12.90 0.57 ab

x : Valor promedio de quince repeticiones

σ : Error estándar

Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas por fila

Cuadro 17. Biomasa (mg) obtenida en diferentes concentraciones de glucosa de ocho cepas de *Suillus* asociados con *P. macrolepis* evaluada durante 30 días.

CEPAS	CONCENTRACIONES DE GLUCOSA (g/l)					
		5	10	20	30	40
TLAX 55 <i>Suillus</i> sp. ME 1534	x σ	8.14 1.21 b	4.60 0.439 b	13.70 3.33 b	17.46 3.6 ab	30.18 5.54 a
TLAX 42 <i>S. subaureus</i> GF 1852	x σ	32.22 6.18 b	39.56 3.60 ab	50.22 2.35 a	39.56 2.49 ab	35.08 3.20 ab
TLAX 48 <i>S. glandulosipes</i> GF 1862	x σ	17.64 0.150 c	30.38 3.29 bc	29.96 5.78 bc	50.64 2.47 a	44.74 1.14 ab
TLAX 49 <i>S. glandulosipes</i> GF 1863	x σ	56.60 6.00 b	71.46 4.24 ab	104.16 9.00 a	78.40 13.0 ab	63.24 7.74 b
TLAX 51 <i>Suillus</i> sp. GF 1869	x σ	2.88 0.723 b	18.80 2.56 a	18.06 2.84 a	16.14 1.77 a	22.76 1.07 a
TLAX 53 <i>S. subaureus</i> GF 1883	x σ	2.56 0.470 b	20.00 4.91 a	17.38 1.93 a	22.08 2.24 a	15.00 2.29 a
TLAX 44 <i>Suillus</i> sp. KL 2650	x σ	48.90 2.17 b	76.54 7.08 a	44.34 6.13 b	48.36 5.72 b	42.74 8.94 b
TLAX 40 <i>S. lakei</i> KL 2740	x σ	13.48 1.25 b	26.48 3.06 a	19.54 3.72 ab	11.04 2.72 b	14.92 2.14 ab

x : Valor promedio de quince repeticiones

σ : Error estándar

Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas por fila

Cuadro 18. Relación biomasa/área (mg/mm²) obtenida en diferentes concentraciones de glucosa de ocho cepas de *Suillus* asociados con *P. macrolepis* evaluada durante 30 días.

CEPAS	CONCENTRACIONES DE GLUCOSA (g/l)					
		5	10	20	30	40
TLAX 55 <i>Suillus</i> sp. ME 1534	x σ	0.069 0.018 a	0.046 0.004 a	0.078 0.009 a	0.062 0.016 a	0.044 0.011 a
TLAX 42 <i>S. subaureus</i> GF 1852	x σ	0.043 0.017 b	0.068 0.009 ab	0.075 0.006 a	0.069 0.007 ab	0.070 0.006 ab
TLAX 48 <i>S. glandulosipes</i> GF 1862	x σ	0.063 0.011 a	0.050 0.002 ab	0.065 0.015 a	0.046 0.003 ab	0.032 0.002 b
TLAX 49 <i>S. glandulosipes</i> GF 1863	x σ	0.058 0.013 ab	0.045 0.003 b	0.086 0.004 a	0.080 0.023 ab	0.053 0.009 ab
TLAX 51 <i>Suillus</i> sp. GF 1869	x σ	0.025 0.007 b	0.069 0.011 ab	0.091 0.024 ab	0.040 0.018 ab	0.106 0.020 a
TLAX 53 <i>S. subaureus</i> GF 1883	x σ	0.035 0.003 a	0.036 0.008 a	0.062 0.016 a	0.046 0.004 a	0.041 0.006 a
TLAX 44 <i>Suillus</i> sp. KL 2650	x σ	0.036 0.005 b	0.058 0.007 ab	0.068 0.012 a	0.066 0.007 a	0.062 0.013 ab
TLAX 40 <i>S. lakei</i> KL 2740	x σ	0.110 0.020 a	0.154 0.037 a	0.174 0.036 a	0.163 0.035 a	0.0107 0.030 a

x : Valor promedio de quince repeticiones

σ : Error estándar

Letras iguales no hay diferencias estadísticamente significativas por fila

Cuadro 19. Porcentaje de supervivencia, altura y diámetro de la corona foliar de plántulas de *P. macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos ectomicorrizógenos evaluados durante 12 meses.

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA (TRIMESTRAL)			
	3o.	6o.	9o.	12o.
TLAX 40 <i>Suillus lakei</i> (KL 2740)	93.15 a	86.3 a	75.34 a	73.97 a
TLAX 49 <i>S. glandulosipes</i> (GF 1863)	90.32 a	80.64 a	74.19 a	67.14 a
TESTIGO	92.95 a	88.73 a	84.5 a	80.28 a

*letras iguales por columna no hay diferencias estadísticamente significativas

TRATAMIENTO	ALTURA DE PLÁNTULAS (cm) (TRIMESTRAL)				
		3o.	6o.	9o.	12o.
TLAX 40 <i>Suillus lakei</i> (KL 2740)	X σ	5.63 a 0.12	9.92 a 0.42	14.47 a 0.66	14.83 a 0.61
TLAX 49 <i>S. glandulosipes</i> (GF 1863)	X σ	4.42 b 0.16	4.82 b 0.16	10.66 b 0.75	12.59 a 0.90
TESTIGO	X σ	3.84 b 0.14	5.11 b 0.21	7.67 c 0.33	10.89 b 0.52

*letras iguales por columna no hay diferencias estadísticamente significativas

x: Valor promedio de 45 plántulas, σ: error estándar

TRATAMIENTO	DIÁMETRO DE PLÁNTULAS (cm) (TRIMESTRAL)				
		3o.	6o.	9o.	12o.
TLAX 40 <i>Suillus lakei</i> (KL 2740)	X σ	2.61 a 0.18	2.96 a 0.30	3.36 a 0.35	3.91 a 0.10
TLAX 49 <i>S. glandulosipes</i> (GF 1863)	X σ	2.26 a 0.11	2.48 a 0.21	2.97 b 0.14	3.05 b 0.23
TESTIGO	X σ	2.60 a 0.26	2.85 a 0.19	3.68 a 0.18	4.36 a 0.22

*letras iguales por columna no hay diferencias estadísticamente significativas

x: Valor promedio de 45 plántulas, σ: error estándar

Cuadro 20. Biomasa aérea y porcentaje de colonización micorrízica de plántulas de *P. macrolepis* no inoculadas e inoculadas con dos cepas de hongos ectomicorrizógenos evaluados durante 12 meses.

TRATAMIENTO	BIOMASA AÉREA DE PLÁNTULAS (mg) (TRIMESTRAL)				
		3o.	6o.	9o.	12o.
TLAX 40 <i>Suillus lakei</i> (KL 2740)	X σ	57.40 a 6.23	83.40 a 13.54	134.6 a 21.87	231.2 a 45.79
TLAX 49 <i>S. glandulosipes</i> (GF 1863)	X σ	70.40 a 9.93	72.40 a 8.86	186.6 a 31.85	304.8 a 38.19
TESTIGO	X σ	70.40 a 6.42	71.0 a 10.83	91.8 b 17.26	110.0 b 15.48

*letras iguales por columna no hay diferencias estadísticamente significativas

x: Valor promedio de 45 plántulas, σ : error estándar

TRATAMIENTO	PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN (TRIMESTRAL)			
	3o.	6o.	9o.	12o.
TLAX 40 <i>Suillus lakei</i> (KL 2740)	16.08 a	33.22 a	59.54 a	57.39 a
TLAX 49 <i>S. glandulosipes</i> (GF 1863)	14.58 a	39.94 a	41.41 b	49.05 a
TESTIGO	0 b	2.56 b	3.75 c	6.81 b

