

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**



**INTERACCIONES ENTRE 4 ESPECIES DE HONGOS  
ECTOMICORRÍDICOS Y DOS ESPECIES DE CONÍFERAS DEL  
CERRO EL POTOSÍ, GALEANA, N.L. MÉXICO.**

**POR**

**BIÓL. ROSA MARÍA ARIAS MOTA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS FORESTALES**

**LINARES, N.L.**

**DICIEMBRE, 1997**

TM

Z5591

FCF

1997

A7



1020120345

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES**



**INTERACCIONES ENTRE 4 ESPECIES DE HONGOS  
ECTOMICORRÍCICOS Y DOS ESPECIES DE CONÍFERAS DEL  
CERRO EL POTOSÍ, GALEANA, N.L. MÉXICO.**

**POR**

**BIÓL. ROSA MARÍA ARIAS MOTA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS FORESTALES**

**LINARES, N.L.**


**DICIEMBRE, 1997**

0119-93660

TM  
Z5991  
FCF  
1997  
A7

**INTERACCIONES ENTRE 4 ESPECIES DE HONGOS  
ECTOMICORRÍDICOS Y DOS ESPECIES DE CONÍFERAS DEL  
CERRO EL POTOSÍ, GALEANA, N.L. MÉXICO.**

**Aprobación de la Tesis:**



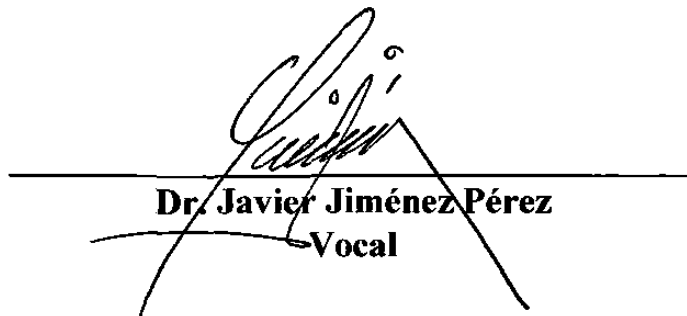
---

**Dr. Fortunato Garza Ocañas**  
Presidente



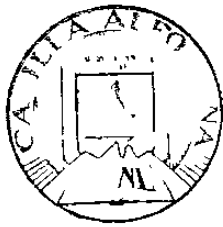
---

**Dr. José Guadalupe Marmolejo Moncivais**  
Secretario



---

**Dr. Javier Jiménez Pérez**  
Vocal



FONDO TESIS

# TABLA DE CONTENIDO

	Página
TABLA DE CONTENIDO . . . . .	I
INDICE DE TABLAS . . . . .	IV
INDICE DE FIGURAS . . . . .	V
RESUMEN . . . . .	VIII
SUMMARY . . . . .	IX
CAPITULO 1	
INTRODUCCIÓN . . . . .	1
1.1    Justificación . . . . .	14
1.2    Objetivos . . . . .	15
CAPITULO 2	
MATERIALES Y MÉTODOS . . . . .	16
2.1    Organigrama de actividades . . . . .	16
2.2    Ubicación del área de estudio . . . . .	17
2.3    Localización del área de estudio . . . . .	20
2.4    Especies forestales seleccionadas . . . . .	21
2.4.1    Colecta de semillas y su germinación . . . . .	21
2.5    Hongos ectomicorrícicos seleccionados . . . . .	21
2.6    Aislamiento de hongos ectomicorrícicos . . . . .	22
2.7    Crecimiento y caracterización de cultivos puros de los hongos seleccionados . . . . .	23
2.8    Interacciones de cultivos <i>in vitro</i> . . . . .	23
2.8.1    Diseño experimental <i>in vitro</i> . . . . .	24
2.9    Síntesis aséptica de ectomicorrizas <i>in vitro</i> . . . . .	24
2.10    Síntesis no aséptica de ectomicorrizas . . . . .	25
2.10.1    Diseño experimental . . . . .	26



	Página
2.11 Reaislamiento de ectomicorrizas . . . . .	26
2.12 Producción semimasiva del inóculo de los hongos . . . . .	26
2.13 Competencia por establecimiento en vivero . . . . .	30
2.13.1 Diseño experimental . . . . .	31
2.13.2 Parámetros medidos . . . . .	31

### CAPITULO 3

RESULTADOS . . . . .	33
3.1 Crecimiento y caracterización de cultivos puros de los hongos seleccionados . . . . .	33
3.2 Interacciones de cultivos <i>in vitro</i> . . . . .	37
3.2.1 <i>Lepista nuda</i> x especies . . . . .	37
3.2.2 <i>Scleroderma verrucosum</i> x especies . . . . .	37
3.2.3 <i>Pisolithus tinctorius</i> x especies . . . . .	38
3.2.4 <i>Cantharellus cibarius</i> x especies . . . . .	38
3.3 Síntesis aséptica de ectomicorrizas <i>in vitro</i> . . . . .	40
3.4 Síntesis no aséptica de ectomicorrizas . . . . .	42
3.4.1 Descripción de las ectomicorrizas . . . . .	44
3.5 Competencia por establecimiento en vivero . . . . .	48
3.5.1 <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	51
3.5.1.1 Porcentaje de micorrización . . . . .	51
3.5.1.2 Altura de las plántulas. . . . .	53
3.5.1.3 Diámetro del cuello de la raíz . . . . .	55
3.5.1.4 Largo del sistema radicular . . . . .	57
3.5.1.5 Peso fresco aéreo . . . . .	59
3.5.1.6 Peso seco aéreo . . . . .	61
3.5.1.7 Peso fresco del sistema radicular . . . . .	63
3.5.1.8 Peso seco del sistema radicular . . . . .	65

	Página
3.5.2 <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	67
3.5.2.1 Porcentaje de micorrización. . . . .	67
3.5.2.2 Altura de las plántulas. . . . .	69
3.5.2.3 Diámetro del cuello de la raíz . . . . .	71
3.5.2.4 Largo del sistema radicular . . . . .	73
3.5.2.5 Peso fresco aéreo . . . . .	75
3.5.2.6 Peso seco aéreo . . . . .	77
3.5.2.7 Peso fresco del sistema radicular . . . . .	79
3.5.2.8 Peso seco del sistema radicular . . . . .	81
3.5.3 <i>Pinus pseudostrobus</i> x parámetros medidos . . . . .	83
3.5.4 <i>Pinus culminicola</i> x parámetros medidos . . . . .	86
3.6 Análisis de correlación de los parámetros medidos . . . . .	89

#### CAPITULO 4

DISCUSIÓN . . . . .	90
---------------------	----

#### CAPITULO 5

CONCLUSIONES . . . . .	100
------------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA . . . . .	103
------------------------	-----

APÉNDICES . . . . .	110
---------------------	-----

## INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla	
3.1 Características de crecimiento <i>in vitro</i> en medio modificado MMN a un pH de 6.4 y a una temperatura de 30° C en 10 días.. . . .	34
3.2 Zona de interacción . . . . .	39
3.3 Ectomicorrizas en <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	44
3.4 Ectomicorrizas en <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	45

## INDICE DE FIGURAS

	Página
Figuras	
2.1 Inoculación de frascos para producción de inóculo . . . . .	28
2.2 Producción semimasiva de inóculo . . . . .	29
3.1 Media del crecimiento <i>in vitro</i> de las especies seleccionadas en medio modificado de Melin Norkans . . . . .	35
3.2 Cultivos puros de las especies de hongos ectomicorrícicos obtenidos.	36
3.3 Síntesis <i>in vitro</i> : Estadios iniciales en la colonización de <i>Pisolithus tinctorius</i> en <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	41
3.4 Síntesis no aséptica: Porcentaje de micorrización por estratos y total. <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	43
3.5 Síntesis no aséptica: Porcentaje de micorrización por estratos y total. <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	43
3.6 Tipos morfológicos de ectomicorrizas de <i>Pinus pseudostrobus</i> : A) bifurcadas largas, B) bifurcadas cortas, C) dicotómicas D) coraloides . . . . .	46
3.7 Tipos morfológicos de ectomicorrizas de <i>Pinus culminicola</i> : A y B) bifurcadas cortas, C) bifurcadas largas D) dicotómicas . . . . .	47
3.8 Inoculaciones individuales y mixtas en vivero en plántulas de <i>Pinus pseudostrobus</i> y <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	49
3.9 Procedimientos para toma de datos en las plántulas inoculadas con los diferentes tratamientos. . . . .	50
3.10 Porcentaje de micorrización de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	52
3.11 Altura de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	54
3.12 Diámetro del cuello de la raíz de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	56

	Página
3.13 Largo del sistema radicular de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	58
3.14 Peso fresco aéreo de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	60
3.15 Peso seco aéreo de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	62
3.16 Peso fresco del sistema radicular de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	64
3.17 Peso seco del sistema radicular de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	66
3.18 Porcentaje de micorrización de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	68
3.19 Altura de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	70
3.20 Diámetro del cuello de la raíz de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	72
3.21 Largo del sistema radicular de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	74
3.22 Peso fresco aéreo de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	76
3.23 Peso seco aéreo de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	78
3.24 Peso fresco del sistema radicular de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados en <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	80
3.25 Peso seco del sistema radicular de las plántulas por tratamientos en los muestreos realizados en <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	82

	Página
3.26 Parámetros medidos a las plántulas por tratamiento mostrando el comportamiento global de los muestreos realizados en <i>Pinus pseudostrobus</i> . . . . .	85
3.27 Parámetros medidos a las plántulas por tratamiento mostrando el comportamiento global de los muestreos realizados en <i>Pinus culminicola</i> . . . . .	88

## RESUMEN

En este estudio se colectaron cuerpos fructíferos en campo y se aislaron cultivos puros de los hongos ectomicorrícicos (ECM) *Cantharellus cibarius* Fries., *Pisolithus tinctorius* (Mich. ex Pers) Coker & Couch., *Lepista nuda* Bull ex Fr Cooke y *Scleroderma verrucosum* Pers. Estos hongos se asocian formando micorrizas con *Pinus pseudostrobus* Lindl. y *Pinus culminicola* Andresen & Beaman, especies presentes en el cerro El Potosí, Galeana, N.L. Se llevaron a cabo interacciones entre las colonias de estos hongos a fin de observar su comportamiento en condiciones *in vitro*. Estos resultados de los experimentos mostraron diferentes rangos de crecimiento entre las especies, los cuales son diferentes de los que ocurren en condiciones no asépticas en vivero. Aparentemente este parámetro no juega un papel relevante en la competencia por establecimiento en las raíces de las plántulas. En los experimentos de interacciones fúngicas en vivero se utilizaron inoculaciones individuales y mixtas a fin de observar el desarrollo de las especies de hongos por el establecimiento en el sistema radicular de los pinos así como su efecto en el crecimiento general de las plántulas. Los resultados de estos experimentos mostraron que los mejores tratamientos fueron las inoculaciones mixtas; en el caso de *P. pseudostrobus* la combinación correspondiente a *Pisolithus tinctorius* y *Cantharellus cibarius* aportó los mejores resultados en los parámetros medidos; en *P. culminicola* la combinación de *Lepista nuda* y *Cantharellus cibarius* fue la mejor. En los tratamientos individuales, *Scleroderma verrucosum* fue el mejor para *P. pseudostrobus* y *Lepista nuda*, para *P. culminicola*. En ambos hospederos prevaleció una combinación fúngica en la que intervino *Cantharellus cibarius*, el cuál es un hongo comestible y altamente apreciado en el mercado internacional. Aunque este hongo mostró un rango de crecimiento *in vitro* muy lento prevaleció como uno de los mejores. Esto nos indica que existe un comportamiento diferente entre el crecimiento de este hongo *in vitro* y en condiciones semejantes a las naturales que se presentaron en los sustratos utilizados en los experimentos en vivero. Asimismo, se observó que las respuestas de crecimiento de las plantas en los diferentes tratamientos utilizados fueron significativamente diferentes entre sí y para cada hospedero. En lo que respecta a la morfología de las ectomicorriza formadas se encontró que varió de acuerdo a las especies de hongos siendo simples, bifurcadas simples, ramificadas y coraloides, pero estas no variaron en relación al hospedero.

## SUMMARY

In this study field collection of fruiting bodies and pure culture isolations of the ectomycorrhizal (ECM) fungi *Cantharellus cibarius* Fries., *Pisolithus tinctorius* (Mich. ex Pers) Coker & Couch., *Lepista nuda* Bull ex Fr Cooke and *Scleroderma verrucosum* Pers. were made. These fungi form ectomycorrhizal associations with *Pinus pseudostrobus* Lindl. and *Pinus culminicola* Andresen and Beaman in the study area (i.e. cerro "El Potosí", Galeana, N.L.). Colony interactions between these fungi *in vitro* were carried out in order to observe their behaviour regarding competition. Results showed different growth rates of the species both *in vitro* and under greenhouse conditions; apparently this parameter is not determinant for results found on establishment experiments in greenhouse. Interaction experiments carried out under greenhouse conditions included the use of single and mixed mycelial inoculations in order to observe fungal competition and their general growth effects on their hosts. Results showed that mixed inoculated treatments were better than single ones, in the mixed treatments the combination of *Pisolithus tinctorius* and *Cantharellus cibarius* showed best results for *P. pseudostrobus* and *Lepista nuda* and *Cantharellus cibarius* was the best for *P. culminicola*. In the single inoculated treatments *Scleroderma verrucosum* and *Lepista nuda* were the best for *P. pseudostrobus* and *P. culminicola* respectively. *Cantharellus cibarius* was found in the mixed treatments showed the best results for the parameters measured in both hosts. These results occurred despite the fact that this fungus showed a slow growth rate *in vitro*; nevertheless these results showed that fungal growth may vary considerably both *in vitro* and under greenhouse conditions and results obtained from experiments *in vitro* must be interpreted carefully and partially. Plant growth responses to the treatments used were significantly different amongst them and for each host.

