



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS

BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

“Efecto de los hongos ectomicorrizógenos en el crecimiento y supervivencia de plántulas de *Pinus hartwegii* Lindl. y *Abies religiosa* (Kunth Schldl. et Cham.): Un enfoque para la restauración de ambientes deteriorados en la Cuenca del Río Magdalena D.F.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

IRENE SANDOVAL GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ
SÁNCHEZ

MÉXICO, D. F.

ENERO, 2010



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de noviembre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** de la alumna **SANDOVAL GONZÁLEZ IRENE** con número de cuenta **88316996** con la tesis titulada **"EFECTO DE LOS HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS EN EL CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE PLÁNTULAS DE *Pinus hartwegii* LINDL Y *Abies religiosa* (KUNTH SCHLTDL. ET CHAM): UN ENFOQUE PARA LA RESTAURACIÓN DE AMBIENTES DETERIORADOS EN LA CUENCA DEL RÍO MAGDALENA D.F."**, realizada bajo la dirección del **DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ SÁNCHEZ**:

Presidente: DR. ROBERTO ANTONIO LINDIG CISNEROS
Vocal: DRA. ANA ELENA MENDOZA OCHOA
Secretario: DR. FRANCISCO JAVIER ÁLVAREZ SÁNCHEZ
Suplente: DRA. MA. GUADALUPE SANTIAGO MARTÍNEZ
Suplente: DR. JESÚS PÉREZ MORENO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de enero de 2010.

Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACYT por la Beca para realizar los estudios de la Maestría en Ciencias Biológicas.

A la Secretaría de Desarrollo Institucional de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Macroproyecto “Manejo de Ecosistemas y Desarrollo Humano” (SDEI-PTID-02) por el apoyo económico para realizar este proyecto de investigación.

A la Maestría en Ciencias Biológicas (con Orientación en Restauración Ecológica) y a la Fundación Packard por la ayuda al cursar los estudios de Maestría.

A los integrantes del Jurado: Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez, Dr. Jesús Pérez Moreno, Dra. Ana Mendoza Ochoa, Dra. Guadalupe Santiago Martínez y Dr. Roberto Lindig Cisneros, ya que los comentarios de cada uno enriquecieron el manuscrito.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. Javier Álvarez, por su tiempo y ayuda para la realización de este proyecto.

Al grupo de Ecología del Suelo del Departamento de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias, en especial a: M. en C. Juan Carlos Peña, P. de Biól. Lizbeth Guzmán, Biól. Ernesto Delgadillo Durán, M. en C. Erwin Pinón Pensamiento, P. de Biól. Kurt Unger, P. de Biól. Adrian Hernández, M. en C. Diego Olivera Morales, Biól. Wendy Luna, M. en C. Oswaldo Núñez Castillo, y a todos los que en algún momento me brindaron su apoyo para la realización de este proyecto.

Un especial agradecimiento a la candidata a Dra. Irene Sánchez, por su tiempo y ayuda, en el manejo de las muchas bases de datos para el análisis estadístico.

A la candidata a Dra. Gema Galindo Flores, por su paciencia y guía en la metodología de propagación de micelio.

A la Dra. Guadalupe Barajas, por la ayuda en el ANCOVA.

Muy en especial al Biól. Marco Romero, por su apoyo y ayuda en todo momento, para resolver mis dudas con los programas de computación.

ÍNDICE	
1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. OBJETIVOS	6
4. HIPÓTESIS	6
5. ANTECEDENTES	7
5.1 El Bosque	7
5.2 Generalidades de los hongos ectomicorrizógenos	8
5.3 La ectomicorriza (ECM)	9
5.4 Especificidad	11
5.5 Microrestauración	12
5.6 Micorizas en la restauración de bosques	13
5.7 Otros estudios	16
5.8 Estudios de ectomicorizas en laboratorio para los géneros usados en este estudio	16
5.9 Deterioro de los Bosques en el Valle de México	18
6. METODOLOGÍA	20
6.1 Ubicación de la Cuenca	20
6.2 Vegetación	21
6.3 Suelo	21
6.4 Clima	22
6.5 Parcelas de estudio	22
6.6 Factores de deterioro	24
6.7 Aspectos Históricos	25
6.8 Especies vegetales estudiadas	27
<i>i) Pinus hartwegii</i>	27
<i>ii) Abies religiosa</i>	27
6.9 Especies de hongos ectomicorrizógenos usados	28
<i>i) Suillus brevipes</i>	28
<i>ii) Inocybe splendens</i>	29
6.10 Colecta de esporomas y aislamiento de tejido	29
6.11 Cepas en medio sólido y líquido	30
6.12 Plántulas en vivero	30
6.13 Producción masiva de micelio en botellas	30
6.14 Extracción de micelio	31
6.15 Obtención de suelo forestal	31
6.16 Pruebas de germinación	32
<i>i) Pinus hartwegii</i>	32
<i>ii) Abies religiosa</i>	32
6.17 Análisis de macronutrientes en el tejido vegetal	34
6.18 Inoculación en vivero	34
6.19 Transplante a campo	35
6.20 Inoculación en campo	36
6.21 Análisis de crecimiento	36
6.22 Supervivencia	37
6.23 Obtención de raíces	37
6.24 Caracterización macromorfológica y micromorfológica	38
6.25 Porcentaje de micorrización	39

6.26	Análisis estadístico	39
6.27	Diagrama de flujo del método	40
7.	RESULTADOS	41
7.1	Selección de cepas	41
7.2	Crecimiento en vivero	41
7.3	Pruebas de Germinación	44
7.3	Análisis de crecimiento en campo	45
7.4	TRC (Tasa relativa de crecimiento) en campo para cada especie	49
7.5	Supervivencia en campo	54
7.6	Biomasa de raíz y vástago para cada especie	57
7.7	Proporción raíz-vástago (R/V) para cada especie	58
7.8	PST (Peso seco total) por especie	60
7.9	Análisis de macronutrientes del tejido vegetal	61
7.9.1	<i>Pinus hartwegii</i>	61
7.9.2	Comparación entre cosecha inicial y final para <i>P. hartwegii</i>	62
7.9.3	<i>Abies religiosa</i>	64
7.9.4	Comparación entre cosecha inicial y final para <i>A. religiosa</i>	66
7.10	Morfotipos de Micorriza	68
7.11	Porcentaje de colonización	71
	i) <i>Pinus hartwegii</i>	71
	ii) <i>Abies religiosa</i>	72
8.	DISCUSIÓN	74
8.1	Crecimiento en vivero	74
8.2	Crecimiento en campo considerando la TRC (Tasa Relativa de Crecimiento)	75
	A) <i>Pinus hartwegii</i>	77
	B) <i>Abies religiosa</i>	79
8.3	Análisis de Macronutrientes en el tejido vegetal	81
8.4	Los hongos ectomicorrizógenos como parte de una alternativa de restauración forestal	83
9.	CONCLUSIONES	85
10.	BIBLIOGRAFÍA	86
	Apéndice 1	94
	Apéndice 2	95
	Apéndice 3	96
	Apéndice 4	97
	Apéndice 5	98
	Apéndice 6	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema de las estructuras ectomicorrízicas.	10
Figura 2	Ubicación de la Cuenca.	20
Figura 3	Mapa donde se ubican las parcelas de <i>A. religiosa</i> y <i>P. hartwegii</i>	23
Figura 4	Esquema que muestra la distancia entre plantas al momento de ser transplantadas a campo.	36
Figura 5	Crecimiento de <i>P. hartwegii</i> en vivero (± 1 E. E.) a los 150 días después de su germinación. Dónde: a) diámetro al tallo, b) altura total y c) altura al meristemo (n= 320).	42
Figura 6	Crecimiento de <i>A. religiosa</i> en vivero (± 1 E. E.) a los 240 días después de su germinación. Dónde: a) diámetro al tallo, b) altura total y c) altura al meristemo (n= 320).	43
Figura 7	Crecimiento de <i>P. hartwegii</i> en campo comparando la medición inicial con la medición final. Dónde: a) diámetro al tallo, b) altura total y c) altura al meristemo (n= 293).	45
Figura 8	Crecimiento de <i>A. religiosa</i> en campo comparando la medición inicial con la medición final. Dónde: a) diámetro al tallo, b) altura total y c) altura al meristemo (n= 174).	47
Figura 9	Parámetros morfométricos para <i>P. hartwegii</i> en campo, donde a) diámetro al tallo, b) altura total y c) altura al meristemo (± 1 E. E.) (n= 293). La flecha indica el momento en el que se separan los tratamientos y se inoculó con <i>S. brevipes</i> y con suelo forestal en vivero. La estrella indica el momento en que se realizó la segunda inoculación para <i>S. brevipes</i> y la primera para <i>I. splendens</i>	50
Figura 10	Parámetros morfométricos para <i>A. religiosa</i> en campo, donde a) diámetro al tallo, b) altura total y c) altura al meristemo (± 1 E. E.) (n= 174). La flecha indica el momento en el que se separan los tratamientos y se inoculó con <i>S. brevipes</i> y con suelo forestal en vivero. La estrella indica el momento en que se realizó la segunda inoculación para <i>S. brevipes</i> y la primera para <i>I. splendens</i>	53
Figura 11	Supervivencia de <i>Pinus hartwegii</i> a través del tiempo, en campo,	

	sometidas a diferentes tratamientos (n= 293).	55
Figura 12	Supervivencia de <i>Abies religiosa</i> a través del tiempo, en campo, sometidas a diferentes tratamientos (n= 174).	56
Figura 13	Biomasa de raíz y vástago (promedio \pm E. E.) de las plantas en los distintos tratamientos por especie; a) <i>Pinus hartwegii</i> (n= 5 muestras por tratamiento), b) <i>Abies religiosa</i> (n= 5 muestras por tratamiento).	58
Figura 14	Proporción raíz-vástago (R/V) (promedio \pm E. E.) de las plantas en los distintos tratamientos por especie; a) <i>Pinus hartwegii</i> (n= 5 muestras por tratamiento), b) <i>Abies religiosa</i> (n= 5 muestras por tratamiento).	59
Figura 15	Peso seco total (PST) promedio (\pm E. E.) por especie y tratamiento correspondiente a la cosecha de septiembre de 2008; a) <i>Pinus hartwegii</i> (n= 5 muestras por tratamiento), b) <i>Abies religiosa</i> (n= 5 muestras por tratamiento).	60
Figura 16	Ectomicorrizas observadas en raíces de los diferentes tratamientos	68
Figura 17	Porcentaje de colonización micorrízica promedio para <i>Pinus hartwegii</i> (\pm 1EE) por cada tratamiento; las barras de color blanco corresponden a septiembre de 2008 y las barras de color gris a febrero de 2009. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey $p < 0.05$)(n= 5 muestras por tratamiento).	71
Figura 18	Porcentaje de colonización micorrízica promedio para <i>Abies religiosa</i> (\pm 1EE) por cada tratamiento; las barras de color blanco corresponden a septiembre de 2008 y las barras de color gris a febrero de 2009. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey $p < 0.05$)(n= 5 muestras por tratamiento).	73

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Géneros típicos de micobiontes y fitobiontes de zonas templadas y boreales involucradas en la simbiosis ectomicorrízica.	11
Cuadro 2	Morfotipos colectados en los Bosques de Pino y Oyamel durante la estación de lluvias 2006 (Tomado de Alvarado Sánchez, 2008).	17
Cuadro 3	Temperatura y humedad promedio del suelo y el aire en las parcelas de estudio.	24
Cuadro 4	Características generales fisico-químicas del suelo en las parcelas de estudio.	24
Cuadro 5	Resultados de las pruebas de germinación para las semillas de <i>Pinus hartwegii</i> y <i>Abies religiosa</i> , sometidas a diferentes tratamientos, el hipocótilo se desarrolló de 1 a 3 mm.	44
Cuadro 6	ANCOVA para <i>Pinus hartwegii</i> comparando la medición inicial y final en campo (n= 293).	46
Cuadro 7	ANCOVA para <i>Abies religiosa</i> comparando la medición inicial y final en campo (n= 174).	48
Cuadro 8	Resultados del ANdeVA para la TRC (Tasa Relativa de Crecimiento) de los parámetros de mormométricos en <i>Pinus hartwegii</i> (n= 293).	51
Cuadro 9	Resultados del ANdeVA para la TRC de los parámetros de crecimiento para <i>Abies religiosa</i> , n= 174.	54
Cuadro 10	Prueba de Peto y Peto (Pyke y Thomson, 1986) con los respectivos valores de χ^2 para <i>Pinus hartwegii</i> (n= 293).	55
Cuadro 11	Prueba de Peto y Peto (Pyke y Thomson, 1986) con los respectivos valores de χ^2 para <i>Abies religiosa</i> , n= 174.	57
Cuadro 12	Resultados del ANdeVA para las variables obtenidas de biomasa entre tratamiento para cada especie al momento de la cosecha en septiembre de 2008, cuando las plantas tenían un año en campo, (n= 5 muestras por tratamiento).	61
Cuadro 13	Resultados del ANdeVA para los análisis de macronutrientes en el tejido vegetal de <i>Pinus hartwegii</i> en la cosecha final (n= 5 muestras por tratamiento).	62

Cuadro 14	Asignación en el porcentaje de macronutrientes para <i>Pinus hartwegii</i> en la cosecha correspondiente a julio de 2007 (cosecha inicial) (n= 5 muestras por especie). Números en negritas muestran diferencias significativas.	63
Cuadro 15	Asignación en el porcentaje de macronutrientes para <i>Pinus hartwegii</i> en la cosecha correspondiente a septiembre de 2008 (cosecha final) (n= 5 muestras por tratamiento). Números en negritas muestran diferencias significativas.	63
Cuadro 16	Resultados del ANdeVA para los análisis de macronutrientes en el tejido vegetal de <i>Pinus hartwegii</i> , comparando la cosecha inicial (n= 5 muestras por especie) y final (n= 5 muestras por tratamiento) Números en negritas muestran diferencias significativas.	64
Cuadro 17	Resultados del ANdeVA para los análisis de macronutrientes en el tejido vegetal de <i>Abies religiosa</i> en la cosecha final (n= 5 muestras por tratamiento).	65
Cuadro 18	Asignación en el porcentaje de macronutrientes para <i>Abies religiosa</i> en la cosecha inicial (julio 2007) (n= 5 muestras por especie) Números en negritas muestran diferencias significativas.	65
Cuadro 19	Asignación en el porcentaje de macronutrientes para <i>A. religiosa</i> en la última cosecha (septiembre 2008) (n= 5 muestras por tratamiento) Números en negritas muestran diferencias significativas.	66
Cuadro 20	Resultados del ANdeVA para los análisis de macronutrientes en el tejido vegetal de <i>Abies religiosa</i> comparando la cosecha inicial (n= 5 muestras por especie) y final (n= 5 muestras por tratamiento)	67
Cuadro 21	Características de los morfotipos en Deemy (2009) para especies del género <i>Inocybe</i> en comparación con las observadas en las raíces de <i>Pinus hartwegii</i> y <i>Abies religiosa</i> , *= especie usada en este estudio.	69
Cuadro 22	Características de los morfotipos en Deemy (2009) para especies del género <i>Suillus</i> en comparación con las observadas en las raíces de <i>Pinus hartwegii</i> y <i>Abies religiosa</i> , *= especie usada en este estudio.	70
Cuadro 23	Resultados del ANdeVA para el porcentaje de colonización en plantas de <i>Pinus hrtwegii</i> y <i>Abies religiosa</i> en campo para los diferentes tratamientos (n= 5 muestras por tratamiento).	72

1. RESUMEN

Se usaron las cepas de los hongos ectomicorrizógenos *Suillus brevipes* (Peck.) Kuntze e *Inocybe splendens* R. Heim, se propagó el micelio en medio BAF (Medio Biotina aneurina ácido fólico) e inocularon plántulas de *Pinus hartwegii* Lindl. y *Abies religiosa* (Kunth Schltl. et Cham.). Se tomaron mediciones en vivero de los siguientes parámetros de crecimiento: diámetro a la base, altura total y altura al meristemo. Posteriormente se transplantaron al bosque en la Cuenca del Río Magdalena, D.F. en el que permanecieron un año, se obtuvieron mediciones de la supervivencia, cociente raíz/vástago, peso seco total y tasa relativa de crecimiento; se realizó también la caracterización de la micorriza y un análisis de macronutrientes (N, P y C) en los cuatro tratamientos: 1) Sin Suelo (control), 2) Con Suelo Forestal, 3) *S. brevipes* y 4) *I. splendens*. Con respecto a supervivencia, *P. hartwegii* presentó el mayor porcentaje, ya que en el caso del tratamiento con suelo fue de 88.7% (que para esta especie fue el más bajo); para *A. religiosa* disminuyó notablemente su supervivencia en el mes de marzo de 2008, y se observó para el tratamiento sin suelo el porcentaje más bajo (65.27%). La prueba de Peto y Peto no mostró diferencias significativas entre tratamientos para ambas especies, pero se observó una ligera tendencia a un mayor aumento en supervivencia en las plantas inoculadas con *S. brevipes* e *I. splendens*.

Los datos de la proporción raíz-vástago mostraron que las dos especies tienden a asignar más biomasa a la parte aérea que a la raíz. Con respecto al peso seco total, el análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo para *Abies religiosa* se observó una tendencia a mayor aporte de biomasa con *I. splendens* y para *P. hartwegii* con *S. brevipes*. La tasa relativa de crecimiento presentó diferencias significativas para *P. hartwegii* en todos los parámetros, mientras que para *A. religiosa*, fueron significativas el tiempo y la interacción para cada variable de respuesta.

Se describieron las características morfológicas y anatómicas más comunes de las micorrizas, con lo cual se comprobó que las cepas inoculadas colonizaron las raíces de las plantas. Con respecto a los macronutrientes, el nitrógeno presentó diferencias significativas y se registró que para *P. hartwegii* se le asigna mayor porcentaje al vástago. En cuanto al fósforo los tratamientos con suelo y *S. brevipes* presentaron los valores más altos; para *A. religiosa* las plantas inoculadas con *I. splendens* y *S. brevipes* presentaron valores altos de concentración de P. En cuanto a las pruebas de germinación, *P. hartwegii* tuvo un

porcentaje alto, por el contrario para *A. religiosa* fue prácticamente nulo, por lo que es una especie difícil de propagar. Se concluye que algunas especies de hongos ectomicorrizógenos le confieren ventajas a las plantas que son inoculadas. Se considera que sólo un año o dos es poco tiempo para establecer conclusiones finales, por lo que es de suma importancia el monitoreo a largo plazo en los programas de restauración ya que la información que se genere será muy importante para ajustar los programas de manejo y dirigir al sistema hacia las metas deseadas.

1. ABSTRACT

The mycelia of the ectomycorrhizal fungi *Suillus brevipes* (Peck.) Kuntze and *Inocybe splendens* R. Heim, was propagated using BAF media (Biotin-aneurin-folic acid); then saplings of *Pinus hartwegii* Lindl. and *Abies religiosa* (Kunth Schltdl. et Cham.) were inoculated. In a greenhouse the next growth variables were analyzed: stem diameter, total height and meristem height. The saplings remained for one year after that in field conditions in permanent plots of the Magdalena River Basin, Southern Mexico City; survivorship, root/shoot ratio, total dry weight and the relative growth rate were measured. The mycorrhiza description and nutrient analysis (C, N, P) were did it too in four treatments: 1) without soil (control), 2) with forest' soil, 3) *S. brevipes* and 4) *I. splendens*.

P. hartwegii had highest survivorship, 88% for the forest soil treatment (the lower value); *A. religiosa* survivorship had the lowest values for March 2008, in particular for no forest soil treatment (65.27%). Peto and Peto test didn't show significant differences between treatments for both species, but small differences were observed for *S. brevipes* and *I. splendens*. treatments. The root/shoot ratio shows that biomass allocation was higher for aboveground tissues for both species. Using an ANOVA, there were no significant differences for total dry weight; however *Abies religiosa* had a small biomass allocation with *I. splendens* and *P. hartwegii* with *S. brevipes*. The Relative growth rate was different for *P. hartwegii*, whereas for *A. religiosa*, time and the interaction were significant.

The mycorrhiza description proved root colonization. The nutrients' analysis showed significant differences for N, and for *P. hartwegii* higher allocation was for shoot. There were significant P allocation for soil and *S. brevipes* treatments; for *A. religiosa* higher P allocation was for *I. splendens* and *S. brevipes*. Seed germination was higher for *P. hartwegii*, and there was not observed for *A. religiosa*. Some species of ectomycorrhizal fungi give plant advantages in field conditions, but more than one year data are necessary. So, a long term monitoring will be very important for restoration programs.

2. INTRODUCCIÓN

La zona ecológica templada subhúmeda de México presenta varios tipos de vegetación que son: bosque de pino, bosque de encino, bosque de pino-encino y bosque de Oyamel (Rzedowski 1978). Desafortunadamente el bosque de coníferas, es uno de los bosques más perturbados en todo el mundo, el rango de deforestación para México, es muy fluctuante y no se ha llegado a un consenso, pero a partir de la década de los noventa y hasta el año 2000 la pérdida de bosques en el país estaba entre las 348 mil y las 776 mil hectáreas por año. La zona templada subhúmeda a pesar de ser una de las más extensas en México, es una de las zonas menos protegida, en su mayoría son parques nacionales con fin para la recreación con problemas para su conservación (Toledo y Ordóñez, 1993) y su restauración ecológica; tal es el caso de los bosques de La Cuenca de la Magdalena Contreras ubicada en la Cd. De México.

Ante esta problemática en México se han desarrollado algunas estrategias, como el Programa ProÁrbol, cuyo objetivo es otorgar estímulos a los propietarios de terrenos para proteger y restaurar los recursos naturales de los bosques, plantando millones de árboles en el territorio nacional; sin embargo la tasa de sobrevivencia en algunos casos es del 0% (PRONARE, 2004).

Una alternativa para reforestar los bosques templados es emplear coníferas inoculadas con hongos ectomicorrizógenos nativos, ya que si se usan especies de hongos que se asocian a las plantas en forma natural, la tasa de sobrevivencia en campo se ve favorecida, así como otras variables determinantes para el crecimiento de las especies forestales. A través del micelio, los hongos ayudan a las raíces en la absorción de agua y nutrimentos minerales, así como protección contra patógenos y a cambio las plantas le confieren al hongo carbohidratos derivados de la fotosíntesis (Smith y Read 1997).

El uso de parcelas experimentales como sitios de observación a mediano y largo plazo, esta permitiendo descubrir que generalizar la respuesta de las plantas micorrizadas es muy difícil, ya que cada combinación planta-hongo-suelo responde en forma distinta, por lo que hay que seleccionar los hongos adecuados (Parladé, 2005) ya que cada hongo le confiere ciertas ventajas específicas a las plantas. Las parcelas permanentes se han

convertido en un instrumento de intervención y manejo del ecosistema a la restauración ecológica de los bosques para tratar de resolver los problemas ocasionados por su deterioro.

Lo anterior es de particular importancia para reforestar las pocas áreas boscosas que rodean la Cd. de México, ya que en especial La Cuenca de la Magdalena Contreras proporciona un lugar de esparcimiento y recreación a la población capitalina, así como importantes servicios ambientales, como recarga del manto acuífero, conservación de la biodiversidad, regulación climática, entre algunos. Por otro lado, la misma población de la ciudad ejerce una gran presión sobre esta zona boscosa, ya que se encuentra constantemente amenazada por asentamientos irregulares, tala clandestina, basura, etc.

3. OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar el efecto de dos especies de hongos ectomicorrizógenos en plántulas de dos especies forestales importantes, para ser usados en la restauración de bosques templados.

Objetivos particulares:

1. Determinar el efecto de *Suillus brevipes* (Peck.) Kuntze y de *Inocybe splendens* R. Heim en la supervivencia y crecimiento de *Pinus hartwegii* Lindl. y *Abies religiosa* (Kunth Schldl. et Cham) en campo.
2. Determinar la presencia de estructuras de colonización del hongo ectomicorrizógeno inoculado en las raíces de las plantas.
3. Diseñar una propuesta restauración para *Pinus hartwegii* Lindl. y *Abies religiosa* (Kunth Schldl. et Cham) enfocada en el uso de *Suillus brevipes* (Peck.) Kuntze e *Inocybe splendens* R. Heim como una alternativa de restauración.

4. HIPÓTESIS

Las plantas micorrizadas con inóculo nativo crecerán y sobrevivirán más al transplantarlas al bosque con respecto a aquéllas que no son micorrizadas.

5. ANTECEDENTES

5.1 El Bosque

El bosque de coníferas se localiza desde zonas a nivel del mar hasta las cimas montañosas. Se encuentra en clima semiárido hasta un ambiente frío y húmedo, presenta grandes fluctuaciones de temperatura en el día y en las estaciones, lo que provoca un estrés fisiológico en plantas y animales que habitan en estos bosques. Estos bosques poseen una gran cantidad de biomasa aérea ocasionando que se encuentren varios estratos de vegetación, los cuales determinan la estructura vertical y las condiciones ambientales de la vegetación (Smith y Smith, 2001).

La zona ecológica templada subhúmeda de México se encuentra en las regiones montañas y presenta varios tipos de vegetación. Presenta un clima muy estacional los inviernos son muy fríos (en ocasiones con temperaturas bajo cero), lluvias escasas y veranos cálidos y húmedos (Challenger, 1998). Los principales tipos de vegetación de la zona templada son: bosque de pino, bosque de encino, bosque de pino-encino y bosque de Oyamel (Rzedowski 1978).

México es el país con mayor diversidad en pinos, especie que es económicamente importante entre los árboles de clima templado, es la especie dominante de los bosques primarios y es la especie pionera tras las perturbaciones naturales y antropogénicas (Challenger, 1998). Los bosques de pino cubren el 5% del territorio (Rzedowski, 1978), encontrándose en los extremos norte y sur de Baja California a lo largo de la Sierra Madre Occidental, del Eje Volcánico Transversal, de la Sierra Madre del Sur, de las sierras del norte de Oaxaca y de las dos grandes Sierras de Chiapas. En la Sierra Madre Oriental, en forma dispersa, se encuentra en una pequeña porción de la Sierra de Tamaulipas ubicada en la Planicie Costera Nororiental del Golfo de México y en algunas sierras de la gran zona árida del Altiplano en el Estado de Coahuila (Muller 1947, en Rzedowski, 2006). Los pinares de México crecen sobre rocas ígneas de origen volcánico, gneis y esquistos, tolerando los suelos ácidos (Rzedowski, 1978).

Los bosques de *Abies* en México son relictos de los bosques llamados “taiga” que cubren las tierras más septentrionales de Eurasia y Norteamérica. Se desarrollan dentro de límites altitudinales de 2400 a 3600 m snm como fragmentos aislados dentro de áreas de bosque de pino y encino (Challenger, 1998). Se localizan en las serranías del Valle de México, en algunas montañas del Eje Volcánico Transversal como el Pico de Orizaba, el

Cofre de Perote, el Nevado de Toluca, el Tancítaro, el Nevado de Colima, en la Sierra Madre del Sur en Guerrero, y del área sur y norte de Oaxaca, en Chiapas, la zona del Tacaná, en la Sierra Madre Oriental en los estados de Durango y Chihuahua, en la Sierra Madre Oriental en Nuevo León y Tamaulipas. Ocupa el 0.16% del Territorio Nacional, se desarrollan en cañadas o barrancas protegidos de la acción de fuertes vientos e insolación, crecen sobre sustratos volcánicos en andesitas y basaltos, sobre calizas y en el sur del país sobre granitos y roca metamórfica; además, toleran suelos ligeramente ácidos (Rzedowski, 2006).

Tal es el caso de los bosques de la Cuenca del Río Magdalena (CRM) que se encuentra en una zona de suma importancia para las actividades recreativas de la población de la Cd. de México, pero al mismo tiempo en la que se generan problemas de basura, tenencia de la tierra, asentamientos irregulares, tala ilegal, lo que la hace también un punto de conflicto social muy importante en la ciudad. Los servicios ambientales que proporciona a la población son relevantes, como recarga de acuíferos, equilibrio en la temperatura y clima, entre otros (GODF, 2000). Por tal motivo, se han generado acciones para reforestar, rescatar o restaurar dichos sistemas; una alternativa para restaurar es el uso de los hongos micorrizógenos puesto que para todas las especies forestales se han reportado como micorrízicas obligadas, ya que requieren de la interacción con dichos hongos para su establecimiento.