*letras iguales por columna no hay diferencias estadísticamente significativas

x: valor promedio de cinco plántulas

LITERATURA CITADA

- AboEl-Nil, M.M. 1987. Tissue culture of Douglas-fir and western North American conifers. In: Bonga, J.M. y D.J. Durzan (Eds.) Cell and tissue culture in forestry. Vol 3, Martinus Nijhoff Publishers.
- Acosta-Pérez, R. 1992. Algunas coníferas del estado de Tlaxcala. Folleto de divulgación No. 14. Gob. del Estado de Tlaxcala-Jardín Botánico Tizatlán, Tlaxcala, México.
- Ahuja, M.R. 1993. Micropropagation á la carte. In: Ahuja, M.R. (Ed) Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers. Pp. 3-9.
- Agerer, R. 1986. Studies on ectomycorrhizae II. Introducing remarks on characterization and identification. Mycotaxon 26:473-492.
- Aguilar, A.R., L. Varela y Y.A. Carreón. 2002. Estudio preliminar del efecto de la asociación ectomicorrícica en etapas iniciales del crecimiento de *Pinus michoacana* bajo condiciones de vivero. In: Guzmán G. y G. Mata (Eds.) Estudio sobre los hongos latinoamericanos. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología. Xalapa, Veracruz. Pp 363.
- Aitken-Christie, J., A.P. Singh; K.J. Horgan y T.A. Thorpe. 1982. Cellular events influencing shoot formation in *Pinus radiata* cotyledons. In: Fujiwara A. (Ed.). Plant tissue culture. ProC. 5th Intl. Cong. Plant. Tissue and Cell Culture.
- Aitken-Christie, J. y T.A. Thorpe. 1984. Clonal propagation: gymnosperms. In: Vasil, I.K. (Ed) Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press. Pp 82-95.
- Álvarez, I. 1985. Producción y manejo del inóculo, técnicas de inoculación. In: Fundación Internacional para la Ciencia, (FIC)-Centro Agronómico Experimental de Investigación y Enseñanza (CATIE), (Eds). Técnicas de investigación en micorrizas. Turrialba, Pp 131-136
- Amaranthus, M.P., C.Y. Li y D.A. Perry. 1987a. Nitrogen fixation within mycorrhizae of Douglas-fir seedlings. In: Sylvia, D. M; L.L. Hung y J.H. Graham (Eds.). Mycorrhizae in the Next Decade: Practical Applications and Research Priorities. University of Florida, Gainesville.
- Amaranthus, M.P., D.A. Perry y S.L. Borchers. 1987b. Mycorrhizae improve seedling survival on a hot, dry site in southwest Oregon. In: Schenk, N. (Ed.). Proceedings of the 7th North American Conference on Mycorrhizae. Gainesville.
- Anderson, A., 1991. The Influence of the plant root on mycorrhizal formation. In: Allen M. (Ed) Mycorrhiza functioning. Chapman y Hall, New York, Pp 37-64.
- Anónimo. 1975. Munsell Soil Color Charts. Soil Test Inc. Maryland.
- Aquihuatl, M. A. 2003. Fisiología del crecimiento micelial de hongos ectomicorrizógenos en medio sólido. Tesis de doctorado. Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México, D.F.
- Aquihuatl, M. A., W. Rodríguez y S. Roussos, 1998a. Efecto de la glucosa en el crecimiento de hongos ectomicorrízicos del género *Suillus*. Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica. Colima, Colima. Pp 79.
- Aquihuatl, M. A., W. Rodríguez y S. Roussos, 1998b. Velocidad de extensión radial versus fuentes de nitrógeno en *Lactarius* y *Pisolithus*. Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica. Colima, Colima. Pp 80.
- Aquihuatl, M. A., W. Rodríguez, I. Reyes y S. Roussos, 2000. Cultivo de hongos ectomicorrízicos en soporte: fisiología del crecimiento de *Suillus collinitus*. Memorias VII Congreso Nacional de Micología. Querétaro, Querétaro. Pp 213.
- Aquihuatl, M. A. 2003. Fisiología del crecimiento micelial de hongos ectomicorrizógenos en medio sólido. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.

- Arias, M. y O. Garza-Ocañas, 1997 a. Descripción de ectomicorrizas por cuatro especies de hongos en vivero. Memorias del VI Congreso Nacional de Micología. Tapachula, Chiapas. Pp 132.
- Arias, M. y O. Garza-Ocañas, 1997 b. Inoculaciones individuales y mixtas de 4 hongos micorrícicos en 2 especies de pinos. Memorias del VI Congreso Nacional de Micología. Tapachula, Chiapas. Pp 133.
- Arteca, R.N. 1996. Plant growth substances: principles and applications. Chapman and Hall. New York.
- Attree, S.M. y L.C. Fowke. 1991. Micropropagation through somatic embryogenesis in conifers. In: Bajaj Y.P.S. (Ed). Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 17 High-tech and micropropagation I. Springer-Verlag, Berlin. Pp 53-70.
- Ávila, Z. H., 1988. Aislamiento, caracterización y confirmación de micelios de cuatro especies de *Amanita* (Agaricales) de México. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México D. F.
- Bâ, A.M., J. Garbaye, F. Martin y J. Dexheimer. 1994. Root soluble carbohydrates of *Azelia africana* Sm. Seedlings and modifications of mycorrhiza establishment in response to the excision of cotyledons. *Mycorrhiza* 4:269-275.
- Bárcenas, E., E. Pérez-Silva, A. Burrola y G. Serrano. 1996. Taxonomía y descripción de ectomicorrizas de hongos agaricales de bosques de pino-encino en el Estado de México. I Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica. Resumen, Jalapa. Veracruz. Pp 50.
- Bárcenas, E., C. Serrano, A. E. Díaz y C. Burrola. 2000. Determinación del porcentaje de micorrización en plántulas de *Pinus*, en los viveros de PROBOSQUE. Memorias VII Congreso Nacional de Micología. Querétaro, Querétaro. Pp 112.
- Battacharya, P., S. Dey y B.C. Battacharya. 1994. Use of low-cost gelling agents and support matrices for industrial scale plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37: 15-23.
- Berch, S.M. y A.L. Roth. 1993. Ectomycorrhizae and growth of Douglas-fir seedlings preinoculated with *Rhizopogon vinicolor* and outplanted on eastern Vancouver Island. *Can. J. For. Res.* 23:1711-1715.
- Bergmann, B.A. y A.M. Stomp. 1994. Effect of genotype *in vitro* adventitious shoot formation in *Pinus radiata* and correlations between pairs of phenotypic traits during *in vitro* shoot development. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 39:185-194.
- Biding, H. y G. Krumbiegel-Schoeren. 1984. Clonal propagation: shoot culture. In: Vasil, K. (Ed) Cell culture and somatic cell genetics in plants Vol. 1 Academic Press Inc.
- Birchler, T., R.W. Rose, A. Arroyo y M. Pardos. 1998. La planta ideal: revisión del concepto, parámetros definitorios e implementación práctica. Ed. Mundi-Prensa, España.
- Bonga, J.M. y P. von Aderkas. 1992. *In vitro* culture of trees . Forestry Sciences, Vol 38. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Bowen G.D. 1973. Mineral nutrition of ectomycorrhizae. In: Marks G.C. y T.T. Kozlowski (Eds.). Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology. Academic Press, New York.
- Burgess, J. 1985. An introduction to plant cell development. Cambridge University Press. London.
- Burrola A. C., E. Bárcenas y E. Pérez-Silva. 1997. Caracterización de la ectomicorriza en el género *Amanita*. Memorias VI Congreso Nacional de Micología. Tapachula, Chiapas. Pp 189.
- Cairns, M.A., R. Dirzo y F. Zadroga. 1995. Forest of Mexico. *Journal Forestry.* 93(7):21-24.
- Calixto, F. y M.S. Pais. 1997. Adventitious shoot formation and plant regeneration from *Pinus pinaster* Sol. ex. Aiton. In *Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33:119-124.