Regarding morphology of the ectomycorrhizae it was found that it varied considerably for each fungal species being simple, bifurcated, multiple bifurcated, branched and coralloid and it did not change in relation to the hosts studied.



## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre los hongos y raíces de las plantas en las cuales ambos asociados se benefician (Harley & Smith, 1983). Actualmente se reconocen varios tipos de micorrizas en relación a la estructura de la misma, al simbiote vegetal y fúngico.

Las micorrizas vesículo-arbusculares; se caracterizan por ser intracelulares, forman vesículas y arbusculos en el interior de la célula, no existe una manto exterior ni red de Hartig, se involucran hongos Zygomycetes del orden Endogonales particularmente el género *Glomus*, con excepción del género *Endogone* (Duddridge, 1987).

Las micorrizas Ericoides y Arbutoides (Ectendomicorrizas); no poseen una cubierta o manto, tienen una red de Hartig y las hifas se encuentran tanto intracelular, como intercelularmente, este tipo es característico de Pyrolaceae como *Pyrola* y Ericaceae como *Arbutus*, *Arctostaphylos*, *Vaccinum*, *Rhododendron* y *Calluna*; los hongos involucrados pueden ser Agaricales como *Leccinum manzanitae*, *L. arctostaphylos*, *Boletus amygdalinus*, *B. regius*, *Cortinarius aureofolius*, *Hygrophorus chrysodon*, *Laccaria laccata*, *Laccatarius deliciosus*, *Russula delica*, *Thelephora terrestris*, *Cenococcum geophilum* y algunos Ascomycetes como *Pezizela ericae* (Dudridge, 1986; Acsai & Largent, 1983).

En las micorrizas monotropoides, todo el sistema radicular esta envuelto por hifas fúngicas, se presenta en plantas aclorofilicas como *Monotropa*, *Allotropa*, *Hemitomes*, *Pleuricospora* y *Pterospora* con sus hospederos clorofilicos *Quercus*, *Tsuga*, *Abies*, a

través de hongos micorrícicos tales como *Boletus* sp. *Trucoculumella citrina*, *Rhizopogon vinicolor* y *Cenococcum geophilum* (Castellano & Trappe, 1985).

Las micorrizas Orquidiodes, se presentan en plantas del Orden Orquidiaceae, que son obligadamente micotróficas; sus semillas germinan solamente en presencia de hongos micorrícicos, entre ellos, algunos del grupo de los Tulasnellales; estos hongos desempeñan un papel fundamental para su sostenimiento y desarrollo.

En las ectomicorrizas, las hifas del hongo penetran a los espacios intercelulares y forman la llamada red de Hartig; así como el manto exterior, en esta se ven involucrados plantas de las Familias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Aceraceae, Ulmaceae, Jungladaceae, Leguminosae, Sapindaceae entre otras y participan hongos Zygomycetes del género *Endogone*, y muchos géneros y especies de Ascomycetes y Basidiomycetes.

Actualmente se conoce que las endomicorrizas (VAM) son las más ampliamente distribuidas, en segundo grado le siguen las ectomicorrizas (Molina *et al.*, 1982; Harley, 1986).

La necesidad de asociar a los hongos ectomicorrícicos con sus hospederos fue reconocida a consecuencia del constante fracaso ocurrido en las primeras plantaciones con árboles exóticos (Oliveros, 1932; Gibson, 1963).

La dependencia obligada hacia las plantas fue demostrada a principios de siglo cuando se introdujeron algunas especies de coníferas ( i.e. Pinaceae) hacia el sudeste de Africa (Robertson, 1932). Así, se descubrió que estas plantas exóticas podían establecerse y crecer mejor cuando eran inoculadas con hongos ectomicorrícicos (ECM). Un ejemplo clásico es el de *Pinus radiata*, donde las plántulas fueron inoculadas en el vivero para

posteriormente ser plantadas en el campo, actualmente estas plantaciones de Nueva Zelanda y Australia son de las más productivas del mundo (Molina y Trappe, 1984).

La introducción de los hongos ECM a las plantaciones exóticas es considerada de importancia económica, ya que muchas de las especies e.g. *Boletus edulis*, *Suillus grevillei* y *Lactarius deliciosus* son comestibles y altamente cotizadas ( Singer & Morello, 1984).

Las asociaciones micorrícicas ocurren en la mayoría de las comunidades vegetales del mundo, desde la zona fría ártica hasta los bosques templados y tropicales, así como, en las condiciones semiáridas y áridas y han coevolucionado como una estrategia para eficientizar el transporte de nutrientes del suelo hacia la planta (Trappe, 1977). Así, muchos de los hongos ECM forman cordones miceliarios a través de los cuales ocurre el transporte activo de nutrientes y estos se extienden desde las raíces colonizadas hacia el suelo y otras plantas ( Kropp *et al.*, 1990). Además, los hongos ECM participan en el transporte de nutrientes y la protección física y química, además de las defensas inducidas por la infección fúngica en las plantas hospederas, como es la acumulación de las fitoalexinas a nivel sistémico, la producción de compuestos fenólicos, las proteínas producidas de novo en raíces micorrizadas, la lignificación de las células corticales de las raíces, la formación de las papilas y las estructuras phi ( Garza, 1991, Deverall, 1977; Bonello, 1991).

El hongo es estimulado por hormonas que produce la planta, induciendo la ramificación y elongación de las raíces, de esta manera se incrementa la superficie de absorción, para la obtención de nutrientes especialmente fósforo, esto ocurre principalmente en VAM. Las ectomicorrizas benefician a sus hospederos en el transporte de agua, incrementan la

resistencia del trasplante de árboles jóvenes, algunas micorrizas ayudan a detoxificar suelos o permiten que las plantas prosperen en suelos con altas temperaturas o bien de extrema acidez. La importancia práctica en los viveros reside en que las micorrizas pueden proteger a las raíces de las plantas del ataque de algunos microorganismos patógenos (Molina & Trappe; 1984, Trappe & Luoma, 1992; Read, 1986; Marx & Davey, 1969).

Diversos estudios de ecología nos proveen información acerca de las causas de la mortalidad de las plantaciones, y la necesidad de una adecuada micorrización de las plántulas. Algunos investigadores como Trappe, (1977), indican que muchas de las causas de que no funcionen las plantaciones no es debido a enfermedades de las raíces, sino a la deficiencia en la formación y funcionamiento de las ECM. El buen manejo de los hongos ECM puede proveer una buena herramienta para los procesos de reforestación en el futuro (Molina *et al.*, 1992 ).

La formación inicial de las micorrizas (Ontogenia) depende de factores bióticos y abióticos tales como: pH, temperatura, humedad, nutrición, química del suelo, sequías, saturación del suelo, luz, materia orgánica del suelo, fisiología del hospedero y la rizosfera (Trappe & Luoma, 1992).

La colonización ectomicorrícica se inicia a partir de esporas o hifas (propágulos) de los hongos simbiotes que se encuentran en la rizosfera. El crecimiento vegetativo de estos propágulos sobre la superficie de las raíces es estimulado por los exudados de las raíces iniciando la formación del manto fúngico.

Estos exudados contienen compuestos que poseen la capacidad de disparar la germinación de las esporas de los hongos ectomicorrícicos (Fries *et al.*, 1987). Melin,

(1930) hace referencia al factor M, producido por raíces de pinos, el cual observó tenía un efecto positivo en la germinación de las esporas de algunos hongos ECM. El factor de inducción de germinación (FIG) es una sustancia producida por especies de *Leccinum* del grupo *Aurantiacum* (Fries, 1987).

Posterior a la germinación de las esporas se inicia el proceso de colonización donde se desarrollan las hifas intercelulares en la corteza de la raíz formándose la red de Hartig y esta red puede reemplazar completamente la lámina media entre las células corticales. La morfología de las ectomicorrizas puede variar siendo simples ramificadas, multiramificadas (*i.e* coraloideas), semejante a nódulos, y otras (Ingleby *et al.* , 1990; Brundrett *et al.*, 1996).

Generalmente el color de las ECM es determinado por el color de las hifas de los hongos, pudiendo ser café, negras, blancas, rojas, amarillas, etc. Muchos de los hongos que forman ectomicorrizas son Basidiomicetos. Sin embargo, existen muchas especies de Ascomicetos (e.g. trufas), que forman ectomicorrizas (Hallet, *et al.*, 1994). La mayoría de los hongos ectomicorrícicos dependen de sus hospederos para completar su ciclo de vida ( Marx, 1975).

Las ectomicorrizas difieren de las raíces no micorrizadas por su color, forma, textura y características microscópicas, siendo estas inducidas por el hongo (Harley & Smith, 1983). La infección ectomicorrícica induce cambios estructurales tales como inhibición del desarrollo de los pelos radiculares y bifurcación de las raíces, las cuales se han relacionado con la producción de hormonas tales como auxinas, citoquininas, etileno por el hongo ectomicorrícico ( Marks & Foster, 1973).

Así, la actividad de los hongos ectomicorrícicos al establecer y mantener una estrecha relación con las raíces de los árboles involucra la liberación de metabolitos activos durante las primeras fases de la colonización y en las últimas fases de la formación de la ectomicorriza, en cuyo momento estos compuestos viajan a través de los simbiontes (Slankis, 1973; Molina & Amaranthus, 1990; Molina & Trappe, 1992). A pesar de que los estudios sobre la importancia de la producción de dichos compuestos son pocos resultan suficientes para demostrar la importancia del papel que desempeñan en el establecimiento de la asociación.

No se conoce con exactitud cuales son los factores bioquímicos que determinan que especies de hongos se asocian con que hospedero, de esta manera se reconocen varios niveles de especificidad (Duddridge, 1987; Mason *et al.*, 1987; Molina *et al.*, 1992):

**1) Dependencia vs Independencia:** Esta define si las plantas forman o no micorrizas.

En términos ecológicos, una planta puede ser llamada independiente de micorriza si puede sobrevivir como individuo, competir en una comunidad y reproducirse sin ellas (Trappe, 1989). Gerdeman, (1968) indica que el porcentaje de especies de plantas micotróficas varía de un 13-63%. Los factores ambientales pueden influenciar que una planta sea micotrófica o no en algunos lugares al igual que la presencia de algunas plantas acompañantes.

**2) Simbiontes facultativos vs obligados:** En el sentido más estricto, las plantas u hongos facultativos son aquellos capaces de formar micorrizas, pero que también son capaces de completar su ciclo de vida sin formar micorrizas. Trappe, (1987) considera que las plantas son micotróficas facultativas si funcionan sin micorrizas en situaciones naturales y con micorrizas en otras. Las plantas micótrofás obligadas no

pueden completar su ciclo de vida sin micorrizas. Muchos experimentos de campo y de invernadero indican que la mayoría de las plantas son micótrofas obligadas aproximadamente el 70% (Trappe, 1987).

**3) Fidelidad a una clase de micorriza:** Los hongos micorrícicos típicamente forman una sola clase de micorriza. Por ejemplo, los hongos vesículo-arbusculares no forman ectomicorrizas y viceversa. La excepciones se presentan en algunos Ascomycetes y Basidiomycetes que pueden formar tanto ecto como ectendomicorrizas (Arbutoides). Esto refleja diferentes respuestas morfológicas del hospedero a la colonización.

La mayoría de las plantas también muestran una fuerte fidelidad a una clase de micorriza en particular. De las angiospermas examinadas hasta ahora, 65% de las especies reportadas forman sólo una clase de micorriza, y sólo un 5% forma más de una clase de micorriza (Trappe, 1987).

**4) Rango de hospederos de los hongos micorrícicos:** El rango de hospederos se refiere a la diversidad de especies vegetales por las cuales una especie de hongo puede formar micorrizas. Describe un espectro que varía de un bajo rango de hospederos típicamente restringido a un género, a un rango intermedio de hospedero, restringido a una familia de plantas, y hasta un rango amplio de hospederos que se extiende típicamente a varias familias y ordenes de plantas.

**5) Receptividad del hospedero:** La mayoría de las plantas micorrícicas pueden formar micorrizas con numerosas especies fúngicas. Aún así, el espectro de receptividad del hospedero va desde un rango reducido (con un bajo número de asociados fúngicos)

a un rango amplio (con un alto número de asociados fúngicos). No se conoce ninguna especie de planta que forme micorrizas solamente con una especie fúngica.

**6) Especificidad ecológica:** En este concepto se incluyen todos los factores bióticos y abióticos que afectan la capacidad de las plantas para formar micorrizas funcionales con hongos particulares; en este contexto se incluyen las interacciones entre plantas y entre plantas y hongos, y entre hongos que restringen o mejoran el crecimiento o funcionamiento de cualquier simbionte en hábitats particulares; los micronichos que favorecen o restringen ciertas asociaciones y los microorganismos de la rizosfera que influyen el desarrollo diferencial de las asociaciones hongo-hospedero.