5.2 Generalidades de los hongos ectomicorrizógenos

Se ha observado que la asociación entre hongos ectomicorrizógenos y las raíces de plantas, es una asociación obligada para ambos simbioses (Brundett, 1991). Estudios previos señalan que las semillas pueden germinar y crecer durante algún tiempo, pero si no encuentran hongos adecuados para formar la simbiosis micorrízica morirán (Amaranthus y Trappe, 1993). Asimismo, un mismo género puede desarrollar más de un tipo de micorriza, por ejemplo *Fagihiza globulífera* que se asocia con *Fagus sylvatica* forma dos tipos diferentes de micorrizas, ya que la composición de la ectomicorriza esta relacionada con la edad de los árboles, pues cuando son plántulas, se asocian a sus raíces ciertas especies de hongos ectomicorrizógenos y al ser árboles maduros, se asocian a sus raíces otras especies (Mason *et al.*, 1987).

El costo energético que representa para la planta el hospedero fúngico se compensa por los nutrimentos que éste le proporciona a la planta, en especial carbono, ya que el

hongo a través de su micelio le proporciona a la planta nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y otros nutrientes, los cuales pueden ser limitantes en los ecosistemas (Beagon *et al.*, 2006).

La presencia de asociaciones en las raíces de las plantas con hongos micorrizógenos, le da a éstas una serie de beneficios a nivel ecológico y fisiológico. En el primer caso, posiblemente estos hongos jugaron un papel determinante en la colonización del medio terrestre ya que se ha observado la presencia de hifas cenocíticas y ramificadas en raíces fósiles de *Rhynia*, *Asteroxylon* y *Lycopodium*, lo que pone en evidencia la existencia de la simbiosis desde el periodo Ordovícico, hace 460-455 millones de años (Redecker *et al.*, 2000) algunos de los beneficios se traducen en el incremento en la adecuación de la planta (crecimiento, supervivencia y/o reproducción) (Janos, 1992), resistencia a la sequía (Allen y Boosalis, 1983) y defensa contra patógenos (Linderman, 1980). Además, los hongos micorrizógenos contribuyen a la conservación del suelo a través de la formación de agregados, proporcionando estabilidad a su estructura (Bago *et al.*, 2000). A nivel fisiológico, provocan cambios relacionados con la elasticidad de las hojas y la mejora de su potencial de turgencia, las plantas pueden mantener los estomas cerrados por más tiempo y con ello hay una disminución en la tasa de transpiración, lo que, en ambientes áridos, constituye una ventaja (Augé *et al.*, 1987).

5.3 La ectomicorriza (ECM)

Uno de los tipos más importantes a nivel ecológico es la ectomicorriza (ECM); ésta se forma entre las hifas del hongo cubriendo las raíces cortas de los árboles, formando un manto y así desarrollando una espesa capa de micelio sobre la zona cortical de las raíces llamada "red de Hartig" (Smith y Read, 1997).

Las estructuras características de la ECM son:

El manto fúngico. Es una capa de hifas extrarradicales que cubren la superficie de la raíz, puede presentarse una o varias capas, y proporciona protección a la planta contra organismos patógenos.

Red de Hartig. Las hifas intrarradicales que rodean las células corticales se organizan formando una especie de laberinto; sus células fúngicas se encuentran en contacto directo con las células de la raíz (Figura 1).

Micelio externo vegetativo. Masa de hifas que constituye el cuerpo o talo del hongo.

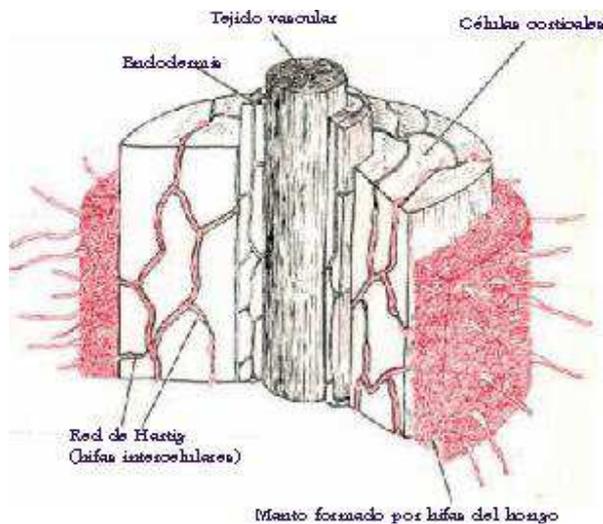


Figura 1. Esquema de las estructuras ectomicorrízicas
(Tomado de Jackson y Manson, 1984)

La morfología de la ectomicorriza está relacionada con el hongo y el género de la planta a la que se asocia, por lo que describir la forma de la micorriza es importante para la identificación de la especie de hongo. Dentro de esas características se encuentra el tipo de ramificación que puede ser dicotómica, no ramificada, coraloide, irregular o pinada; éstas pueden presentar tonos blancos, café, o negro. La superficie del manto es otra característica importante y puede ser lisa, algodónosa, fibrosa o reticulada (Agerer, 1991).

La ECM se establece entre Angiospermas y Gimnospermas leñosas y hongos del grupo Basidiomycetes y Ascomycetes, principalmente en regiones templadas y boreales (Cuadro 1).

Cuadro 1. Géneros típicos de micobiontes y fitobiontes de zonas templadas y boreales involucradas en simbiosis ectomicorrízicas (Pérez-Moreno y Read, 2004).

Micobionte	Fitobionte
Basidiomycotina	
<i>Alpova, Amanita, Astraeus, Boletus, Cantharellus, Cortinarius, Entoloma, Gastroboletus, Gauteria, Gomphidius, Hebeloma, Hygrophorus, Hymenogaster, Hysterangium, Inocybe, Laccaria, Lactarius, Leccinum, Martellia, Paxillus, Pisolitus, Rhizopogon, Rozites, Russula, Scleroderma, Suillus, Tylopilus Tricholoma, Xerocomus</i>	<i>Abies, Alnus, Betula, Corylus, Eucalyptus Fagus, Larix, Picea, Pinus, Populus, Pseudotsunga, Quercus, Salix, Tsunga</i>
Ascomycotina	
<i>Balsamia, Elaphomyces, Genea, Geopora, Helvella, Hydnotria, Sphaerosporella, Tuber</i>	<i>Abies, Betula, Corylus, Eucalyptus, Fagus Larix, Pinus, Populus, Pseudotsunga Quercus, Salix, Tsunga</i>
Zygomycotina	
<i>Endogone</i>	<i>Eucalyptus, Pinus, Pseudotsunga</i>
Deuteromycotina	
<i>Cenococcum</i>	<i>Abies, Larix, Pinus, Polygonum, Pseudotsunga</i>

5.4 Especificidad

La especificidad se define como la asociación de ciertos hongos con algunas plantas hospederas, ya que algunos hongos son aparentemente específicos para un hospedero. Por otra parte, hay ciertos hongos ectomicorrizógenos que se asocian con varias plantas formando ectomicorrizas con numerosos géneros de árboles de diversas familias (Marx y Cordell, 1994). Así, existen tres categorías de especificidad: estrecha, intermedia y amplia (Molina *et al.*, 1992).

Intervalo de hospederos estrecho.

Son los hongos que se asocian solamente con un género de planta. La especificidad del hospedero con intervalo estrecho presenta muchas presiones de selección, por ejemplo, *Alnus rubra*, es resistente a ser colonizada por hongos de intervalo amplio de hospederos, ya que se asocia únicamente con hongos fuertemente específicos (Molina, 1979).

Intervalo de hospederos intermedio.

Los hongos están limitados a una familia de hospederos, por ejemplo, *Suillus* y *Rhizopogon* con pináceas. Muchos hongos producen esporomas siempre con un hospedero en particular, mientras que otros lo hacen con una amplia variedad de hospederos, aunque por otro lado, la falta de esporomas no implica que no se formen micorrizas en el campo (Trappe, 1962; Molina y Trappe 1982).

Intervalo de hospederos amplio.

Los hongos en esta categoría pueden formar micorrizas con diversas plantas hospederas. Se ha observado que gran cantidad de plantas pueden formar micorriza con numerosas especies de hongos (Molina *et al.*, 1992a; 1992b).

La formación de esporomas en los hongos ectomicorrizógenos con amplia gama de hospederos esta regulada por el ambiente, ya que se ha visto que pueden desarrollar esporomas en invernadero, vivero, plantaciones o en el bosque con hospederos de todas las edades. Si existen las condiciones adecuadas de humedad y temperatura, los hongos micorrizógenos sólo forman un tipo de micorriza, aunque algunos ascomicetos y basidiomicetos pueden formar ectomicorriza y ectendomicorriza (Molina *et al.*, 1992a; 1992b). Por otro lado, las plantas también pueden mostrar preferencia a una micorriza en particular, ya que en algunas angiospermas se reporta que el 65% de las especies forman una clase de micorriza, mientras que el 5% forman más de una clase (Trappe, 1987).

Se habla también de la infectividad y efectividad, la infectividad de un hongo se ha definido como la capacidad de los propágulos fúngicos (esporas, micelio, raíces) para colonizar al hospedero y efectividad de un hongo la cual se ha evaluado midiendo el incremento en biomasa o concentración de fósforo en las plantas, asumiéndose cierto grado de funcionalidad (Varela y Estrada, 1997).

5.5 Microrestauración

La microrestauración consiste en usar hongos para reparar o restaurar los ecosistemas, debilitados por la acción humana. Las prácticas de microrestauración usando hongos pueden ser implementadas en cuatro niveles (Staments, 2005):

Microfiltración: filtración de patógenos biológicos y químicos del agua.

Micoforestación y micojardinería: uso de micelio como cultivo acompañante para beneficiar y proteger a las especies vegetales.

Micoremediación: uso del micelio para descomponer desechos tóxicos y contaminantes.

Micopesticidas: uso del micelio para atraer y controlar las poblaciones de insectos.

Se trata de una disciplina relativamente nueva, y no hay duda que será de gran utilidad para complementar las prácticas de restauración ecológica.

5.6 Micorrizas en la restauración de bosques

El primer estudio que se publicó sobre ectomicorrizas fue en 1927 por Kessel y observó que la presencia de esporocarpos de *Rhizopogon sp.* le confería un incremento en el crecimiento y vigor a *Pinus radiata* (Castellano, 1994). El uso de las micorrizas en programas de reforestación se inició al introducir pinos exóticos en países tropicales y subtropicales, en donde, al no encontrarse hongos ectomicorrizógenos propios para las especies de pino, tuvieron que ser importados para que el programa de reforestación tuviera éxito (Mikola, 1973).

Los hongos ectomicorrizógenos se han utilizado en programas de restauración ya que en diversos estudios se ha observado incremento en la adecuación de la planta (crecimiento, supervivencia y/o reproducción) (Janos, 1992); por otra parte, a través de su micelio favorecen la conservación del suelo debido a que forman agregados, proporcionando estabilidad a su estructura (Bago *et al.*, 2000). Desde entonces el conocimiento, importancia ecológica y la aplicación de los hongos micorrizógenos en programas de restauración se ha incrementado, demostrándose su utilidad siempre y cuando sean nativos.

Se ha definido a la restauración ecológica como un proceso cuyo objetivo es recuperar una o más funciones de un ecosistema, dirigiéndolo para que el cambio de las especies a lo largo del tiempo permita la recuperación de la composición de la comunidad, así como sus interacciones, hasta conseguir que funcione en un tiempo relativamente corto de manera parecida a la comunidad original (Hobbs, 2005). Según la definición de la SER (Society for Ecological Restoration) la restauración ecológica es el proceso de ayudar al restablecimiento de un ecosistema que se ha degradado, dañado o destruido; así, un ecosistema se ha restaurado cuando contiene suficientes recursos como para continuar su desarrollo sin ayuda o subsidio adicional.

En la década de los 70's, se inició intensamente el estudio del efecto de la simbiosis sobre el crecimiento de los árboles, en particular con los hongos *Pisolithus tinctorius* y *Rhizopogon sp.* en Estados Unidos (Castellano, 1994). El uso de estos hongos en la restauración de ecosistemas talados, en donde la vegetación que se ha establecido no presenta colonización, y como consecuencia los propágulos micorrízicos son bajos o desaparecen, es una necesidad. El género *Suillus* es el primero que forma micorriza cuando se establecen los pinos en suelos donde los hongos ectomicorrizógenos están ausentes o han sido destruidos (Ashkannejhad y Horton, 2006; Adriaensen *et al.*, 2006), y se sabe que las esporas son propagadas por el viento y animales. En México, de los 170 millones de plantas de diferentes especies producidas anualmente para reforestar, sólo el 50% sobrevive y en algunos casos este porcentaje es de 0% (PRONARE, 2004), por lo que el inocular con propágulos micorrízicos se ha convertido en una práctica necesaria.

El uso de parcelas experimentales como sitios de observación a largo plazo, ha permitido descubrir que el generalizar la respuesta de las plantas micorrizadas es muy difícil ya que cada combinación planta-hongo-suelo responde en forma muy distinta, por lo que hay que seleccionar los hongos adecuados (Trappe, 1977; Pera y Parladé, 2005).

Bonfante (1998) realizó un estudio en el cual inoculó con diferentes especies de *Suillus* cuyos esporomas se obtuvieron bajo *Pinus pinea* y bajo *Pinus sylvestris* en un bosque alpino; los hongos fueron inoculados a las plántulas de *P. pinea* y *P. nigra* ssp. *laricio* var. *corsicana*. Las dos cepas de hongos formaron ectomicorrizas con las dos especies de pinos, sin embargo los esporomas que se colectaron en la zona alpina y se inocularon a *P. nigra* desarrollaron un número bajo de micorrizas. Al analizar las paredes celulares de la planta hospedera se detectó la presencia de β -1,3-glucano, lo que se ha sugerido es una respuesta de defensa de la planta para evitar la micorrización, ya que el hongo no habita en la misma área de *P. nigra*. Esta reacción de defensa no fue encontrada cuando se inoculó la planta con el hongo de la misma área, lo que indica que hay una alta compatibilidad simbiótica si se usan hongos y plantas que comparten las mismas condiciones ambientales.

Torres y Honrubia (1994) inocularon plantas de *Pinus halapensis* con *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon roseolus* y *Suillus collinitus* en sustrato desinfectado y sustrato no desinfectado, no encontrando diferencias significativas en el crecimiento de la planta (altura y peso seco) con respecto a los tratamientos no micorrizados, pero sí observaron una tendencia de mayor crecimiento y peso seco en las plantas que se inocularon con *Pisolithus*

tinctorius y sustrato desinfectado. Por otro lado, Morte *et al.* (2001) realizaron un experimento con plantas micorrizadas y no micorrizadas de *Pinus halapensis* con *Suillus mediterraneensis*, para evaluar la respuesta al stress hídrico al someterlas a cuatro meses de sequía. El stress afectó el crecimiento de las plantas no micorrizadas y micorrizadas, por lo que el hongo no le confirió ventaja ante el stress. Sin embargo cuando se reinició el aporte de agua se observó una tendencia en el incremento en la altura, número de ramas, biomasa total y contenido de clorofila en las plantas micorrizadas. Barberá *et al.* (2005) realizaron un estudio con el objetivo de reforestar ecosistemas mediterráneos en el sudeste español con plantas de *Pinus halapensis* inoculadas con *Suillus collinitus*; sin embargo, al ser transplantados no se observaron efectos positivos en el crecimiento de las plantas. Por otra parte, Ruiz-Diez *et al.* (2006) concluyen que *Suillus collinitus*, *S. bellinii* y *S. mediterraneensis* son las especies que forman más micorrizas e incrementan el crecimiento de *P. halapensis*, por lo que los propone como buenos candidatos para ser usados en la repoblación de dicha especie.

Parladé *et al.* (2001) realizaron un experimento con plantas de *Pinus pinea* y *Rhizopogon roseolus* como inoculante; al someterlas a stress hídrico las plantas micorrizadas no presentaron mayor crecimiento que aquéllas no micorrizadas, sin embargo cuando se reiniciaba el riego observaron que aquellas plantas que tenían un porcentaje alto de colonización micorrícica, se recuperaban lentamente al stress hídrico.

Adriaensen (2006) realizó un experimento en el cual inocularon semillas de *Pinus sylvestris* con *Suillus bovinus* en laboratorio con el fin de conocer si le confiere tolerancia al zinc, encontrando que el uso de *Suillus* puede ser una estrategia prometedora para la estrategia de reclamación en los suelos contaminados con metales pesados y suelos que han sufrido un severo disturbio.

En la restauración con HEM el primer paso es elegir la cepa con el mejor crecimiento *in vitro* para producir inoculante en el laboratorio. Ruíz-Díez *et al.* (2006) sugieren que un criterio importante para elegir a las cepas es que tengan un rápido crecimiento miceliar *in vitro*.

Algunos de los métodos para inocular plántulas con ECM son: a) adicionar cultivos puros de micelio de hongos específicos, b) usar en el agua de riego esporas fúngicas identificadas, c) introducir plántulas micorrizadas con hongos conocidos de calidad, o d) agregar suelo forestal. Las raíces micorrizadas son mucho mas eficientes en la incorporación de elementos minerales en comparación con las raíces vegetales no

micorrizadas, pues exploran más área y son más longevas (Plassard *et al.*, 1991). Sin embargo, recientemente se ha iniciado un nuevo campo que puede ser muy útil en las prácticas de Restauración Ecológica, el cual consiste en inocular directamente en el campo a plántulas ya establecidas dos o seis meses antes (Duñabeitia *et al.*, 2004).

5.7 Otros estudios

Comandini *et al.*, (1998) realizaron un estudio con *Abies alba* y encontraron 25 tipos de micorrizas, entre ellos, a *Inocybe* sp., describiendo las características macroscópicas y microscópicas del manto. Matsuda y Hijii (1998) realizaron un estudio con *Abies firma* cuyo objetivo fue recolectar los esporomas durante tres años, para observar el patrón de distribución espacial y temporal de la especie de hongos ectomicorrizógenos que se asocian con *A. firma*; entre las especies que colectaron se encontró a *Inocybe cincinnata* e *Inocybe* sp. Señalaron que *Inocybe cincinnata* produce esporomas a finales de septiembre y principios de octubre, y su distribución espacial se encuentra fuera de la copa de *Abies*. Estos autores consideran que el género *Inocybe* es un género de estado sucesional temprano en la colonización por ectomicorrizas y tiende a presentarse en la base del árbol en la parte distal, fuera de la copa del árbol.

5.8 Estudios de ectomicorrizas en laboratorio para los géneros usados en este estudio

Alvarado-Sánchez (2008) realizó colectas de esporomas durante la época de lluvias de 2006 en la CRM; colectó 127 morfotipos, 96 en el bosque de *Abies* y 31 en el bosque de *Pinus*; encontró que el género más abundante fue *Inocybe*, después *Boletus*, *Laccaria* y por último *Amanita* (Cuadro 2). Sus colectas y aislamientos sirvieron de base para nuestro estudio.

Clasificación	Tipo de Bosque		
	Pino	Oyamel	TOTAL
Reino: Fungi			
Phylla: Basidiomicotina			
Clase: Holobasidiomycetes			
Subclase: Hymenomycetidae			
Orden: Russulales			
Familia: Russulaceae			
Género: <i>Russula</i>		6	6
Género: <i>Lactarius</i>		5	5
Orden: Cortinariales			
Familia: Cortinariace			
Género: <i>Inocybe</i>	12	58	70
Orden: Boletales			
Familia: Boletaceae			
Género: <i>Suillus</i>	1	3	4
Género: <i>Boletus</i>	3	7	10
Orden: Agaricales			
Familia: Tricholomataceae			
Género: <i>Laccaria</i>	6	4	10
Familia: Amanitaceae			
Género: <i>Amanita</i>	7	4	11
Otros	2	9	11
TOTAL	31	96	127

Cuadro 2. Morfotipos colectados en los Bosques de Pino y Oyamel durante la estación de lluvias en 2006 (tomado de Alvarado Sánchez, 2008).

La autora evaluó el crecimiento micelial *in vitro* de tres especies de hongos ectomicorrizógenos, *Suillus brevipes*, *Inocybe. aff. splendens* y *Boletus pinophilus*, las cuales fueron sometidas a pruebas de crecimiento en cuatro concentraciones de glucosa en medio BAF (10, 20, 30 y 40 g/L), tres medios (BAF, EMA y PDA) y tres diferentes pH en medio BAF (3, 5 y 7) y evaluó cuatro variables de crecimiento: biomasa, tasa media de crecimiento y relación biomasa/aérea. En el caso de *S. brevipes* encontró que crece mejor

en concentraciones altas de glucosa, los medios BAF y PDA y en pH ácidos, mientras que *I. aff. splendens* crece favorablemente en medios enriquecidos y pH neutros.

5.9 Deterioro de los Bosques en el Valle de México

Se han observado daños en la vegetación del Valle de México a partir de la década de los 70's. Alvarado *et al.* (1989) estudió los bosques de *Abies religiosa* en el Desierto de los Leones, observando, mediante un análisis dendrocronológico, que las tasas de crecimiento se redujeron y que las hojas presentaban una senescencia prematura desde la década de los 60's; en el caso de *Pinus hartwegii*, se han documentado daños en las hojas debido al ozono y otros agentes oxidantes.

En la Zona Metropolitana se ha observado que el ozono ocasiona la caída temprana de las hojas y acelera el envejecimiento de los árboles. Desde 1976 se han descrito los síntomas de los oxidantes en *Pinus hartwegii* en El Parque Nacional del Ajusco, como son manchas cloróticas y en bandas en las hojas viejas provocando la temprana defoliación, los árboles presentan un tamaño pequeño, y son atacados por el escarabajo *Arceuthobium globosum*, se observó que las altas concentraciones de ozono provocan inhibición en el crecimiento del tubo polínico y en la germinación de los granos de polen, lo cual afecta la producción de semillas repercutiendo en la baja regeneración de la especie. (Hernández y de Bauer, 1984).

En el caso de *Abies religiosa* en la década de los 80's se observó en el Desierto de los Leones una muerte masiva de individuos, entre otras razones porque la especie fue atacada severamente por el hongo *Phytophthora cinnamomi*, así como por la alta concentración de contaminantes en el aire (de Bauer y Hernández-Tejeda, 2006).

Con respecto a la Zona Cañada de Contreras en la Magdalena Contreras, Nieto de Pascual (1995) realizó un estudio sinecológico en el cual detectó que algunos árboles de *A. religiosa* presentan un moteado clorótico foliar, que en ocasiones termina en las puntas con un color café-rojizo, produciendo pérdida prematura de follaje lo cual son los daños de agentes oxidantes como el ozono.

Por todas las causas anteriores, se ha perdido cobertura vegetal de los pocos bosques que rodean a la Ciudad de México y por tal motivo se pretende conocer un poco más sobre la asociación de los hongos ectomicorrízógenos con las raíces de los árboles, ya que en los programas de reforestación que se implementan se ha observado que la supervivencia llega a ser en ocasiones del 0% después del año de haber sembrado la plántula en el bosque. El

micorrizar las plántulas desde vivero en algunos países es una práctica común, pero desafortunadamente se usan hongos que no son nativos, provocando que los hongos introducidos desplacen a los hongos nativos.

6. METODOLOGÍA

6.1 Ubicación de la Cuenca

El presente trabajo se realizó al límite sur–occidental del Distrito Federal dentro de la cuenca del río Magdalena, forma parte de la vertiente occidental de la sierra de las Cruces, dentro del Distrito Federal. Abarca parte de las delegaciones políticas Magdalena Contreras, Álvaro Obregón y Cuajimalpa, en un intervalo altitudinal de 2570 m snm en el noreste (límite del área ecológica con la urbana) a los 3850 m snm al suroeste (altitud máxima registrada para el cerro el Muñeco) (Ávila, 2002) (Figura 2).

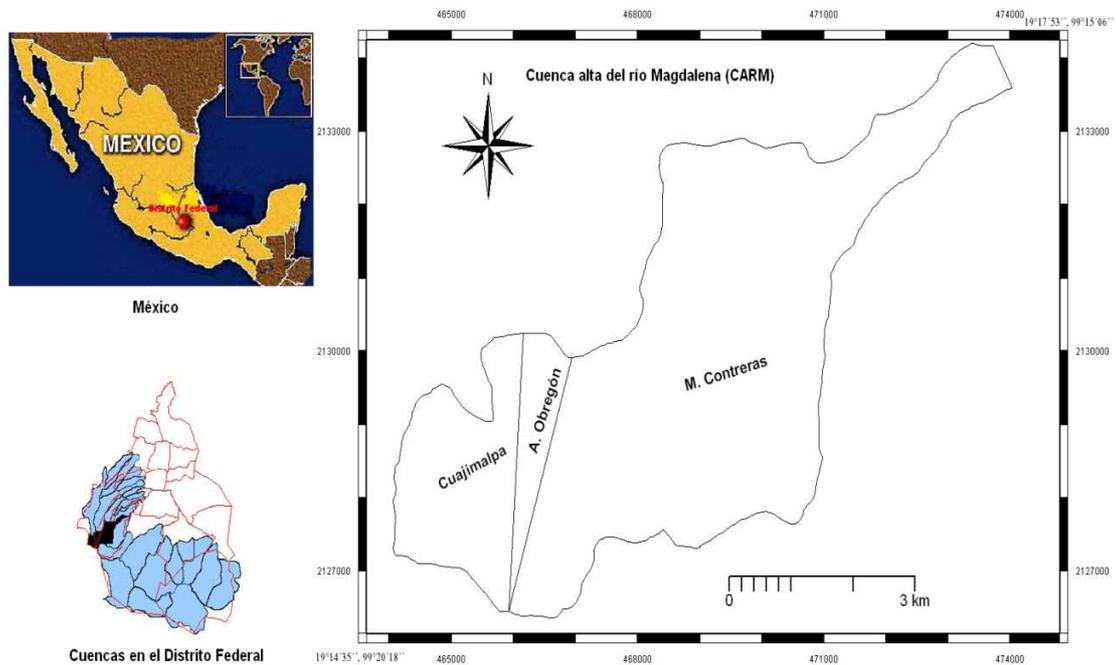


Figura 2. Ubicación de la Cuenca

6.2 Vegetación

Debido al gradiente altitudinal que presenta la Cuenca del Río Magdalena (CRM) se observan cuatro comunidades vegetales: *Pinus hartwegii*, *Abies religiosa*, Bosque Mixto y *Quercus*.

A una altitud de 3400 a 3800 m snm, que corresponde a la parte más alta de la Cuenca, se presenta el bosque de *Pinus hartwegii*. Se encuentra dominado por un estrato arbóreo monoespecífico y abierto; la cobertura vegetal que presenta en promedio es de 65 % de y 35 % de suelo desnudo. Se encuentran representadas dos asociaciones vegetales: *P. hartwegii-Muhlenbergia quadridentata* y *P. hartwegii-Festuca tolucensis*, esta comunidad se localiza sobre pendientes poco pronunciadas de 5 % de inclinación (Almeida *et al.*, en preparación).

La comunidad de *Abies religiosa* la cual se ubica de 2750 a 3500 m snm, se caracteriza por ser un bosque denso que alcanza 100 % de cobertura vegetal, dominado por la presencia del estrato arbóreo y arbustivo. Las asociaciones que la representan son: *A. religiosa-Roldana angulifolia*, *A. religiosa-Acaena elongata* y *A. religiosa-Senecio cinerarioides*. Esta última presenta condiciones avanzadas de deterioro por incendios. Esta comunidad se localiza sobre pendientes muy pronunciadas de 65 % de inclinación (Almeida *et al.*, en preparación)

En la parte baja de la cuenca de 2600 a 3300 m snm, se ubica la comunidad de bosque Mixto y de *Quercus*, el porcentaje de cobertura vegetal es de 80 % y las asociaciones que la conforman son: *Quercus laurina-A. religiosa*, *Q. laurina-Quercus rugosa* y *Pinus patula-Cupressus lusitanica-Alnus jorullensis ssp. Jorullensis*, estas se encuentran sobre pendientes pronunciadas, la parte más baja es muy vulnerable a la pérdida de cobertura forestal debido a los asentamientos humanos (Almeida *et al.*, en preparación).

6.3 Suelo

En la Cuenca del Río Magdalena se encuentran cinco tipos principales de suelo: Andosol húmico, dominante en toda la cuenca y que son suelos jóvenes y poco desarrollados; Mólico, presente solo en una parte alta de la cuenca; Feozem háplico y luvico, en la parte baja de la cuenca y Litosol, presente en la parte baja de la cuenca y poco representado en la parte media de la misma. Con respecto a los tipos de textura, se registraron dos, franco arenoso y areno franco, siendo el primero el dominante. Los

porcentajes de las fracciones de arenas oscilan del 67 al 88%; de limos entre 3 a 18% y arcillas del 15% (Almeida *et al.*, en preparación).