- Campbell, R.A. y D.J. Durzan. 1975. Induction of multiple buds and needles in tissue cultures of *Picea glauca*. Can. J. Bot. 53:1652-1657.
- Cano Pineda, A. y V.M. Cetina Alcalá. 2004. Calidad de planta en vivero y prácticas que influyen en su producción. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Saltillo. Folleto Técnico No. 12, Coahuila, México.
- Carranza, T. N., A. Hernández, L. Varela y G. Chávez. 1998. Validación de métodos de conservación a corto, mediano y largo plazo para hongos ectomicorrízicos. Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica. Colima, Colima. Pp 81.
- Carrillo, S.J.; M.J. Jasso; C.R. Villarreal; M.O. Yañez y P.L. Hernández. 1970. Instructivo para la recolección y manejo de semilla de coníferas hasta su almacenamiento. Depto. de Mejoramiento de Árboles Forestales. SAG-SFT-INIF, México, D.F.
- Castellano, M. A. y N. L. Bougher. 1994. Consideration of taxonomy and biodiversity of Australian ectomycorrhizal fungi. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (Eds). Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. Pp 37-46.
- Castellano, M. A. y R. Molina. 1989. Mycorrhizae. In: Landis, T. D., R. W. Tinus, S. E. McDonald y J. P. Barnett (Eds). The container tree nursery manual. Volume 5, Agricultural Handbook 674. United States Department of Agriculture, Forest Service, Washington, D. C. Pp 101-167.
- Castillo, J., J. García y F. E. San Martí. 1979. Algunos datos sobre la distribución ecológica de los hongos, principalmente los macromicetos, en el estado de Nuevo León. Bol. Soc. Mex. Mic. 13:229-238.
- Cázares, E. y J.E. Smith. 1996. Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhizae in *Pseudotsuga menziesii* and *Tsuga heterophylla* seedlings grown in Oregon Coast range soils. Mycorrhiza 6:65-67.
- Colinas, C., R. Molina, J. Trappe y D. Perry. 1994. Ectomicorrizas and rhizosphere microorganisms of seedlings of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco planted on a degraded site and inoculated with forest soils pretreated with selective biocides. New Phytol. 127:329-337.
- Chalupa, V. 1987. Temperature. In: Bonga J.M. y D.J. Durzan (Eds) Cell and tissue culture in forestry. General principles and biotechnology. Vol. I Martinus Nijhoff Pub. Pp. 142-151.
- Chávez Ávila, V.M., Litz, R.E., Moon, P.A. y Norstog D.K. 1992a. Somatic embryogenesis from leaf callus of mature plants of the gymnosperm *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer (Cycadales). In Vitro Cell. Dev. Biol. 28:59-63.
- Chávez Ávila, V.M., Litz, R.E. y Norstog D.K. 1992b. *In vitro* morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30:93-98.
- Chávez Ávila, V.M., Litz, R.E. y Norstog D.K. 1992c. Somatic embryogenesis and organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumilla*. Plant Cell Org. Cult. 30:99-105.
- Chávez Ávila, V.M. y A. Rubluo. 1995. El cultivo de tejidos vegetales en la conservación. In: Linares, E., P. Dávila, F. Chiang, R. Bye y T. Elias. Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. Instituto de Biología-UNAM. México, D.F. pp. 123-138.
- Cheah, K.T. y T.Y. Cheng. 1978. Histological analysis of adventitious bud formation in cultures douglas fir cotyledon. Amer. J. Bot. 65(8):845-849.
- Chen X-Y. y R. Hampp. 1993. Sugar uptake by protoplast of the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. New Phytol. 125:601-608.
- Cheng, T-Y. 1976. Vegetative propagation of western hemlock (*Tsuga heterophylla*) through tissue culture. Plant Cell Physiol 17:1347-1350.

- Cheng, T. 1977. Recent advances in development of *in vitro* techniques for Douglas fir: In: Sharp, W.R., P.O. Larsen, E.F. Paddock y V. Raghavan (Eds.). Plant cell and tissue culture, principles and applications. Ohio State University Press, Columbus. Pp. 493-508.
- Cheng, T. y T.H. Voqui. 1977. Regeneration of Douglas-fir plantlets through tissue culture. *Science* 198:306-307.
- Cifuentes, B.J., M. Villegas y L. Pérez Ramírez. 1986. Hongos. In: Consejo Nacional de Flora de México (Ed.). Manual de Herbario. México, D.F. 55-64.
- Cigarrero, C., L. Varela y E. Amora-Lazcano. 2002. Evaluación de la micorrización de *Pinus montezumae* y control de calidad del inoculante aplicado en el vivero de San Luis Tlaxialtemalco, México. In: Guzmán G. y G. Mata (Eds.) Estudio sobre los hongos latinoamericanos. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología. Xalapa, Veracruz. Pp 365.
- Contreras, A.R. 1992. Factores de mortalidad en conos de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Tesis Licenciatura. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México.
- Cordell, C. E., D. H. Marx y C. Caldwell. 1991. Operational application of specific ectomycorrhizal fungi in mineland reclamation. In: National meeting of the american society for surface mining and reclamation. Durango. Pp 8.
- Cornejo, O.E.H. 1987. Aspectos ecológicos y dasonómicos del bosque de *Pseudotsuga-Pinus-Abies* en la Sierra de la Marta, Arteaga, Coahuila. Tesis Licenciatura, Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Buenavista, Saltillo, Coahuila.
- Cromer, D.A. 1935. The significance of the mycorrhiza of *Pinus radiata*. *Bull. For. Bur. Aust.* 16:19.
- Cronquist, A. 1984. Introducción a la Botánica. CECSA, México, D.F.
- Cruz-Ulloa, B. S., 1990. Cultivo *in vitro* y caracterización de micelios de basidiomicetos ectomicorrizógenos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F.
- Cruz-Ulloa, B. S., 1991. Características miceliales de *Pisolithus tinctorius* y tres especies de *Rhizopogon*. Memorias IV Congreso Nacional de Micología. Tlaxcala. Tlax. Pp 137.
- Cuaxilo, L. V. 1991. Desarrollo de tres cepas del hongo ectomicorrízico *Laccaria bicolor* (Maire) Orton aislada de los bosques de la Malintzin sobre medios de cultivo a base de espirulina. Tesis Profesional, Depto. de Ingeniería y Tecnología. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.
- Cuevas-Rangel, R. A. 1979. Pruebas de inoculación con el hongo micorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch, en plántulas de *Pinus montezumae* Lamb. en suelos de vivero. *Ciencia Forestal* 4:19:46-62.
- Cuevas-Rangel, R. A. y M. Zamora Martínez. 2002. Efecto de algunos hongos ectomicorrizógenos y ácidos fúlvicos en la producción de biomasa de tres especies de *Eucalyptus*, en vivero. In: Guzmán G. y G. Mata (Eds.) Estudio sobre los hongos latinoamericanos. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología. Xalapa, Veracruz. Pp 366.
- Dahlberg, A. y R. Finlay. 1999. *Suillus* In: Cairney, J.W.G. y S.M. Chambers (Eds). Ectomycorrhizal fungi: Key genera in profile. Springer-Verlag, Alemania. Pp 33-55.
- Darnell, J., H. Lodish y D. Baltimore. 1990. Plant hormones and plant growth and differentiation. In: Molecular cell biology. Scientific American Books, New York. Pp 752-759.
- Davies, P.J. 1990. Plant hormones and the role. In: Davies, P.J. Plant growth and development. 3°. Ed. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Netherlands Pp. 1-11.
- Deacon, J.W. y L.V. Fleming. 1992. Interactions of ectomycorrhizal fungi. In: Allen M.J. (Ed). Mycorrhizal functioning. An integrative plant-fungal process. Chapman & Hall. New York. Pp 249-300.