El fenómeno de especificidad en asociaciones micorrícicas afecta directamente el desarrollo de la comunidad vegetal en varias formas, la dependencia micorrícica, fidelidad a una clase de micorrizas y la capacidad de los propágulos fúngicos micorrícicos son determinantes para el desarrollo de los estadios primarios de la comunidad y afectan la dominancia vegetal a largo plazo.

Durante la sucesión de la comunidad, la compatibilidad compartida por los hongos micorrícicos asociados determina el potencial de interconexión de esas plantas y tiene una influencia directa en las interacciones vegetales.

El crecimiento extramatricial de los hongos ectomicorrícicos en la forma de hifas o cordones miceliarios se extiende desde las raíces infectadas hasta el suelo y muy frecuentemente interconecta los sistemas radiculares de más de una planta (Rovira *et al.*, 1983). Además, existen evidencias de que una sola raíz ectomicorrizada puede haber hasta tres especies de hongos creciendo simultáneamente (Zak & Marx, 1964; Marx & Foster, 1973; Garza, 1991).



La abundancia de asociaciones ectomicorrícicas no específicas en la naturaleza parece ser la regla y se ha sugerido que tiene una significancia ecológica como un mecanismo de adaptación para la sobrevivencia de los asociados (Duddridge, 1987; Harley, 1986). También se ha sugerido que los hongos ectomicorrícicos pueden crecer simultáneamente en el sistema radicular o inclusive en una sola punta de raíz de una planta, pudiendo no ser antagonistas entre sí (Marks & Foster, 1967; Garza, 1991). Las interconexiones pueden formar redes que a su vez conectan plantas de la misma o de diferentes especies a través de las cuales puede ocurrir transporte de nutrientes. El simbionte fúngico depende de la planta para obtener el suministro de carbono, ya que es incapaz de romper y degradar polímeros complejos como la celulosa, pectina y lignina (Harley & Smith, 1983; Harley, 1984).

Las interacciones de los hongos ECM se discuten en relación al desarrollo secuencial de las ectomicorrizas en los sistemas radiculares de los árboles. Los hongos ECM que infectan a plantas en estadios primarios de crecimiento se comportan como pioneros, estos son reemplazados progresivamente por hongos que crecen en estadios secundarios, los hongos pioneros requieren menor cantidad de carbohidratos para su crecimiento en las raíces de las plántulas. Las sucesiones fúngicas se caracterizan por el establecimiento de una especie y su reemplazamiento por otra y estos cambios dependen del suministro de nutrientes disponibles así como de las necesidades de cada especie.

Las sucesiones de hongos ECM no están tan bien documentadas como las sucesiones vegetales o aquellas reportadas para hongos sapróbios. Asimismo, existen estudios sobre hongos ECM que están basados principalmente en la fenología de la producción

de cuerpos fructíferos por un tiempo determinado (Luoma & Trappe, 1992; Fleming, 1983). Mason *et al.*, (1982) observaron las sucesiones de hongos micorrícicos después de registrar los números, tipos y posiciones de cuerpos fructíferos asociados a *Betula pendula* y *B. pubescens*, ellos mencionan que a medida que los árboles maduran, se incrementa el número de fructificaciones de los hongos ECM. Otros autores como Dighton *et al.*, (1985) encontraron una marcada sucesión de hongos ECM en *Picea sitchensis*, en la cual solo algunas especies se presentaron en la plantación inicial y otras en la plantación madura.

Existen otros reportes sobre sucesiones de hongos ectomicorrícicos en plantaciones de coníferas, donde se menciona que los arbolitos jóvenes están infectados principalmente por especies de hongos pioneras, e.g. *Laccaria laccata*, *Thelephora terrestris* entre otros; y los árboles maduros están colonizados por especies secundarias, e.g. *Cantharellus* spp, *Amanita* spp *Boletus* spp, *Suillus* spp, *Russula* spp, entre otras (Dighton, 1987).

Las sucesiones de las comunidades vegetales se han dividido en dos tipos principales: las **sucesiones serales** en las cuales las plantas progresan a partir de comunidades herbáceas y culminan en bosques clímax. En este tipo de sucesiones las comunidades primarias con plantas herbáceas tienen hongos VA en sus sistemas radiculares y conforme la sucesión avanza hacia un bosque clímax se inicia su reemplazamiento (Mason *et al.* , 1987; Janos, 1980). Existen también **sucesiones de sustrato**, esto es, de manera individual ya que los hongos ECM colonizan diferentemente las raíces durante el año y a diferentes distancias en relación a la base de los árboles. Es muy probable que ambas sucesiones ocurran al mismo tiempo; así los árboles jóvenes están

colonizados por especies de hongos pioneros y secundarios. De tal manera, la sucesión en la mayoría de las comunidades vegetales involucra una dinámica de colonización secuencial y reemplazamiento de especies (Mason *et al.*, 1987).

Algunos estudios revelan que pueden ocurrir asociaciones mixtas de especies de hongos en ectomicorrizas individuales (Marks & Foster, 1976). Los hongos ectomicorrícicos compiten entre sí por el espacio donde encuentran su fuente de energía, los patrones de competencia pueden ser observados cuando se examinan las raíces laterales en las diferentes ectomicorrizas. La examinación microscópica de las ectomicorrizas y de su manto fúngico muestran que pueden existir varias especies a lo largo de las raíces (Frankland, 1981; Garza, 1991).

Marks & Foster, (1967) reportan situaciones donde un tipo de micorriza puede ser reemplazado después de un periodo dormante. Por otro lado, estas observaciones fueron hechas después de examinar una raíz y encontraron dos tipos diferentes de ectomicorrizas en una sola punta de raíz.

Existen pocos estudios sobre competencia entre especies de hongos ectomicorrícicos y todavía no se entienden de manera integral los procesos de sucesión de estos hongos. De igual manera, existen muy pocos trabajos reportados sobre la dinámica del proceso de competencia por establecimiento y reemplazamiento entre las especies pioneras y secundarias de hongos ECM. Asimismo, existe muy poca información sobre la estructura de las comunidades de hongos ECM y los mecanismos por medio de los cuales una especie se establece y es reemplazada por otra. Sin embargo algunos trabajos indican que las especies pioneras son más competitivas que las especies secundarias (Marks & Foster, 1967; Mason *et al.*, 1987).

Para entender estos mecanismos son necesarios estudios más detallados o bien realizar experimentos bajo condiciones semejantes a la naturaleza (Brand, 1991).

La manipulación de las asociaciones ectomicorrícicas constituye uno de los problemas frecuentemente encontrados al estudiar la competencia entre las especies de hongos ECM (Molina, 1980). De esta forma, se han reportado diferentes modelos para la síntesis aséptica de ectomicorrizas, los cuales se han utilizado en estudios sobre fisiología, interacción, especificidad y competencia (Melin, 1923; Fortin, 1966; Molina & Palmer, 1982).

Así resulta de gran relevancia el manejo de hongos ECM comestibles para la inoculación de las plántulas que serán destinadas a plantaciones.

Cuando se descubrió accidentalmente la necesidad del manejo de micorrizas en vivero, surgieron diversos métodos para el inóculo, y esta actividad se convirtió en una rutina año con año en diversos viveros del mundo.

Uno de los métodos utilizados es el de inóculo de suelo, el cual se toma de la planta hospedera, para ello se necesita incorporar un 10% de este suelo a las camas de crecimiento, la velocidad de colonización puede ser rápida con este método pero tiene la desventaja de que se necesitan grandes cantidades de este inóculo, además del acarreo inevitable de semillas de maleza o patógenos radiculares potenciales. El método de plántula-propágulo consiste en utilizar plántulas colonizadas como inóculo, este resulta un método lento e irregular, además tiene también la desventaja de acarrear patógenos. Por otro lado las esporas y esporocarpos de setas, Gasteromycetes y trufas resultan una fuente importante de inóculo; las esporas pueden ser inoculadas por

diversas técnicas como son la dilución, espolvoreo, aspersión o atomización, semillas espolvoreadas con esporas, etc.

El método de cultivo puro de hongos permite que puedan ser evaluados los efectos benéficos a considerar como protección contra enfermedades, requisitos nutricionales y velocidad de crecimiento es el de cultivo puro de hongos (Molina & Trappe, 1982).

Mikola, (1973); Trappe, (1977); Marx, (1975) señalan la importancia de utilizar micelio puro de hongos ECM para la inoculación controlada de plántulas en los viveros, ya que permite la selección de dichos hongos para los propósitos específicos.

Varios estudios muestran que un pre-requisito para que se desarrollen los árboles del bosque es la presencia de los hongos ECM en sus raíces, ciertas especies por ejemplo los pinos, tienen un obligado requerimiento de ECM y no pueden crecer normalmente sin ellas. Este punto tiene importancia significativa en los programas de reforestación utilizando árboles con ECM en las áreas del mundo donde los hongos simbiotes no ocurren normalmente (Marx, 1973).

La importancia del entendimiento de las relaciones entre los disturbios, las condiciones de sitio y las micorrizas no se ha exagerado. La reducción de las poblaciones de las ECM debido a los disturbios de los bosques, varía ampliamente y depende de muchos factores, incluyendo el impacto en la regeneración de los mismos (Amarantus, 1992).

Las ECM son especialmente importantes en áreas con disturbio o áreas que han sido degradadas a través del tiempo, afectando de esta manera a los organismos de la rizosfera por los cambios en las prácticas de manejo. La protección y la restauración de los bosques es una de las metas de las prácticas de manejo de los ecosistemas (Marx, 1975).

Muchos hongos ectomicorrícicos son colectados y aislados en cultivos puros para realizar estudios sobre la capacidad de formar ectomicorrizas y estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas. Este tipo de trabajos son importantes para la selección de cepas nativas que se utilizarán para inoculaciones en vivero; las especies de hongos ectomicorrícicos difieren considerablemente en su crecimiento, fisiología y en los beneficios que proporcionan a sus hospederos. Generalmente se seleccionan las especies que proporcionan mayores beneficios, tomando en cuenta el crecimiento de las cepas *in vitro*, la efectividad para formar ectomicorrizas, sus adaptaciones ecológicas, su agresividad en relación a los microorganismos de la rizosfera y el rango de hospederos entre otros (Marx, 1975).

### **1.1 Justificación**

Las poblaciones de hongos ectomicorrícicos son muy dinámicas y están formadas por muchas especies, las cuales están compitiendo por establecerse en los sistemas radiculares de las plantas. Los estudios sobre interacciones son muy importantes para entender e interpretar la estructura, dinámica y el desarrollo de las comunidades fúngicas (Skidmore & Dickinson, 1976; Trappe & Fogel, 1977; Harley & Smith, 1983; Allen & Allen, 1984). A pesar de que se conoce que los hongos son altamente competitivos (Garbaye, 1982) existen muy pocos estudios acerca de las interacciones de hongos ectomicorrícicos en especies de coníferas.

Es importante llevar a cabo investigaciones sobre las especies de hongos nativos que sean capaces de formar ectomicorrizas con árboles forestales específicos en los programas de producción de plántulas en vivero para posteriores trabajos de

reforestación de áreas con disturbios ó para recuperación de hábitats con características únicas, como es el caso del cerro El Potosí, en el cual encontramos un bosque endémico de *Pinus culminicola*, seriamente afectado por incendios, sobrepastoreo y disturbios antropogénicos. Por otro lado *Pinus pseudostrobus* es una especie económicamente muy importante en la región por la demanda de madera. Cabe señalar la escases de trabajos realizados en México utilizando hongos nativos y no hay información a este respecto sobre el área de estudio y las especies de coníferas seleccionadas.

## 1.2 Objetivo general

Evaluar el efecto de los diferentes tratamientos de inoculación (individuales y mixtos) de hongos ectomicorrícicos en dos especies de coníferas del cerro El Potosí, Galeana, N.L.

### Objetivos específicos

- Evaluar algunos aspectos de interacciones *in vitro* y en vivero entre los hongos ectomicorrícicos (ECM) seleccionados.
- Caracterizar y describir los cultivos puros de los hongos ECM.
- Sintetizar en forma aséptica y no aséptica las ectomicorrizas de los hongos seleccionados con las dos especies de coníferas estudiadas.
- Evaluar los efectos de las inoculaciones individuales y mixtos en el crecimiento de dos especies de coníferas.
- Seleccionar el o los mejores tratamientos que resulten para cada hospedero en cuanto a los diferentes parámetros medidos.





La metodología para los experimentos de competencia *in vitro* y en el vivero esta basada en aquella de los estudios realizados por: Mason *et al.* , (1983), Mason, (1980); Molina, (1979); y Garza,(1991).

## **2.2 Ubicación del área de estudio**

### **Localización**

El cerro " El Potosí " forma parte de la Sierra Madre Oriental al sur del Estado de Nuevo León. Alcanza una altitud de 3670 m.s.n.m. se localiza a 15 km al oeste de Galeana, Nuevo León, entre los 24° 50' 60" y 24° 53' 16" de latitud norte y los 100° 13' 9" y los 100° 15' 12" de longitud oeste. El Potosí se ubica en el flanco occidental de la Sierra Madre, y colinda hacia el suroeste con la Altiplanicie Mexicana. La cima del cerro tiene una longitud de poco más de 1 km y una anchura de 300 a 400 m (García y González, 1991).