Las concentraciones registradas de fósforo tienen un promedio de 0.089 mgP/kg, encontrando valores que oscilan entre 0.014 mgP/kg a 0.246 mgP/kg. Estas concentraciones se encuentran dentro de intervalos esperados en suelos derivados de cenizas volcánicas que se caracterizan por una baja cantidad de fósforo disponible, por la alta fijación del fósforo en los sitios de carga variable de los minerales amorfos (Almeida *et al.*, en preparación).

6.4 Clima

El clima de la Cuenca del Río Magdalena está determinado por el relieve montañoso por lo que se presentan tres tipos de clima: C(w2)(w) que corresponde a un clima templado sub-húmedo; se presenta a partir de la zona urbana hasta el piedemonte, sus límites altitudinales abarcan de los 2450 a 2800 m snm, donde se desarrolla la comunidad de bosque Mixto y de *Quercus*; C(e)(w2)(w) que corresponde a un clima semifrío sub-húmedo, se presenta en las laderas de montaña, sus límites altitudinales abarcan de los 2800 a 3600 m snm donde se encuentra la comunidad de *Abies religiosa*, y C(e)(m)(w) que corresponde a un clima semifrío húmedo, el cual se presenta en las partes altas de la cuenca, a más de 3600 m snm, donde se ubica el bosque de *Pinus hartwegii*. (Almeida *et al.*, en preparación).

Los tres tipos climáticos presentan un régimen de lluvias en verano y el porcentaje de lluvia invernal es menor al 5%. La precipitación en la Cuenca aumenta en cantidad conforme aumenta el gradiente altitudinal (Lab. Ecosistemas de Montaña, en proceso 2a) se presenta poca oscilación térmica, la temperatura media anual oscila entre 10 a 14 °C, los meses más calientes son abril, mayo y junio.

6.5 Parcelas de estudio

La zona en la que se ubican las parcelas permanentes de pino y oyamel, corresponde a la zona Forestal de Conservación; estas zonas tienen una gran extensión de vegetación natural, importante para la recarga del acuífero y la conservación de la biodiversidad. Los servicios ambientales que proporcionan a la población los hacen imprescindibles, por lo que requieren de un uso planificado y controlado, para evitar su deterioro (GODF, 2000).

La mayor parte de la Cuenca del Río Magdalena es propiedad de la comunidad Magdalena Atlitic. Por medio de las asambleas, que se realizan el primer domingo de cada

mes, y donde se reúnen la mayoría de los propietarios, se llegó a un acuerdo en el cual nos permitieron establecer dos parcelas permanentes por cada tipo de vegetación. Cada parcela tiene un área de 50 x 50 m aproximadamente y se encuentra cercada con alambre de púas; dentro de estas se llevan a cabo varios experimentos que pertenecen a tesis de licenciatura y posgrado de diferentes grupos de investigación.

Las coordenadas geográficas fueron tomadas en el centro de cada parcela. Para *A. religiosa*: la parcela uno 19° 15' 10.10'' latitud Norte, 99° 19' 9.12'' longitud Oeste, la parcela dos son 19° 15' 13.69'' latitud Norte, 99° 19' 8.6'' longitud Oeste. Para las parcelas de *P. hartwegii*: parcela uno 19° 14' 52.68'' latitud Norte, 99° 19' 3.99'' longitud Oeste, y la parcela dos 19° 14' 52.50'' latitud Norte, 99° 19' 0.76'' longitud Oeste (Figura 3). Para los objetivos del presente estudio se usaron las parcelas pertenecientes a la comunidad de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*. (Figura 3).

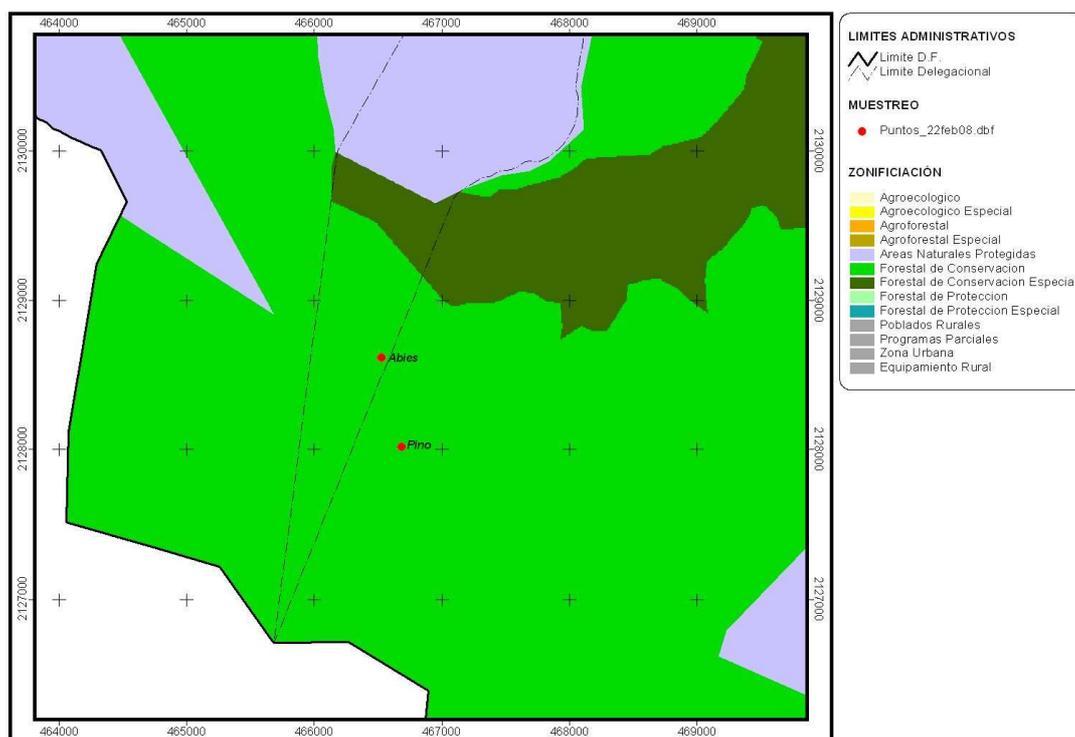


Figura 3. Mapa donde se ubican las parcelas de *A. religiosa* y *P. hartwegii* (CORENA 2008).

De estas investigaciones se han determinado en forma particular las características de temperatura y humedad de suelo y aire en las parcelas, las que se presentan en el Cuadro 3. (Unger y Hernández, en proceso).

Cuadro 3. Temperatura y humedad promedio del suelo y del aire en las parcelas de estudio.

	<i>Abies religiosa</i>	<i>Pinus hartwegii</i>
T°C máx.suelo	12.9	21.3
T°C máx. aire	27.52	41.9
H gH ₂ O g ⁻¹	1.07	0.43
H gH ₂ O m ⁻³	12.7	9.5

Por otro lado, los resultados del análisis de suelo se observan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Características generales físico-químicas del suelo en las parcelas de estudio.

	pH	MO	N	P	CIC	NH ₄	NO ₃	C
Parcelas		(%)	mgKg ⁻¹	mgKg ⁻¹	Cmol(+)Kg ⁻¹			
<i>Pinus hartwegii</i>	4.9	36.38	0.898	8.8	43.4	41	293.2	18.13
<i>Abies religiosa</i>	5.14	11.84	0.332	4	26.5	25	114.4	7.81

6.6 Factores de deterioro

La parte baja de la Cuenca, en especial en las cotas altitudinales de 2500 a 3000 m snm, esta expuesta a la presencia de asentamientos irregulares, crecimiento de parcelas agrícolas, turismo descontrolado y puestos de comida sobre todo los fines de semana contribuyen al deterioro de la zona.

La parte media de la Cuenca, que abarca de 3000 a 3500 m snm, presenta un riesgo alto a la erosión pues tiene pendientes muy abruptas, corresponde al bosque de *Abies religiosa*, en el cual la presencia de *Senecio cinerarioides* se considera un indicador de perturbación y muestra el deterioro de la zona (Almeida *et al.*, en preparación).

Además, se observa corta ilegal forestal que no se ha logrado controlar, hay presencia de ganado en la zona lo que provoca la compactación del suelo y la pérdida de reclutamiento de plántulas de oyamel en forma natural ya que las usan como alimento.

La zona alta de la Cuenca, la cual se ubica a un gradiente altitudinal de 3500 a 3800 m snm, en donde se presenta el bosques de *Pinus hartwegii*, es menos vulnerable a la erosión, pero es más vulnerables a incendios forestales originados por el hombre (Almeida *et al.*, en preparación).

La presencia de ganado es evidente ya que el suelo en algunas zonas se encuentra muy compactado, el ganado se alimenta de las plántulas de pino, lo que impide que se regenere en forma natural. Se observan también evidencias de tala ilegal.

6.7 Aspectos Históricos

La Cuenca del Río Magdalena (CRM) fue declarada Zona Protectora Forestal el 27 de Junio de 1932, con una extensión aproximada de 3100 ha (DOF, 1932). En este acuerdo se concluye que es importante conservar el bosque por salud pública, ya que se encuentra cerca de la Ciudad de México, y es necesario para sostener el caudal del Río Magdalena, el cual proporciona energía eléctrica a la región, a la que se conoce como Cañada de los Dinámos y aún en la actualidad se considera una de las principales áreas de excedente hídrico en el Distrito Federal (Mazari, 2000). Sin embargo, el acuerdo de 1932 también contempla otorgar permisos para la explotación de los recursos forestales.

Para el 19 de mayo de 1947, se publica otro decreto presidencial en donde se declara Zona de Protección Forestal del río Magdalena, el cual abarca una faja de 12 kilómetros de longitud desde el nacimiento del río hasta aguas abajo en la parte urbana, cubriendo 500 metros a cada lado del cauce.

Para el 1º de Agosto de 2000, se publica en la Gaceta Oficial del Distrito Federal El Programa General de Ordenamiento Ecológico del D.F., que tiene como política ambiental la conservación, protección, restauración y aprovechamiento sustentable. En base a esas políticas ambientales, se zonifica el suelo de conservación para mantener los servicios ambientales y fomentar el desarrollo rural y se zonifican ocho unidades ambientales: Forestal de Conservación, Forestal de Conservación Especial, Forestal de Protección, Forestal de Protección Especial, Agroforestal, Agroforestal Especial, Agroecológica y Agroecológica Especial.

La mayor parte de la CRM es propiedad de la comunidad Magdalena Atlitic, y existen zonas de litigio con la comunidad San Nicolás Totolapan y San Mateo Tlaltenango.

Debido a estos conflictos, el manejo de ecosistemas en esta cuenca se ha dificultado. A pesar de la importancia del área, su situación legal presenta un desorden administrativo en el que no es claro a quien compete su administración y qué restricciones de uso presenta

La presente tesis forma parte del proyecto Manejo de Ecosistemas y Desarrollo Humano en la Cuenca del Río Magdalena, el cual se desarrolla en el marco del Programa de Apoyo a la Investigación en Facultades y Escuelas de la UNAM y cuyo objetivo general es “Generar un diagnóstico ambiental del suelo de conservación ecológica de Magdalena Contreras, que permita obtener información sobre el estado actual de la flora, fauna y vegetación de los ecosistemas forestales como base, para proponer acciones en el contexto del manejo de ecosistemas para la conservación y restauración del área, así como destacar las especies de mayor relevancia biológica para proponer lineamientos para su uso y conservación”

Dentro de los objetivos particulares del proyecto Manejo de Ecosistemas y Desarrollo Humano en la Cuenca del Río Magdalena. En las estrategias de manejo se encuentran las estrategias de restauración ecológica, dentro de las cuales se contempló en el proyecto Manejo de Ecosistemas y Desarrollo Humano en la Cuenca del Río Magdalena, como objetivos particulares, restablecer la cobertura vegetal a través de la introducción y seguimiento de especies de diferentes estadios sucesionales y analizar algunos de los factores limitantes del crecimiento y establecimiento de las especies a lo largo del tiempo y el espacio. Y la presente tesis realiza una pequeña aportación para tales objetivos.

Con la información obtenida en éste trabajo como con la información de otros grupos de investigación, se propondrán mecanismos para el diseño de estrategias en el manejo de la Cuenca.

6.8 Especies vegetales estudiadas

i) *Pinus hartwegii*

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Spermatophyta

Clase: Coniferae

Orden: Pinales

Familia: Pinaceae

Género: *Pinus*

Especie: *Pinus hartwegii* Lindl.

Es el pino que se desarrolla a mayor altitud, por lo general de 2700 a 4000 m s nm, a menudo sobre laderas de fuertes pendientes en México.

Árbol de 5 a 25 o 30 m de altura, tronco con un diámetro hasta de 75 cm de corteza gruesa y áspera, de color café oscuro a grisácea, ramas extendidas con hojas aciculares de 4 ó 5 en cada fascículo, a veces 3 a 6 claro, rígidas, de 6 a 18 cm de largo, de color verde claro, casi glaucas, vaina persistente, tiene amentos masculinos de 1 a 2.5 cm de largo, de color amarillento o violáceo a café, conillos femeninos oblongos, de color azul violáceo y dispuestos en grupos de 2 a 4, a veces 6, cortamente pedunculados, conos ovoideo-oblongos, levemente encorvados de 7 a 14 cm de largo por 5 a 8 cm de diámetro, de color café oscuro o casi negro persistentes, dispuestos en pares o en grupos de 3 o 4, presenta semilla de 5 a 8 mm de largo color café con el ala de 12 a 20 mm de largo por 5 a 12 mm de ancho de color café con líneas oscuras. En el Valle de México se encuentra entre 2600 a 4200 m snm; los bosques de *P. hartwegii* son medianamente densos a abiertos, forman el último nivel de la vegetación arbórea, en ocasiones la cobertura del estrato herbáceo es mayor a la cobertura arbórea, puede formar bosques puros pero también cohabita con otras especies de árboles (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

ii) *Abies religiosa*

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Pinophyta

Clase: Pinopsida

Orden: Pinales

Familia: Pinaceae

Género: *Abies*

Especie: *Abies religiosa* (Kunth Schltdl. et Cham)

Es un árbol que llega a medir 40 o hasta 60 m, el tronco mide de 40 cm a 1.5m de diámetro, tiene una corteza lisa en los árboles jóvenes y gruesa con placas escamosas en los árboles adultos, tiene ramas horizontales y hojas alternas de 20 a 30 mm de largo por 1.5 cm de ancho, las inflorescencias femeninas son en forma de conillos subcilíndricos de 7 cm de largo, con las brácteas rojizas de margen rasgado, los conos maduros son cilíndrico-oblongos de 10 a 16 cm de largo por 4 a 6 cm de ancho, semillas resinosas de 9 a 10 mm de largo por 5 mm de ancho, lisas de color castaño brillante de largo por 10 a 15 mm de ancho el a la mide de 22 a 25 m. Su nombre común es “Oyamel”, se encuentra a una altitud de 2600 a 3500 m snm. Puede formar bosques puros pero también cohabita con otras especies de árboles. En el valle de México se localiza en El Chico a Epazoyucan, Tepeapulco, Villa N. Romero a Tlalpan y Milpa Alta, Texcoco y Amecameca y Juchitepec. La madera se usa para fabricar papel, vigas para la construcción (Rzedowski; Rzedowski, 2001) y como árbol de navidad.

6.9 Especies de hongos ectomicorrizógenos usados

i) *Suillus brevipes*

Clasificación toxonómica

Reino: Fungi

Phylla: Basidiomycota

Clase: Holobasidiomycetes

Subclase: Hymenomycetidae

Orden: Boletales

Familia: Boletaceae

Género: *Suillus*

Especie: *Suillus brevipes* (Peck) Kuntze 1898

Suillus es un hongo ectomicorrizógeno que se asocia a las primeras etapas de vida de las plántulas (Bowen, 1994; Santiago-Martínez, 1992 y 2002), forma esporomas epígeos con himenóforos tubulares. Es un género de fácil aislamiento y una especie que se reporta como comestible (Alvarado Sánchez, 2008); últimamente se ha propuesto como un género que se puede usar para rehabilitar suelos contaminados con metales pesados (Adriaensen, 2006).

ii) *Inocybe splendens*

Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Phylla: Basidiomycota

Clase: Holobasidiomycetes

Subclase: Hymenomycetidae

Orden: Cortinariales

Familia: Cortinariace

Género: *Inocybe*

Especie: *Inocybe splendens* R. Heim

Inocybe es un hongo ectomicorrizógeno que se asocia a las primeras etapas de vida de las plántulas (Bowen, 1994) así como en estados sucesionales tempranos (Matsuda e Hijii, 1998). Presenta láminas adheridas al estípite; en los esporomas maduros el velo interno se transforma en una cortina, las cuales se observan como fibrillas en el borde del píleo (Herrea y Ulloa, 1990). Su comportamiento *in vitro* no ha sido muy estudiado (Alvarado Sánchez, 2008).

6.10 Colecta de esporomas y aislamiento de tejido

A partir del trabajo realizado por Alvarado (2008) se seleccionaron las sepas de *Suillus brevipes* e *Inocybe splendens*.

Las cepas se encuentran en el separio del Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigaciones de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, *Suillus brevipes* tiene la clave TLAX62 e *Inocybe splendens* la clave TLAX64.

6.11 Cepas en medio sólido y líquido

Las cepas se aislaron cada tres meses en medio nutritivo PDA a partir del mes de octubre del 2006. En cada proceso de resiembra, las colonias fueron fragmentadas en pequeños cuadros de 5 X 5 mm, los cuales fueron transferidos al medio de cultivo fresco y sólido (Santiago *et al.* 1999).

Después de una o dos resiembras en PDA, se transfirieron a medio BAF sólido (Biotina Aneurina Ácido Fólico) (finales de diciembre de 2006), se dejó crecer la cepa y después de un mes se volvieron a cortar en pequeños cuadros de 5 X 5 mm, los cuales se transfirieron (inicio de febrero de 2007) a matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio líquido Biotina Aneurina Ácido Fólico (BAF) (Moser, 1960), adicionándose 15 g de dextrosa por litro. Los matraces fueron mantenidos en agitación mecánica a 150 rpm y 25°C durante dos o tres meses.

6.12 Plántulas en vivero

Las plántulas de *Pinus hartwegii* Lindl. y *Abies religiosa* (Kunth Schldtl. et Cham) fueron proporcionadas por el vivero de San Luis Tlaxiátemalco ubicado en la Delegación Xochimilco D. F. Se nos indicó que las semillas fueron colectadas del Ajusco y germinadas en contenedores de plástico rígido, en el mes de octubre de 2006.

Cada mes de febrero a julio del 2007, se registraron los parámetros de crecimiento correspondientes a altura total, altura al meristemo y diámetro a la base a 1 cm del suelo. Es importante señalar que de febrero a mayo se tomaron las mediciones morfométricas, sin evaluar los tratamientos con HEM ya que la primera inoculación con *S. brevipes* (Peck.) Kuntze, y suelo forestal se llevó a cabo en el mes de junio. En el vivero organizaron y etiquetaron las plantas para identificar cuáles serían destinadas a los diferentes tratamientos.

6.13 Producción masiva de micelio en botellas

Para la producción de micelio (marzo de 2007), se requirieron 14 botellas lecheras de vidrio de un litro, en las cuales se depositaron 600 ml de vermiculita con pH de 7, 66 ml de turba y 300 ml de medio de cultivo BAF y se le adicionaron 10 g de dextrosa por litro.

Las botellas fueron selladas con un tapón de algodón, y se esterilizaron por una hora a 120 lb de presión en un autoclave. Posteriormente, se sacaron las botellas y se dejaron enfriar a temperatura ambiente; a partir de este momento todo el proceso se llevó a cabo en

la campana de flujo laminar ya que se requiere de un ambiente totalmente estéril para evitar que se contamine el material.

Las cepas se encontraban en medio BAF líquido de 100 ml, con un volumen de 250 ml, de tal manera que de cada matraz se vertían 50 ml de inóculo y medio líquido aproximadamente a una botella que contenía vermiculita, turba, BAF y dextrosa, mientras que los 50 ml restantes se pasaron a una segunda botella; este procedimiento se repitió para cada matraz y cepa de hongo. Al finalizar, las botellas fueron incubadas a 25°C durante aproximadamente tres meses.

6.14 Extracción de micelio

Cuando se observó que el micelio cubría el material que se encontraba dentro de las botellas, el contenido fue sacado cuidadosamente y depositado en un lienzo de manta de cielo (junio 2007). El material fue expuesto cuidadosamente a un chorro de agua para eliminar los residuos del medio de cultivo ya que el azúcar es sustrato para microorganismos, se depositó sobre papel de estraza y se dejó secar a temperatura ambiente (un día). Ya seco el micelio se guardó en una bolsa de plástico y se refrigeró a 4°C, hasta que fue utilizado (Santiago *et al.*, 1999).

Este proceso sólo se realizó para la cepa de *S. brevipes* ya que *I. splendens* se contaminó y como consecuencia no creció la cepa, por lo que se realizó una segunda producción de micelio a finales del mes de junio del mismo año.

En la segunda fase de producción de micelio se prepararon 24 botellas lecheras. En esta ocasión, las dos cepas no se contaminaron y por segunda vez se obtuvo micelio de *S. brevipes* y por primera vez de *I. splendens*; el material fue extraído cuidadosamente de las botellas y no fue expuesto al agua ni se dejó secar, sólo se refrigeró inmediatamente para que posteriormente se inocularan las plántulas directamente en campo (agosto de 2007).

6.15 Obtención de suelo forestal

En junio de 2007, se colectó suelo forestal de la zona de oyamel y pino para determinar el potencial de inóculo. El criterio que se usó para coleccionar suelo de la zona fue tomar cuatro muestras al azar, para obtener una muestra heterogénea del inóculo potencial del bosque, ya que los propágulos no se distribuyen de forma continua en condiciones naturales; el suelo se bañó ligeramente con Captan, con el fin de eliminar hongos patógenos y se dejó secar al aire libre.

6.16 Pruebas de germinación

i) Pinus hartwegii

Tratamiento 1

Se realizaron pruebas de germinación en semillas de *Pinus hartwegii* utilizando el método que se describe a continuación (Galindo-Flores *et al.*, 2001).

- 1) Las semillas, se remojaron 24 horas con agua destilada, realizando tres cambios de agua en las 24 horas.
- 2) Se dejaron remojar 15 minutos en H₂O₃ al 30% en agitación constante.
- 3) Las semillas se lavaron varias veces con agua destilada y esterilizada para quitar los residuos de peróxido en una coladera.
- 4) Se rociaron con captan (0.5g por litro) y se enjuagaron con agua destilada, se desinfectó el papel filtro para ser usado como sustrato con alcohol del 96°.
- 5) Se colocaron 100 semillas distribuidas en dos cajas Petri de 15 cm de diámetro y se colocaron en forma de espiral, procurando que no se tocaran las semillas entre sí, a una distancia de 0.5 mm entre cada una, contando con una repetición más, teniendo un total de 200 semillas.
- 6) Se almacenaron en una cámara de germinación de la Unidad de Ambientes Controlados de la Facultad de Ciencias a 16/8 horas (obscuridad/luz) a 25°C; cada 48 horas se agregaba agua con una pipeta de 10 ml.

Tratamiento 2

Se realizó una segunda prueba ahora a 12/12 (obscuridad/luz) a 25°C en una cámara de ambientes controlados, siguiendo los mismos procedimientos para el tratamiento de las semillas que en el tratamiento 1.

ii) Abies religiosa

Los conos fueron colectados en el bosque de Oyamel de Tlaxcala, en los límites con Puebla en diciembre de 2006.

Tratamiento 1

Las pruebas de germinación de *Abies religiosa* se intentaron con tres tratamientos, en un inicio a las semillas se les quitó el ala membranosa; posteriormente:

- 1) Las semillas se remojaron 24 horas con agua destilada, realizando tres cambios de agua en las 24 horas, antes de montar el experimento.
- 2) Se dejaron remojar 15 minutos en H₂O₃ al 30% en agitación constante.
- 3) Las semillas se lavaron varias veces con agua destilada y esterilizada para quitar los residuos de peróxido en una coladera.
- 4) Se rociaron con captan y posteriormente se lavaron con agua destilada; se desinfectó el papel filtro para ser usado como sustrato con alcohol del 96°.
- 5) Se colocaron 100 semillas distribuidas en dos cajas Petri de 15 cm de diámetro y se colocaron en forma de espiral, procurando que no se tocaran las semillas entre sí, a una distancia de 0.5 mm entre cada una, contando con una repetición más, teniendo un total de 200 semillas.
- 6) Finalmente, se almacenaron en una cámara de germinación de la Unidad de Ambientes Controlados de la Facultad de Ciencias a 16/8 horas (obscuridad/luz) a 25°C; cada 48 horas se agregaba agua con una pipeta de 10 ml. Es importante señalar que se observó crecimiento de hongos en algunas semillas, por lo que fueron eliminadas de la caja Petri en cada observación que se efectuaba (Galindo-Flores *et al.*, 2001).

Tratamiento 2

Se realizó una segunda prueba ahora a 12/12 (obscuridad/luz) a 25°C en una cámara de ambientes controlados. Siguiendo los mismos procedimientos para el tratamiento de las semillas, se colocaron 100 semillas distribuidas en dos cajas Petri de 15 cm de diámetro y se colocaron en forma de espiral, procurando que no se tocaran las semillas entre sí, a una distancia de 0.5 mm entre cada una, contando con una repetición más; cada 48 horas se agregaba agua con una pipeta de 10 ml. (Galindo-Flores *et al.*, 2001).

Tratamiento 3

Para este experimento fue necesario esterilizar turba y vermiculita con la cual se realizó una mezcla y preparó un sustrato a una proporción 2:1; se depositó la mezcla en un recipiente de 5 cm de profundidad por 45 cm de largo y 25 cm de ancho a temperatura ambiente expuesto a la luz del día. Las semillas se trataron de la siguiente manera:

- 1) Se remojaron con H₂O₂ al 30% durante 30 minutos.
- 2) Posteriormente se lavaron con agua destilada.
- 3) Se remojaron en Captan por 24 horas en el refrigerador (0.5g X litro).
- 4) Finalmente se lavaron con agua destilada para quitar el exceso de Captan y se colocaron 100 semillas, sobre la turba y vermiculita a 1.5 cm de profundidad en posición horizontal con respecto al sustrato; cada 48 horas se agregaba agua con una pipeta de 10 ml.

6.17 Análisis de macronutrientes en el tejido vegetal

Antes de ser inoculadas en vivero se tomaron 7 plántulas al azar por especie para obtener el porcentaje de macronutrientes en vástago y raíz de carbono, fósforo y nitrógeno.

Para tal efecto se colocaron en un horno a 70°C durante una semana, posteriormente se enviaron las muestras separando la parte de vástago y raíz, finamente macerados, para su análisis en el laboratorio, de Fertilidad del Colegio de Postgraduados, con el fin de realizar una comparación entre la cosecha inicial julio 2007 y una cosecha final en agosto 2008, tiempo en el que las plantas habían permanecido un año en campo, sólo que en esta ocasión se obtuvieron muestras al azar de 5 plantas por cada tratamiento.

En la última semana de Agosto de 2008 se realizó una cosecha de 5 plantas por tratamiento por especie, en la cual se registró peso seco de la raíz, tallo y total con una balanza de precisión; para tal efecto se colocaron en un horno de secado a 70°C hasta se obtuvo el peso seco constante. Se realizaron análisis de macronutrientes para vástago y raíz por tratamiento para obtener el porcentaje de carbono, fósforo y nitrógeno, las muestras se enviaron al Laboratorio de Fertilidad del Colegio de Postgraduados.

6.18 Inoculación en vivero

En el proceso de inoculación en el vivero, se cambiaron las plántulas a tubetes con mayor capacidad correspondiente a 250 ml. Previamente se esterilizó vermiculita y turba en un autoclave a 120°C, durante 30 minutos; se realizó una mezcla 2:1, para ser usada como sustrato inerte en la inoculación de las plántulas con suelo forestal y micelio de *S. brevipes*, ya que como se mencionó anteriormente, fue la cepa que no se contaminó.

La inoculación de las plántulas con *S. brevipes* y suelo forestal se realizó en el mes de junio. Se obtuvieron 4 g de micelio para inocular cada planta. El número total de

plántulas que se inocularon fue de 160, 80 para pino y 80 para oyamel; fueron agregados 170 ml de vermiculita y turba previamente esterilizados, para que el transplante al tubete con mayor capacidad no tuviera espacios y así evitar la entrada de aire.