- Debreczy, Z. y I. Rácz. 1995. New species and varieties of conifers from México. *Phytologia* 78(4):217-307.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2001. NOM-059-ECOL-2001. Miércoles 6 de marzo del 2002. Poder Ejecutivo, Secretaría de Desarrollo Social, México, D.F.
- Dighton, J., J.M. Poskitt y D.M. Howard. 1986. Changes in occurrence of basidiomycete fruitbodies during forest stand development: with specific reference to mycorrhizal species. *Trans. British Myc. Soc.* 87:163-171.
- Dixon, R. K., H. E. Garret, J. A. Bixby, G. S. Cox y J. G. Tompson. 1981. Growth ectomycorrhizal development and root soluble carbohydrates of black oak seedlings fertilized by two methods. *Forest Sci.* 270:617-624.
- Dodd, J.C. y B.D. Thomson. 1994. The screening and selection of inoculant arbuscular-mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (Eds). *Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. Pp 149-158
- Domínguez Álvarez, F.A. 1986. Estudio ecológico de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco, en la región de Huayacocotla, Ver. Tesis Licenciatura, División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Méx.
- Dosskey, M.G., R.G. Linderman y L. Boersma. 1990. Carbon-sink stimulation of photosynthesis in Douglas fir seedlings by some ectomycorrhizas. *New Phytol.* 115:269-274.
- Dosskey, M.G., L. Boersma y R.G. Linderman. 1991. Role for the photosynthate demand of ectomycorrhizas in the response of Douglas fir seedlings to drying soil. *New Phytol.* 117: 327-334.
- Duddridge, J. A. y D. J. Read. 1984. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. II. ectomycorrhizal development in pine *in vitro*. *New Phytol* 96:575-582.
- Dustan, D.I. y T.A. Thorpe. 1984. Plant tissue culture technology and its potential for use with forest and bioenergy tree species. In: Hasnain, S. (Ed) *Proc. 5th. Canadian bio-energy research and development seminar*. Elsevier Applied Sciences, London. Pp 23-35.
- Ek, M., P.O. Ljungqvist y E. Stenström. 1983. Indol-3-acetic acid production by mycorrhizal fungi determined by gas chromatography-mass spectrometry. *New Phytol* 94:401-407.
- Ellis, D.D. y R.C. Judd. 1987. SDS-PAGE analysis of bud-forming cotyledons of *Pinus ponderosa*. *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 11:57-65.
- Ellis, D.D. y D.E. Bilderback. 1989. Temporal competence of embryonic *Pinus ponderosa* cotyledons to form multiple buds *in vitro*. *Amer. J. Bot.* 78(3):348-355.
- Estrada-Torres, A. y M. Valdés. 1986. El crecimiento y la micorrización de plántulas de pino inoculadas con *Pisolithus tinctorius* en el Semillero o en el Envase de Trasplante. *Biótica* 11:137-142.
- Firn, R.D. 1986. Growth substance sensitivity: the need for clearer ideas, precise terms and purposeful experiments. *Plant Physiol.* 67:267-272.
- Farjon, A. 1990. Pinaceae drawings and description of the genera *Abies*, *Cedrus*, *Pseudolarix*, *Keteleeria*, *Nothotsuga*, *Tsuga*, *Cathaya*, *Pseudotsuga*, *Larix* and *Picea*. Koletz Scientific Books, Köningstein. Pp. 177-181.
- Foster, R.C. y G.C. Marks. 1973. Structure, morphogenesis and ultrastructure of ectomycorrhizae. In: Marks G.C. y T.T. Kozlowski (Eds). *Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology*. Academic Press, New York. Pp 25-35
- France, R.C. y C.P. Reid. 1983. Interactions of nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.* 61: 964-984.

- Franco, P.J.G. 1990. Dinámica de la regeneración natural de *Pseudotsuga flahaultii* Flous, en el bosque de *Pseudotsuga-Pinus-Abies*. Tesis licenciatura, Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Buenavista, Saltillo, Coahuila.
- García-Campusano, F.T.A. 1999. Inducción de brotes y enraizamiento a partir del cultivo *in vitro* de embriones maduros de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Tesis Licenciatura. Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala.
- Garza, E. E. Rincón, L. Varela y A. Estrada-Torres, 1996. Las ectomicorrizas de un bosque de encino en la reserva ecológica del Ajusco, México, D. F. I Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica. Resumen, Jalapa, Veracruz. Pp 51.
- Garza-Ocañas, F. 1986. Hongos ectomicorrízicos en el Estado de Nuevo León. Rev. Mex. Mic. 2:197-206.
- George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1. The technology. 2da. ed. Exegetics Limited. London.
- Gianinazzi-Pearson V. y S. Gianinazzi. 1989. Phosphorus metabolism in mycorrhizas. In: Boddy L. R. Marchant y D. J. Reid (Eds). Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 227-242.
- Goldfarb, B. y J.B. Zaerr. 1989. Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. In: Bajaj, Y.P.S. (Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry. Springer-Verlag, Berlin. Pp. 526-545.
- Grove, T. S. y N. Malajczuk. 1994. The potential for management of ectomycorrhiza in forestry. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (Eds.). Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Pp 159-170.
- Grönroos, R. y S. von Arnold. 1985. Initiation and development of wound tissue and roots on hypocotyl and epicotyl cuttings of eastern white pine (*Pinus strobus*) seedlings. Physiol. Plant. 64:393-401.
- Grönroos, R. y S. von Arnold. 1987. Initiation of roots on hypocotyl cuttings of *Pinus contorta* *in vitro*. Physiol. Plant. 64:393-401.
- Gupta P.K., R. Timmins y W.C. Carlson. 1993. Somatic embryogenesis: a possible tool for large scale propagation of forest species. In: Young Soh, W., J.R. Liu y A. Komamine (Eds.). Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants. Korean Soc. Plant Tissue Culture. Pp 18-37.
- Guzmán, G. 2000. Nuevos Datos Taxonómicos y Biogeográficos de *Scleroderma stellatum* (Basidiomycotina, Sclerodermatales). Memorias VII Congreso Nacional de Micología. Querétaro, Querétaro. Pp 29.
- Hacskeylo, E. 1973. Carbohydrate physiology of ectomycorrhizae. In: Marks G.C. y T.T. Kozlowski (Eds.). Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology. Academic Press, New York. Pp 207-231
- Harley, J. L. 1940. A study of the root system of the beech in woodland soil with special reference to mycorrhizal infection. J. Ecol. 28:107-117.
- Harley, J.L. y E.L. Harley. 1987. A check-list of mycorrhiza in the British flora. New Phytol 105 (2):1-102.
- Harley, J. L. y S. E. Smith. 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press, London.
- Harry, I.S. y T.A. Thorpe. 1994. Regeneration of plantlets through organogenesis from mature embryos of Jack pine. Plant Cell Tiss.Org. Cult. 37:159-164.
- Harry, I.S.; C. Martínez-Pulido y T.A. Thorpe. 1995. Plantlet regeneration from mature embryos of *Juniperus cedrus*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 41:75-78.
- Hartman, K. 1987. Propagación de plantas. CECSA. México, D.F.

- Hermann, R.K. y D.P. Lavender. 1990. *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco: Pinaceae In: Russell, M.B. y B.H. Honkala (Eds.) Silvies of North America 1: Conifers. Agriculture Handbook 654. Vol. 1 USDA Forest Servives, Washington, D.C.
- Ho, R.H. 1987. Embryo Culture. In: Bonga, J.M. y D.J. Durzan (Eds.) Cell and tissue culture in forestry. Specific principles and methods: Growth and development. Vol. 2. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Pp 137-167.
- Honrubia, M., P. Torres, G. Días y A Cano. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. ICONA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. LUDECME VIII. Monografía 54, Murcia, España.
- Honrubia, M., P. Torres, G. Díaz y A. Morte. 1993. Biotecnología Forestal: Micorrización y Micropropagación. (Manual de Prácticas) Universidad de Murcia y Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos, Murcia.
- Hopkins, W.G. 1995. Introduction to plant physiology. John Wiley and Sons Inc. USA.
- Horgan, K. y J. Aitken-Christie. 1981. Reliable plantlet formation from embryos and seedling shoot tips of radiata pine. *Physiol. Plant.* 53:170-175
- Hoston, T.R. y T.D. Bruns. 1998. Multiple-host fungi are the most frequent and abundant ectomycorrhizal types in a mixed stand of Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii*) and bishop pine (*Pinus muricata*). *New Phytol.* 139:331-339
- Hurtado, M.D.V. y M. E. Merino. 1991. Cultivo de tejidos vegetales. Trillas, México, D.F.
- Hutchinson, L.J. 1991. Description and identificación of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America, *Myxotaxon* 42:387-504.
- Ineichen, K. y V. Wiemken. 1992. Changes in the fungus-specific, soluble-carbohydrate pool during rapid and synchronous ectomycorrhiza formation of *Picea abies* with *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza* 2:1-7.
- Ingleby, K., P.A. Mason, F. T. Last y L.V. Fleming. 1990. Identification of ectomycorrhizas. ITE Research Publication No. 5. Institute of Terrestrial Ecology, London.
- Jackson, R.M. y P.A. Mason. 1984. Mycorrhiza. Studies in biology. No. 159. Edward-Arnold. London.
- Jacobs, W.P. 1979. Plant hormones and plant development. Cambridge University Press. London.
- Jasper, D. A. 1994. Management of mycorrhizas in revegetation. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (Eds.). Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Pp 211-219.
- Jennings, D. H. 1989. Some perspectives on nitrogen and phosphorus metabolism in fungi. In: Boddy L. R. Marchant y D. J. Reid (Eds.). Nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi. Cambridge University Press, Cambridge, pp.1-32.
- Juárez, L., A. Montoya-Esquível y A. Kong-Luz. 2000. Estudio taxonómico sobre el género *Amanita* en el Parque Nacional la Malinche. Memorias VII Congreso Nacional de Micología. Querétaro, Quretaro. Pp 119.
- Kevers, C., M. Coumans, M. F. Coumans-Gillés y Th. Gaspar. 1984. Physiological and biochemical events leading to vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 61:69-74.
- Klironomos, J.N. y W.B. Kendrick. 1993. Research on mycorrhizas-trends in the past 40 years as expressed in the mycolite database. *New Phytol* 125:595-600.
- Kolevska-Pleitikapic, B. y Z. Buturovic-Deric. 1995. Regeneration of *Picea omorika* plants via organogenesis. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 41:189-192.