### **Suelos**

Su topografía es de lomeríos bajos, haciéndose escarpadas las pendientes en el extremo noreste y el flanco oriental. El sustrato está constituido principalmente por roca caliza, los suelos son delgados, con alta proporción de materia orgánica y están clasificados como una combinación de Litosol y Redzina de textura fina (García y González, 1991)

### **Clima**

La zona presenta el clima del tipo Bshw(e)w", semiseco templado, con lluvias escasas todo el año y más del 18% de precipitación invernal. La precipitación anual oscila entre 400 y 600 mm; el rango de temperatura media anual fluctúa entre 12 y 18 °C, los meses

más cálidos son junio y agosto con una temperatura media entre 18 y 20 °C (García, 1996).

### Vegetación

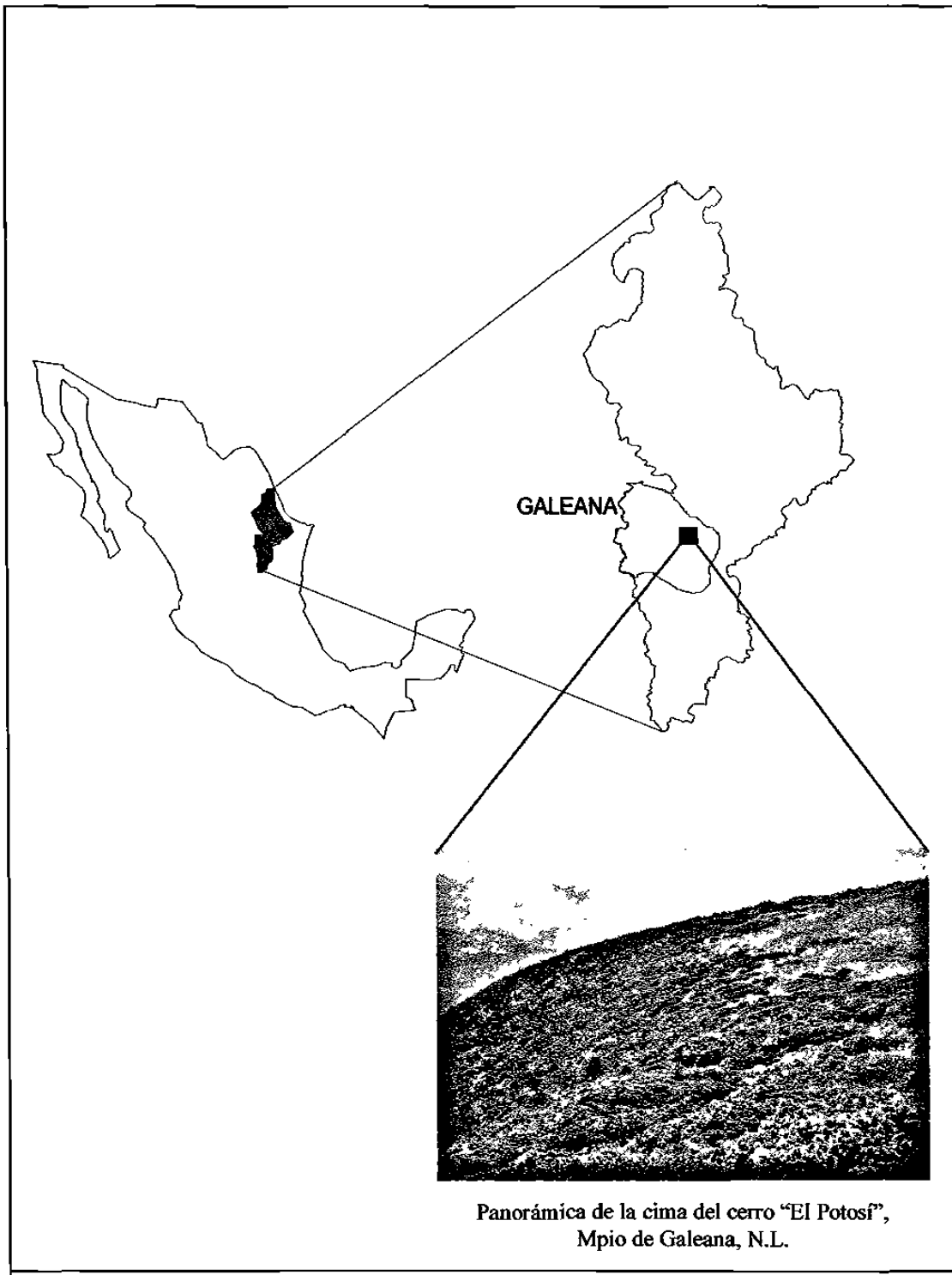
La vegetación que se presenta abajo de los 3500 m.s.n.m. se encuentra en grave estado de deterioro debido a la tala inmoderada, excepto en algunas cañadas y sitios escarpados. A menos de 1700 m.s.n.m. en los alrededores del cerro, se presentan matorrales xerófilos y bosque abierto de *Pinus arizonica* Engelm. y/o *P. cembroides* Zucc. Entre los 2000-2700 m.s.n.m., se encuentran matorrales de *Berberis trifoliata* Moric. , *Juniperus erythrocarpa* Cory. , *Condalia* sp. *Rhus trilobata* Nutt. De los 2070-2180 m.s.n.m., predomina un bosque abierto de *P. arizonica* y *P. cembroides* , que es sustituido por bosques de *Quercus* hasta los 2300 m.s.n.m. destacan *Quercus* aff. *emoryi* Torr. , *Q. greggii* , *Q. affinis* Scheil. , *Q. hypoxantha* Trel. , *Q. crassifolia* H. al. B. y *Q. diversifolia* Trel; así como *Arbutus xalapensis* H. B. K. De los 2300 a los 2600 prevalecen matorrales secundarios de *Quercus* y *Cercocarpus* con individuos aislados de *Pseudotsuga* , así como bosques de *Quercus* con *Pseudotsuga* y *Pinus*.

En los 2560 - 2650 m.s.n.m. , se encuentra un bosque muy perturbado de *P. pseudostrobus* Lindl. , con matorral de *Q. hypoxantha* y *Ceanothus* sp. En exposiciones al norte y oriente entre los 2670-2700 m.s.n.m. destacan *Pinus* y *Pseudotsuga* Carr., y en áreas donde todo el bosque original ha sido talado se encuentran bosquecillos bajos de *Populus tremuloides* Michx. Entre los 2850-2930 m.s.n.m. predomina *P. hartwegii* Lindl. asociado a *P. ayacahuite* Ehr. , en el sotobosque aparecen individuos aislados de *Pinus. culminicola* Andresen & Beaman. De los 2930-3000 m.s.n.m. aparece un matorral denso de *Q. greggii* con individuos

jóvenes de *P. hartwegii* y *Pseudotsuga menziesii* Mirb. (Franco). Por otro lado *P. menziesii*. y *P. ayacahuite*, con escaso *P. hartwegii* y *Abies vejari* Martínez forman bosque semidensos entre los 3000-3200 m.s.n.m. Hacia altitudes más elevadas predomina *P. hartwegii* sustituido en cañadas y exposiciones al norte por *P. ayacahuite* y *A. vejari* hasta los 3470 m.s.n.m.

El bosque de *P. hartwegii*, alcanza la cima del cerro por el lado norte, pero en el declive oriental es sustituido a partir de los 3450 m.s.n.m. por matorral de *P. culminicola* (García y González, 1991).

### 2.3 Localización del área de estudio



Panorámica de la cima del cerro "El Potosí",  
Mpio de Galeana, N.L.

## 2.4 Especies forestales seleccionadas

Las especies seleccionadas son *Pinus culminicola*, Andresen y Beaman; *Pinus pseudostrabus* Lindl. Estas especies son importantes desde el punto de vista económico y ecológico. *P. pseudostrabus*, es una especie muy valorada en esta región por su madera de alta calidad. Por otro lado, *P. culminicola* tiene gran importancia ecológica ya que se trata de una especie endémica al cerro El Potosí que ha sido seriamente afectada por incendios, pastoreo y disturbios antropogénicos.

### 2.4.1 Colecta de semillas y su germinación

Las semillas de las especies de pinos fueron colectadas en el cerro El Potosí con ayuda del personal técnico del laboratorio de semillas de la Facultad de Ciencias Forestales (UANL). En este laboratorio, se realizaron pruebas de flotación y germinación de las semillas para su posterior siembra en el vivero del bosque escuela.

Las semillas se esterilizaron superficialmente con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (30% por 45 min.) y se lavaron 2 veces por 45 minutos cada uno con agua desionizada estéril.

Las semillas se transfirieron a cajas de Petri con medio de agua desionizada agar (ADA), y se incubaron a 20 °C en una cámara bioclimática con un fotoperíodo de 16 hrs. hasta que se requirieron para los experimentos *in vitro*.

## 2.5 Hongos ectomicorrícicos seleccionados

Las especies de hongos seleccionados son *Cantharellus cibarius* Fries, el cual es uno de los hongos comestibles silvestres más conocidos en Europa y Norteamérica. Trappe, (1982) considera a este hongo como uno de los más difíciles de cultivar bajo

condiciones estériles y reporta que tiene un amplio rango de hospederos. (Fries,1979; Moore *et al.*, 1989), estudios sobre *Scleroderma verrucosum* Pers., son muy pocos los realizados. *Pisolithus tinctorius* (Mich. ex Pers.) Coker & Couch es un hongo reportado para 33 países de el mundo y en 38 de 50 estados de los E.U.A., se encuentra asociado con un gran número de hospederos (Molina & Trappe, 1982; Marx, 1976). *Pisolithus tinctorius* es una de las especies más utilizadas para fines de inoculación, dada su facilidad de aislamiento, su rápido crecimiento en condiciones axénicas y su facilidad para producir inóculo en substratos inorgánicos (Trappe & Palmer, 1982) y es uno de las especies de hongos ecológicamente adaptadas a sitios adversos, tales como suelos minados (Marx, 1976). *Pisolithus tinctorius* tiene un gran potencial en la reforestación y la inoculación artificial de numerosas especies en viveros, lo que nos indica que tiene un amplio potencial para aumentar la sobrevivencia y crecimiento de las plantas. La cepas utilizada en este estudio fueron colectada en el cerro El Potosí. *Lepista nuda* Bull ex Fr Cooke, es un hongo que ha sido colectado en el cerro El Potosí en la época de lluvias a 3100 m.s.n.m y se asocia micorrícicamente con *Pinus hartwegii*, *Pinus pseudostrobus* y *Pseudotsuga menziesii* (Arias, 1994).

## 2.6 Aislamiento de hongos ectomicorrícicos

Se llevaron a cabo una serie de colectas de material fúngico del cerro El Potosí, con el fin de obtener los cultivos puros de hongos ectomicorrícicos.

Los cultivos puros se aislaron a partir de tejido del contexto de los cuerpos fructíferos en cajas de Petri con medio modificado de Melin Norkans (MMN), incubándose enseguida a una temperatura de 26 °C. Para el mantenimiento de las colonias en

estado puro se procedió a la técnica de transferencias sucesivas. Estas cepas se utilizaron para la producción semimasiva del inóculo miceliar, así como para su posterior reconocimiento y caracterización *in vitro*.

### **2.7 Crecimiento y caracterización de cultivos puros de los hongos seleccionados**

Se llevó a cabo el reconocimiento de las cepas con ayuda de un microscopio compuesto obteniéndose una descripción detallada de cada uno de los cultivos puros de los hongos esta incluye características macroscópicas (e.g color del micelio, apariencia, cambios de coloración del medio de cultivo) y características microscópicas (e.g. diámetro de las hifas, presencia o ausencia de fibulas, reacciones químicas con KOH y solución de Melzer).

Por otro lado se realizaron mediciones del crecimiento miceliar de cada una de las especies. Esto se realizó por 10 días a una temperatura de incubación de 30 °C utilizando el medio de cultivo MMN con un pH de 6, empleándose 5 repeticiones para cada cepa. Se elaboraron figuras del crecimiento radial de cada hongo ectomicorrícico.

### **2.8 Interacciones de cultivos *in vitro***

Se procedió a aparear colonias de las especies de hongos ectomicorrícicos seleccionados en cajas de Petri con medio de MMN a un pH de 6.4. Para la inoculación se utilizaron discos de 5 mm de diámetro tomándose del margen de las colonias con crecimiento activo de cada una de las especies. Se confrontaron todas las posibles tratamientos y se incuban a 25 °C en la oscuridad por 5 semanas, una vez alcanzado un equilibrio en el

crecimiento (ca. 5 semanas) se realizaron las observaciones de las hifas que se encuentran en la zona de interacción.

### 2.8.1 Diseño experimental: *in vitro*

	<b>Cc</b>	<b>Pt</b>	<b>Sv</b>	<b>Ln</b>
<b>Cc</b>	*Cc X Cc	Cc X Pt	Cc X Sv	Cc X Ln
<b>Pt</b>	Pt X Cc	*Pt X Pt	Pt X Sv	Pt X Ln
<b>SV</b>	Sv X Cc	Sv X Pt	*Sv X Sv	Sv X Ln
<b>Ln</b>	Ln X Cc	Ln X Pt	Ln X Sv	*Ln X Ln

Cc = *Cantharellus cibarius*

\* Tratamientos Testigos

Pt = *Pisolithus tinctorius*

Sv = *Scleroderma verrucosum*

Ln = *Lepista nuda*

### 2.9 Síntesis aséptica de ectomicorrizas *in vitro*

La síntesis de ectomicorrizas *in vitro* se realizó con plántulas de *Pinus pseudostrobus*.