El suelo que se obtuvo del bosque de oyamel se usó para inocular plántulas de oyamel, y el suelo que se obtuvo del bosque de pino se usó para inocular las plántulas de pino; para llenar la capacidad de los tubetes se agregaron 100 ml más de vermiculita y turba, previamente esterilizada.

A las 160 plántulas restantes, que correspondían al testigo, se le agregaron 185 ml de vermiculita y turba para que tuvieran el mismo volumen que los dos tratamientos anteriores y así poder comparar entre todos los tratamientos.

6.19 Transplante a campo

El transplante se realizó a principios de septiembre de 2007, en cuatro parcelas permanentes de 50 x 50 m aproximadamente (dos en cada comunidad vegetal). En cada parcela se transplantaron al azar 40 plántulas por cada tratamientos 1) sin suelo nativo “control”, 2) inoculadas con suelo nativo, 3) inoculadas con *S. brevipes* y 4) inoculadas con *I. splendens*), teniendo 160 plántulas para la parcela uno y 160 más para la parcela dos, contando con un total de 320 plántulas por especie. Se realizó el mismo procedimiento para pino, de tal forma que se transplantaron 640 plántulas por las dos especies.

Las plántulas fueron transplantadas a una distancia de 1.5 m entre una y otra y a tres metros de distancia de cada una de las líneas establecidas usando el método tradicional forestal llamado “3 de bolillo” (CONAFOR-SEMARNAT, 2004) (Figura 4).

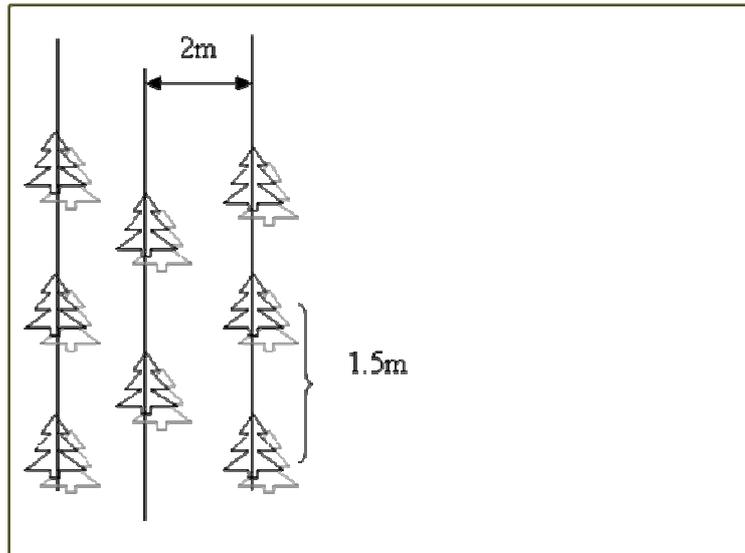


Figura 4. Esquema que muestra la distancia entre plantas al momento de ser transplantadas en campo con el método forestal “3 de bolillo”.

6.20 Inoculación en campo

La primera inoculación con *Inocybe splendens* R. Heim se realizó en el campo, y se agregaron 17 g a cada plántula; fueron inoculadas 80 plántulas por especie, dando un total de 160 plántulas. Posteriormente, se realizó la segunda inoculación con *Suillus brevipes*, para lo cual se agregaron 20 g de micelio a cada plántula. Las plántulas fueron marcadas con una placa de aluminio; en dicha etiqueta se especificaba la parcela a la que pertenecían, el tratamiento y un número del 1 al 40.

6.21 Análisis de crecimiento

Desde el momento del trasplante, cada bimestre se registraba la altura total de las plantas tomadas con un flexómetro, considerando para esto en las plantas de oyamel desde el suelo hasta la terminación de las hojas apicales, y en pino desde la base hasta las acículas sin levantarlas del suelo ya que debido a su crecimiento algunas caían por su peso. La altura al meristemo fue tomada con un flexómetro, considerando para oyamel la medición desde el suelo hasta los meristemos apicales, y para pino desde el suelo hasta el macollo. El diámetro a la base del tallo fue considerado a un centímetro del suelo para ambas especies, y fue tomado con un vernier digital (marca Mitutoyo).

Se aplicó un análisis de crecimiento de acuerdo a Hunt (1982), considerando las siguientes variables: cociente raíz/vástago, peso seco total, tasa relativa de crecimiento.

- Cociente raíz/vástago (R/V):

$$R/V = PSr/PSv,$$

donde: PSr es el peso seco de la raíz y PSv es el peso seco vástago.

- Peso seco total (PST)

$$PST = PSt + PSr$$

Donde: PSt es el peso seco del tallo y PSr es el peso seco de la raíz.

- Tasa relativa de crecimiento en altura (TRCa):

$$TRCa = \frac{\ln Alt_{t_2} - \ln Alt_{t_1}}{t_2 - t_1}$$

Donde: Alt_{t_1} corresponde a altura inicial en cm y Alt_{t_2} es la altura final, t_1 es el tiempo inicial en días y t_2 es el tiempo final.

6.22 Supervivencia

En cuanto a la supervivencia, si se observaba que la planta estaba seca o trozada por la acción de una pisada de animal o por la caída de una rama, se continuaba tomando las mediciones correspondientes ya que en varias ocasiones se observó que en la siguiente visita se desarrollaba pequeñas ramas y con esto se recuperaba la planta, por lo que se consideró que en la tercera medición si se observaba completamente seca y sin crecimiento de ramas laterales esa planta se consideraba como muerta.

6.23 Obtención de raíces

En el mes de marzo de 2007 se realizó un muestreo de raíces de las plantas, para realizar la caracterización macro y microscópica de las micorrizas formadas y con esto verificar que las características generales correspondieran a las cepas inoculadas. Para tal fin, se obtuvieron tres muestras de raíces por cada tratamiento al azar, teniendo un total de

12 muestras por especie y en el mes de agosto de 2008 se obtuvieron cinco muestras de raíces al azar por cada tratamiento. Para obtener las raíces de las plantas, se usaron tubos de PVC de 20 cm de largo y una pulgada de diámetro, los cuales se colocaban en el suelo junto al eje principal de la planta golpeando con un martillo, poco a poco, hasta que el tubo fue enterrado y posteriormente se extraía, procurando que el suelo y las raíces que se encontraban dentro no se cayeran. El tubo se envolvió en papel aluminio, con su respectiva etiqueta y bolsa de plástico transparente, al llegar al laboratorio se refrigeraron a 3°C, para su futuro manejo.

Posteriormente, los tubos que contenían las muestras de raíces se sumergieron en agua durante 24 horas, para que el exceso de suelo se removiera. Al día siguiente el material dentro del tubo fue colectado cuidadosamente sobre un tamiz, las raíces obtenidas se lavaron cuidadosamente con agua corriente de la llave para quitar el exceso de tierra que aun quedaba adherido a ellas y, finalmente, con unas pinzas de relojero se colectaron las raíces de la malla del tamiz y se colocaron en una caja Petri con un poco de agua de la llave para observar la morfología de la micorriza. El proceso se repitió nuevamente en febrero de 2009.

6.24 Caracterización macromorfológica y micromorfológica

Las raíces obtenidas fueron observadas en el microscopio estereoscópico. Se describieron las características morfológicas y anatómicas más comunes. En la descripción macromorfológica se consideró el color, el tipo de ramificación, presencia de rizomorfos y tipos de manto, se observaron al objetivo 20x, tomándose también fotografías de cada tipo de micorriza en un fotomicroscopio estereoscópico, Zeiss modelo Stemi SV6.

Al terminar lo anterior, las muestras se guardaron en frascos de plástico transparente con su respectiva etiqueta; el frasco contenía una solución de Formol (30 ml), Alcohol etílico (30 ml) y agua (40 ml).

Para la caracterización anatómica del manto fueron realizados cortes longitudinales. Se obtuvieron preparaciones semipermanentes, a las cuales se les agregó ácido láctico, y se observaron al objetivo 100x en un fotomicroscopio fotónico Olympus modelo AX70. Todas las fotografías fueron tomadas en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

6.25 Porcentaje de micorrización

Conjuntamente al observar y caracterizar a las micorrizas se obtenía el porcentaje de colonización, contando las raíces micorrizadas (Marx *et al.*, 1991) que se encontraban en los tubos de PVC, en el mes de septiembre de 2008 y febrero de 2009, es importante aclarar que no se observó el sistema radical en su totalidad, ya que las plantas no fueron extraídas de las parcelas.

6.26 Análisis estadístico

Se aplicó un ANCOVA, teniendo como covariable la medición inicial y como variable de respuesta la medición final de cada variable de respuesta, para comparar entre tratamientos; los análisis se realizaron en el programa Stat Graphics Plus 2.0

La supervivencia se analizó mediante la prueba no paramétrica “logrank” de Peto y Peto (Pyke y Thompson, 1986), con un análisis de χ^2 para comparar entre especies y tratamientos.

Para obtener la Tasa Relativa de Crecimiento (TRC), las variables registradas (diámetro a la altura del tallo, altura al meristemo y altura total) fueron transformadas a logaritmo natural, analizándose por medio de un análisis de varianza (ANDeVA) de dos vías, tratamiento (con cuatro niveles, sin suelo, con suelo, *S. brevipes* e *I. splendens*) y tiempo (con nueve niveles).

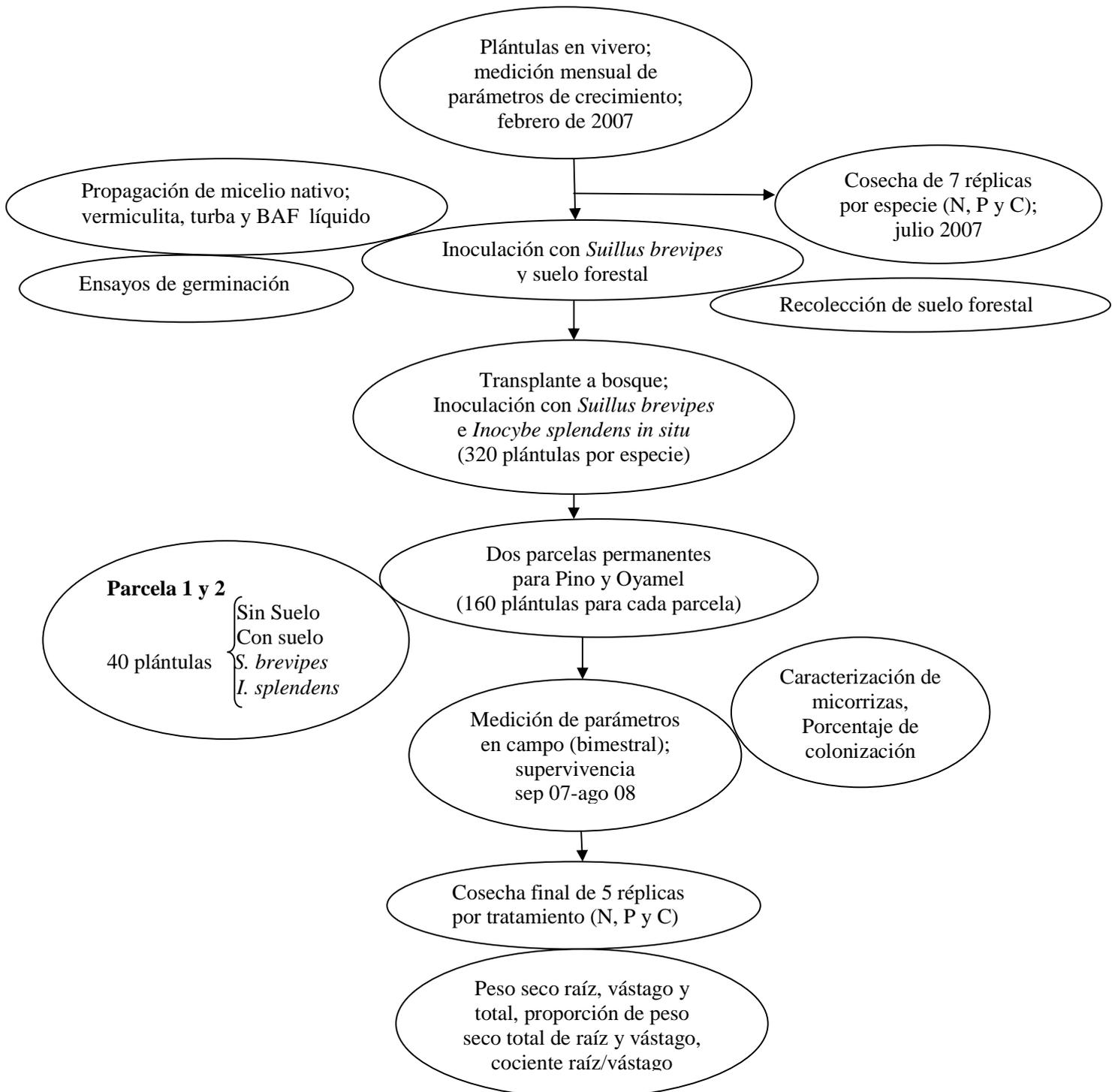
Para analizar biomasa, que en este caso fue para la cosecha final, los datos de raíz y vástago fueron transformados a raíz cuadrada, y los datos de R/V (proporción raíz/vástago) y PST (Peso seco total) a logn; en este caso se analizaron con un ANDeVA factorial con dos vías (tratamiento y especie), tratamiento con cuatro niveles, correspondientes a sin suelo, con suelo, con *S. brevipes* e *I. splendens*, y especie con 2 niveles. La prueba de Cochran señaló que si hubo homocedasticidad. Los análisis se realizaron en el programa STATISTICA versión 6.0.

Para analizar el porcentaje de carbono, fósforo y nitrógeno en raíz y vástago de cada especie, se aplicó un análisis de varianza (ANDeVA) de una vía y dos factores (raíz y vástago), y para comparar entre cosechas se aplicó un análisis de varianza (ANDeVA) de una vía y dos factores (cosecha inicial y cosecha final) y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey utilizando el programa STATISTICA versión 6.0.

El porcentaje de colonización se transformó a arcoseno y se aplicó un ANDeVA de dos vías

(tratamiento y tiempo) tratamiento con cuatro niveles, correspondientes a sin suelo, con suelo, con *S. brevipes* e *I. splendens*, y tiempo con 2 niveles.

6.27 Diagrama de flujo del método



7. RESULTADOS

7.1 Selección de cepas

Se seleccionaron las cepas de BAF *Suillus brevipes* (Peck.) Kuntze e *Inocybe splendens* R. Heim para cultivar micelio en vermiculita.

7.2 Crecimiento en vivero

Desde el mes de febrero a mayo de 2006 se tomaron mensualmente mediciones en el vivero de los siguientes parámetros: diámetro a la base del tallo a un cm del suelo, altura total del tallo y altura al meristemo, para 320 plántulas por especie, teniendo un total de 640 plántulas de ambas especies. En ese tiempo las plántulas no fueron micorrizadas con cepas nativas ni con suelo forestal, por lo que en las gráficas no se contempla la separación entre tratamientos (Figura 5). En febrero de 2006, las plántulas de *P. hartwegii* tenían 150 días desde su germinación, y las de *A. religiosa* tenían 240 días.

Es importante señalar que para el lote de plántulas que nos proporcionaron en el vivero, fueron revisadas las raíces de siete individuos al azar por especie en tres ocasiones entre febrero y junio del mismo año; y no se observó formación de ectomicorrizas.

El diámetro inicial a la base del tallo de *P. hartwegii* fue de $\bar{x} = 3.83$ mm (\pm EE 0.05), con una altura al meristemo inicial de $\bar{x} = 0.74$ mm (\pm EE 0.01) y una altura total de $\bar{x} = 7.91$ cm (\pm EE 0.11) (Figura 5).

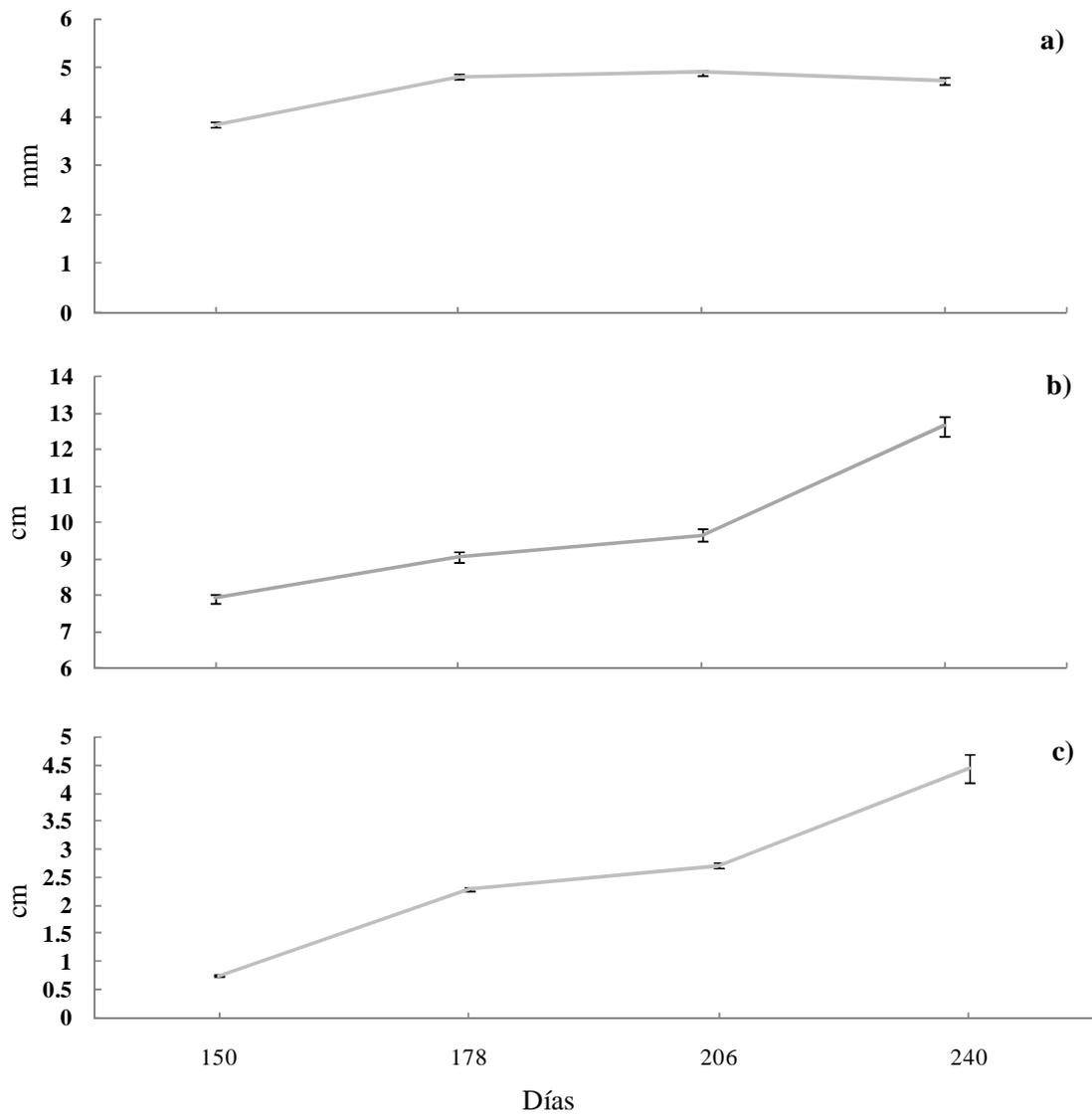


Figura 5. Crecimiento de *Pinus hartwegii* en vivero ($\pm 1E. E.$) a los 150 días después su germinación. Dónde: a) diámetro a la base del tallo, b) altura total y c) altura al meristemo (n= 320).

El diámetro inicial del tallo de *A. religiosa* fué de $\bar{x} = 1.80 \text{ mm} (\pm \text{EE } 0.01)$, con una altura inicial al meristemo de $\bar{x} = 13.16 \text{ cm} (\pm \text{EE } 0.25)$ y una altura total de $\bar{x} = 13.39 \text{ cm} (\pm \text{EE } 0.12)$ (Figura 6).

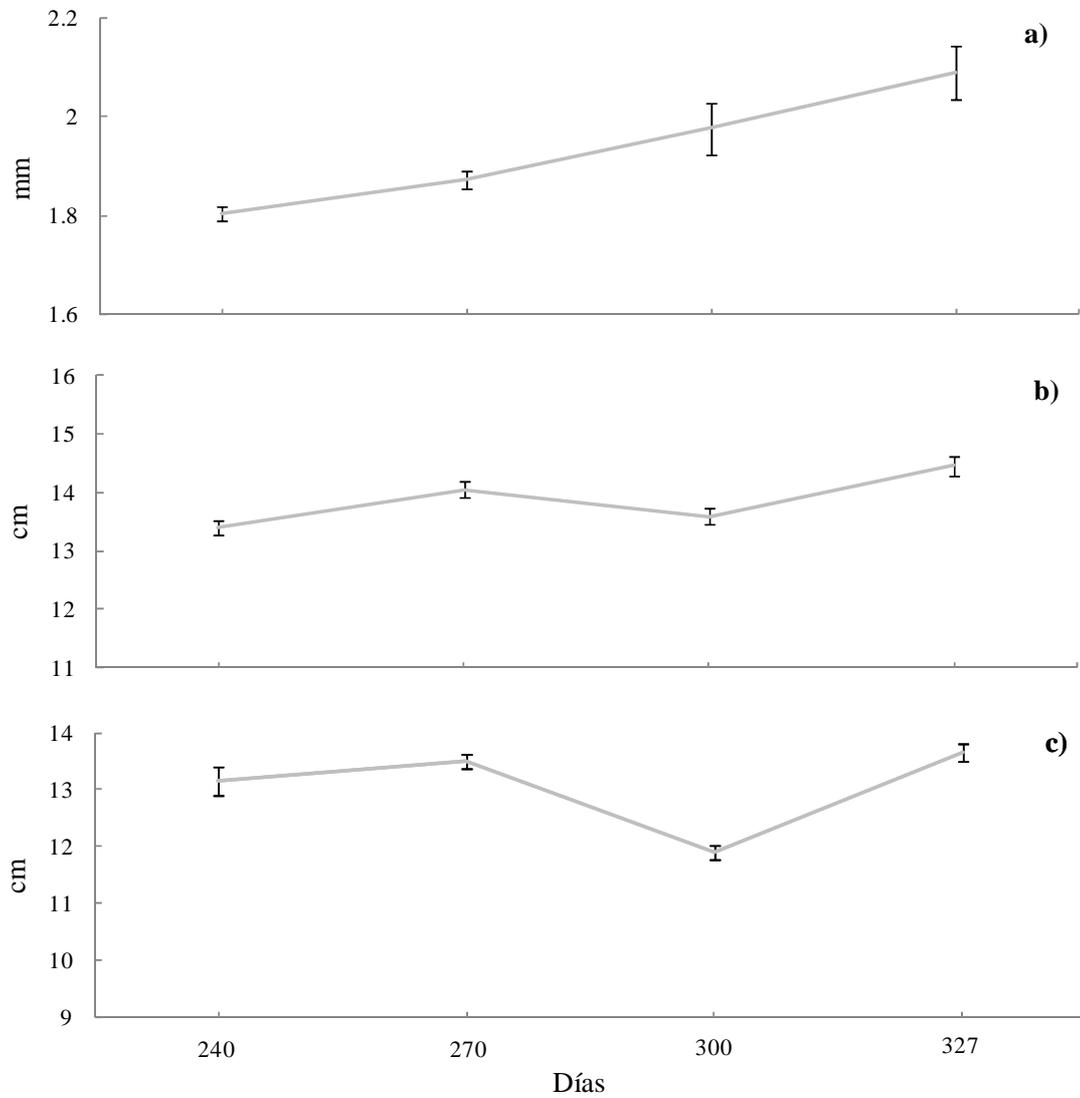


Figura 6. Crecimiento de *Abies religiosa* en vivero a los 240 días después de su germinación. Dónde: a) diámetro a la base del tallo, b) altura total y c) altura al meristemo ($\pm 1\text{EE}$) ($n = 320$).

7.3 Pruebas de Germinación

Pinus hartwegii es una especie con un porcentaje de germinación alto, en comparación con la germinación de las semillas de *Abies religiosa* que tiene un porcentaje muy bajo o nulo, el hipocolito se desarrolló de 1 a 3 mm (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de las pruebas de germinación para las semillas de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*, sometidas a diferentes tratamientos, el hipocolito se desarrolló de 1 a 3 mm.

Especie	Tratamientos			
<i>Pinus hartwegii</i>	Tratamiento 1			
	16/8 a 25°C	65%	de germinación a la tercera semana	
	Tratamiento 2			
	12/12 a 25°C	87%	de germinación a la tercera semana	
<i>Abies religiosa</i>	Tratamiento 1			
	16/8 a 25°C	0%	de germinación a la tercera semana	
	Tratamiento 2			
	12/12 a 25°C	30%	de germinación pero, sólo se desarrolló el hipocolito	
	Tratamiento 3			
	temperatura ambiente	10%	de germinación pero, sólo se desarrolló el hipocolito	

7.3 Análisis de crecimiento en campo

El ANCOVA para cada variable de respuesta, comparando la medición inicial y final con sus respectivos tratamientos, para ambas especies no registró diferencias significativas en ninguna variable (Figura 7 y 8) (Cuadro 6 y 7).

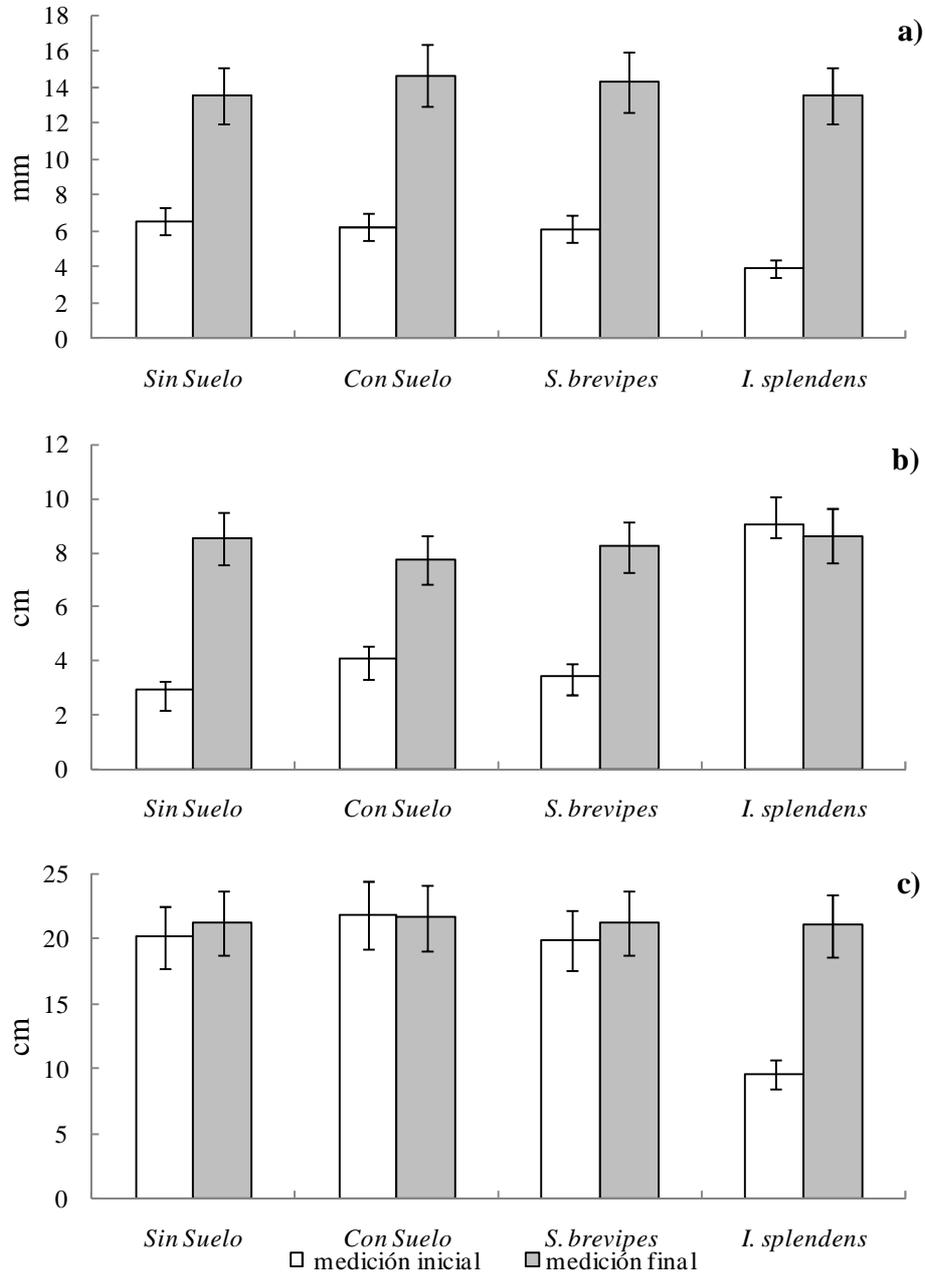


Figura 7. Crecimiento de *Pinus hartwegii* en campo, comparando la medición inicial con la medición final. Dónde a) diámetro a la base del tallo, b) altura al meristemo y c) altura total ($\pm 1E E$) (n= 293).