- Kong-Luz A. y G. Santiago-Martínez. 1991. Ectomicorriza de *Russula brevipes* con *Abies religiosa*. Memorias del IV Congreso Nacional de Micología, Tlaxcala, Tlax.. Pp 138.
- Kornerup, A. y J.H. Wanscher. 1984. Methuen handbook of colour. 3º. ed. Richarg Clayltd, London.
- Kyte, L. 1987. Plant from test tubes. An introduction to micropropagation. Timber Press. Portland.
- Laiho, O. 1988. The structure of mycorrhizae and mycorrhizal in forest soil and nurseries. *Karstenia* 28:63.
- León, G. y G. Guzmán. 1980. Las especies de hongos micorrízicos conocidas en la región de Uxpanapa-Coatzacoalcos-Los Tuxtlas-Papaloapan-Xalapa. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 14:27-38.
- Le Tacon, F., J. Garbaye, D. Bouchard, G. Chevalier, J. M. Olivier, J. Guimberteau, N. Poitou y H. Frochot. 1988. Field results from ectomycorrhizal inoculation in France. In: Lalonde, M. y Y. Piché (Eds.). Canadian workshop on mycorrhizae in forestry. Université Laval, Paris. 51-74.
- Lewis, D.H. y J.L. Harley. 1965a. Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. I. Identity of endogenous sugars and utilization of exogenous sugars. *New phytol.* 64: 224-237.
- Lewis, D.H. y J.L. Harley. 1965b. Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. II. Utilization of exogenous sugars by uninfected and mycorrhizal roots. *New phytol.* 64: 238-255.
- Lewis, D.H. y J.L. Harley. 1965c. Carbohydrate physiology of mycorrhizal roots of beech. III. Movement of sugars between host and fungus. *New phytol.* 64: 256-269.
- López-Escamilla, A. 2000. Organogénesis *in vitro* y adquisición de la competencia morfogenética a partir de embriones maduros de *Picea chihuahuana* Martínez (Gymnospermae), especie en peligro de extinción. Tesis de Doctorado en Ciencias. Fac. Ciencias UNAM. México, D.F.
- López-Olivares C. R. y A. M. Fierros-González. 1990. Estudio morfológico de ectomicorrizas en plantaciones de *Pinus caribaea* var. *hodurensis* en la Sabana, Oaxaca, México. *Mic. Neotrop. Aplic.* 3:31-40.
- López-Olivares C. R. F. J. Zamudio-Sánchez y A. M. Fierros-González, 1990. Evaluación Micorrizica y su Relación con el Crecimiento en Plantaciones de *Pinus caribaea* var. *hodurensis* en la Sabana, Oaxaca, México. *Mic. Neotrop. Aplic.* 3:53-66.
- Mápula, L.R., R. Bonilla y D.A. Rodríguez. 1996. Germinación y crecimiento de *Pseudotsuga macrolepis* Flous, en Chapingo, México. *Ciencia Forestal.* 5:111-117.
- Martínez, M. 1953. Las pináceas mexicanas. Secretaría de Agricultura y Ganadería, México, D.F.
- Martínez-Pulido, C., I.S. Harry y T. A. Thorpe. 1994. Effect of various bud induction treatments on elongation and rooting of adventitious shoots of Canary Island Pine (*Pinus canariensis*). *Plant Cell Tiss.Org. Cult.* 39:225-230.
- Marks, G.C. y R.C. Foster. 1973. Structure, morphogenesis, and ultrastructure of ectomycorrhizae. In: Marks G.C. y T.T. Kozlowski (Eds.). *Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology.* Academic Press, New York.
- Marx, D. H. 1973. Mycorrhizal and feeder root disease. In: Marks G. C. and T. T. Kozlowski (Eds). *Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology.* Academic Press, New York. Pp. 351-382.
- Marx, D. H. 1980. Ectomycorrhizal fungus inoculations: A tool for improving forestation practices. In: Mikola, P. (Ed) *Tropical mycorrhiza research.* Claredon Press, Oxford. Pp. 11-71.
- Marx, D.H. y C.E. Cordell. 1989. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In: Whipps, J.M. y R.D. Lumsden (Eds.). *Biotechnology of fungi to improve plant growth.* Cambridge University Press. London. Pp 1-25.

- Marx, D. H. y W. C. Bryan. 1975. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *Forest Sci.* 21:245-254.
- Marx, D.H. y C.B. Davey. 1967. Ectotrophic mycorrhizae as deterrents to pathogenic root infection. *Nature.* 1:213-239.
- Marx, D.H. y C.B. Davey. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. III. Resistance of aseptically formed mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopath.* 59:549-558.
- Marx, D. H. y G. E. Hatchell. 1986. Root stripping of ectomycorrhizae decreases field performance of Loblolly and Longleaf pine Seedlings. *Southern J. Appl. For.* 10:173-179.
- Marx, D. H. y D. S. Kenney. 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In: Schenk, N. C. (Ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research.* The American Phytopathological Society, St. Paul. Pp 131-146.
- Marx, D. H., J. L. Ruehle, D. S. Kenney, C. E. Cordell, J. W. Riffle, R. J. Molina, W. H. Pawuk, S. Navratil, R. W. Tinus y O. C. Goodwin. 1982. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on container-grown tree seedlings. *For. Sci.* 28:373-400.
- Marx, D. H., J. L. Ruehle y C. E. Cordell. 1991. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. In: Norris, J. R. (Ed.). *Techniques for the study of mycorrhiza.* Vol 23. 383-411.
- Masera, O. 1996. Deforestación y degradación forestal en México. Grupo Interdisciplinario Rural Apropiada. GIRA. Pátzcuaro, Michoacán.
- Masera, O., M. Ordoñez y F. Dirzo. 1992. Emisiones de carbono, producto de la deforestación en México. Centro de Ecología, UNAM, México, D.F.
- Mason, P. A. 1980. Aseptic synthesis of sheathing (ecto-) mycorrhizas. In: Ingram D. S. y J. P. Helgeson (Eds.). *Tissue culture methods for plant pathologist.* Blackwell. Scientific Publications, London. Pp 173-178.
- Massicotte. H.B., L.H. Melville, C.Y. Li y R.L. Peterson. 1992. Structural aspects of Douglas-fir [*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)Franco] tuberculate ectomycorrhizae. *Trees* 6:137-146.
- Méndez-Montiel y Zavala-Chávez, 1996. Un procedimiento para la protección contra insectos de conos en *Pseudotsuga macrolepis* Flous. *Rev. Chapingo. Ciencias Forestales.* 1:119-124.
- Meyer, F.H. 1973. Distribution of ectomycorrhizae in native and man-made forest. In: Marks G.C. Y T.T. Kozlowski (Eds.). *Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology.* Academic Press, New York. Pp. 79-105
- Mikola, P. 1973. Application of mycorrhizal symbiosis in forestry practice. In: Marks G. C. y T. T. Koslowski (Eds) *Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology.* Academic Press, New York, 383-410.
- Miller, O.K. 1983. Ectomycorrhiza in the agaricales and gasteromycetes. *Can. J. Bot.* 61:909-916.
- Miller, O.K.Jr. 1984. *Mushrooms of North America.* E.P. Dutton , New York.
- Miller, O. K. Jr. T. Jenkins y P. Dery. 1986. Mycorrhizal synthesis of *Amanita muscaria* var. *persicina* with Hard Pines. *Mycotaxon* 26:165-172.
- Miller S. L. y E. B. Allen. 1992. Mycorrhizae, nutrient traslocation, and interactions between plants. In: Allen M. F. (Ed). *Mycorrhizal functioning.* Chapman & Hall, New York. Pp. 301-332.
- Minocha, S.C. 1987. Plant growth regulators and morphogenesis in cell and tissue culture of trees. In : Bonga, J.M. y D.J. Durzan (Eds) *Cell and tissue culture in forestry.* Vol. 1 Martinus Nijhoff Pub. Pp 50-66.