Se utilizaron cajas de Petri plásticas, las cuales se les corto un triángulo de aproximadamente 0.5 cm del margen de la tapa y de la base. Las cajas contenían 30 ml medio de agua desionizada agar (ADA), el cual no tiene nutrientes y facilita el establecimiento de los hongos micorrícicos en las raíces de las plántulas (Mason, 1980).

Se colocaron 4 discos de 5mm de diámetro de cada una de las especies de los hongos ECM en cajas Petri con MMN y se incubaron a 25°C durante 1 semana. Las plántulas de 1 mes de edad, germinadas en condiciones estériles (ver Figura 3.5), se colocaron dentro de las cajas Petri a través de los orificios realizados, colocándose el sistema radicular bajo el medio de cultivo (ADA), las cajas se sellaron con cinta parafilm y los



orificios se sellaron con lanolina esterilizada, para evitar la entrada de contaminantes y mantener la humedad dentro de la caja.

Se incubaron en una germinadora a una temperatura de 26 °C con un fotoperiodo de 16 horas por 2 meses. Posteriormente se tomarán muestras de raíces para observar la colonización micorrícica.

### **2.10 Síntesis no aséptica de ectomicorrizas**

Esta, se realizó con plántulas de *P.pseudostrobus* y *P. culminicola*, las cuales fueron germinadas en contenedores tipo bloque con sustrato de peat moss-perlita en una proporción de 4:1 y mantenidas en el Bosque Escuela de la UANL durante 6 meses. Estas plántulas se inocularon en el mes de junio con los hongos ectomicorrícicos seleccionados y se mantuvieron en el bosque escuela de la UANL durante 2 meses, tiempo óptimo para el establecimiento de los hongos ECM.

Los muestreos para determinar el porcentaje de micorrización, se hicieron mediante el método visual, el cual consistió en seccionar la raíz de cada una de las plántulas micorrizadas en tres partes revisándose cada una de ellas bajo el microscopio estereoscópico, asignando un valor a cada sector en la base a los rangos ya establecidos (0-25, 25-50, 50-75, 75-100). Enseguida se procedió al reaislamiento de las ectomicorrizas para corroborar su identidad.

### 2.10.1 Diseño experimental

4 hongos ectomicorrícicos ( tratamientos )

2 hospederos

5 repeticiones

<b>HOSPEDEROS</b>		
	<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Pinus culminicola</i>
<b>H</b>		
<b>O</b>	<i>Cantharellus cibarius</i>	<i>Cantharellus cibarius</i>
<b>N</b>	<i>Pisolithus tinctorius</i>	<i>Pisolithus tinctorius</i>
<b>G</b>	<i>Scleroderma verrucosum</i>	<i>Scleroderma verrucosum</i>
<b>O</b>	<i>Lepista nuda</i>	<i>Lepista nuda</i>
<b>S</b>	Testigo	Testigo

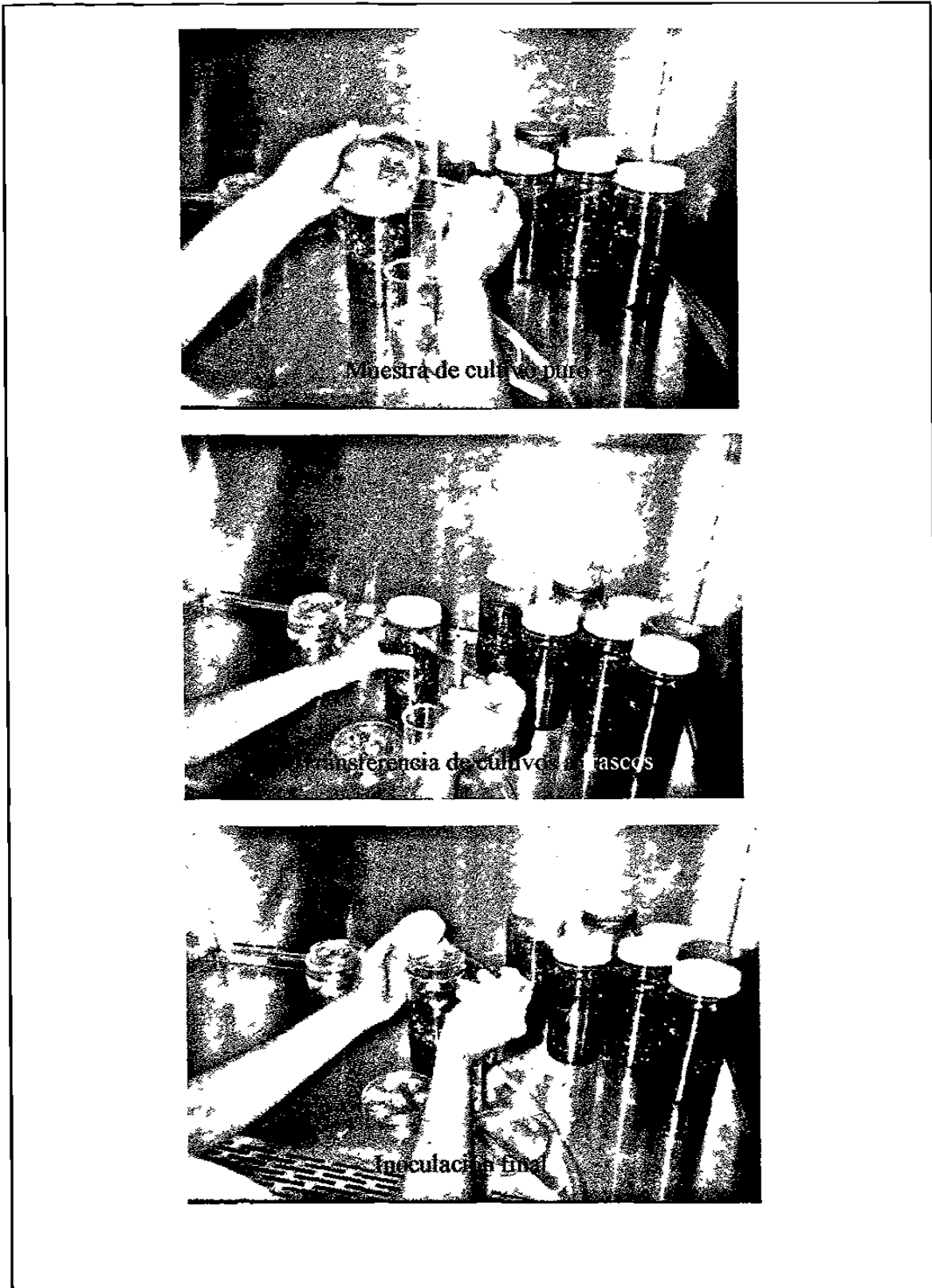
### 2.11 Reaislamiento de ectomicorrizas

Para el reconocimiento de las características del manto fúngico, se extrajo una muestra de ectomicorrizas del interior del medio de cultivo y se colocó en la superficie del medio MMN de la caja Petri donde se reaislan , después de 3 a 4 días de incubación a 25°C se observó el color del manto y de la colonia. Posteriormente se realizó un análisis microscópico para observar las fibulas.

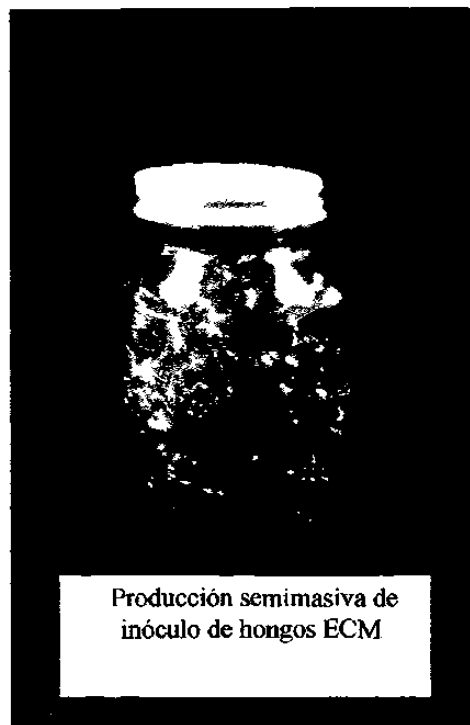
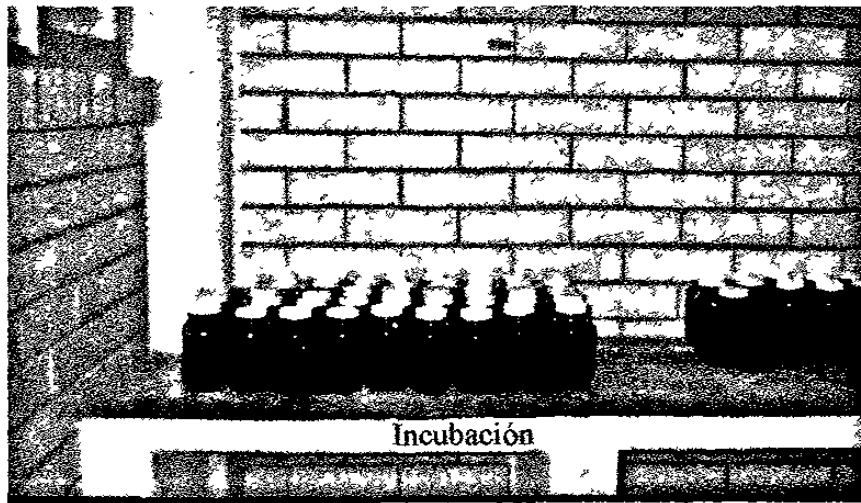
### 2.12 Producción semimasiva del inóculo de los hongos

Para la producción semimasiva de inóculo se utilizaron 100 frascos de vidrio de 1 litro, los cuales se llenaron a  $\frac{3}{4}$  partes de su capacidad con una mezcla de 4:1 de peat moss-perlita, humedecidas con 200 ml de medio líquido de MMN a 1/10 de su concentración original. Estos se esterilizaron durante 1 hora a 120°C. Una vez fríos los frascos se

inocularon con todo el contenido de una caja Petri con una colonia con crecimiento activo en MMN de cada especie. Los frascos se incubaron a 25°C durante un mes. Cada frasco fue agitado manualmente, con el fin de fragmentar el micelio y activar el crecimiento del mismo (ver Figura 2.1 y 2.2).



**Figura 2.1 Inoculación de frascos para producción de inóculo**



**Fig 2.2 Producción semimasiva de inóculo**

### 2.13 Competencia por establecimiento en vivero

Se realizó la siembra de las semillas en contenedores, utilizando un sustrato artificial de peat moss-perlita. Las plántulas se mantuvieron en el vivero Bosque Escuela por 6 meses. Posteriormente las plántulas de *P. pseudostrobus* y *P. culminicola* se inocularon con 27.6 gr del inóculo producido en frascos de cada una de las especies de hongos ectomicorrícicos seleccionados en la proporción 50/50 de peat moss- perlita y la cepa del hongo. Transcurridos 2 meses, el tiempo necesario para el establecimiento de los hongos ECM, se realizaron muestreos sin reemplazamiento cada mes durante 3 meses con 5 repeticiones, donde se tomaron los siguientes parámetros: altura de la plántula, diámetro del cuello de la raíz, largo del sistema radicular, porcentaje de micorrización, peso fresco y peso seco de la parte aérea y el sistema radicular. Esto con el propósito de comparar el desarrollo en el tiempo de los diferentes tratamientos en las plántulas inoculadas y el testigo. Para los muestreos se seleccionaron cinco plántulas al azar por tratamiento.

**2.13.1 Diseño experimental**

2 hospederos  
 5 repeticiones  
 12 tratamientos

HOSPEDEROS		
	<i>Pinus culminicola</i>	<i>Pinus pseudostrobus</i>
T	A	A
R	B	B
A	C	C
T	D	D
A	AxB	AxB
M	BxC	BxC
I	CxD	CxD
E	AxC	AxC
N	BxD	BxD
T	AxD	AxD
O	AxBxCxD	AxBxCxD
S	E	E

A= *Cantharellus cibarius*  
 B= *Scleroderma verrucosum*  
 C= *Lepista nuda*  
 D= *Pisolithus tinctorius*  
 E= *Testigo*

**2.13.2 Parámetros medidos**

a) Porcentaje de micorrización

Método visual: Se observó el sistema radicular de cada plántula por el método visual, seccionándose este en tres estratos, superior, medio e inferior, asignándose un

porcentaje para cada estrato, tal porcentaje se obtiene ubicando cada estrato dentro del rango mencionado en la sección 2.8. Para obtener el porcentaje de micorrización total para cada plántula se realizó la sumatoria de las medias de los tres estratos y se dividió entre tres.

b) Altura de las plántulas: Se midió a partir del cuello de la raíz a 5 cm del suelo hasta el meristemo apical.

c) Diámetro del cuello de la raíz: Se midió con un vernier (mm) en las plántulas muestreadas.

d) Largo del sistema radicular: Las plántulas se sacaron de las macetas cuidadosamente, el sistema radicular se midió con una cinta métrica.

e) Peso fresco y peso seco de la parte aérea y radicular: Se midió el peso fresco de ambos con una balanza analítica. Los sistemas de ambos se secaron en un horno a 80° C por 24 hrs y se midió el peso seco de igual manera con una balanza analítica.



## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Crecimiento y caracterización de cultivos puros de los hongos seleccionados

Uno de los requerimientos fundamentales para el entendimiento de las ectomicorrizas en los ecosistemas, es obtener la caracterización e identificación de las diferentes formas que se presentan ( Miller *et al.*, 1983). Para este experimento se procedió como se menciona en la sección 2.7.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes crecimientos radiales de los 4 hongos ectomicorrícicos  $Pr > F = .0001$  (ver apéndice A tabla 1) (ver Figura 3.1 y 3.2).

**Tabla 3.1. Características de crecimiento *in vitro* en medio de MMN modificado, a un pH de 6.4 y a una temperatura de 30° C en 10 días**

Especie	Colonia	Crecimiento x día	Color del medio	Diámetro y Características	Rx. KOH Y Melzer	Fibulas
<i>Lepista nuda</i>	Micelio blanco, centro con tintes violáceos	0.075-2.2555 cm	No presenta cambios de coloración	2-6 µm pared delgadas, lisas, septadas, no ramificadas	hialinas en KOH y ligeramente dextrinoides en Melzer	Abundantes
<i>Scleroderma verrucosum</i>	Micelio color blanco algodonoso	0.155-3.4052 cm	No presenta cambios de coloración	1.6-3.2 µm Pared delgada, ramificadas, septadas	hialinas en KOH y ligeramente dextrinoides en Melzer	Abundantes
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Micelio color café amarillento claro al inicio, más oscuro y rojizo con la edad algodonoso	0.0125-0.572 cm	El medio de cultivo se tiñe de color café amarillento	3.2-6.4 µm Moderadamente gruesas, septadas y ramificadas, granulaciones en las hifas	Ligeramente dextrinoides en KOH y Melzer	Abundantes
<i>Cantharellus cibarius</i>	Micelio color anaranjado claro, oscureciéndose con la edad, crecimiento gelatinoso, inmerso sobre el medio de cultivo Formación de esclerocios	0.1-0.72 cm	El medio se tiñe de color café amarillento oscuro	2.4-5.6 µm hifas septadas, embebidas en una capa gelatinosa, incrustaciones en la pared de 8.8-12.0 µm	hialinas en KOH y Melzer	Abundantes

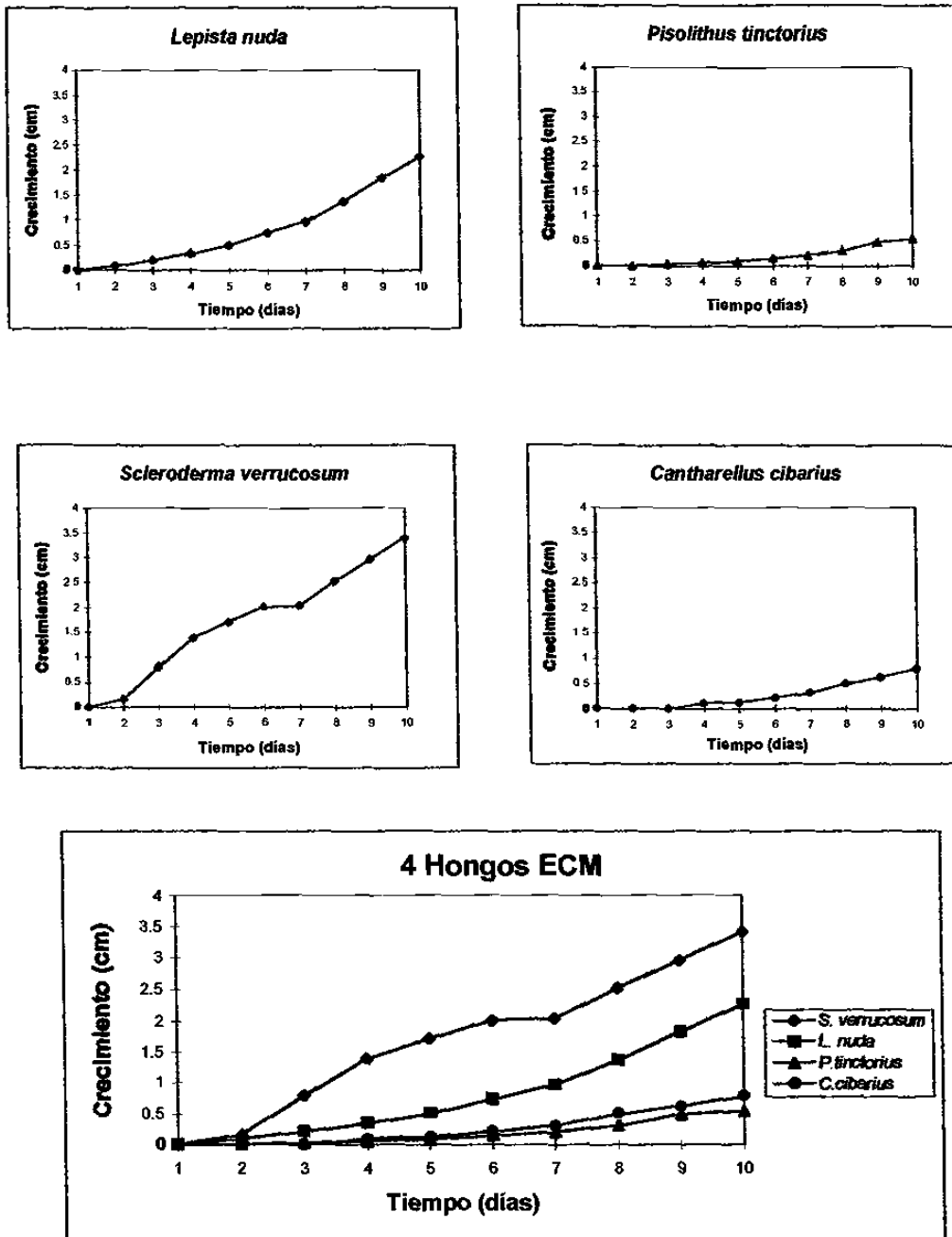


Figura 3.1 Media del crecimiento *in vitro* de las especies seleccionadas en medio de Melin Norkans modificado

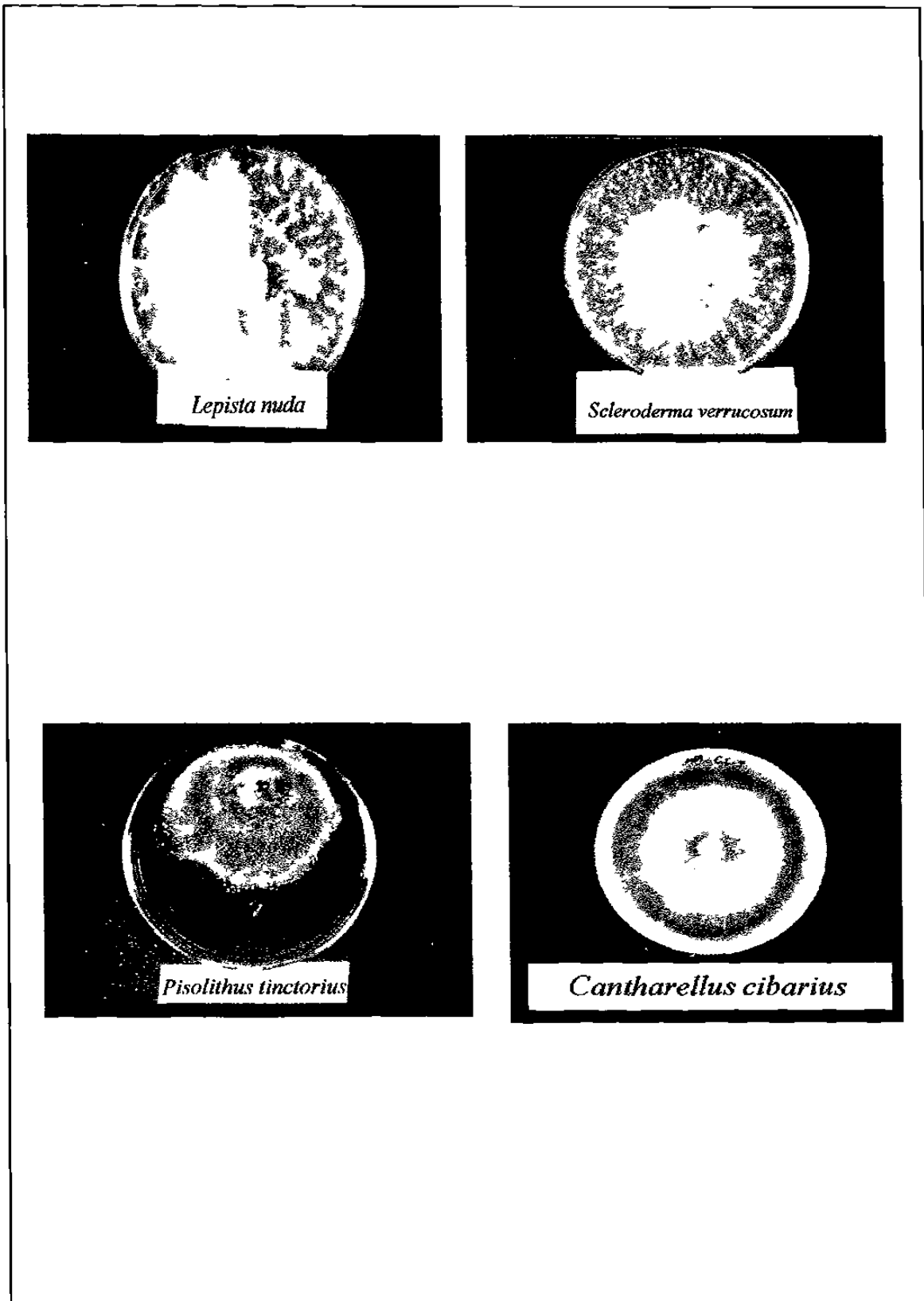


Figura 3.2 Cultivos puros de las especies de hongos ectomicorrícicos obtenidos.

### 3.2 Interacciones de cultivos *in vitro*

Los pareados de cepas se realizaron como se describe en la sección 2.8 y después de 6 semanas de haberse realizado los pareados se observaron las siguientes interacciones:

#### 3.2.1 *Lepista nuda* x especies

*L. nuda* creció sobre la colonia de *P. tinctorius*, *S. verrucosum* inhibió el crecimiento de *L. nuda*. En la combinación de *L. nuda* con *C. cibarius* se formó una línea de separación entre las colonias sin ocurrir sobrecrecimiento (ver tabla 3.2). En el pareado de *L. nuda* con *P. tinctorius* se observaron las hifas de *L. nuda* retorcidas y con las puntas ligeramente redondeadas, las hifas de *P. tinctorius* presentan gran cantidad de fíbulas y un aspecto deformado. En el pareado con *S. verrucosum* las hifas de *L. nuda* presentan gran cantidad de fíbulas y puntas redondeadas; las hifas de ambos se entremezclan, diferenciándose perfectamente entre sí ( ver tabla 3.2 ).

#### 3.2.2 *Scleroderma verrucosum* x especies

*S. verrucosum* creció sobre *P. tinctorius* inhibiéndolo. *S. verrucosum* creció más rápido que *L. nuda* con sobrecrecimiento. Por otro lado *S. verrucosum* inhibió el crecimiento de *C. cibarius*, observándose también sobrecrecimiento (ver tabla 3.2).

En el pareado de *L. nuda* con *P. tinctorius*, las hifas de *L. nuda* se observan abundantes fíbulas, tienen puntas de las hifas redondeadas y sobresalen hifas retorcidas. Por otro lado, en las hifas de *P. tinctorius* se observan pocas fíbulas. En el pareado con *C. cibarius* se diferencian las hifas de *C. cibarius* en una capa gelatinosa y las hifas de

*S. verrucosum* se observan más oscuras al KOH, retorcidas con las puntas ensanchadas y presencia de fibulas (ver tabla 3.2).

### 3.2.3 *Pisolithus tinctorius* x especies

*L. nuda* inhibió el crecimiento de *P. tinctorius*. De igual manera *S. verrucosum* inhibió el crecimiento de *P. tinctorius* observándose pigmentación de color café claro en el medio de cultivo. Por otro lado *P. tinctorius* creció sobre la colonia de *C. cibarius*, sin detener su crecimiento y *C. cibarius* continuó creciendo inmerso en el medio de cultivo (ver tabla 3.2). En el pareado de *P. tinctorius* con *L. nuda* se observan abundantes fibulas en las hifas de *L. nuda*, en las hifas de *P. tinctorius* se observan gran número de granulaciones adheridas, además de algunas hifas con lisis y dobladas. En el caso del pareado con *S. verrucosum* no se observan granulaciones adheridas a las hifas de *P. tinctorius* (ver tabla 3.2).

### 3.2.4 *Cantarellus cibarius* x especies

*S. verrucosum* inhibió el crecimiento de *C. cibarius*. Con *L. nuda* se formó una línea de separación entre ambos, sin presentar sobrecreciendo solamente provocó un lento crecimiento de *C. cibarius*. En el caso del pareado con *P. tinctorius*, *C. cibarius* creció por abajo de *P. tinctorius*, observándose el crecimiento de ambos en la misma velocidad sin ninguna interacción negativa (ver tabla 3.2). En el pareado con *L. nuda*, se distinguen las hifas de *C. cibarius* en una capa gelatinosa, observándose pocas fibulas. En el pareado con *P. tinctorius* las hifas tienen gran cantidad de fibulas, las hifas se observan grandes y deformes (ver tabla 3.2).