Cuadro 6. ANCOVA para *Pinus hartwegii*, comparando la medición inicial y final en campo (n= 293).

Variable	gl	F	p
Diámetro a la base del tallo	1	0	n. s.
Tratamiento	3	0.54	n. s.
Error	288		
Altura al meristemo	1	1.98	n. s.
Tratamiento	3	0.9	n. s.
Error	288		
Altura total	1	2.57	n. s.
Tratamiento	3	2.14	n. s.
Error	288		

nivel de significancia. n.s= $p > 0.05$

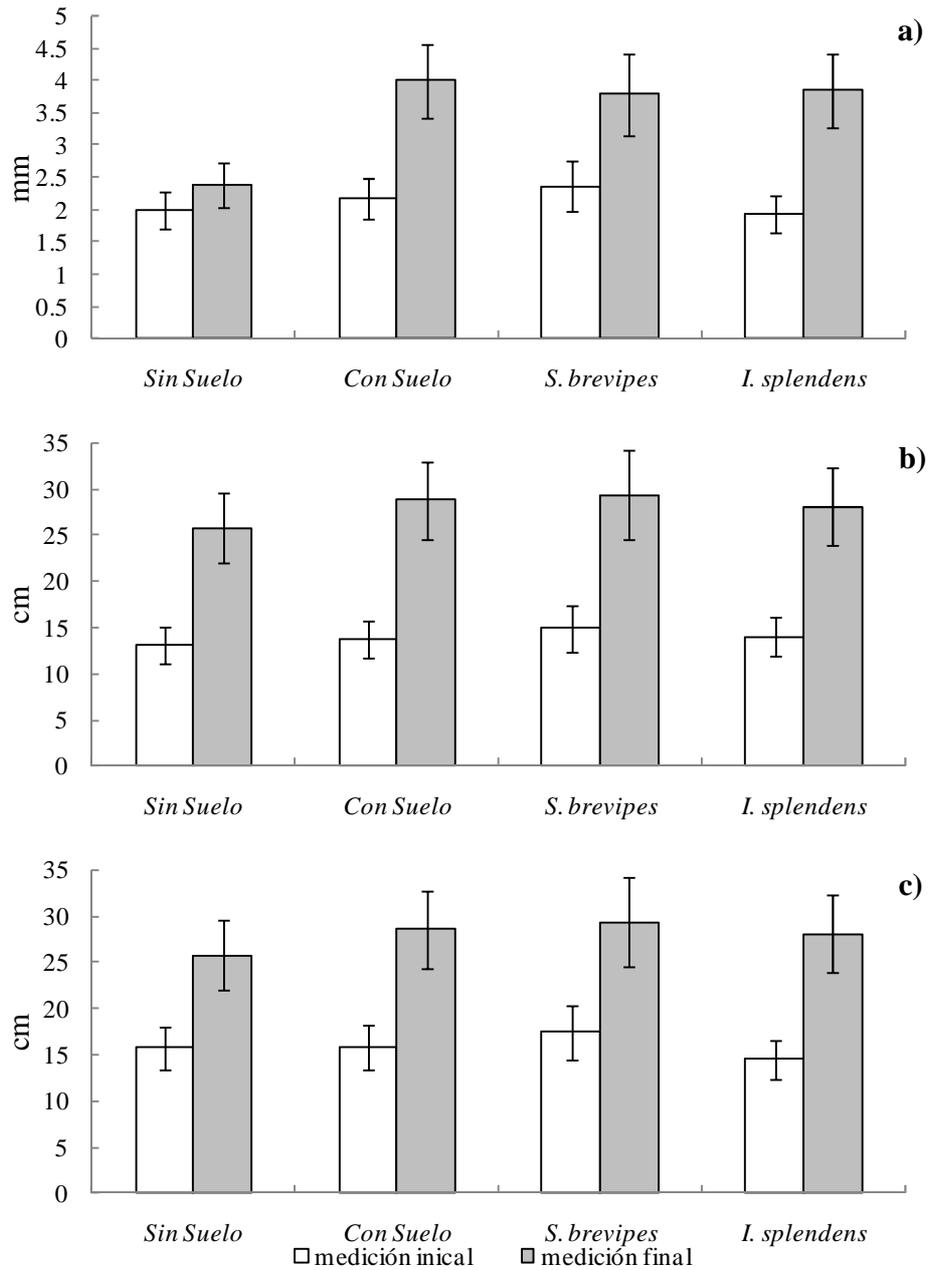


Figura 8. Crecimiento de *Abies religiosa*, en campo comparando la medición inicial con la medición final. Dónde a) diámetro a la base del tallo, b) altura al meristemo y c) altura total ($\pm 1E E$) (n= 174).

Cuadro 7. ANCOVA para *Abies religiosa* comparando la medición inicial y final en campo (n= 174).

Variable	gl	F	p
Diámetro a la base del tallo	1	2.57	n. s.
Tratamiento	3	2.14	n. s.
Error	169		
Altura al meristemo	1	1.18	n. s.
Tratamiento	3	1.27	n. s.
Error	169		
Altura total	1	1.63	n. s.
Tratamiento	3	1.38	n. s.
Error	169		

nivel de significancia. n.s= $p > 0.05$

7.4 TRC (Tasa relativa de crecimiento) en campo para cada especie

El diámetro a la base del tallo en *P. hartwegii* se incrementó en el periodo de estudio en campo de $\bar{x}=6.17$ cm (\pm EE 0.14) a $\bar{x}= 14.68$ cm (\pm EE 1.18) (Figura 9). El ANdeVA mostró diferencias significativas en el diámetro a la base para el factor micorriza, así como también para el tiempo y la interacción micorriza/tiempo (Cuadro 8). Los resultados de la prueba de Tukey se presentan en forma detallada en el Apéndice 1.

La altura al meristemo en *P. hartwegii* se incrementó en el periodo de estudio en campo de $\bar{x}=2.88$ cm (\pm EE 0.13) a $\bar{x}=8.62$ cm (\pm EE 0.35). El ANdeVA mostró diferencias significativas en el diámetro a la base para el factor micorriza, así como también para el tiempo y la interacción micorriza/tiempo (Cuadro 8). Los resultados de la prueba de Tukey se presentan en forma detallada en el Apéndice 2.

Con respecto a la altura total en *P. hartwegii*, se incrementó en el periodo de estudio en campo de $\bar{x}=19.86$ cm (\pm EE 0.26) a $\bar{x}=21.80$ cm (\pm EE 0.55). El ANdeVA mostró diferencias significativas en el diámetro a la base del tallo para el factor micorriza; también se observaron diferencias significativas para el tiempo y la interacción micorriza/tiempo (Cuadro 8). Los resultados de la prueba de Tukey se presentan en forma detallada en al Apéndice 3.

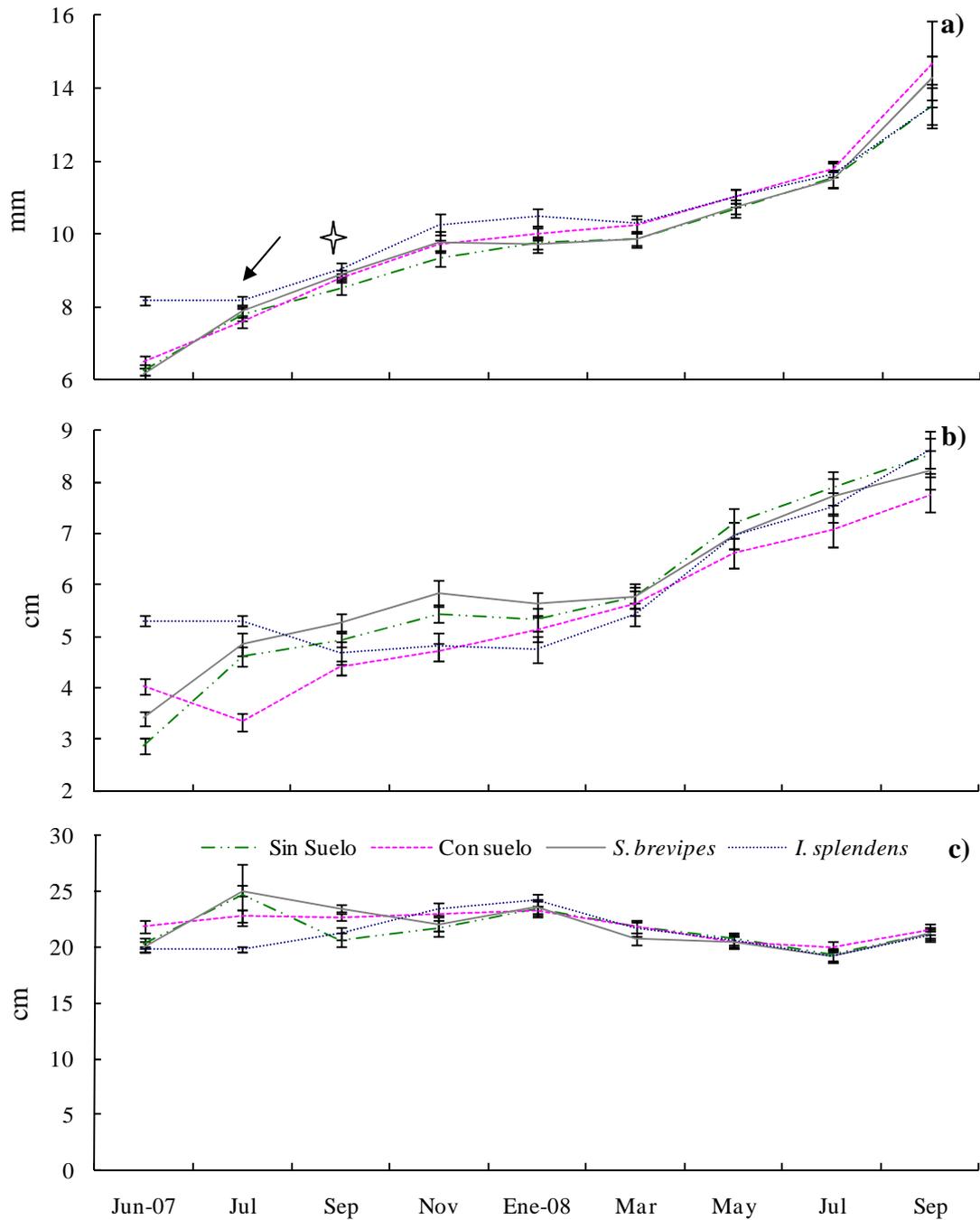


Figura 9. Parámetros morfométricos para *Pinus hartwegii* en campo, dónde: a) diámetro a la base del tallo, b) altura al meristemo y c) altura total (\pm EE) (n= 293). La flecha indica el momento en que se separaron los tratamientos y se inoculó con *S. brevipes* y con suelo forestal en vivero. La estrella indica el momento en que se realizó la segunda inoculación para *S. brevipes* y la primera para *I. splendens* in situ.

Cuadro 8. Resultados del ANDeVA para la TRC (Tasa Relativa de Crecimiento) de los parámetros morfométricos en *Pinus hartwegii* (n= 293).

Variable de respuesta	Factor	gl	F	p
TRC	Trat	3	43.6549	***
Diámetro a la base	T	7	250.3310	***
	TratXT	21	51.7513	***
	Error	2312		
TRC	Trat	3	20.42750	***
Altura al meristemo	T	7	2.92202	***
	TratXT	21	23.33125	***
	Error	2312		
TRC	Trat	3	48.0480	***
Altura total	T	7	252.7477	***
	TratXT	21	121.1612	***
	Error	2312		

nivel de significancia. n.s.= $p > 0.05$, *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$. Dónde Trat.= Tratamiento, T= Tiempo
 Trat.XT= Interacción Tratamiento/Tiempo

El diámetro a la base del tallo en *Abies religiosa* se incrementó en el periodo de estudio en campo de $\bar{x}=2.18\text{cm}$ ($\pm\text{EE } 0.04$) a $\bar{x}=4$ cm ($\pm\text{EE } 0.12$) (Figura 10). El ANdeVA no mostró diferencias significativas en el diámetro a la base debido al factor micorriza, pero el factor tiempo sí generó diferencias significativas, así como la interacción micorriza/tiempo (Cuadro 9). Los resultados de la prueba de Tukey se presentan en forma detallada en el Apéndice 4.

La altura al meristemo en *A. religiosa* se incrementó en el periodo de estudio en campo de $\bar{x}=14.18$ cm ($\pm\text{EE } 0.36$) a $\bar{x}=29.36$ cm ($\pm\text{EE } 1.57$). El ANdeVA no mostró diferencias significativas en el diámetro a la base debido al factor micorriza, pero el factor tiempo sí generó diferencias significativas, y también la interacción micorriza/tiempo (Cuadro 9). Los resultados de la prueba de Tukey se presentan en forma detallada en el Apéndice 5.

Con respecto a la altura total en *A. religiosa*, se incrementó en el periodo de estudio en campo $\bar{x}=14.85\text{cm}$ ($\pm\text{EE } 0.44$) a $\bar{x}=29.36$ cm ($\pm\text{EE } 1.57$). El ANdeVA no mostró diferencias significativas en el diámetro a la base debidas al factor micorriza; sin embargo, el factor tiempo sí generó diferencias significativas y la interacción micorriza/tiempo fue también significativa (Cuadro 9). Los resultados de la prueba de Tukey se presentan en forma detallada en el Apéndice 6.

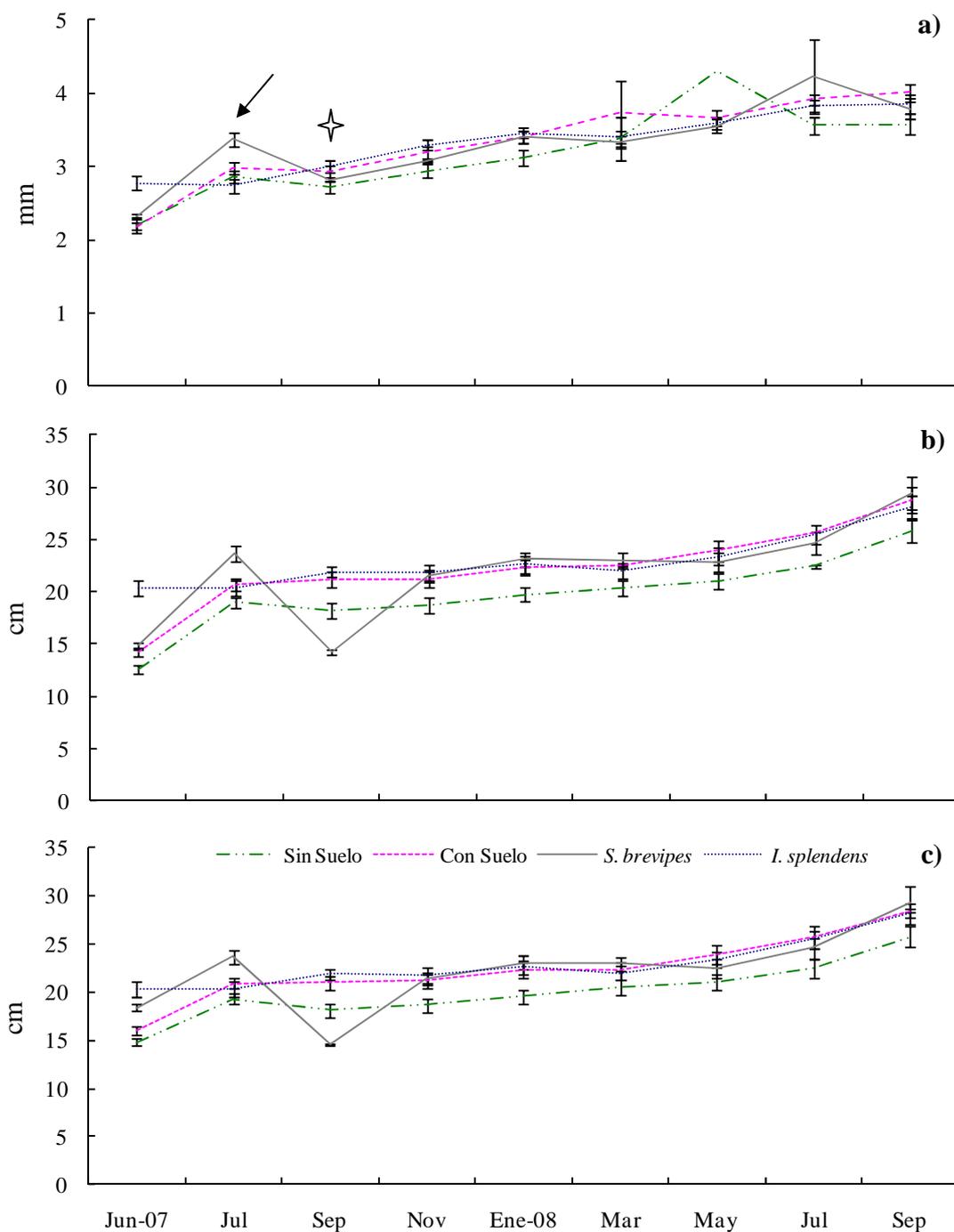


Figura 10. Parámetros morfométricos para *Abies religiosa* en campo, dónde: a) diámetro a la base del tallo, b) altura al meristemo y c) altura total (\pm EE) (n= 174). La flecha indica el momento en que se separaron los tratamientos y se inoculó con *S. brevipes* y con suelo forestal en vivero. La estrella indica el momento en que se realizó la segunda inoculación para *S. brevipes* y la primera para *I. splendens* in situ.

Cuadro 9. Resultados del ANDeVA para la TRC (Tasa Relativa de Crecimiento) de los parámetros morfométricos en *Abies religiosa* (n= 174).

Variable de respuesta	Factor	gl	F	p
TRC	Trat.	3	0.9747	n.s
Diámetro a la base	T	7	44.2778	***
	Trat.XT	21	15.5347	***
	Error	1368		
TRC	Trat.	3	0.6435	n.s
Altura al meristemo	T	7	54.8943	***
	Trat.XT	21	14.8666	***
	Error	1368		
TRC	Trat.	3	0.5828	n.s
Altura total	T	7	24.4397	***
	Trat.XT	21	11.5447	***
	Error	1368		

nivel de significancia. n.s= $p > 0.05$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Dónde Trat.= Tratamiento, T= Tiempo
 Trat.XT= Interacción Tratamiento/Tiempo

7.5 Supervivencia en campo

Durante el tiempo que las plantas permanecieron en campo, *Abies religiosa* fue la especie que presentó la menor supervivencia con respecto a *Pinus hartwegii* (Figura 12).

En el caso de *P. hartwegii*, la prueba de Peto y Peto no mostró diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo se observó que disminuyó ligeramente su supervivencia en los meses de noviembre a enero, excepto para las plantas inoculadas con *I. splendens*; se observa una tendencia a menor supervivencia en el tratamiento con suelo forestal y una mayor supervivencia en el tratamiento correspondiente a las plantas inoculadas con *S. brevipes* (Figura 11) (Cuadro 10).

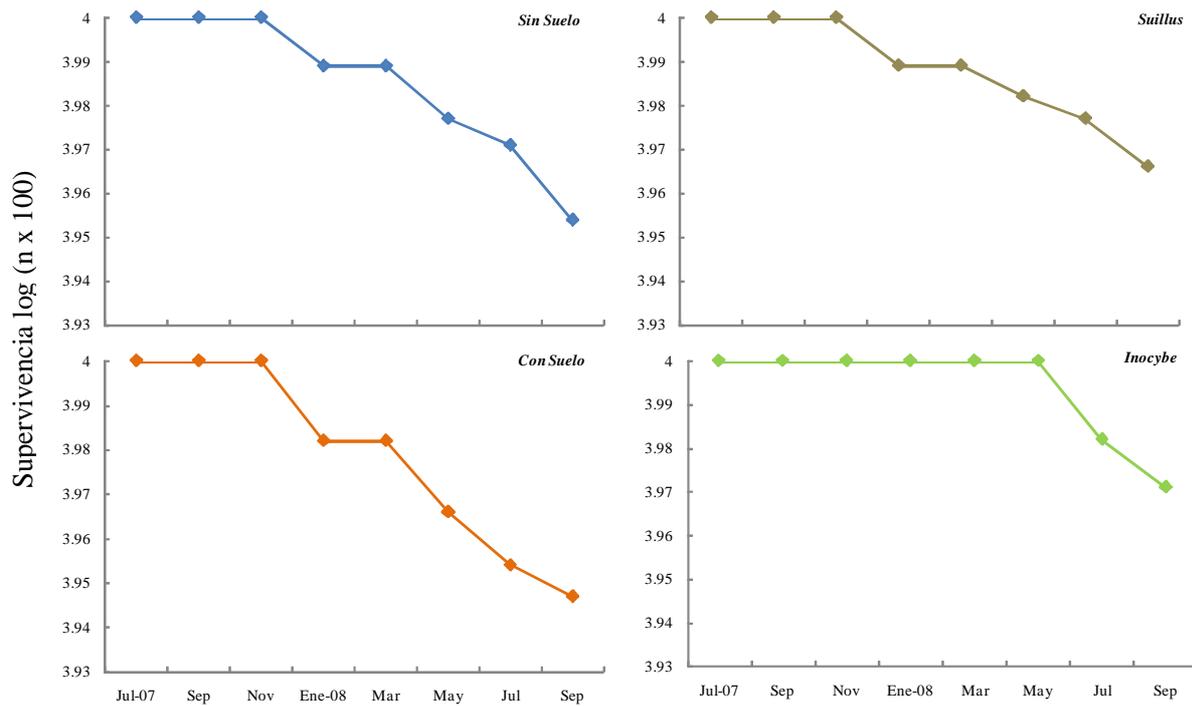


Figura 11. Supervivencia de *Pinus hartwegii* a través del tiempo, en campo, sometidas a diferentes tratamientos (n= 293).

Cuadro 10. Prueba de Peto y Peto (Pyke y Thompson, 1986) con los respectivos valores de χ^2 para *Pinus hartwegii* (n= 293).

Tratamiento	χ^2
Sin suelo-Con suelo	0.303
Sin suelo- <i>S. brevipes</i>	0.358
Sin suelo- <i>I. splendens</i>	0.358
Con suelo- <i>S. brevipes</i>	1.289
Con suelo- <i>I. splendens</i>	0.782
<i>S. brevipes</i> - <i>I. splendens</i>	0.082

En *Abies religiosa* se encontró que disminuyó la supervivencia en los meses de marzo a mayo de 2008 (Figura 12). La prueba de Peto y Peto no mostró diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo se observa una tendencia a mayor supervivencia en plantas inoculadas con *S. brevipes* ($\chi^2=3.263$) con respecto a aquellas que no son inoculadas (sin suelo) (Cuadro 11).

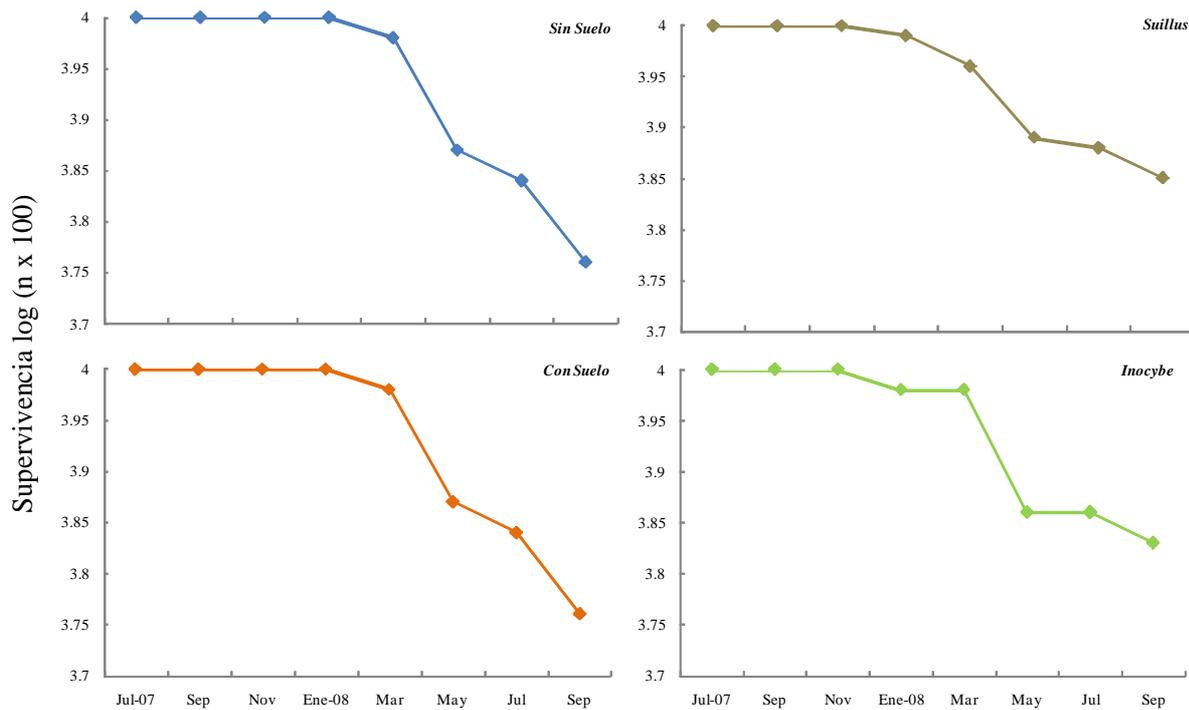


Figura 12. Supervivencia de plántulas de *Abies religiosa* a través del tiempo, en campo, sometidas a diferentes tratamientos (n= 174).

Cuadro 11. Prueba de Peto y Peto (Pyke y Thompson, 1986) con los respectivos valores de χ^2 para *Abies religiosa* (n= 174).

Tratamiento	χ^2
Sin suelo-Con suelo	0.0
Sin suelo-<i>S. brevipes</i>	3.263
Sin suelo-<i>I. splendens</i>	0.751
Con suelo-<i>S. brevipes</i>	0.933
Con suelo-<i>I. splendens</i>	0.751
<i>S. brevipes-I. splendens</i>	0.933

7.6 Biomasa de raíz y vástago para cada especie

La biomasa asignada a la raíz y vástago, al momento de la cosecha en septiembre de 2008 (cuando las plantas tenían un año en las parcelas experimentales), según en ANdeVA no mostraron diferencias significativas por el factor tratamiento para cada especie (Cuadro 11) (Figura 13).