- Mohammed, G. y W. E. Vidaver. 1988. Root production and planlet developmet in tissue-cultured conifers. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39:225-230.
- Molina, R., H. Massicotte y J. M. Trappe. 1992a. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: Community-ecological consequences and practical implications. In: Allen M. F. (Ed). *Mycorrhizal funtioning*. Chapman & Hall, New York, pp.357-423.
- Molina, R., H. B. Massicotte y J. M. Trappe. 1992b. Ecological role of specificity phenomena in ectomycorrhizal plant communities: Potentials for interplant linkages and guild development. In: Read, D. J., D. H. Lewis, A. H. Fitter y I. J. Alexander. *Mycorrhizas in Ecosystems*. CAB International, Cambridge. 106-112.
- Molina, R. y J. G. Palmer. 1982. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Schenk N. C. (Ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research*. American Phytopathological Society, St. Paul, pp.115-129.
- Molina, R. y J. M. Trappe. 1984. Mycorrhiza management in bareroot nurseries. In: Duryea M. L. y T. D. Landis (Eds). *Forest nurseries manual: Production of bareroot seedlings*. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, La Haya. Pp 211-223.
- Monjarás González, G. 2001. Influencia de reguladores de crecimiento, sustratos y medios de cultivo en la inducción de plántulas completas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous. Tesis licenciatura, Depto. de Agrobiología, Lic. en Biología Agropecuaria, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Méx.
- Montes-Rivera, G. 1993. Guía metodológica para cultivar *in vitro* *Picea chihuahuana* y *Pseudotsuga menziesii*. Instituto Tecnológico Forestal No. 1, S.E.P., Durango. México
- Moser, M. 1960. Die gattung phlehmanium. Die pilze mitteleuropa's 4. J. Bad Heilbrunn.
- Muñoz García, J.C. 2003. Inoculación esporal en *Pinus pseudostrobus* y *P. montezumae* con diferentes hongos ectomicorrizógenos, bajo condiciones de vivero. Tesis de licenciatura, Departamento de Agrobiología, Licenciatura en Biología Agropecuaria, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nájera, M.F. 1990. Estudio ecológico de *Pseudotsuga menziesii* var. *glauca* (Mayr) Franco, en la unidad de administración forestal "Tepehuanes". Seminario de titulación. División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Méx.
- Navarro, L. L. 2000, Inoculación miceliar de dos cepas de hongos ectomicorrizógenos (*Suillus glandulosipes* y *Rhizopogon* sp.) en *Pinus montezumae* en condiciones de vivero. Tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla.
- Niembro, R.A. 1979. Semillas forestales. Depto. de bosques. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México.
- Niembro, R.A. 1987. Colecta y manejo de semillas forestales. In: Fierros González A.M.; F. Becerra Luna; E.M. Zepeda Bautista. (comp.). *Memoria del Primer Simposio Nacional Sobre Investigación Forestal*. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, México.
- Nobles, M.K. 1965. Identification of cultures of wood inhabiting hymenomycetes. *Can J. Bot.* 43:1097-1139.
- Nylud, J.E. y H. Wallander. 1989. Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. *New Phytologist.* 112:389-398.
- Olsson, S. 1995. Mycelial density profiles of fungi on heterogeneous media and their interpretation in terms of nutrient reallocation patterns. *Mycol. Res.* 99(2):143-155.

- Olsson, S. 1999. Nutrient translocation and electrical signaling in mycelia. In: Gow, N.A.R., G.D. Robson y G.M. GDA (Eds.). The fungal colony. Symposium of the British Mycological Society Held at the Scientific Societies' Lecture Theatre, London. British Mycological Society-Cambridge University Press. Cambridge. Pp.25-48
- Orozco-García, J. P. 1991. Inoculación de Esporas de Hongos Ectomicorrízicos en *Pinus* spp. Memorias IV Congreso Nacional de Micología. Tlaxcala. Tlax. Pp 144.
- Orozco-García, J. P., L. A. Camacho, P. V. Zúñiga y Ma. G. Lomeli-Ramírez. 2002. Efecto de la Inoculación de *Pisolithus arhizus* y *Cenococcum geophilum* en *Pinus douglasiana* y *P. pseudostrabus* en vivero comercial. In: Guzmán G. y G. Mata (Eds.) Estudio sobre los hongos latinoamericanos. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología. Xalapa, Veracruz. Pp. 373.
- Ortiz González, N. 2000. Macromicetos asociados con los bosques de *Pseudotsuga macrolepis* en el estado de Tlaxcala. Tesis licenciatura, Depto. de Agrobiología, Lic. en Biología Agropecuaria, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Méx.
- Palm, M. E. y E. L. Steward. 1984. *In vitro* synthesis of mycorrhizae between presumed specific and nonspecific *Pinus* + *Suillus* combinations. *Mycologia* 76:579-600.
- Palmer, J.G. y E. y HacsKaylo. 1970. Ectomycorrhizal fungi in pure culture I. Growth on single carbon source. *Physiol. Plant.* 23:1187-1197.
- Pantidou, M.E. 1961. Cultural studies of boletaceae. *Gyrodon merulioides* and four species of *Boletinus*. *Can. J. Bot.* 39:1149-1161.
- Pantidou, M.E. y Groves. 1966. Cultural studies of boletaceae. Some species of *Suillus* and *Fuscoboletinus*. *Can. J. Microbiol.* 44:1371-1393.
- Parladé J. y I.F. Alvarez. 1993. Coinoculation of aseptically grown Douglas fir with pairs of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 3:93-96.
- Patel, K.R. y G.P. Berlyn. 1983. Cytochemical investigations on multiple bud formation in tissue cultures of *Pinus coulteri*. *Can. J. Bot.* 61:575-585.
- Patel, K.R. y T.A. Thorpe. 1984. *In vitro* differentiation of plantlets from embryogenic explants of lodgepole pine (*Pinus contorta* Doug. ex. Loud.) *Plant Cell Tissue Org. Cult.* 3:131-142.
- Pensado P. C. M. y Garza O.F. 1998. Las ectomicorrizas y sus hongos en el bosque de *Pinus culminicola* Andersen & Beaman del Cerro Potosí, Galeana, Nuevo León, México. Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica. Colima, Colima. Pp 61.
- Peña-Cabriales, J. J. y M. Valdés. 1974. Rhizosphere du Spain (*Abies religiosa*). II. Mycorrhizes: Isolement et culture. *Can. J. Microbiol.* 20:412-417.
- Peñuelas, J.L. y L. Ocaña. 1995. Cultivo de plantas forestales en contenedor. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Mundi-Premsa, España.
- Pérez-Moreno, J. Y R. Ferrera-Cerrato. 1991. Aislamiento y caracterización de quince cepas de hongos ectomicorrízicos. Memorias IV Congreso Nacional de Micología. Tlaxcala. Tlax. 135.
- Pérez-Rodríguez, P.M. 2000. Claves de determinación con énfasis en familias de árboles. Universidad Autónoma de Chapingo, Edo. de México, Méx.
- Pérez-Sánchez, M.A. 1996. Producción y viabilidad de semillas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous, en las localidades de Tlaxco y Terrenate, Tlaxcala. Tesis licenciatura, Dpto. de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlax.