Tabla 3.2 Zona de interacción

Tratamientos de spp ***	Tipo de interacción y especie dominante *	Hifas de contacto **
Ln X Sv	Ant 3(Sv)	a, b
Ln X Pt	Ant 1 (Ln)	e,f
Ln X Cc	Sin 2,5	h
Sv X Ln	Ant 1 (Sv)	a, b, g
Sv X Pt	Ant 1 (Sv)	d, a,
Sv X Cc	Ant 1(Sv)	c
Pt X Sv	Ant 3(Sv)	d, g
Pt X Ln	Ant 3(Ln)	e,f,
Pt X Cc	Sin 2, 5	a
Cc X Sv	Ant 3(Sv)	c
Cc X Ln	Ant 2, 4	f
Cc X Pt	Sin 2, 5	a

\* Tipo de interacción

- 1.- Sobrecrecimiento
- 2.- Sin sobrecrecimiento
- 3.- Inhibición del crecimiento
- 4.- Zona limitante
- 5.- Crecimiento por abajo sin inhibición

\*\*\* Especies

Cc= *Cantharellus cibarius*  
 Pt= *Pisolithus tinctorius*  
 Sv= *Scleroderma verrucosum*  
 Ln= *Lepista nuda*

\*\* Hifas de contacto

- a=Hifas retorcidas  
 b=Puntas con terminaciones redondeadas  
 c=Embebidas en una capa gelatinosa  
 d=Hifas oscuras  
 e=Hifas con granulaciones  
 f=Lisis de Hifas  
 g=Hifas deformes

Sin. = Sinergismo

Ant. = Antagonismo

### 3.3 Síntesis aséptica de ectomicorrizas *in vitro*

La síntesis *in vitro* se realizó en cajas de Petri como se menciona en la sección 2.9 con cada una de las especies de los hongos ectomicorrícicos y *P. pseudostrobis*. Este experimento no se logró realizar con el hospedero *P. culminicola*, ya que no se obtuvo germinación de las semillas en condiciones *in vitro*.

En cuanto a los resultados se observaron los primeros estadios de la colonización ectomicorrícica en el hospedero *P. pseudostrobis* con las 4 especies de los hongos (ver Figura 3.3).



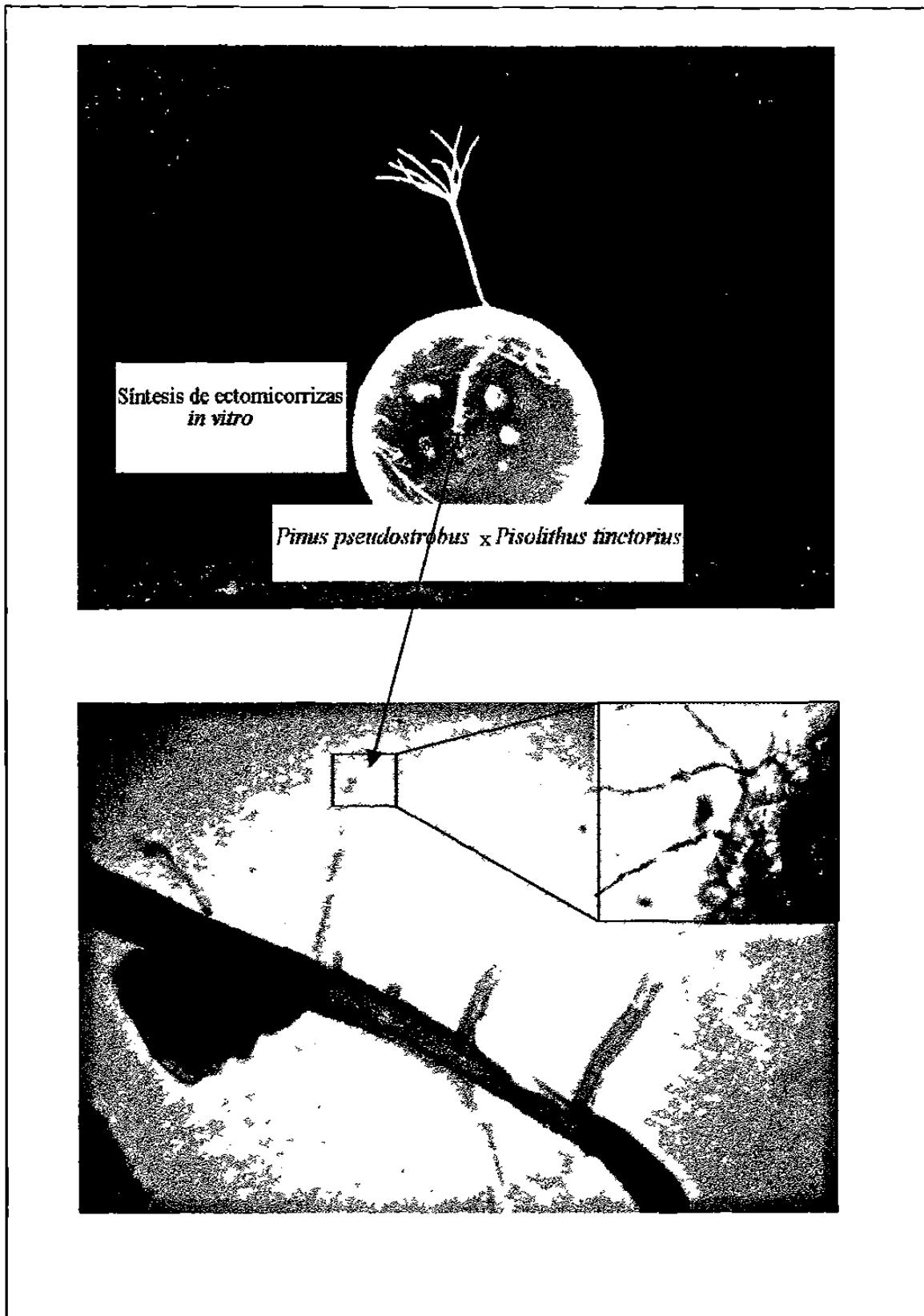
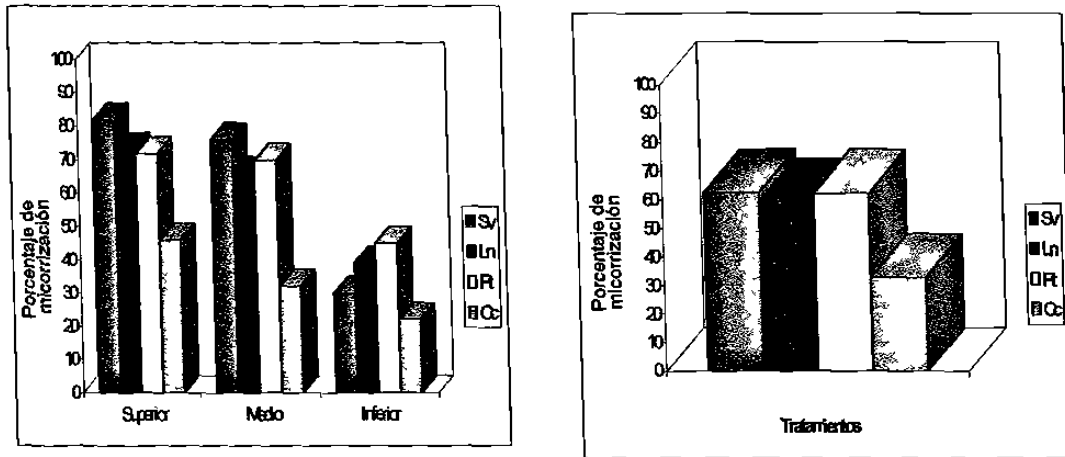


Figura 3.3 Síntesis *in vitro*: Estadios iniciales en la colonización de *Pisolithus tinctorius* en *Pinus pseudostrobus*.

### 3.4 Síntesis no aséptica de ectomicorrizas

El experimento se llevó a cabo como se menciona en el capítulo 2.10 (ver datos en apéndice B tabla 1 y 2). Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para el porcentaje de micorrización de *P. pseudostrobis*  $Pr>F= .0003$  (ver Figura 3.4 y apéndice C tabla 1) Asimismo, se observaron diferencias estadísticamente significativas para *P. culminicola*  $Pr>F=4533$  (ver Figura 3.5 y apéndice C tabla 2) la síntesis no aséptica con respecto al porcentaje de micorrización. Se observó un mayor porcentaje de micorrización en *P. pseudostrobis* con el tratamiento de Sv en el estrato superior. En el hospedero *P. culminicola* el mayor porcentaje de micorrización se obtuvo con el tratamiento Ln en el estrato superior.



*Pinus pseudostrobus*

Figura 3.4 Síntesis no aséptica: Porcentaje de micorrización por estratos y total

*Pinus culminicola*

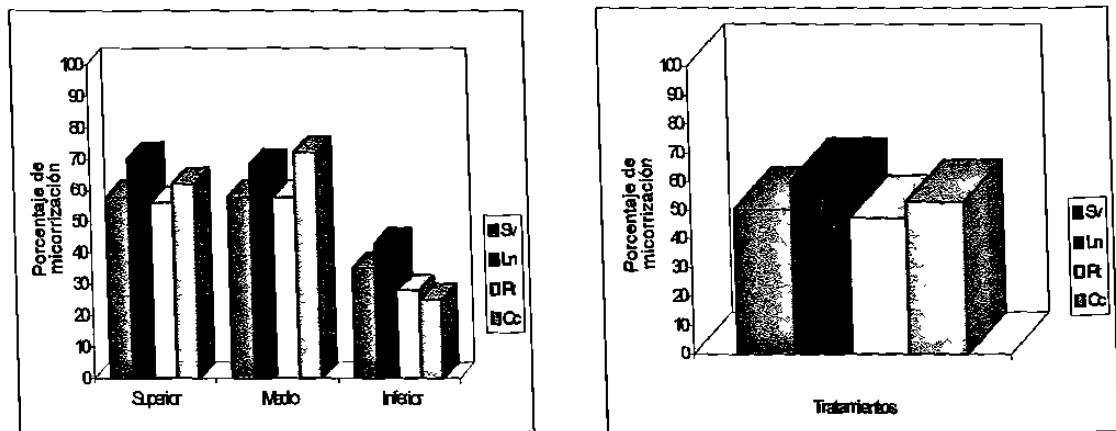


Figura 3.5 Síntesis no aséptica: Porcentaje de micorrización por estratos y total

### 3.4.1 Descripción de las ectomicorrizas

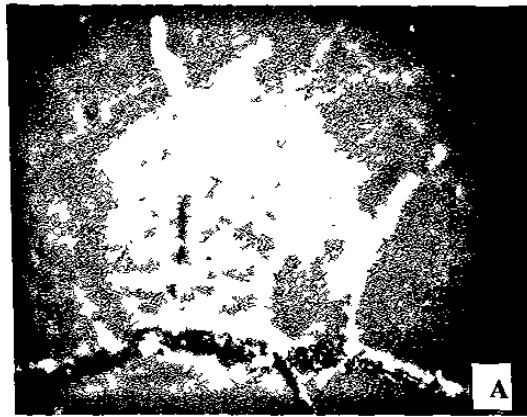
Se observaron diferentes tipos morfológicos de ectomicorrizas, variando desde simples, bifurcadas largas y cortas, dicotómicas, ramificadas, hasta coraloideas en los dos hospederos *P. pseudostrobus* (ver tabla 3.3, Figura 3.6) y *P. culminicola* (ver tabla 3.4, Figura 3.7).