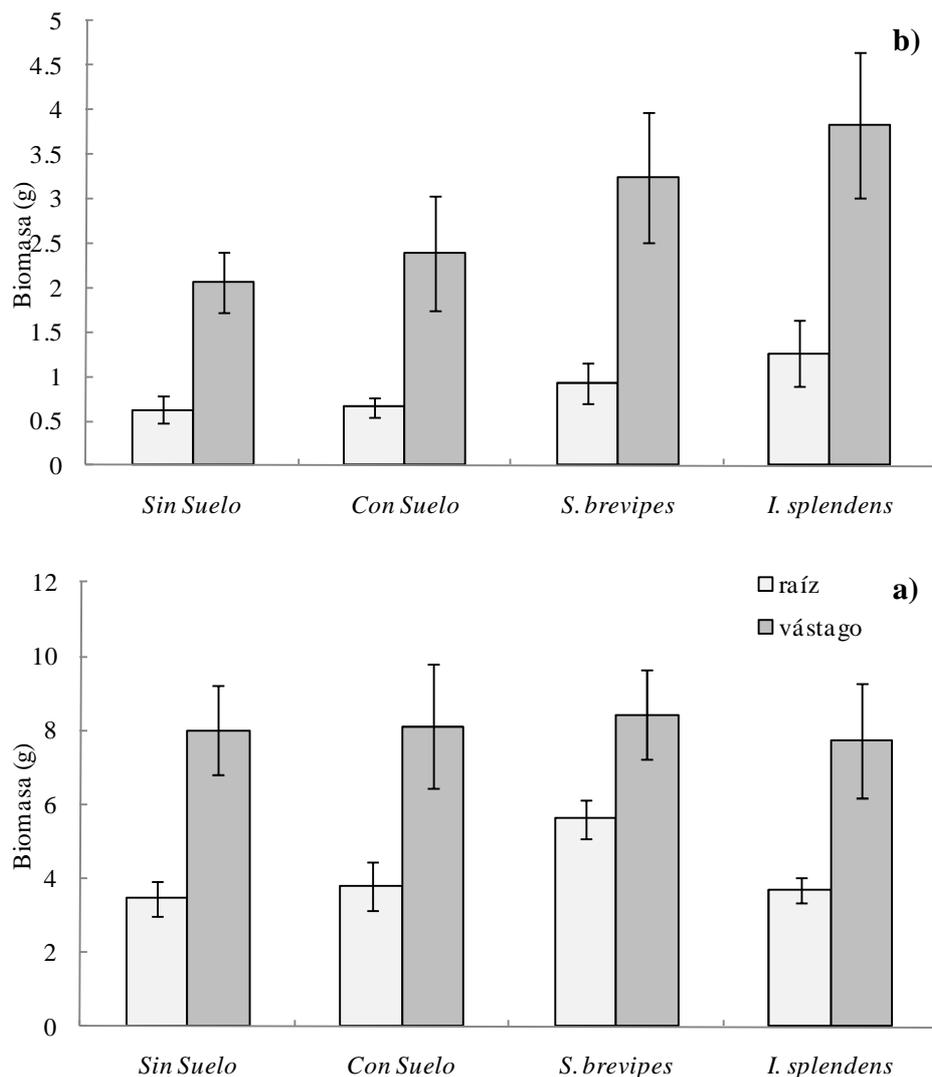


Figura 13. Biomasa de raíz y vástago (promedio \pm EE) de las plantas en los distintos tratamientos por especie; a) *Pinus hartwegii* n= 5 muestras por tratamiento, b) *Abies religiosa* (n= 5 muestras por tratamiento).

7.7 Proporción raíz-vástago (R/V) para cada especie

Los datos de la proporción raíz/vástago fueron transformados a \log_n ; según el ANDeVA, no se presentaron diferencias significativas en cada especie al momento de la cosecha en septiembre de 2008 (cuando las plantas tenían un año en campo) (Cuadro 12). Sin embargo, se observó que las dos especies tienden a asignar mayor biomasa a la parte

aérea que a la raíz; *A. religiosa* en particular asigna mayor biomasa a raíz, ya que la proporción R/V en esta especie presenta los valores más bajos (menor a 1) (Figura 14).

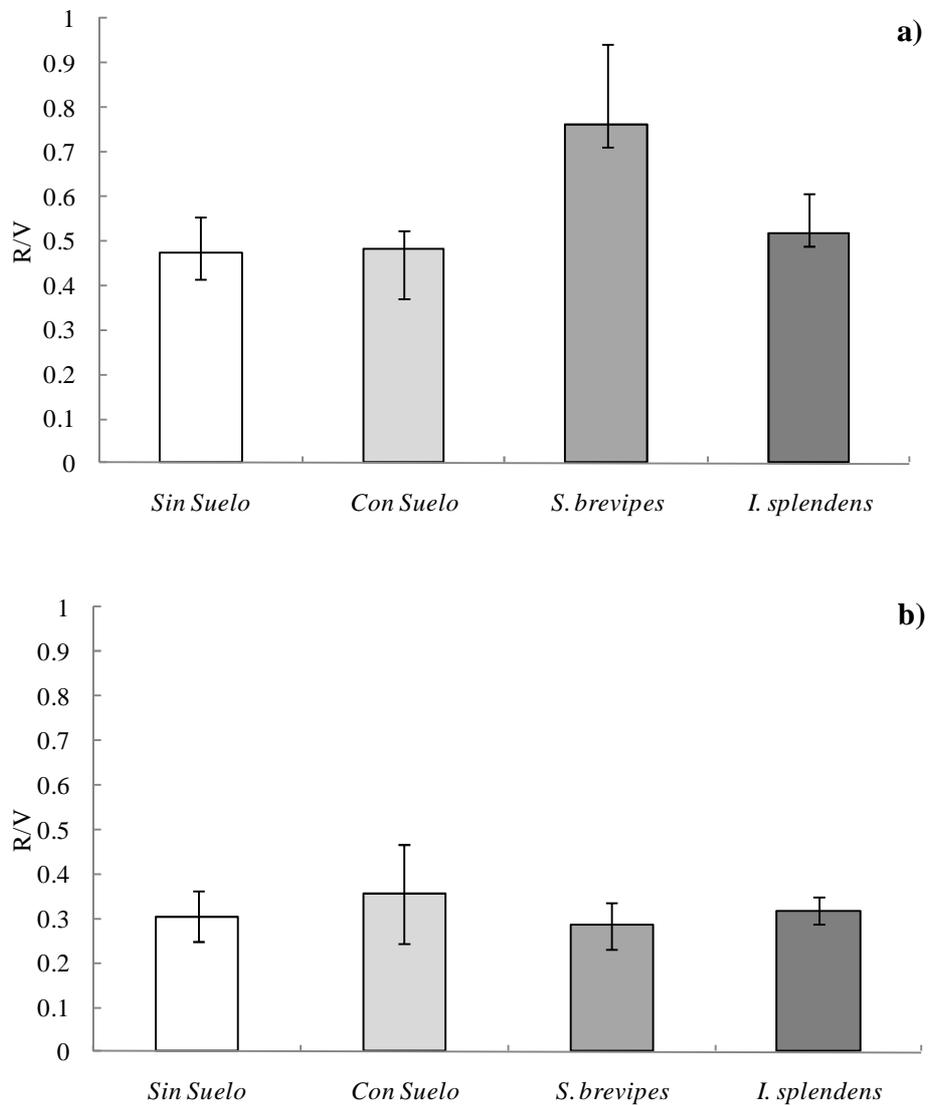


Figura 14. Proporción raíz-vástago (R/V) (promedio \pm EE) de las plantas en los distintos tratamientos por especie a) *Pinus hartwegii* (n= 5 muestras por tratamiento), b) *Abies religiosa* (n= 5 muestras por tratamiento).

7.8 PST (Peso seco total) por especie

Se transformaron los datos a logn y la prueba de ANdeVA no indicó diferencias significativas (Cuadro 12) (Figura 15).

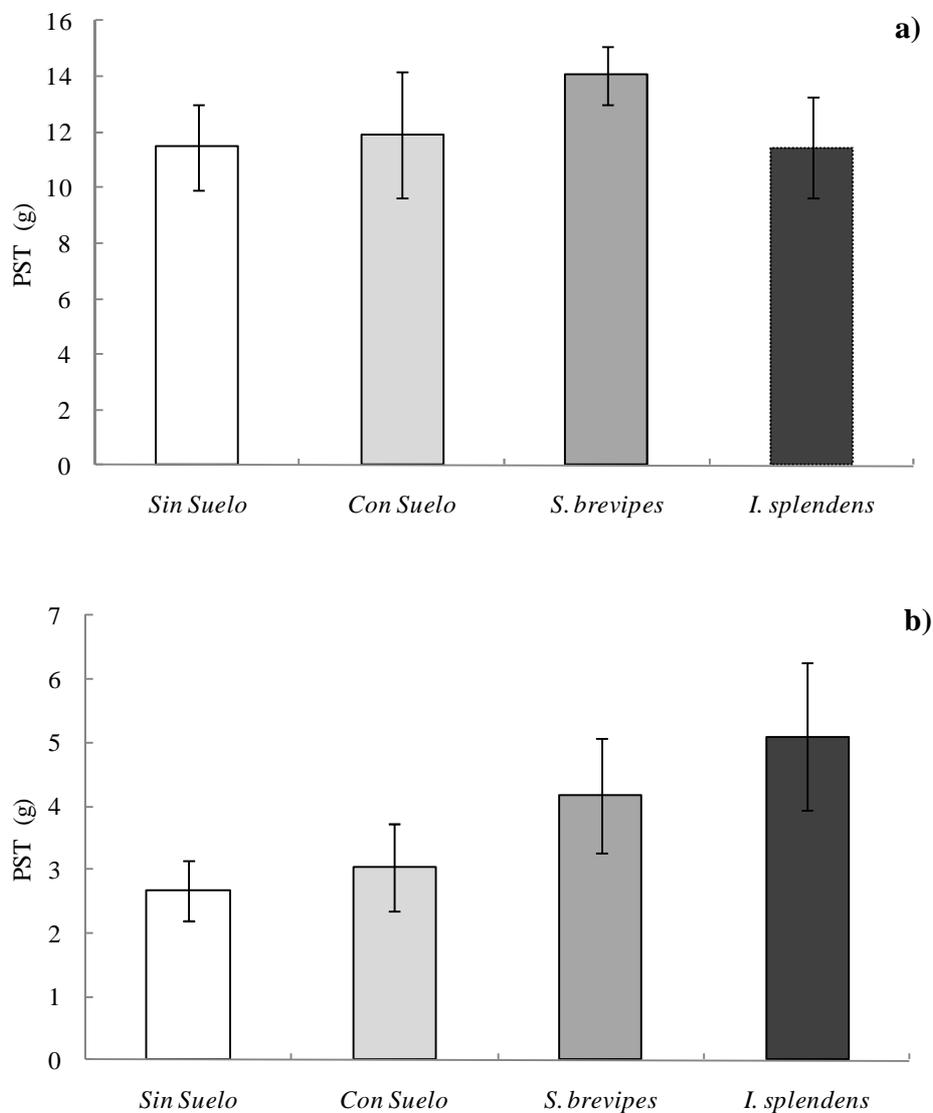


Figura 15. Peso seco total (PST) promedio (\pm EE) por especie y tratamiento correspondiente a la cosecha de septiembre de 2008; a) *Pinus hartwegii* (n= 5 muestras por tratamiento), b) *Abies religiosa* (n= 5 muestras por tratamiento).

Cuadro 12. Resultados del ANdeVA para las variables obtenidas de biomasa entre tratamiento para cada especie al momento de la cosecha en septiembre de 2008, cuando las plantas tenían un año en campo (n= 5 muestras por tratamiento).

Especie	Variable	Factor	gl	F	p
<i>Pinus hartwegii</i>	Raíz	Tratamiento	3	1.822	n.s
		Error	16		
	Vástago	Tratamiento	3	1.657	n.s
		Error	16		
	R/V	Tratamiento	3	0.327	n.s
		Error	16		
	PST	Tratamiento	3	0.231	n.s
		Error	16		
<i>Abies religiosa</i>	Raíz	Tratamiento	3	1.822	n.s
		Error	16		
	Vástago	Tratamiento	3	1.657	n.s
		Error	16		
	R/V	Tratamiento	3	0.327	n.s
		Error	16		
	PST	Tratamiento	3	0.231	n.s
		Error	16		

nivel de significancia. n.s= $p > 0.05$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

7.9 Análisis de macronutrientes del tejido vegetal

7.9.1 *Pinus hartwegii*

Los análisis de macronutrientes de la parte de vástago y raíz, de acuerdo al ANdeVA mostraron en el caso del Nitrógeno que no hubo diferencias significativas entre tratamientos ni tampoco en la interacción, pero sí en el factor planta ($p = 0.00007$) (Cuadro 13); en cuanto a la prueba de Tukey mostró que se le asigna mayor porcentaje de nitrógeno a el vástago (Cuadro 14 y 15).

En cuanto al fósforo, el ANdeVA mostró diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.0001$) (Cuadro 13), mientras que la prueba de Tukey mostró que los tratamientos con suelo y *S. brevipes* asignaron mayor porcentaje de fósforo a vástago y raíz (Cuadro 14 y 15).

Cuadro 13. Resultados del ANdeVA para los análisis de macronutrientes en el tejido vegetal de *Pinus hartwegii* en la cosecha final (n= 5 muestras por tratamiento).

Elemento	Factor	gl	F	p
Nitrógeno	T	3	2.399	n.s
	P	1	21.706	***
	TXP	3	2.548	n.s
	Error	28		
Carbono	T	3	1.63	n.s
	P	1	4	n.s
	TXP	3	0.53	n.s
	Error	28		
Fósforo	T	3	10.077	***
	P	1	0.499	n.s.
	TXP	3	0.252	n.s.
	Error	28		

nivel de significancia. n.s= $p > 0.05$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Dónde: T= Tratamiento, P= Planta(vástago y raíz), TXP= Interacción Tratamiento/Planta

7.9.2 Comparación entre cosecha inicial y final para *P. hartwegii*

En el caso del N, el ANdeVA no mostró diferencias significativas entre las cosechas ni en la interacción, pero sí para la planta ($p = 0.0003$) (Cuadro 16). La prueba de Tukey mostró que se le asigna mayor porcentaje de nitrógeno al vástago (Cuadro 14 y 15).

Por lo que respecta a fósforo, el ANdeVA mostró diferencias significativas entre cosecha ($p = 0.00007$) (Cuadro 16). La prueba de Tukey mostró que la cosecha inicial y final son diferentes, siendo la inicial cuando se le asigna mayor porcentaje de fósforo a la planta. El ANdeVA también mostró diferencias significativas para el factor planta ($p = 0.00007$) (Cuadro 16), y la prueba de Tukey mostró que se le asigna mayor fósforo a la raíz. El ANdeVA también mostró diferencias significativas ($p = 0.0003$) (Cuadro 14 y 15) en la interacción y la prueba de Tukey mostró que la cosecha inicial/vástago es diferente a las demás, presentando los valores más altos de asignación de fósforo (Cuadro 14 y 15).

Cuadro 14. Asignación en porcentaje de macronutrientes para *Pinus hartwegii* en la cosecha correspondiente a julio 2007 (cosecha inicial) (n= 5 muestras por especie). Números en negritas muestran diferencias significativas.

<i>Pino</i>	N %	P %	C %
vástago	1.11(±0.026)	0.2(±0.007)	47.6(±0.516)
raíz	0.77(±0.028)	0.31(±0.020)	47.23(±0.310)

Cuadro 15. Asignación en porcentaje de macronutrientes para *Pinus hartwegii* en la cosecha correspondiente a septiembre 2008 (cosecha final) (n= 5 muestras por tratamiento). Números en negritas muestran diferencias significativas.

<i>Pino</i>	Tratamiento	N %	P %	C %
vástago	Con Suelo	1.25(±0.115)	0.15(±0.004)	47.69(±0.985)
	Sin Suelo	0.96(±0.118)	0.08(±0.012)	50.28(±1.923)
	<i>S. brevipes</i>	1.35(±0.082)	0.14(±0)	47.06(±0.924)
	<i>I. splendens</i>	1.29(±0.077)	0.1(±0.015)	48.52(±1.137)
raíz	Con Suelo	1.1(±0.174)	0.14(±0.021)	47.18(±0.321)
	Sin Suelo	0.79(±0.135)	0.09(±0.012)	47.08(±1.320)
	<i>S. brevipes</i>	0.69(±0.060)	0.16(±0.018)	45.2(±1.003)
	<i>I. splendens</i>	0.7(±0.058)	0.1(±0.011)	47.41(±0.732)

Cuadro 16. Resultados del ANDeVA para los análisis de macronutrientes en el tejido vegetal de *Pinus hartwegii*, comparando la cosecha inicial (n= 5 muestras por especie) y final (n= 5 muestras por tratamiento).

Elemento	Factor	gl	F	p
Nitrógeno	C	1	0.854	n.s
	P	1	14.932	***
	CXP	1	0.025	n.s
	Error	42		
Carbono	C	1	0.06	n.s
	P	1	1.59	n.s
	CXP	1	0.66	n.s
	Error	42		
Fósforo	C	1	94.955	***
	P	1	19.272	***
	CXP	1	15.262	***
	Error	42		

nivel de significancia. n.s= $p > 0.05$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Dónde: C= Cosecha, P= Planta(vástago y raíz), CXP= Interacción Cosecha/Planta

7.9.3 *Abies religiosa*

Los análisis de fósforo mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.00003$) (Cuadro 17). La prueba de Tukey mostró que *S. brevipes* e *I. splendens* presentaron los valores más altos. Es importante señalar con respecto al tratamiento con suelo que no se obtuvieron datos ya que las muestras de material biológico fueron insuficientes para los análisis (Cuadro 19).

Cuadro 17. Resultados del ANDeVA para los análisis de macronutrientes en el tejido vegetal de *Abies religiosa* en la cosecha final (n= 5 muestras por tratamiento).

Elemeto	Factor	gl	F	p
Nitrógeno	T	3	0.043	n.s.
	P	1	0.747	n.s.
	TXP	3	0.422	n.s.
	Error	31		
Carbono	T	3	0.21	n.s.
	P	1	0.39	n.s.
	TXP	3	0.35	n.s.
	Error	31		
Fósforo	T	2	16.756	***
	P	1	0.011	n.s.
	TXP	2	0.047	n.s.
	Error	22		

nivel de significancia. n.s.= $p > 0.05$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Dónde: T= Tratamiento, P= Planta(vástago y raíz), TXP= Interacción Tratamiento/Planta

Cudro 18. Asignación en porcentaje de macronutrientes para *Abies religiosa* en la cosecha inicial (julio 2007) (n= 5 muestras por especie). Números en negritas muestran diferencias significativas.

<i>Oyamel</i>	N	P	C
	%	%	%
vástago	1.86(±0.031)	0.51(±0.021)	48.34(±0.484)
raíz	0.84(±0.029)	0.4(±0.054)	45.64(±0.148)

Cuadro 19. Asignación en porcentaje de macronutrientes para *A. religiosa* en la última cosecha (septiembre 2008) (n= 5 muestras por tratamiento). Números en negritas muestran diferencias significativas.

<i>Oyamel</i>	Tratamiento	N %	P %	C %
vástago	Con Suelo	1.22(±0.137)	-	48.19(±0.912)
	Sin Suelo	1.06(±0.132)	0.09(±0.008)	48.94(±0.531)
	<i>S. brevipes</i>	1.7(±1.171)	-	48.63(±0.653)
	<i>I. splendens</i>	1.15(±0.095)	0.13(±0.006)	48.71(±1.275)
raíz	Con Suelo	1.02(±0.120)	-	49.04(±1.153)
	Sin Suelo	1.12(±0.120)	0.09(±0.009)	48.34(±1.583)
	<i>S. brevipes</i>	1.07(±0.060)	0.11(±0.007)	50.06(±0.845)
	<i>I. splendens</i>	0.93(±0.124)	0.13(±0.006)	48.91(±0.857)

(-) el material biológico insuficiente para obtener el análisis del macronutriente.

7.9.4 Comparación entre cosecha inicial y final para *A. religiosa*

En lo que se refiere al nitrógeno, el ANdeVA mostró diferencias significativas en el factor cosecha ($p= 0.001$) (Cuadro 20), y la prueba de Tukey mostró que la cosecha inicial presenta un valor alto de asignación de nitrógeno a la planta. Por otro lado, se observaron diferencias significativas en el factor planta (Cuadro 20), mientras que la prueba de Tukey mostró que se le asigna más nitrógeno a la parte del vástago. Con respecto a la interacción, el ANdeVA mostró diferencias significativas (Cuadro 20); la prueba de Tukey mostró que el valor cosecha-inicial/vástago es diferente de las demás combinaciones y presentó el valor más alto (Cuadro 18 y 19).

Con respecto al fósforo, el ANdeVA mostró diferencias significativas en el factor cosecha ($p= 0.001$) (Cuadro 20); según la prueba de Tukey la cosecha inicial tiene un valor alto. Con respecto al factor planta, el ANdeVA mostró diferencias significativas ($p= 0.026$) (Cuadro 20); en este caso la prueba de Tukey mostró que el vástago presentó un valor alto de asignación de fósforo. La interacción cosecha/planta tuvo diferencias significativas de acuerdo al ANdeVA ($p= 0.023$) (Cuadro 20); para este caso la prueba de Tukey mostró que la interacción cosecha-inicial/vástago presentó un valor alto de asignación de este macronutriente (Cuadro 18 y 19).

Para el carbono, el ANdeVA mostró diferencias significativas en el factor cosecha (Cuadro 20); de acuerdo a la prueba de Tukey la cosecha final presentó un valor alto. En cuanto a la interacción, el ANdeVA mostró diferencias significativas (Cuadro 20), y la prueba de Tukey mostró que la interacción cosecha-inicial/raíz presentó un porcentaje bajo de asignación de este macronutriente (Cuadro 18 y 19).

Cuadro 20. Resultados del ANdeVA para los análisis de macronutrientes en el tejido vegetal de *Abies religiosa* comparando las cosechas inicial (n= 5 muestras por especie) y final (n= 5 muestras por tratamiento).

Elemento	Factor	gl	F	p
Nitrógeno	C	1	11.857	***
	P	1	38.482	***
	CXP	1	37.866	***
	Error	33		
Carbono	C	1	6.98	*
	P	1	2.03	n.s.
	CXP	1	4.77	*
	Error	33		
Fósforo	C	1	497.61	***
	P	1	5.401	*
	CXP	1	5.628	*
	Error	33		

nivel de significancia. n.s.= $p > 0.05$, *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$. Dónde: C= Cosecha, P= Planta(vástago y raíz), CXP= Interacción Cosecha/Planta

7.10 Morfotipos de Micorriza

Se encontraron los siguientes morfotipos en raíces de las plantas y sus correspondientes tratamientos (Figura 16), se tomaron algunas características de cada morfotipo para compararlas con otras reportadas en Deemy (Cuadro 21 y 22).

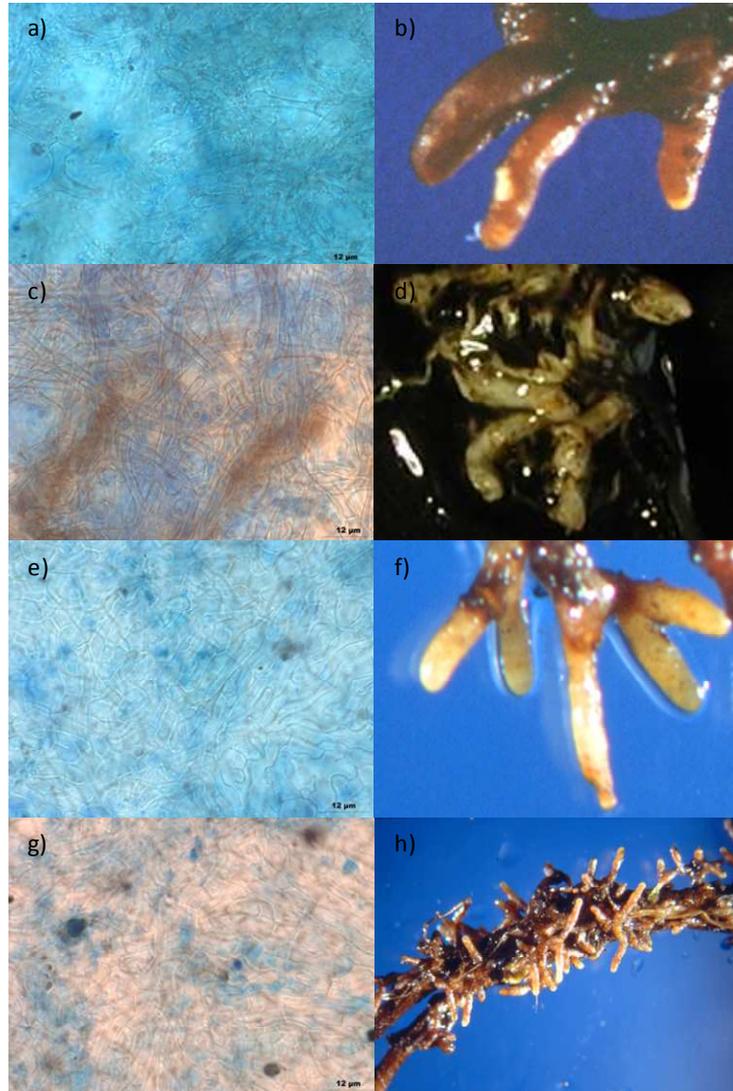


Figura 16. Ectomicorrizas observadas en raíces de los diferentes tratamientos y su posible afinidad con el hospedero vegetal, a y b, *Inocybe splendens* con *Pinus hartwegii*, a) corte del manto plectenquimatoso (100x), b) ramificación dicotómica (20x), c y d, *I. splendens* con *Abies religiosa*, c) corte del manto plectenquimatoso (100x), d) ramificación irregular pinada (20x), e y f, *Suillus brevipes* con *A. religiosa*, e) corte del manto plectenquimatoso (100x), f) ramificación dicotómica (20x), g y h, *S. brevipes* con *P. hartwegii*, g) corte del manto plectenquimatoso (100x), h) ramificación coraloides (20x).

Cuadro 21. Características de los morfotipos en Deemy (2009) para especies del género *Inocybe* en comparación con las observadas en las raíces de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*, * = especie usada en el presente estudio.

	<i>Inocybe appendiculata</i>	<i>Inocybe obscuroidia</i>	<i>Inocybe terrigena</i>	<i>Inocybe petiginosa</i>	<i>Inocybe splendens*</i>	<i>Inocybe splendens*</i>
	con	con	con	con	con	con
	<i>Picea</i>	<i>Picea</i>	<i>Pinus</i>	<i>Pseudotsunga</i>	<i>Pinus</i>	<i>Abies</i>
Ramificación	monopodial pinada o monopodial piramidal	monopodial pinada monopodial piramidal	dicotómica coraloide	monopodial pinada	dicotómica	irregular pinada
Color	blanco, café o rojo	café, blanco, café oscuro	amarillo o naranja	blanco café	café a amarillo	blanco, café
Textura	ligeramente algodonosa	ligeramente algodonosa	ligeramente a densamente algodonosa	ligeramente algodonosa	ligeramente algodonosa	ligeramente algodonosa
Rizomorfos	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes	ausentes
Anatomía del manto	plectenquimatoso	plectenquimatoso	plectenquimatoso	plectenquimatoso	plectenquimatoso	plectenquimatoso
Largo de la micorriza	0 a 15 mm	0 a 10 mm	0 a 5 mm	0 a 3 mm	1 a 4 mm	1 a 3 mm
Diámetro de las puntas no ramificadas	0.4 a 0.6 mm	0.7 mm	0.5 mm	0 a 0.6 mm	0.3 a 0.5 mm	0.5 a 0.7 mm

Cuadro 22. Características de los morfotipos en Deemy (2009) para especies del género *Suillus* en comparación con las observadas en las raíces de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*, * = especie de hongo usada en el presente estudio.

	<i>Suillus bovinus</i>	<i>Suillus flavus</i>	<i>Suillus collinitus</i>	<i>Suillus laricinus</i>	<i>Suillus brevipes</i> *	<i>Suillus brevipes</i> *
	con	con	con	con	con	con
	<i>Pinus</i>	<i>Larix</i>	<i>Pinus</i>	<i>Larix</i>	<i>Pinus</i>	<i>Abies</i>
Ramificación	coraloide	monopodial piramidal	dicotómica o coraloide	monopodial pinada o monopodial piramidal	dicotómica o coraloide	monopodial piramidal
Color	ocre, café amarillento o amarillento	café	café oscuro a café rojizo	café, rojo o blanco	café amarillento a naranja	café amarillento blanco
Textura	ligeramente lanudo	ligeramente algodonosa	ligeramente lanudo	densamente algodonosa	ligeramente lanudo	ligeramente algodonosa
Rizomorfos	presentes	presentes	presentes	presentes	presentes	presentes
Anatomía del manto	plectenquimatosa	plectenquimatoso	plectenquimatoso	plectenquimatoso	plectenquimatoso	plectenquimatoso
Largo de la micorriza	0 a 15 mm	0 a 9.2 mm	3 a 5 mm	0 a 14 mm	1 a 3 mm	1 a 3 mm
diámetro de las puntas no ramificadas	*	0.4 a 0.57 mm	*	0.67 a 0.77 mm	0.2 mm	0.5 a 0.58 mm

* Datos no disponibles.

7.11 Porcentaje de colonización

i) *Pinus hartwegii*

El porcentaje de colonización para *P. hartwegii*, fluctuó de 0% en septiembre de 2008 hasta 14% en febrero de 2009 (Figura 17). El ANdeVA mostró diferencias significativas entre tratamiento y tiempo así como en la interacción (Cuadro 23). La prueba de Tukey mostró que las plantas inoculadas con *Suillus brevipes* presentan los mayores porcentajes y son diferentes a todos los demás tratamientos (Figura 17). La prueba de Tukey mostró que febrero de 2009 presentó los mayores porcentajes de colonización (Figura 17).