- Perrin, R., X. Parladé y J. Pera. 1996. Receptiveness of forest soils to ectomycorrhizal association: I. Concept and method as applied to the symbiosis between *Laccaria bicolor* (Maire) Orton and *Pinus pinaster* Art or *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *Mycorrhiza* 6: 469-476.
- Phillips, G.C. y J.F. Hubstenberger. 1995. Micropropagation by proliferation of axillary buds. In: Gamborg, O.L. y G.C. Phillips (Eds.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental methods*. Springer-Verlag, Berlin.
- Quintos, M. y M. Valdés. 1987. El desarrollo de micorriza y el crecimiento de plántulas de Pino Real (*Pinus engelmannii*) al inocularse con *Pisolithus tinctorius*. *Rev. Lat-Amer. Microbiol.* 29:189-192.
- Quintos, M., L. Varela y M. Valdés. 1984. Contribución al Estudio de los macromicetos, principalmente los ectomicorrízicos en el Estado de Durango. *Bol. Soc. Méx. Mic.* 19:283-290.
- Ramírez, J., J. Castillo, M. Ibarra, G. Olalde y F. Landeros. 2000. La familia Amanitaceae y Russulaceae en el Estado de Querétaro. *Memorias VII Congreso Nacional de Micología*. Querétaro, Querétaro. Pp 123.
- Rancillac, M., M. Faye y A. David. 1982. *In vitro* rooting of cloned shoots in *Pinus pinaster*. *Physiol. Plant.* 56:97-101.
- Raven, H.P., R.F. Evert y S. E. Eichorn. 2000. *Biology of plants*. Worth Publishers Inc., New York, USA. Pp 333-370.
- Reid, C.C.P. 1973. Transport of C¹⁴-labelled substances in mycelial strands of *Thelephora terrestris*. In: HacsKaylo, E. (Ed.) *Mycorrhizae, USDA Forest Serv. Misc. Publ. No. 1189*. Washington. Pp 222-227.
- Reyes, I., y M. Aquihuatl, 2000. Macromicetos del bosque de encino de Rincón de Ugarte Tejupilco de Hidalgo, México. *Memorias VII Congreso Nacional de Micología*. Querétaro, ueretaro. Pp 113.
- Reyes, J. I. y S. Palacios. 1998. Micorrización de *Quercus hintonii* Warb., especie endémica del Estado de México. *Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica*. Colima, Col. Pp 84.
- Robert, M. y V.M. Loyola. 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. In: Robert, M. y V.M. Loyola (comp.) *El cultivo de tejidos vegetales en México*. CICY-CONACYT, México. Pp 21-26.
- Roth, A.L. y S.M. Berch. 1992. Ectomycorrhizae of Douglas-fir and western hemlock seedlings outplanted on eastern Vancouver Island. *Can. J. For. Res.* 22: 1646-1655.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. LIMUSA, México, D.F.
- Salzer, P. y Hager A. 1991. Sucrose utilization of the ectomycorrhizal fungi *Amanita muscaria* and *Hebeloma crustuliniforme* depends on the cell wall-bound invertase activity of their host *Picea abies*. *Bot. Acta* 104:439-445.
- Santiago-Martínez, G. 1992. Pruebas de crecimiento, síntesis *in vitro* y caracterización de 10 cepas de hongos ectomicorrízicos. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Santiago-Martínez, G., 2002. Pruebas de crecimiento, descripción e identificación de cultivos de hongos ectomicorrízicos e inoculación controlada de plántulas con esporas. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias UNAM, México, D.F.
- Santiago-Martínez G, L. Varela y A. Estrada-Torres. 1993. Síntesis *in vitro* de la micorriza de *Pisolithus tinctorius* y *Pinus montezumae*. *Rev. Mex. Mic.* 9:77-83.
- Santiago-Martínez, G., L. Varela, A. Estrada-Torres y V. Cuaxilo. 1995. Efecto de seis medios de cultivo sobre el crecimiento de tres cepas de *Pisolithus tinctorius*. *Rev. Mex. Mic.* 11:57-68.
- Santiago-Martínez, G., A. Estrada-Torres, L. Varela, y A. Komg-Luz. 1997. Efecto de compuestos fungistáticos sobre algunas cepas de *Suillus*. *Rev. Mex. Mic.* 13:28-32.

- Santiago-Martínez, G., A. Estrada-Torres, L. Varela, A y T. Herrera. 2001. Efecto de compuestos fungistáticos sobre el crecimiento de algunas cepas del género *Amanita*. *Rev. Mex. Mic.* 17:17-20.
- Santiago-Martínez, G., A. Estrada-Torres, L. Varela, A y T. Herrera. 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia* 37(6):575-584.
- SARH (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos). 1994. Inventario forestal periódico del estado de Tlaxcala. Plan Nacional de Desarrollo 1989-1994, Subsecretaría Forestal y Fauna Silvestre-SARH, México, D.F.
- SEDESOL e INE (Secretaría de Desarrollo Social e Instituto Nacional de Ecología). 1993. Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y protección al ambiente 1991-1992. Secretaría de Desarrollo Social, México, D.F.
- Serrano, G., E. Bárcenas y E. Pérez-Silva. 1997. Estudio del género *Lactarius* como hongo ectomicorrízico en dos zonas forestales del Estado de México. *Memorias VI Congreso Nacional de Micología, Chiapas*. Pp 135.
- Schwarz, O.J.; R.M. Beaty y E.O. Franco. 1991. Egg-cone Pine (*Pinus oocarpa* Schiede). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed) *Biotechnology in agriculture an forestry. Trees III*. Vol.16. Springer-Verlag, Berlin. Pp 304-316.
- Simard, S.W., D.A. Perry, J.E. Smith y R. Molina. 1997. Effects of soil trenching on occurrence of ectomycorrhizas on *Pseudotsuga menziesii* seedlings grown in mature forest of *Betula papyrifera* and *Pseudotsuga menziesii*. *New Phytol.* 136:327-340.
- Smith, W.H. 1969. Release of organic materials from the roots of tree seedlings. *Forest. Sci.* 15:138-143.
- Stribley, D. P. 1987. Mineral nutrition. In: Safir G. R. (Ed). *Ecophysiology of VA mycorrhizal plants*. CRC Press, Florida. Pp 59-70.
- Sommer, H.E., C.L. Brown y P.P. Kormanik. 1975. Differentiation of plantlets in long leaf pine (*Pinus palustris* Mill) tissue cultured *in vitro*. *Bot. Gaz.* 135:196-200.
- Styles, 1993. El género *Pinus*: su panorámica en México. In: Ramamoorthy T.P., R. Bye, A. Lot y J. Fa. (Eds.). *Diversidad biológica en México. Orígenes y distribución*. Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. Pp 397-420.
- Sul, I. y S.S. Korban. 1994. Effect of cytokinins on axillary shoot proliferation and elongation of several genotypes of *Sequoia sempervirens*. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 30:131-135.
- Tejocote, P. M., J. J. García, E. G. Bárcenas, C. A. Burrola, y A. E. B. González Borja. 2000. Obtención y manejo de germoplasma implicado en la síntesis de ectomicorrizas *in vitro*. *Memorias VII Congreso Nacional de Micología. Querétaro, Queretaro*. Pp 111.
- Theodorou, C. y G. D. Bowen. 1973. Inoculation of seeds and soil with basidiospores of mycorrhizal fungi. *Soil Biol. Biochem* 5:763-771.
- Theodorou, C. y P. Reddell. 1991. *In vitro* síntesis of ectomycorrhizas on Casuarinaceae with a range of ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 118:279-288.
- Thomas, G.W., D. Rogers y R.M. Jackson. 1983. Changes in the mycorrhizal status of Sitka spruce following outplanting. *Plant Soil* 71:319-323.
- Thompson, M.R. y T.A. Thorpe. 1987. Metabolic and non metabolic roles of carbohydrates. In: Bonga, J.M. y Durzan (Eds). *Cell and tissue culture in forestry*. Vol. 1. Martinus Nijhoff Pub. Pp 89-112.
- Thorpe, T.A. y S. Biondi. 1984. Conifers: fiber and wood. In: Sharp, W.R., D.A. Evans, P.V. Ammirato, Y. Yamada (Eds.). *Handbook of plant cell culture, Crop-Science, Vol 2* McMillan Publisher, New York. Pp 435-503.
- Thorpe, T.A. y K. Patel. 1984. Clonal propagation: adventitious buds In: Vasil, K. (Ed.). *Cell culture and somatic cell genetics in plants*, Vol. 1 Academic Press Inc., New York. Pp. 49-60.