La interacción tratamiento/tiempo según el ANdeVA mostró diferencias significativas (Cuadro 23), siendo las plantas inoculadas con *S. brevipes* en septiembre 2008 y febrero 2009 las que presentaron el mayor porcentaje de colonización, según la prueba de Tukey (Figura 17).

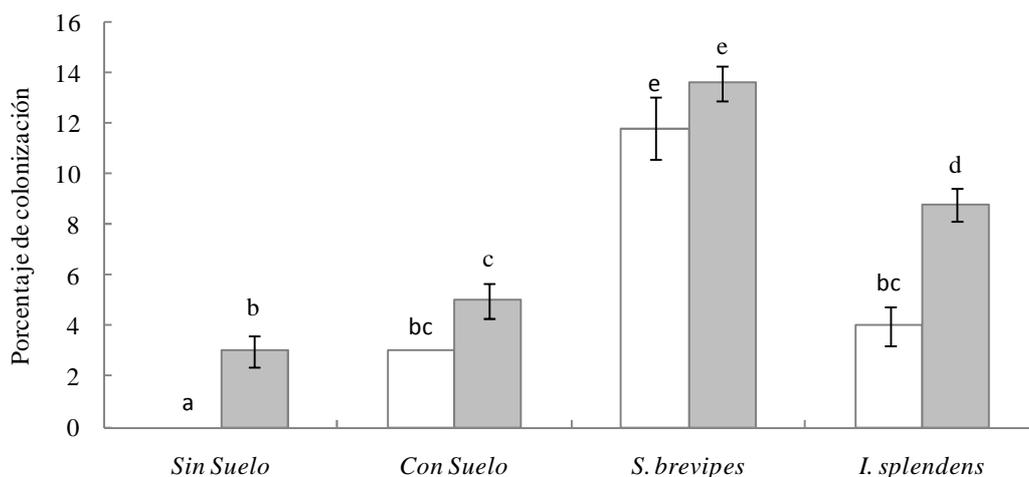


Figura 17. Porcentaje de colonización micorrízica promedio para *Pinus hartwegii* (\pm EE) por cada tratamiento; las barras de color blanco corresponden a septiembre de 2008 y las barras de color gris a febrero de 2009. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey $p < 0.05$) ($n = 5$ muestras por tratamiento).

Cuadro 23. Resultados del ANdeVA para el porcentaje de colonización en plantas de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa* en campo para los diferentes tratamientos (n= 5 muestras por tratamiento).

Especie	Variable de respuesta	Factor	gl	F	p
<i>Pinus hartwegii</i>	Porcentaje de colonización	Trat	3	161.285	***
		T	1	105.633	***
		TratXt	3	10.687	***
		Error	32		
<i>Abies religiosa</i>		Trat	3	281.193	***
		T	1	112.488	***
		TratXt	3	54.555	***
		Error	35		

nivel de significancia. n.s= $p > 0.05$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. Dónde: Trat= Tratamiento, T= Tiempo y TratXT= Interacción Tratamiento/Tiempo

ii) *Abies religiosa*

El porcentaje de colonización para *A religiosa*, fluctuó de 0% en septiembre de 2008 hasta 10% en febrero de 2009 (Figura 18). El ANdeVA mostró diferencias significativas entre tratamientos, tiempo así como en la interacción (Cuadro 23). La prueba de Tukey mostró que las plantas sin suelo (testigo) y con suelo son diferentes a los demás tratamientos (Figura 18); la prueba de Tukey mostró que septiembre 2008 es diferente en el porcentaje de colonización (Figura 18). La interacción tratamiento/tiempo según el ANdeVA mostró diferencias significativas, las plantas inoculadas formaron un grupo presentando valores altos de colonización con respecto a los dos tratamientos restantes (Cuadro 23) (Figura 18).

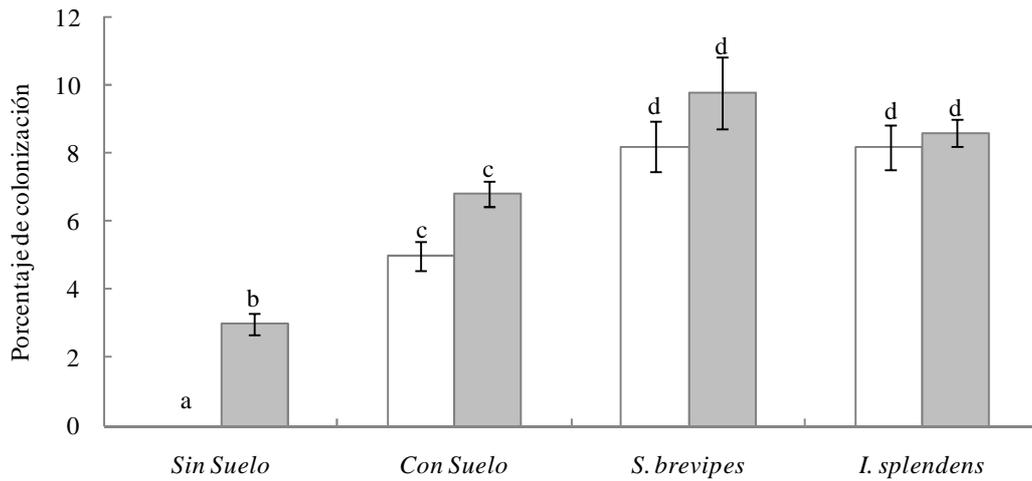


Figura 18. Porcentaje de colonización micorrízica promedio para *Abies religiosa* (\pm EE) por cada tratamiento; las barras de color blanco corresponden a septiembre de 2008 y las barras de color gris a febrero de 2009. Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey $p < 0.05$) ($n = 5$ muestras por tratamiento).

Es importante señalar que en el segundo muestreo se observaron micorrizas de campo, pero no se contemplaron en el porcentaje de colonización.

8. DISCUSIÓN

8.1 Crecimiento en vivero

Al ser revisadas las raíces de las plántulas del lote que se destinó a nuestro experimento en tres ocasiones, en marzo, mayo y antes de realizar la inoculación en vivero, no se observaron micorrizas. Fuimos informados que se dos meses antes a iniciar nuestras mediciones, se habían inoculado con un producto comercial Irrigospor®, un inoculante que contenía esporas de hongos ectomicorrizógenos de *Pisolithus tinctorius* y *Rhizopogon*. El hecho de que no se hayan observado ectomicorrizas en las plántulas, podría explicarse porque en el vivero cuando realizaron la mezcla del sustrato para germinar las semillas de pino y oyamel, le agregaron micronutrientes y un fertilizante de liberación lenta (Multicote® con la fórmula 12-25-12, N-P-K, respectivamente). En estas condiciones las plantas tenían los minerales necesarios para su crecimiento. Por lo tanto, la asociación de la raíz con el hongo ectomicorrizógeno no se formó, lo cual ya lo había observado García-Rodríguez (2005), quien al fertilizar eucalipto con Multicote® 18-6-12-3 (N-P-K-Mg), observó que no se desarrollaron ectomicorrizas en las raíces.

Se tiene conocimiento de que el exceso de fertilizantes ocasiona que la síntesis de proteínas y compuestos fosfatados aumente y la translocación de hidratos de carbono a la raíz disminuya, lo que se refleja en un mayor crecimiento de la planta y una disminución de la colonización micorrízica. También se sabe que el exceso de riego provoca una falta de oxígeno para la cual son sensibles la mayoría de los hongos ectomicorrizógenos (HEM); y ya que las plántulas se encontraban bajo los métodos del vivero, con un riego constante, esta práctica pudo haber influido en que no se desarrollara la asociación con el inóculo comercial usado previamente. Existen otras prácticas en los viveros como aplicación de tratamientos de desinfección o pesticidas, que también son perjudiciales para la micorriza (Parladé, 1999).

Otra posible explicación puede enfocarse en el sentido de que el inoculante que se usó en vivero, el cual contenía esporas de hongos ectomicorrizógenos de *Pisolithus tinctorius* y *Rhizopogon*, géneros que no se encontraron en las colectas de esporomas de Pino y Oyamel realizadas por Alvarado-Sánchez (2008), sugiere que no hay compatibilidad simbiótica y por lo tanto no se forma la micorriza, así que se estaría presentando una respuesta de defensa de la planta para evitar la micorrización, puesto que el hongo no habita en la misma área (Bonfante, 1998). Esta situación no fue encontrada cuando se inoculó la

planta con el hongo de la misma zona, lo que indica que hay una alta compatibilidad si se usan hongos y plantas que comparten las mismas condiciones ambientales.

En el tiempo que permanecieron las plántulas en el vivero, se observó que *Abies religiosa* tuvo un decremento en la altura total y en la altura al meristemo en el mes de abril, que corresponde a 300 días después de su germinación; esto puede deberse a que en ese mes, se presentó en el vivero una enfermedad llamada Botritis (coms. del personal del vivero) que sólo atacó a las plántulas de *A. religiosa*. Esta enfermedad es provocada por un hongo que ocasiona podredumbre en brotes y hojas a la plántula, lo cual parece explicar la disminución en la altura total y al meristemo.

Con respecto al diámetro a la base del tallo de *A. religiosa*, se observó una tendencia a aumentar, ya que el efecto del hongo que atacó las plántulas solo actúa en los meristemos apicales. Tal vez la enfermedad repercutió en la supervivencia de campo, ya que fue la especie que presentó menor supervivencia.

8.2 Crecimiento en campo considerando la TRC (Tasa Relativa de Crecimiento)

Al comparar la medición inicial con la final en el ANCOVA (Análisis de covarianza) no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo se observaban tendencias mu claras, por lo que se realizó un análisis de Tasa relativa de crecimiento.

En forma general se observó que las dos especies presentaron una tendencia a tener afinidad a una especie de hongo ectomicorrízico, considerando el año que permanecieron en campo. Para *Pinus hartwegii* se observó una tendencia a asignar mayor biomasa a su sistema radical si es inoculada con *Suillus brevipes*, lo que esta relacionado con el mayor porcentaje de colonización observado en las plantas inoculadas con *S. brevipes*, se observó que es mayor el aporte de la biomasa en el peso seco total de la planta, por lo que esta especie de hongo es más efectiva para Pino. Con respecto a *Abies religiosa*, se observó que las plantas inoculadas son las que sobreviven más, en especial si son inoculadas con *S. brevipes*; también se observó que hay una tendencia a mayor aporte de biomasa en peso seco total si las plantas son inoculadas con *Inocybe splendens*, por lo anterior es de suma importancia que esta especie sea inoculada con más de una sepa de hongos ectomicorrizógenos nativos, sería ideal un inóculo mixto.

Lo anterior nos indica que la formación de ectomicorrizas se establece en función de las interacciones genéticas que existen entre una especie de hongo y una especie de planta en forma muy particular (Brundett *et al.* 1996) y que es de suma importancia conocer la naturaleza de la asociación hongo-planta para aumentar la supervivencia y productividad de las especies que tienen un uso comercial y que se usan para reforestar (Read y Pérez-Moreno, 2003).

Por otro lado hay que tomar en cuenta que los porcentajes de colonización que se observaron en el presente estudio fueron tomados directamente de plántulas introducidas al bosque, las cuales se encuentran sometidas a diversos factores y que la mayoría de estudios, en donde se obtienen porcentajes mayores de colonización, han sido realizados bajo condiciones de invernadero donde el éxito de los hongos está asegurado, ya que es posible controlar las condiciones que permitan el desarrollo de la asociación.

Con respecto a los hongos ectomicorrizógenos se considera a ambos géneros, *Suillus* e *Inocybe*, como hongos ectomicorrizógenos de hospederos amplio ya que se pueden encontrar en las primeras etapas de formación de un bosque y también se puede observar la presencia de los dos géneros en bosques que han sufrido algún disturbio (Moreno, 1999). En particular, Matsuda e Hijii (1998) consideran que *Inocybe* es un género que tiende a presentarse en la base del árbol en la parte distal, fuera de la copa del árbol. Aunque otros autores consideran al género *Suillus* como un hongo de intervalo de hospedero intermedio (Trappe, 1962; Molina y Trappe 1982).

Actualmente es una práctica común en México el uso de micelio propagado en laboratorios, aunque resulta costosa. Sin embargo, el grupo de trabajo del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala lleva más de quince años investigando al respecto, y han desarrollado técnicas para plantas y hongos mexicanos, desde la propagación de plantas de interés forestal, la obtención de inóculo micorrízico, y/o esporal. Su trabajo ha permitido demostrar que existen respuestas favorables a la micorrización con hongos ectomicorrizógenos (Santiago Martínez *et al.* 1999; Martínez y Pérez *et al.* 2009). Sin embargo, se ha visto que los beneficios que los hongos le proporcionan a la planta, no son inmediatamente observables en las plantas que se inoculan. Parladé (1999), realizó un estudio con *Abeto Douglas* e inoculó con *Laccaria bicolor* (S-238N) en tres plantaciones; en dos de ellas observó que después de cinco años de crecimiento en el campo, ocurrió un aumento significativo de la altura media de las

plantas, pero no observó diferencias significativas en la supervivencia en las plantas inoculadas.

A) *Pinus hartwegii*

Con respecto a los parámetros de crecimiento en campo para esta especie, se observó que en el caso del diámetro a la base del tallo disminuye en época de secas y vuelve a aumentar en cuanto llega la época de lluvias. Esto podría explicarse porque el estrés hídrico disminuye la división y elongación celular, así como el transporte de elementos esenciales (Rojas, 2003). En la zona de estudio, un estudio colateral del Macroproyecto “Manejo de Ecosistemas y Desarrollo Humano”, se registró una temperatura máxima en suelo de 21.3°C y una temperatura máxima del aire de 41.9°C (Unger, en preparación). Se sabe que los pinos responden al estrés hídrico cerrando sus estomas y disminuyen la tasa de varios procesos fisiológicos, pudiendo ocasionar que las células de los tejidos de conducción de esta especie se colapsen (Blodgett *et al.*, 1997), explicando con ello la disminución de la variable mencionada durante la sequía.

Con respecto a *P. hartwegii*, se observó que presentaron diferencias significativas todos los tratamientos en diámetro a la base, altura al meristemo del tallo y altura total, siendo el tratamiento sin suelo el que presentó los valores más bajos, mientras que en lo que se refiere a la altura al meristemo se observaron diferencias significativas en todos los tratamientos, siendo con suelo el tratamiento que presentó los valores más bajos, mientras que las plantas inoculadas con *I. splendens* presentaron los valores más altos, ciertamente mostrando las ventajas que el hongo le confiere. Dado que la colonización fue más alta por *S. brevipes*, parecería entonces que es más infectiva esta especie, pero más efectiva con *I. splendens* pues con ésta última la colonización fue menor. Torres y Honrubia (1994) inocularon plantas de *Pinus halapensis* con *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon roseolus* y *Suillus collinatus*, no encontrando diferencias significativas en el crecimiento y biomasa de la planta (altura y peso seco) con respecto a los tratamientos no micorrizados, pero sí observaron un tendencia a mayor crecimiento y peso seco en las plantas que se inocularon con *Pisolithus tinctorius* y un sustrato desinfectado. Por otra parte, Barberá *et al.* (2005) realizaron un estudio con el objetivo de reforestar ecosistemas mediterráneos en el sudeste español con plantas de *Pinus halapensis* inoculadas con *Suillus collinitus*; sin embargo, al ser transplantados no se observaron efectos positivos en el crecimiento de las plantas. Sin

lugar a dudas, la complementariedad funcional que puede haber entre la planta y el hongo, está afectada por las condiciones del sustrato utilizado, haciendo patente la conveniencia de utilizar incluso también sustrato (suelo) del sitio de estudio, como fue en nuestro caso, ya que nosotros deseábamos determinar si el suelo forestal tendría propágulos micorrízicos (esporas o raíces micorrizadas de hongos nativos) para que colonizaran las raíces y conocer la respuesta de las plantas inoculadas con el suelo forestal de las áreas dominadas por *P. hartwegii* o *A. religiosa*.

En cuanto a la altura total de *P. hartwegii*, se observó una disminución que fue significativamente diferente en todos los tratamientos. La disminución a través del tiempo se puede relacionar con el hecho de que se observó que algunas plantas presentaron herbivoría por vacas, ratones y conejos, ya que a pesar de que las parcelas experimentales se encuentran cercadas con alambre de púas, se detectó que algunos comuneros las abrían para que las vacas entraran a forrajear. Esto pudo haber afectado a las plantas de todos los tratamientos, ya que las plantas se encontraban al azar, además, las plantas más altas se encuentran más expuestas al doblamiento en campo (Ritchie 1984) pudiendo ello ocasionar los cambios en altura observados.

La supervivencia de esta especie presentó valores altos, lo que la hace una especie de fácil manejo para reforestar el área correspondiente a la Cuenca del Río Magdalena. Además sus semillas tienen un porcentaje alto de germinación entre el 65% y 87% (observaciones personales) el fotoperiodo influye en forma positiva en la germinación de las semillas, ya que se obtuvo un porcentaje de germinación mayor con un fotoperiodo 12/12, por lo que ambas variables promueven su permanencia sobre todo si las plantas son inoculadas con *S. brevipes* o *I. splendens*.

La especificidad micorrízica es sumamente importante sobre todo en las primeras fases de desarrollo de las plantas, ya que es la etapa en la cual la planta ectomicorrízicamente obligada debe asociarse con el hongo, aunque una especie vegetal no responde de igual manera a un hongo micorrízico en las diferentes prácticas de reforestación (Manjón *et al.*, 1999). Sin embargo, en gran medida el efecto del hongo sobre la planta depende de las condiciones ambientales (Parladé, 1999); como ya se mencionó anteriormente, en el caso de la Magdalena Contreras se observa que en época de secas aumenta la temperatura, lo que hace que las plantas se sometan a estrés hídrico, por lo que las especies de hongos ectomicorrizógenos nativos que se usaron en el presente estudio, les confirieron ciertas ventajas durante esta época.

Por lo que respecta a la asignación de biomasa, aunque no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, si se observó una tendencia a un mayor incremento de biomasa para *P. hartwegii* micorrizada con *S. brevipes*. Esta combinación de géneros *Pinus-Suillus* ha sido muy utilizada en plantas para una posterior introducción a campo y como muestran nuestros resultados es muy infectiva; incluso se ha recomendado esa combinación como estrategia para la reforestación en sitios contaminados, ya que se ha observado que el género *Suillus* es resistente a la presencia de metales pesados en suelos (Adriaesens *et al.* 2006).

Nuestros resultados muestran una tendencia en cuanto a la supervivencia y doble inoculación, una de ellas en campo, a la observada en un estudio realizado por Duñabeitia *et al.* (1997), quienes reforestaron 4 hectáreas en el Parque Natural de Urkiola, España, inoculando con una solución de un contenido de 2×10^9 esporas de *Scleroderma citrinum* y *S. verrucosum* a la Haya (*Fagus sylvatica*), melojo o rebollo (*Quercus pyrenaica*), serbal (*Sorbus aucuparia*) y con *Lactarius blumii* al abedul (*Betula celtiberica*); nuevamente a los cinco meses las plantas fueron reinoculadas. Los autores realizaron dos años de seguimiento en campo, en los cuales observaron porcentajes de supervivencia con valores superiores al 96%, con excepción de *Betula celtiberica* en la que el porcentaje disminuyó al 83%. Entre las variables biométricas, observaron diferencias significativas en la altura de las plantas inoculadas con respecto al control; los autores explican esto debido al hecho de que las plantas inoculadas tienen un aporte nutricional superior, lo cual es reflejado en la altura de las plantas, los autores recomiendan un muestreo a largo plazo. El anterior es el único trabajo publicado en el que se hace referencia a la reinoculación en campo y reforestaron a una mayor escala. Es evidente que para plantas con crecimiento muy lento, como las que hemos estudiado en la Cuenca del Río Magdalena, sería importante realizar un monitoreo a largo plazo de su crecimiento y supervivencia, para determinar si finalmente se pudiesen observar diferencias significativas en los tratamientos inoculados.

B) *Abies religiosa*

Los estudios realizados con *Abies religiosa* son muy pocos hasta el momento en comparación con los realizados con diversas especies de pinos, más aún si consideramos que el uso de un par de especies de HEM, es solo una proporción muy pequeña de las 5000 a 6000 especies que se estima existen de hongos ectomicorrizógenos (Molina *et al.*, 1992).

A. religiosa es una especie forestal difícil de propagar ya que su germinación puede llegar a ser muy baja o nula (observaciones personales). Nieto de Pascual (2003) realizó un estudio con conos provenientes de Río Frío, Edo. de México con el objetivo de determinar las características y calidad de las semillas; encontró una gran variabilidad en el porcentaje de germinación (de 10% a 80% de germinación por cono), predominando un potencial germinativo bajo, lo que se ha considerado una característica del género *Abies*. Por lo que si se quiere reforestar la Cuenca del Río Magdalena con esta especie, hay que tomar en cuenta esto en la fase de propagación.

Con respecto a las variables de crecimiento no se presentaron diferencias significativas en ningún tratamiento, sin embargo se observó una ligera tendencia ya que el tratamiento sin suelo presentó los valores más bajos; los porcentajes de colonización confirmaron este resultado. En cuanto a la supervivencia se encontró una diferencia significativa, ya que las plantas con el tratamiento sin suelo tuvieron la mayor mortalidad, mientras que las plantas inoculadas con *S. brevipes* presentaron la menor mortalidad; si bien los valores de colonización no fueron significativos, aunque se observó ligeramente mayor con este tratamiento. Así mismo se observó una menor supervivencia en el mes de marzo de 2008, lo que refleja que es una especie forestal muy susceptible a la época de secas, por lo que se recomienda ampliamente inocular *A. religiosa* con *S. brevipes* o *I. splendens* ya que se observó que el hongo le confiere ventaja en supervivencia a esta especie.

Se encontró una ligera tendencia a mayor aporte de biomasa en las plantas inoculadas con *I. splendens* (aparentemente la más efectiva, aunque no significativamente) para *A. religiosa*, por lo que aunque sea una tendencia, es otra evidencia de que *A. religiosa* debe ser inoculada, no con una sino con varias especies de hongos ectomicorrizógenos nativos, para su posterior reintroducción a campo, ya que por lo que se encontró en este trabajo *S. brevipes* le confiere una mayor supervivencia en el bosque mientras que *I. splendens* le confiere una ligera tendencia a mayor aporte de biomasa a la planta.

Debido a lo explicado en párrafos anteriores, no hay duda de que se recomienda ampliamente inocular a *P. hartwegii* y *A. religiosa* con HEM, y podemos considerar en general que *S. brevipes* es más infectiva e *I. splendens* la más infectiva. Contemplar la inoculación con HEM para programas de restauración, reforestación, ó reclamación, etc. es de suma importancia por que si bien es cierto que inmediatamente no se observan beneficios en las plantas, a largo plazo los beneficios de los HEM se expresa en incremento

de la supervivencia, altura total, altura al meristemo y diámetro a la base del tallo. Por ello es de suma importancia el monitoreo a largo plazo, por lo menos tres años ya que la información que se genere será muy importante para ajustar los programas de restauración y dirigir al sistema hacia las metas deseadas (Lindig-Cisneros, 2007). Sin embargo, un aspecto importante a considerar es que sería conveniente bajar el costo de la propagación de micelio; esto se encuentra en sus inicios, y para ello BRAUN Biostat® (2009) ha construido un Bioreactor con capacidad de 5 y 10 L, aunque para los países en desarrollo aún sigue siendo costoso.

8.3 Análisis de Macronutrientes en el tejido vegetal

Los estudios que se han realizado en campo para entender los procesos *in situ* son muy pocos hasta el momento, ya que la mayoría son estudios de laboratorio en ambientes controlados y no se toman en cuenta todas las variables que intervienen en condiciones naturales.

Se conoce que la asociación con HEM aumenta la superficie de absorción de la planta para la obtención de los nutrimentos. Uno de los descubrimientos más interesantes de este trabajo tiene que ver, en el caso de *Pinus hartwegii*, con las diferencias entre tratamientos en el contenido de fósforo, tanto en parte aérea como en raíz, el cual fue mayor tanto en el tratamiento con suelo como en el caso de las plantas inoculadas con *Suillus brevipes* en comparación con los tratamientos sin suelo o con *Inocybe splendens*. Esto es importante ya que en pinos se ha observado que es el micelio externo el responsable de la absorción y el transporte en mayor cantidad el fósforo que las raíces; el primer reporte sobre esto fue descrito por Finlay y Read (1986) y posteriormente por Pérez-Moreno y Read (2004). Los ECM estimulan la solubilización y movilización del fósforo promoviendo la producción de biomasa (Garg *et al.*, 1999). Este parece ser el caso de nuestro estudio ya que se encontraron diferencias significativas en el fósforo, presentando mayor concentración en aquellas plantas que fueron inoculadas, como lo observaron también Colpaert y Van Laere (1996). Con respecto al tratamiento inoculado con *S. brevipes* se observa que se le asigna mayor cantidad de fósforo en particular a la parte aérea de las plantas, lo que apoya la idea de cierta especificidad. El mayor porcentaje de colonización se encontró en las raíces de plantas micorrizasas con *S. brevipes*, lo que sugiere que es un hongo efectivo.

Con respecto al nitrógeno, se observó que en *P. hartwegii* un mayor porcentaje se asigna al vástago, lo que coincide con un estudio realizado por He *et al.* (2007), quienes trabajaron con tres especies del género *Quercus* en el norte de California, analizando el porcentaje de nitrógeno en hojas y raíces. Los autores reportan que es similar en las tres especies, pero encontraron diferencias en el porcentaje en cuanto a la parte de la planta analizada (hojas y raíz), asignando más nitrógeno a las hojas. En cuanto a los morfotipos en la raíz, reportaron que las raíces finas colonizadas aquellos de color negro y café presentaron menos nitrógeno que raíces colonizadas por morfotipos de color blanco. Lo anterior sugiere que podría haber más nitrógeno que se incorpora en biomasa a la parte de vástago en esta misma especie, ya que es un elemento estructural, por lo que es una respuesta fisiológica más que por el tratamiento.

En *A. religiosa* se observó mayor porcentaje de nitrógeno al inicio en el vástago; con respecto a la cosecha final no se encontraron diferencias significativas lo que apoya la idea de que la inoculación no tiene efecto al menos para el nitrógeno en esta fase del experimento.

También se observó que las plantas micorrizadas con *S. brevipes* e *I. splendens* en la evaluación de la cosecha final (septiembre de 2008), presentaron valores altos para fósforo en el vástago así como valores altos de carbono en la raíz; esto se puede atribuir al efecto de la colonización por los HEM ya que el hongo tiene más carbono como sustrato disponible hacia la etapa final del experimento, y a su vez el hongo le proporciona fósforo que se asigna a formar biomasa en la parte del vástago de la planta (Sim *et al.*, 2007).

Se sabe que algunas especies de hongos producen enzimas para poder asimilar los nutrimentos orgánicos del suelo (Smith y Read, 1997) lo que parece ser el caso de algunos hongos ectomicorrizógenos en la CRM. Para esta especie de oyamel resulta ser muy interesante, ya que presenta una menor supervivencia en campo, lo que apoya más aún la propuesta de inocular esta especie forestal con hongos ectomicorrizógenos nativos, ya que se observó que la inoculación tiene un efecto positivo en la asignación de fósforo para la planta.

Cada especie de HEM usada en el presente estudio, por lo que se ha visto *in vitro*, tiene un pH particular de crecimiento, *S. brevipes* crece mejor en pH ácidos mientras que *I. splendens* crece favorablemente en pH neutros (Alvarado Sánchez, 2008). El promedio de pH para las parcelas de *P. hartwegii* fue de 4.9 y para *A. religiosa* de 5.14 (Peña, comunicación personal). En las parcelas experimentales ocupadas en este estudio, parece

haber una cierta preferencia para crecer en pH más ácido para *S. brevipes* en el bosque de Pino ya que se encontró un mayor porcentaje de colonización en las raíces de *P. hartwegii* inoculadas con *S. brevipes*. En cuanto a *I. splendens* no se observa una tendencia por lo menos en lo que respecta a este periodo del estudio.

Finalmente, al realizar la caracterización macromorfológica y micromorfológica de las micorrizas se llegó a la conclusión de que las características generales de los morfotipos concuerdan con los reportados en Deemy (2009) para las especies del género *Suillus brevipes* y *Inocybe splendens*, por lo que se concluye que las cepas propagadas en laboratorio y con las cuales se inocularon las plantas, formaron micorrizas, con las raíces de las especies forestales *P. hartwegii* y *A. religiosa*.

8.4 Los hongos ectomicorrizógenos como parte de una alternativa de restauración forestal

Sin duda los beneficios que los hongos confieren a las plantas son varios, entre ellos se encuentran: i) incremento en la absorción de diversos nutrimentos incluyendo N y de P (lo cual se observó en el presente experimento), a través del establecimiento de redes miceliales que incrementan el área de absorción de la raíz; ii) protección en contra de patógenos de la raíz, por ejemplo de los miembros causantes del “dampig-off” tales como *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium*; iii) mejoría en la estructura del suelo, a través de la formación de macro y microagregados mediante el establecimiento de conspicuas redes miceliales; iv) influencia en la estructura de las comunidades vegetales a través de la conexión entre diferentes especies vegetales por redes miceliales comunes (Pérez-Moreno y Read, 2004); vi) les confiere un incremento en el crecimiento y vigor a las plantas (Castellano, 1994; Ruiz-Diez *et al.* (2006); vii) incremento en la adecuación de la planta (crecimiento, supervivencia y/o reproducción) (Janos, 1992); y viii) mayor crecimiento y peso seco en las plantas que son inoculadas (Torres y Honrubia, 1994). Por todo lo anterior, es importante que se contemplen como parte esencial de una estrategia integral de restauración ecológica de los ecosistemas.

Además, como se observó en el presente trabajo, hay especies forestales de suma importancia económica que desde su germinación son difíciles de propagar, y cuando se ha logrado la germinación, sería muy preocupante que por el hecho de no estar micorrizadas con HEM nativos, se murieran en el transcurso de su establecimiento en campo, lo que se ha visto que lamentablemente ocurre en los programas públicos de reforestación, aunque

existen otras variables que influyen en la supervivencia y establecimiento de las plántulas en campo.

Se sugieren a continuación algunos factores importantes que deben ser considerados en los proyectos enfocados a la restauración del Bosque de Pino y Oyamel de la Magdalena Contreras:

Selección de especies. A partir de los ensayos de germinación de semillas se recomienda usar semillas de *P. hartwegii* ya que presentan un porcentaje de germinación alto, en el fotoperíodo correspondiente a 12/12; por otro lado, las semillas de *A. religiosa* tienen un porcentaje de germinación nulo, por lo que se sugiere continuar con otras metodologías para obtener éxito en este proceso. Otra opción sería comprar plántulas de esta especie en el vivero.

Inoculación de micelio. Sin duda se sugiere el uso de hongos nativos para la inoculación de las plántulas ya que según los resultados obtenidos, cada sepa, le otorga ciertas ventajas en el campo ya que si se usa inóculo comercial se corre el riesgo de no formarse la asociación micorrízica. La inoculación se realizaría en la fase de vivero aunque también se recomendaría *in situ* al momento de ser transplantadas a campo.

Transplante. Al momento de transplantar, se recomienda la exclusión de pastos y herbáceas para evitar con esto, la competencia por los recursos, se podría inocular con micelio de HEM, en el momento del transplante.

Monitoreo. Se recomienda realizar por lo menos el primer año de establecimiento en campo, una visita cada tres meses para observar supervivencia. Después de ello, sería importante continuar con un monitoreo a mediano y largo plazo tanto de la colonización por HEM, como del crecimiento y supervivencia de las plantas.

9. CONCLUSIONES

Se observó una tendencia a mayor asignación de biomasa hacia las partes aéreas en ambas especies forestales.

Abies religiosa es una especie de difícil manejo, por lo que se recomienda ampliamente la inoculación con HEM nativos, para aumentar su supervivencia, si es posible con un inóculo mixto de HEM nativos.

En el caso de *Pinus hartwegii*, se observaron diferencias entre tratamientos en el contenido de fósforo, tanto en parte aérea como en raíz, el cual fue mayor tanto en el tratamiento con suelo como en el caso de las plantas inoculadas con *Suillus brevipes*. Ello comprueba que la inoculación con HEM sí favoreció la absorción de fósforo.

Los resultados permiten recomendar el uso de plantas de *P. hartwegii* inoculadas con *S. brevipes*, y de *A. religiosa* con *I. splendens* para Programas de Restauración en la zona de estudio.

Dado que las especies mostraron un lento crecimiento, y considerando que en otras variables se observaron tendencias no significativas en los resultados, se sugiere continuar realizando un monitoreo para un periodo amplio de tiempo tomando mediciones cada cuatrimestre o semestre, ya que solamente un año o dos es poco tiempo para establecer conclusiones determinantes.

Sería recomendable realizar experimentos en campo en una mayor escala (paisaje) para ampliar el conocimiento de los HEM mexicanos con especies forestales.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Adriaensen K., Vangronsveld J. y Colpaert J. V.** 2006. Zinc-tolerant *Suillus bovinus* improves growth of Zn-exposed *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 16: 553-558.
- Agerer R.** 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycot Progress*. 5: 67-107.
- Allen M. F. y Boosalis M. G.** 1983. Effect of two species of VA mycorrhizal fungi on drought tolerance of winter wheat. *New Phytol.* 93:67-76.
- Amaranthus M. P. y Trappe J. M.** 1993. Effects of erosion on ectomycorrhizal inoculum potential of soil following forest fire in Southwest Oregon. *Plant and Soil* 150:41-49.
- Arnolds I.** 1991. Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe. *Agriculture, Ecosystem and Environment* 35:209-244.
- Ashkannejhad S. y Horton T. R.** 2006. Ectomycorrhizal ecology under primary succession on coastal sand dunes: interactions involving *Pinus contorta*, suilloid fungi and deer. *New Phytologist* 169: 345-354.
- Augé R. M., Schekel K. A. y Wample R. L.** 1987. Rose leaf elasticity changes in response to drought acclimation and mycorrhizal colonization. *Physiol. Plant.* 70:175-182.
- Ávila-Akerberg V. D.** 2002. La Vegetación en la cuenca alta del río Magdalena: un enfoque florístico, fitosociológico y estructural. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 86 pp
- Begon M., Townsend R. C. y Harper J.** 2006. *Ecology*. Blackwell Publishing, Reino Unido. 759 pp.

- Bago B.** 2000. Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* 226:263-274.
- Benítez Badillo G.** 1988. Efectos del fuego en la vegetación herbácea de un bosque de *Pinus hartwegii* Lindl. en la sierra del Ajusco. En: E. H. Rapoport e I.R. López M. (Eds.). Aportes a la ecología urbana de la Ciudad de México. MAB-Limusa. México, D. F. pp. 111-152.
- Bloggett J. T., Krunger E. L. y Stanosa G. R.** 1997. Effects of moderate stress on disease development by *Sphaeropsis sapinea* on red pine. *Phytopatology* 87: 422-428
- Brundett M.** 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Adv. Ecol. Res.* 21: 171-313.
- Braun Biostat** (<http://www.labsx.com>), consultada el 10 de octubre de 2009.
- Bowen G.** 1994. The ecology of the ectomycorrhiza formation and functioning. *Plant and Soil* 159: 61-67.
- Challenger A.** 1998. Utilización y Conservación de los Ecosistemas Terrestres de México, pasado, presente y futuro. CONABIO. México D. F. 847 pp.
- Colpaert J. V. y Van Laere A.** 1996. A comparison of the extracellular enzyme activities of two ectomycorrhizal and leaf-saprophytic basidiomycetes colonising beech leaf litter. *New Phytol.* 134: 133-141.
- CONAFOR-SEMARNAT.** 2004. Protección, restauración y conservación de suelos forestales. Manual de obras y prácticas. 210 pp.
- CORENADER.** 2004. El Suelo de Vegetación en del Distrito Federal. Secretaria del Medio Ambiente del Distrito Federal. <http://www.sma.df.gob.mx/sma/corenader>, consultada el 10 de octubre de 2009.

- Castellano M.** 1994. Currents status of outplanting studies using ectomycorrhizae-inoculated forest trees. En: Pflieger F.L. and R. G. Linderman (Eds.) Mycorrhizae and planta health. The American Phytopathological Society (APS) Press. Minnessota.
- Comandini O., Pacioni G. y Rinaldi A. C.** 1998. Fungi in ectomycorrhizal associations of silver fir (*Abies alba* Miller) in Central Italy. Mycorrhiza 7: 323-328.
- De Bauer Ma. de Lourdes y Hernández-Tejeda T.** 2006. A review of ozone-induced effect ont the forest of central Mexico. Science Direct. 147: 446-453.
- Deemy.** 2009. Determination of ectomycorrhize (<http://www.deemy.de>), consultada desde el 17 de marzo de 2008 a 15 de noviembre de 2009.
- Duñabeitia M., Rodríguez N., Salcedo I. y Sarrionandia E.** 2004. Field mycorrhization and its influence on the establishment and development of the seedlings in a broadleaf plantation in the Basque County. Forest Ecology and Management 195: 129-139.
- Finlay R. D y Read D. J.** 1986. The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants II. The uptake distribution of phosphorus by mycelia strands interconnecting host plants. New Phytol. 103: 157-165.
- Galindo-Flores G., García Campusano F., Monjarás González G. y Chávez Ávila V. M.** 2001. Regeneración *in vitro* de *Pseudotsuga macrolepis* Flous a partir de embriones maduros. Investigación para el Desarrollo Regional. SEP-CONACYT, México D.F. ISBN 968-823-274-2
- He H. X., Horwath R. J. y Zasoski R. J.** 2007. Nitrogen sink strength of ectomycorrhizal morphotypes of *Quercus douglassi*, *Q. garryana*, and *Q. agrifolia* seedlings grown in a northern California oak woodland. Mycorrhiza 18: 33-41.

- Harley J. L., Malloch D. W., Pirozynski K. A. y Raven P. H.** 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A review). PNAS. USA 77: 2113-2118.
- Hernández T. T. y de Bauer L. I.** 1984. Evolución del daño por agentes oxidantes en *Pinus hartwegii* y *P. montezumae* var. *lindleyi* en el Ajusco, D.F. Agrociencia. México 56: 183-194.
- Herrera T. y Ulloa M.** 1990. El reino de los hongos. Fondo de Cultura Económica. México.
- Hobbs R. J.** 2005. The future of restoration ecology: Challenges and opportunities. Restoration Ecology 13: 239-241.
- Honrubia M., Torres P., Díaz G. y Morte A.** 1993. Biotecnología forestal: Micorrización y micropropagación. (Manual de prácticas). Universidad de Murcia y Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos, Murcia.
- Hung L. L. y Trappe J. M.** 1983. Diversity of ecto-mycorrhizal fungal communities in relation to the abiotic environment. Mycologia. 75: 234-241.
- Jackson R. M. y Manson P. A.** 1984. Mycorrhizal. Studies in biology. No. 159. Edward-Arnold. Londres.
- Janos D. P.** 1980. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical root forest plant growth. Ecol. 61:151-162.
- Lindermann R. G.** 1980. Mycorrhizal interactions with the rizosphere microflora. The mycorrhizosphere effect. Phytopathol. 93:67-76.
- Lindig-Cisneros R., Blanco-García A., Sáenz-Romero C., Alvarado-Sosa P. y Alejandre-Melena N.** 2007. Restauración adaptable en la Meseta Purépecha. Bol. Soc. Bot. Méx. 80: 33-47.

- Mason P. A., Last F. T., Wilson J., Deacon J. W., Fleming L. V. y Fox F. M.** 1987. Fruiting and succession of ectomycorrhizal fungi. En: Pegg G.F., Ayers P.G. (Eds.) Fungal infection of plants. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 253-268.
- Matsuda Y. y Hijii N.** 1998. Spatio temporal distribution of fruitbodies of ectomycorrhizal fungi in an *Abies firma* forest. *Mycorrhiza* 8:131-138.
- Marx D. H., Ruehle J. L. y Cordell C. E.** 1991. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. En Noris J. R. (ed) Techniques for the study of Mycorrhiza. 23: 283-411
- Mazari M.** 2000. Dualidad Población-Agua: Inicio del Tercer Milenio. Ed. El Colegio Nacional, México D. F.
- Mikola P.** 1973. Application of mycorrhizal symbiosis in forest practice. En: Marx D.H. y Kolowski (Eds.) Ectomycorrhiza. Academic Press. London. Pag. 383-411.
- Martínez y Pérez J. L., Hernández Cuevas L. V., Santiago Martínez M. G., Guerra de la Cruz V. y Legorreta Padilla F.** 2009. Manual para la propagación y micorrización de plantas arbustivas silvestres para la restauración de suelos degradados. UAT. 23 pp
- Marx D. H. y Cordell C. E.** 1994. The Use of Specific Ectomycorrhizas to Improve Artificial Forestation Practices. In: Wipps J. M. y R. D. Lumsden (eds). Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth. University Press, Cambridge, Pag. 1-25.
- Monte A., Díaz G., Rodríguez P., Alarcón J. J. y Sánchez-Blanco M. J.** 2001. Growth and water relations in mycorrhizal and nonmycorrhizal *Pinus halapensis* plant in response to drought. *Biologia Plantarum* 44(2): 263-267.
- Molina R., Massicotte H. B. y Trappe J. M.** 1992a. Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical

- implications. En: Allen M.F. (Ed.). Mycorrhizal functioning. Chapman and Hall, London. Pag. 357-423.
- Molina, R., Massicotte H. B. y Trappe J. M.** 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. Pag. 106-112.
- Molina R.** 1979. Pure Culture Synthesis and Host Specificity of Red Alder Mycorrhizae. *Can. J. Bot.* 57:1223-1228.
- Molina R. y Trappe J. M.** 1982. Lack of Mycorrhizal Specificity by The Ericaceous Host *Arbutus menziesii* and *Artostaphylos uva-ursi*. *New Phytologist* 90:495-509.
- Nava López M. Z.** 2003. Los bosques de la cuenca alta del río Magdalena, D.F., México. Un estudio de vegetación y fitodiversidad. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM. 64 pp
- Nieto de Pascual-Polo C.** 1995. Estudio Sinecológico del Bosque de Oyamel de la Cañada de Contreras, Distrito Federal. *Rev. Ciencia Forestal en México.* Vol. 20 (77): 3-34.
- Nieto de Pascual-Polo C.** 2003. Estudio de algunas características de conos y semillas de *Abies religiosa* (HBK) Schl. et Cham. *Agrociencia* 37: 521-531.
- Plassard C. P., Scheromm D. y Mousain L.** 1991. Assimilation of mineral nitrogen and ion balance in the two partners of ectomycorrhizal symbiosis, Data and hypothesis. *Experientia* 47: 340-349.
- Pérez-Moreno J. y Read D.** 2004. Los Hongos Ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 19 (5): 239-247.
- PRONARE.** 2004. Comisión Nacional Forestal. www.conafor.gob.mx, consultada el 10 de octubre de 2009.

- Redecker D., Kodner R. y Graham E. L.** 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. Science 289:1920-1921.
- Ritchie G. A.** 1984. Assessing seedling quality. In: Forest Nursery Manual: Production of Bareroot Seedlings. Duryea, M.L. and T.D. Landis (eds.) Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publisherr, The Hague/Boston/Lancaster, Forest Research Laboratory, Oregon state university. Corvallis, OR. Pag. 243-257.
- Rojas G. M.** 2003. La resistencia a la sequía. Universidad Autónoma de Nuevo León. Ciencia 6(3): 326-331.
- Ruíz- Díez B., Rincón Ana M., de Felipe María R. y Fernández-Pascual M.** 2006. Molecular characterization and evaluation of mycorrhizal capacity of *Suillus isolates* from Central Spain for the selection of fungal inoculants. Mycorrhiza 16: 465-474.
- Rzedowski G. y Rzedowski J. y colaboradores.** 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2ed. Instituto de Ecología-CONABIO. México. 1406 pp.
- Rzedowski, J.** 2006. Vegetación de México. 1er. Edición digital, CONABIO, México. 584 pp.
- Santiago-Martínez G. y Estrada-Torres A.** 1999. Hongos Ectomicorrizógenos Producción de Inoculantes para Plantas de Interés Forestal. Folleto Técnico No. 19. Fundación produce Tlaxcala, UAT.
- SER.** Principios de SER Internacional sobre la Restauración Ecológica. Boletín de la Society for Ecological Restoration International. Grupo de trabajo sobre ciencia y tecnología. Versión 2: Octubre de 2004.
- Smith S. E.** 1983. Mycorrhizal symbiosis. Academic Press. Londres, RU. 483 pp.

- Smith S. E. y Read D. J.** 1997. Mycorrhizal symbiosis. 2nd ed. Academic Press. Nueva York, EEUU. 605 pp.
- Smith R. L. y Smith T. M.** 2001. Ecología. 4a edición. Edit. Addison Wesley. España. 642 pp.
- Staments P.** 2005. Mycelium running. How mushrooms can help save the world. Colorcraft Ltd. Hong Kong, China. 339 pp.
- Toledo V. M. y Ordóñez Ma. de J.** 1993. The biodiversity scenario of Mexico: A review of terrestrial habitats. En: T. P Ramamoorthy, R. Bye, A Lot y J. Fa (Eds.) Biologiacal diversity of Mexico: Origins and distribution. Oxford University Press, Nueva York. pp. 757-777
- Trappe J. M.** 1962. Fungus Associates of Ectotrophic Mycorrhizae. Bot. Rev. 28:538-606.
- Trappe J. M.** 1987. Phylogenetic and Ecologic Aspects of Mycotrophy in the Angiosperms from Evolutionary Stanpoint. In: Safir G. R. (Ed). Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants. CRC Press, Florida. Pag. 2-25.
- Varela L. y Estrada-Torres A.** 1997. Diversity and potential use of mycorrhizae for sustainable development in Mexicio. In Palm M. E. y I. H. Chapela (Eds.) Mycology in Sustainable Development: Expanding Concepts, Vanishing Borders. Parway, North Carolina, 160-182.

Apéndice 1

La prueba de Tukey mostró los siguientes grupos por tratamiento y tiempo para *Pinus hartwegii* para el diámetro a la base del tallo, correspondiente al análisis de TRC (Tasa relativa de Crecimiento). Donde: 1= julio 07, 2= septiembre 07, 3= noviembre 07, 4= enero 08, 5= marzo 08, 6= mayo 08, 7= julio 08, 8= septiembre 08. Los tratamientos están agrupados en forma creciente de acuerdo a los valores arrojados por esta prueba.

Tratamiento	Tiempo	1	2	3
<i>I. splendens</i>	5	a		
<i>S. brevipes</i>	4	a		
Sin Suelo	5	a		
<i>S. brevipes</i>	5	a		
Con Suelo	5	a		
Sin Suelo	4	a		
<i>I. splendens</i>	4	a		
Con Suelo	4	a		
<i>I. splendens</i>	7	a		
<i>I. splendens</i>	6	a		
<i>S. brevipes</i>	7	a		
Con Suelo	7	a		
<i>I. splendens</i>	2	a		
Sin Suelo	7	a		
Con Suelo	6	a		
Sin Suelo	6	a		
Con Suelo	3	a		
<i>S. brevipes</i>	6	a		
Sin Suelo	2	a		
<i>S. brevipes</i>	3	a		
Sin Suelo	3	a		
<i>S. brevipes</i>	2	a		
<i>I. splendens</i>	8	a		
Sin Suelo	8	a		
<i>I. splendens</i>	3	a		
Con Suelo	2	a		
Con Suelo	8	a		
<i>S. brevipes</i>	8	a		
Sin Suelo	1		b	
Con Suelo	1		b	
<i>S. brevipes</i>	1		b	
<i>I. splendens</i>	1			c

Apéndice 2

La prueba de Tukey mostró los siguientes grupos por tratamiento y tiempo para *Pinus hartwegii* para la altura al meristemo, correspondiente al análisis de TRC (Tasa relativa de Crecimiento). Donde: 1= julio 07, 2= septiembre 07, 3= noviembre 07, 4= enero 08, 5= marzo 08, 6= mayo 08, 7= julio 08, 8= septiembre 08. Los tratamientos están agrupados en forma creciente de acuerdo a los valores arrojados por esta prueba.

Tratamiento	Tiempo	1	2	3	4
Con Suelo	1	a			
<i>I. splendens</i>	1	a			
<i>I. splendens</i>	2		b		
<i>S. brevipes</i>	4		b	bc	
Sin Suelo	4		b	bc	
<i>I. splendens</i>	4		b	bc	
<i>I. splendens</i>	3		b	bc	
Con Suelo	4		b	bc	
<i>S. brevipes</i>	5		b	bc	
<i>S. brevipes</i>	8		b	bc	
Con Suelo	7		b	bc	
Sin Suelo	2		b	bc	
<i>S. brevipes</i>	7		b	bc	
Sin Suelo	8		b	bc	
Sin Suelo	5		b	bc	
Sin Suelo	7		b	bc	
Con Suelo	5		b	bc	
<i>S. brevipes</i>	2		b	bc	
Con Suelo	8		b	bc	
<i>S. brevipes</i>	3		b	bc	
Con Suelo	3		b	bc	
Sin Suelo	3		b	bc	
<i>I. splendens</i>	7		b	bc	
<i>I. splendens</i>	8		b	bc	
<i>I. splendens</i>	5		b	bc	
Con Suelo	6		b	bc	
<i>I. splendens</i>	6		b	bc	
<i>S. brevipes</i>	6		b	bc	
Sin Suelo	6			c	
Con Suelo	2			c	
<i>S. brevipes</i>	1				d
Sin Suelo	1				d

Apéndice 3

La prueba de Tukey mostró los siguientes grupos por tratamiento y tiempo para *Pinus hartwegii* para la altura total, correspondiente al análisis de TRC (Tasa relativa de Crecimiento). Donde: 1= julio 07, 2= septiembre 07, 3= noviembre 07, 4= enero 08, 5= marzo 08, 6= mayo 08, 7= julio 08, 8= septiembre 08. Los tratamientos están agrupados en forma creciente de acuerdo a los valores arrojados por esta prueba.

Tratamiento	Tiempo	1	2	3	4	5	6
<i>S. brevipes</i>	2	a					
Sin Suelo	2		b				
<i>S. brevipes</i>	5		b	bc			
<i>I. splendens</i>	5		b	bc			
Con Suelo	6		b	bc			
Sin Suelo	7		b	bc			
<i>S. brevipes</i>	7		b	bc			
<i>I. splendens</i>	7		b	bc			
<i>I. splendens</i>	6		b	bc			
Con Suelo	5		b	bc			
Sin Suelo	5		b	bc			
Sin Suelo	6		b	bc			
Con Suelo	3		b	bc			
Con Suelo	7		b	bc			
<i>S. brevipes</i>	6		b	bc			
Con Suelo	2		b	bc			
<i>I. splendens</i>	4		b	bc			
<i>I. splendens</i>	2		b	bc			
Con Suelo	4		b	bc			
Sin Suelo	4		b	bc			
<i>S. brevipes</i>	4		b	bc			
Sin Suelo	3			c			
Con Suelo	8			c			
Sin Suelo	8			c			
Con Suelo	1			c			
<i>S. brevipes</i>	8			c			
<i>I. splendens</i>	8			c			
<i>I. splendens</i>	3			c			
Sin Suelo	1				d		
<i>S. brevipes</i>	1				d		
<i>S. brevipes</i>	3					e	
<i>I. splendens</i>	1						f

Apéndice 4

La prueba de Tukey mostró los siguientes grupos por tratamiento y tiempo para *Abies religiosa* para el diámetro a la altura del tallo, correspondiente al análisis de TRC (Tasa relativa de Crecimiento). Donde: 1= julio 07, 2= septiembre 07, 3= noviembre 07, 4= enero 08, 5= marzo 08, 6= mayo 08, 7= julio 08, 8= septiembre 08. Los tratamientos están agrupados en forma creciente de acuerdo a los valores arrojados por esta prueba.

Tratamiento	Tiempo	1	2	3	4	5
<i>S. brevipes</i>	2	a				
Sin Suelo	2		b			
Con Suelo	5		b			
<i>S. brevipes</i>	5		b			
Sin Suelo	8		b			
Sin Suelo	5		b			
Con Suelo	2		b			
<i>I. splendens</i>	1		b	bc		
<i>I. splendens</i>	5		b	bc		
<i>S. brevipes</i>	8		b			
Con Suelo	8		b			
<i>I. splendens</i>	8		b	bc		
<i>S. brevipes</i>	7		b			
Sin Suelo	7		b			
Con Suelo	3		b			
<i>I. splendens</i>	6		b	bc		
<i>S. brevipes</i>	6		b			
<i>I. splendens</i>	7		b	bc		
Sin Suelo	3		b			
<i>I. splendens</i>	4		b	bc		
Con Suelo	7		b			
Sin Suelo	6		b			
Sin Suelo	4		b			
Con Suelo	4		b			
<i>I. splendens</i>	3		b	bc		
Con Suelo	6		b	bc		
<i>S. brevipes</i>	4		b	bc		
<i>S. brevipes</i>	3			bc	cd	
Sin Suelo	1				d	de
<i>I. splendens</i>	2				d	de
<i>S. brevipes</i>	1					e
Con Suelo	1					e

Apéndice 5

La prueba de Tukey mostró los siguientes grupos por tratamiento y tiempo para *Abies religiosa* para la altura al meristemo, correspondiente al análisis de TRC (Tasa relativa de Crecimiento). Donde: 1= julio 07, 2= septiembre 07, 3= noviembre 07, 4= enero 08, 5= marzo 08, 6= mayo 08, 7= julio 08, 8= septiembre 08. Los tratamientos están agrupados en forma creciente de acuerdo a los valores arrojados por esta prueba.

Tratamiento	Tiempo	1	2	3	4
<i>S. brevipes</i>	2	a			
Sin Suelo	2	a	ab		
<i>I. splendens</i>	5	a	ab	abc	
Con Suelo	3		b	bc	
<i>S. brevipes</i>	5		b	bc	
Con Suelo	5		b	bc	
<i>I. splendens</i>	1	a	ab	abc	
<i>I. splendens</i>	7	a	ab	abc	
<i>I. splendens</i>	4	a	ab	abc	
Sin Suelo	5		b	bc	
Con Suelo	7		b	bc	
Sin Suelo	3		b	bc	
Sin Suelo	6		b	bc	
<i>S. brevipes</i>	6		b	bc	
<i>I. splendens</i>	6	a	ab	abc	
<i>I. splendens</i>	3	a	ab	abc	
Con Suelo	6		b	bc	
Con Suelo	2		b	bc	
Con Suelo	4		b	bc	
Sin Suelo	7		b	bc	
<i>S. brevipes</i>	7		b	bc	
Sin Suelo	4		b	bc	
Con Suelo	8			c	
Sin Suelo	8			c	
<i>S. brevipes</i>	4			c	
<i>S. brevipes</i>	3			c	
<i>S. brevipes</i>	8			c	
<i>I. splendens</i>	8		b	bc	
<i>S. brevipes</i>	1				d
<i>I. splendens</i>	2				d
Sin Suelo	1				d
Con Suelo	1				d

Apéndice 6

La prueba de Tukey mostró los siguientes grupos por tratamiento y tiempo para *Abies religiosa* para la altura total, correspondiente al análisis de TRC (Tasa relativa de Crecimiento). Donde: 1= julio 07, 2= septiembre 07, 3= noviembre 07, 4= enero 08, 5= marzo 08, 6= mayo 08, 7= julio 08, 8= septiembre 08. Los tratamientos están agrupados en forma creciente de acuerdo a los valores arrojados por esta prueba.

Tratamiento	Tiempo	1	2	3	4	5
<i>S. brevipes</i>	2	a				
Sin Suelo	2	a	ab			
<i>I. splendens</i>	5	a	ab	abc		
Con Suelo	5		b	bc		
Con Suelo	3		b	bc		
<i>S. brevipes</i>	5		b	bc		
<i>I. splendens</i>	1	a	ab	abc		
<i>I. splendens</i>	7	a	ab	abc		
<i>I. splendens</i>	4	a	ab	abc		
Sin Suelo	5		b	bc		
Con Suelo	7		b	bc		
Sin Suelo	3		b	bc		
Sin Suelo	6		b	bc		
Con Suelo	2		b	bc		
<i>S. brevipes</i>	6		b	bc		
<i>I. splendens</i>	6	a	ab	abc		
<i>I. splendens</i>	3	a	ab	abc		
Con Suelo	4		b	bc		
Sin Suelo	7		b	bc		
Con Suelo	6		b	bc		
<i>S. brevipes</i>	7			c		
Sin Suelo	4			c		
Con Suelo	8			c		
Sin Suelo	8			c		
<i>S. brevipes</i>	3			c		
<i>S. brevipes</i>	4			c		
<i>S. brevipes</i>	8			c		
<i>I. splendens</i>	8		b	bc	bcd	
<i>S. brevipes</i>	1				d	de
Sin Suelo	1				d	de
Con Suelo	1					e
<i>I. splendens</i>	2					e