- Thorpe, T.A., I.S. Harry y P.P. Kumar. 1991. Application of micropropagation to forestry. In: Debergh P.C. y R.H. Zimmerman (Eds.). Micropropagation. Kluwer Academic Publishers. New York. Pp. 311-336.
- Thorpe, T.A. y P.P. Kumar. 1993. Cellular control of morphogenesis. In: Ahuja M.R. (Ed.). Micropropagation of woody plants. Kluwer Academic Publishers. New York. Pp 11-29.
- Tosh, J.E., S. Eric, S. John, E.S. e Irene A.W.C. 1993. Ectomycorrhizal seedlings reponse to selected components of landfill leachate. Mycol. Res. 97(2):129-135.
- Torres, P. 1992. Estudio de las ectomicorrizas de pino Carrasco (*Pinus halepensis* Miller). Tesis de Doctorado, Universidad de Murcia, Murcia, España.
- Torres, A., G. Santiago-Martínez y A. Estrada-Torres. 1997. Síntesis de la ectomicorriza de *Pinus montezumae* y *Rhizopogon* sp. Memorias VI Congreso Nacional de Micología. Tapachula, Chiapas. Pp 191.
- Trappe, J. 1967. Pure culture synthesis of Douglas fir mycorrhizae with species of *Hebeloma*, *Suillus*, *Rhizopogon* and *Atræus*. Forest Science 13(2): 121-130.
- Trappe, J. M. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. Annu. Rev. Phytopathol. 15:203-222.
- Tulecke, W. 1987. Somatic embryogenesis in woody perennial. In: Bonga, J.M. y D.J. Durzan (Eds) Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 2 Specific principles and methods: Growth and development. Kluwer Academic Publishers. New York. Pp. 61-91
- Uribe-Arróyave, I., L. Varela y R. Valenzuela, 1997. Nuevos Registros de hongos hipogeos y una nueva especie de *Protuberá* en el Estado de Tlaxcala. Memorias VI Congreso Nacional de Micología. Tapachula, Chiapas. Pp 198.
- Valdés, M. 1986. Survival and growth of Pines with specific ectomycorrhizae after three years on a highly eroded site. Can. J. Bot. 64:885-888.
- Valdés, M. y R. Grada-Yautentzi, 1980. Mycorrhizal inoculation and the afforestation of the valley of México city. In: Tropical Mycorrhizae Research. Pp. 93-96.
- Valdés, M., F. Piña y R. Grada. 1983. Inoculación micorrizica y crecimiento de plántulas de pino en suelo erosionado. Bol. Soc. Méx. Mic. 18:65-70.
- Varela, L. y A. Estrada-Torres, 1997. Diversity and potential use of mycorrhizae for sustainable development in Mexico. In: Palm M. E. y I. H. Chapela (Eds.) Mycology in sustainable development: expanding concepts, Vanishing Borders. Parway, North Carolina. Pp 160-182.
- Vázquez García A., G. Santiago Martínez y A. Estrada-Torres. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica 73(1)1-15.
- Vázquez-Marrufo, G., M. M. Gálvez-Guerra y V. Olalde-Portugal, 1998. Caracterización fisiológica de dos cepas del género *Amanita* (Basidiomicetos). Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrizica. Colima, Col. Pp77
- Villa, C. J., 1998. Producción de plantas de *Pinus douglasiana* micorrizadas con *Pisolithus tinctorius*. Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrizica. Colima, Colima. Pp 85.
- Villalobos, V.M. , T.A. Thorpe y E.C. Yeung. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejidos en especies forestales. Ciencia y Desarrollo. 51(9):43-59.
- Villalobos, V.M., D.W.N. Yeung y T.A. Thorpe. 1984. Light-cytokinin interaction in shoot formation in cultured cotyledon explants of radiata pine. Physiol.Plant 61:497-504.

- von Arnold, S. 1988. Tissue culture methods for clonal propagation of forest trees. Newsletter IAPTC 56:2-13.
- von Arnold, S. y T. Eriksson. 1978. Induction of adventitious buds on embryos of norway spruce grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 44:283-287.
- von Arnold, S. y T. Eriksson. 1979. Bud induction on isolated needles of norway spruce (*Picea abies* L., Karts.) grown *in vitro*. *Plant Science Letters* 15:363-372.
- von Arnold, S. y T. Eriksson. 1985. Initial stages in the course of adventitious bud formation on embryos of *Picea abies*. *Physiol. Plant.* 64:41-47.
- Vozzo, J. A. y E. Hacskeylo, 1971. Inoculation of *Pinus caribea* with ectomycorrhizal fungi in Puerto Rico. *Forest Sci.* 17:239-245.
- Werner, D., 1992. Symbiosis of plants and microbes. Chapman & Hall, London. Pp 339-380.
- Williams, J.A. 2000. Biogeography of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*). San Francisco State University Department of Geography. San Francisco, USA.
- Wingler, A., M. Guttenberg y R. Hampp. 1993. Determination of manitol in the ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas by enzymatic micro-assays. *Mycorrhiza* 3:69-93.
- Xicohténcatl, A., G. Santiago-Martínez y A. Estrada-Torres, 1997. Ectomicorriza de *Pinus montezumae* con dos especies de *Suillus*. *Memorias VI Congreso Nacional de Micología*. Tapachula, Chiapas. Pp 192.
- Xochitiotzin, H. M., 2000. Inoculación Esporal de *Pinus montezumae* con *Suillus tomentosus* e *Inocybe griseovelata*, en tres sustratos bajo condiciones de vivero. Tesis de licenciatura, Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- Yang Z.L.; M. Wei□; I. Kottke; F. Oberwinkler; U. Nehls; M. Guttenberger y R. Hampp. 1999. *Amanita* In: Cairney J.W.G. y Chambers, S.M. (Eds) *Ectomycorrhizal fungi: Key genera in profile*. Springer-Verlag. Alemania. Pp 201-230.
- Yáñez, E.L. 1991. Análisis de la producción de semillas de *Pseudotsuga macrolepis* Flous en una población natural de la Sierra de Pachuca, Hidalgo. Tesis licenciatura, División de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Méx.
- Yeung, E.C.; J.A. Aitken; S. Biondi y T.A. Thorpe. 1981. Shoot histogenesis in cotyledon explants of radiata pine. *Bot. Gaz.* 142:494-501.
- Zak, B. 1971. Characterization and classification on mycorrhizae of Douglas fir. II. *Pseudotsuga menziesii* + *Rhizopogon vinicolor*. *Can. J. Bot.* 49:1079-1084.
- Zak, B. y M. Larsen. 1978. Characterization and classification of mycorrhizae of Douglas-fir. III. *Pseudotsuga menziesii* + *Byssoporia (Poria) terrestris* vars. *lilacinorosea*, *parksii* y *sublutea*. *Can. J. Bot.* 56:1416-1424.
- Zak, B. y D. H. Marx, 1964. Isolation of mycorrhizal fungi from roots of individual slash pines. *Forest Sci.* 10:214-222.
- Zamora-Martínez, M., L. Varela y E. Amora, 2002. Marco legal para la producción de plantas micorrizadas en México. In: Guzmán G. y G. Mata (Eds.) *Estudio Sobre los Hongos Latinoamericanos. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología*. Xalapa, Veracruz. Pp376.
- Zavala-Chávez, F. y Méndez-Montiel, J.T. 1996. Factores que afectan la producción de semillas en *Pseudotsuga macrolepis* Flous. en el estado de Hidalgo, México. *Acta Botánica Mexicana*. 36:1-13.
- Zar, 1984 *Biostatistical analysis* 2°. Ed. Prentice Hall Inc. New Jersey