**Tabla 3.3 Ectomicorrizas en *Pinus pseudostrobus***

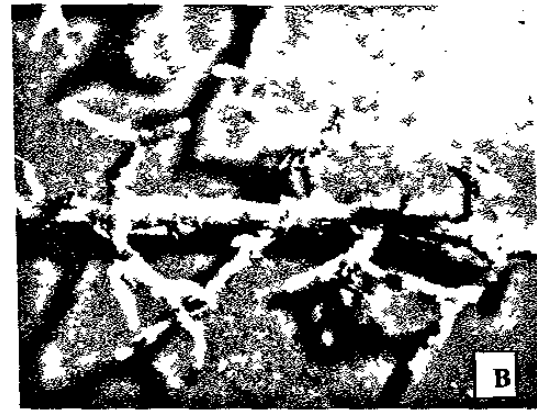
Espece	Forma	Color	Red Hartig	Manto	Fíbulas
<i>Lepista nuda</i>	ramificada dicotómica, coraloide	Café claro	Bien desarrollada	color blanco	Infrecuentes
<i>Scleroderma verrucosum</i>	Dicotómica o bifurcadas cortas	Café claro a oscuro, puntas más claras	Bien desarrollada	color blanco	Abundantes
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Dicotómicas o bifurcadas largas, algunas casi coraloideas	Café claro doradas, otras más oscuras cuando están maduras	Bien desarrollada	color café oscuro	Abundantes
<i>Cantharellus cibarius</i>	Simples y largas, algunas bifurcadas	Café oscuro	Bien desarrollada	color café doradas	Infrecuentes

Tabla 3.4 Ectomicorrizas en *Pinus culminicola*

<b>Especie</b>	<b>Forma</b>	<b>Color</b>	<b>Red Hartig</b>	<b>Manto</b>	<b>Fibulas</b>
<i>Lepista nuda</i>	Ramificada tipo coraloide	Café claro	Bien desarrollada	Poco desarrollado	Infrecuentes
<i>Scleroderma verrucosum</i>	Bifurcadas o dicotómicas cortas	Café oscuro	Bien desarrollada	Poco desarrollado	Infrecuentes
<i>Pisolithus tinctorius</i>	De simples a bifurcadas largas	Café claro doradas, otras más oscuras cuando están maduras	Bien desarrollada	Poco desarrollado	Abundantes
<i>Cantharellus cibarius</i>	Dicotómicas largas	Café oscuro	Bien desarrollada	Poco desarrollado	Infrecuentes



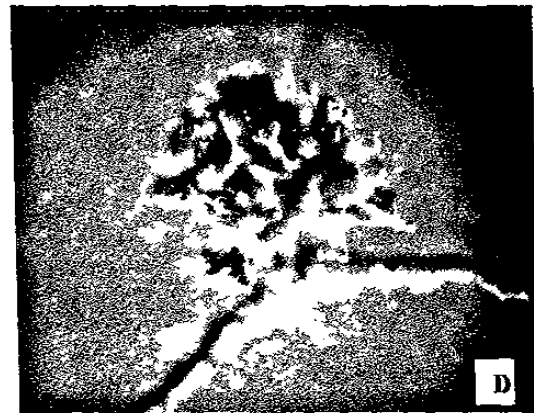
*Pisolithus tinctorius*



*Scleroderma verrucosum*

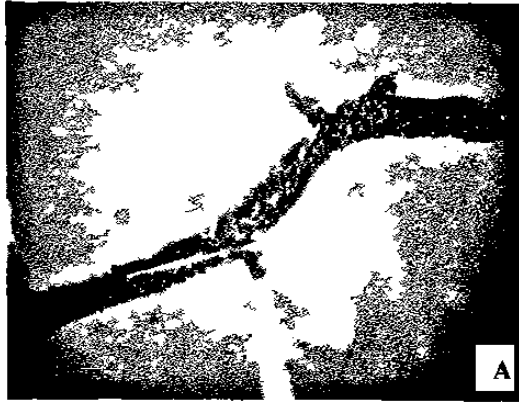


*Cantharellus cibarius*



*Lepista nuda*

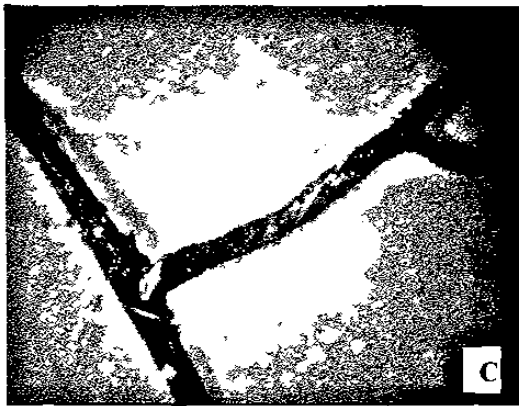
Figura 3.6 Tipos morfológicos de ectomicorrizas de *Pinus pseudostrobus*: A) bifurcadas largas, B) bifurcadas cortas, C) dicotómicas, D) coraloides.



*Cantharellus cibarius*



*Scleroderma verrucosum*

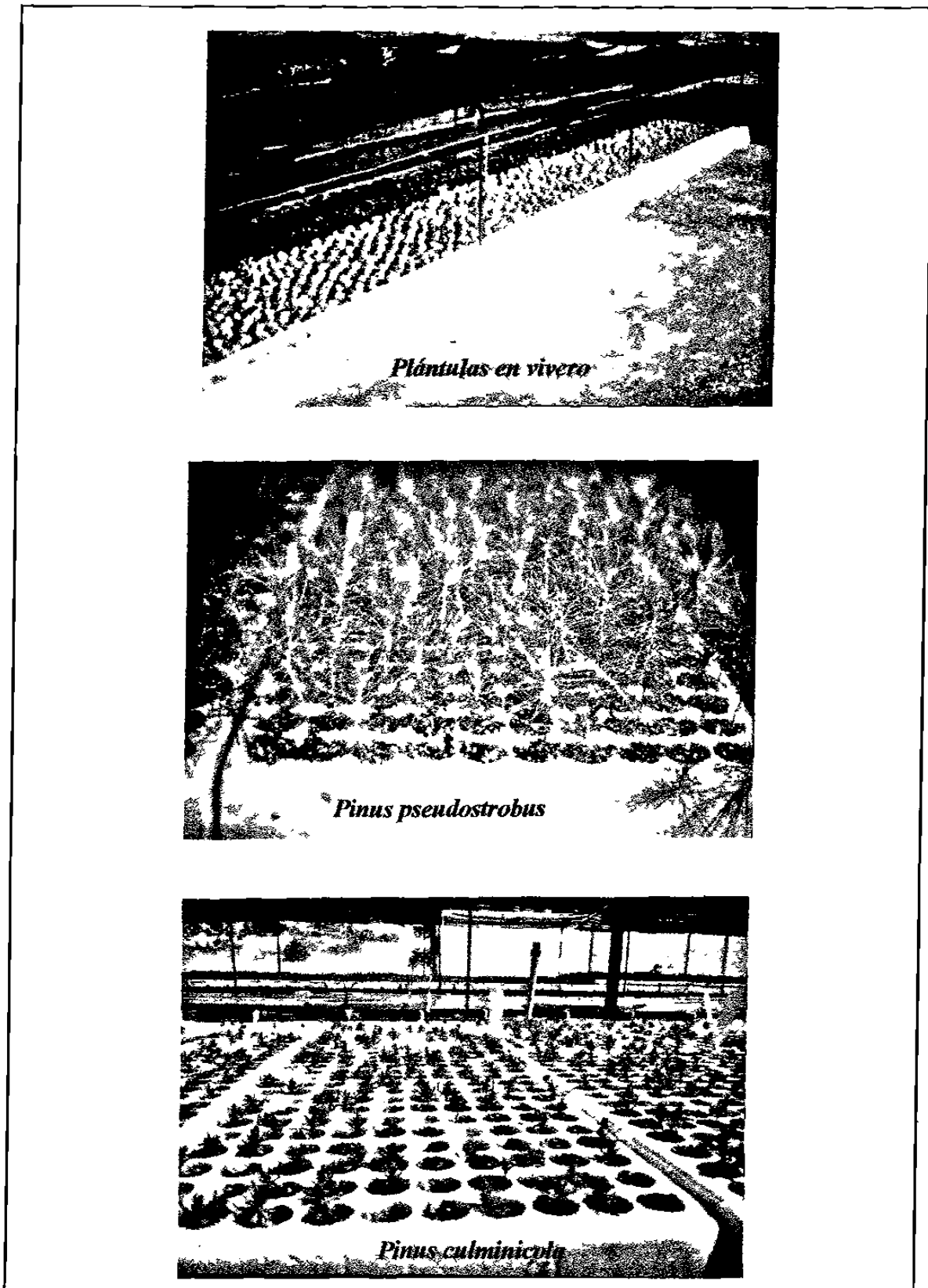


*Pisolithus tinctorius*



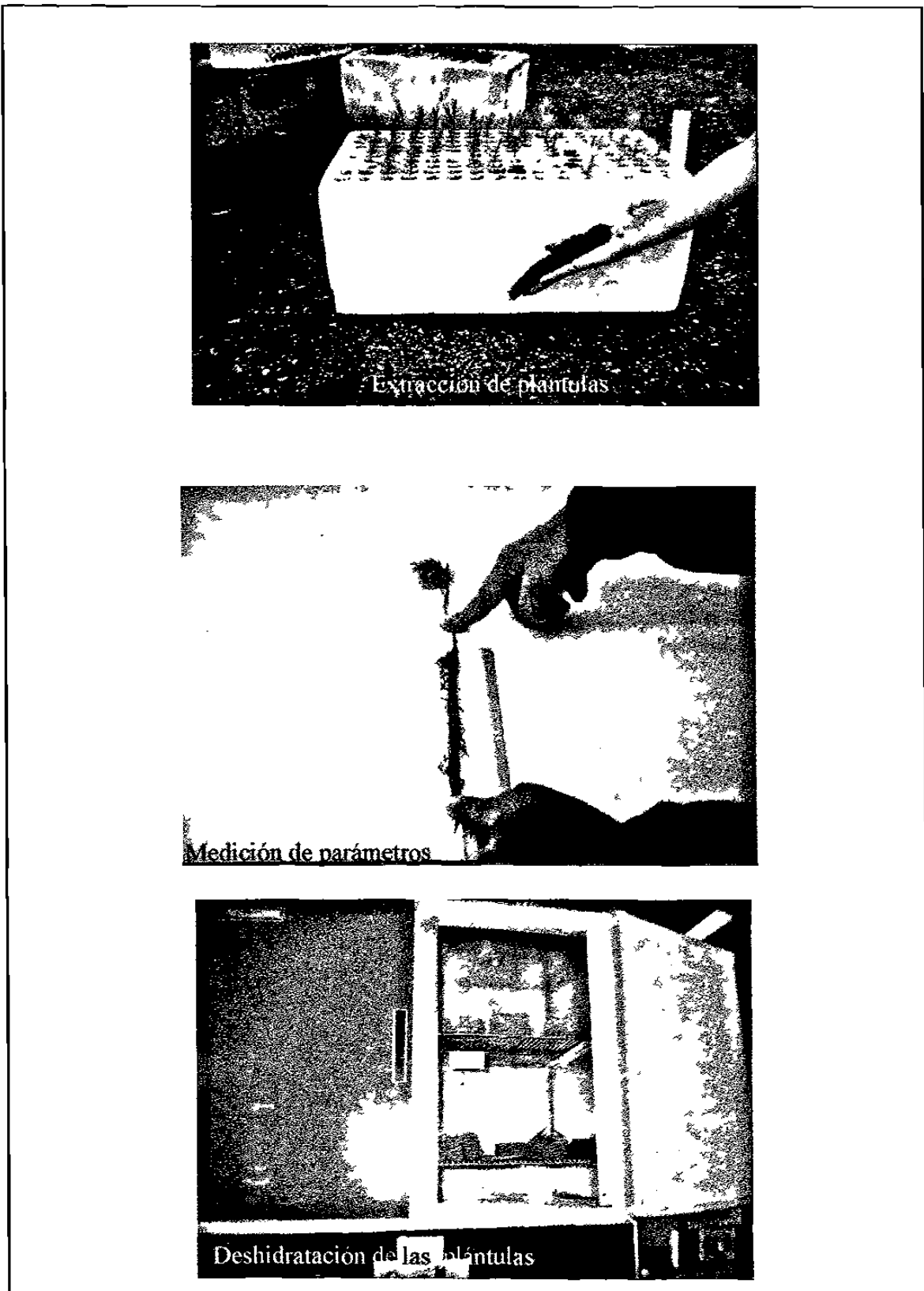
*Lepista nuda*

Figura 3.7 Tipos morfológicos de ectomicorrizas de *Pinus culminicola*: A) bifurcadas cortas, B) bifurcadas cortas, C) bifurcadas largas, D) dicotómicas



**Figura 3.8 Inoculaciones individuales y mixtas en vivero en plántulas de *P. pseudostrobus* y *P. culminicola*.**





**Figura 3.9** Procedimientos para toma de datos en las plántulas inoculadas con los diferentes tratamientos

### 3.5.1 *Pinus pseudostrobus*

#### 3.5.1.1 Porcentaje de micorrización

**Primer muestreo** el tratamiento Ln x Pt presentó el mayor porcentaje de micorrización, los otros mostraron el siguiente orden descendente de micorrización Pt x Cc; Ln; Ln x Cc; todos; Pt; Sv x Pt; Sv x Cc; Cc; Sv x Ln; Sv y finalmente el tratamiento testigo mostró el menor porcentaje de micorrización (ver apéndice D tabla 1 Figura 3. 10 ).

**Segundo muestreo** el tratamiento Pt x Cc presentó el mayor porcentaje de micorrización, los demás tratamientos mostraron el siguiente orden de mayor a menor: Sv x Pt, en segundo lugar Ln x Cc; Pt; Sv x Ln, en el tercer lugar Ln x Pt y el tratamiento de todos; Sv; Sv x Cc; Ln; Cc; y el último lugar el tratamiento testigo (ver apéndice D tabla 2 y Figura 3.10).

**Tercer muestreo** el tratamiento individual de Ln presentó el mayor porcentaje de micorrización, los otros mostraron el siguiente orden descendente: Pt x Cc; Ln x Pt; todos; Sv x Ln; Sv x Pt; Sv x Cc; Cc; Pt; Ln x Cc; Sv observándose el valor más bajo de micorrización para el tratamiento testigo (ver apéndice D tabla 3, Figura 3. 10). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de micorrización para cada uno de los tratamientos en los tres muestreos; un  $Pr>F= .0003$  (ver apéndice F tabla 1)  $Pr>F= .0001$  (ver apéndice G tabla 1) y  $Pr>F= .0010$  (ver apéndice H tabla 1) respectivamente.

*Pinus pseudostrobus*

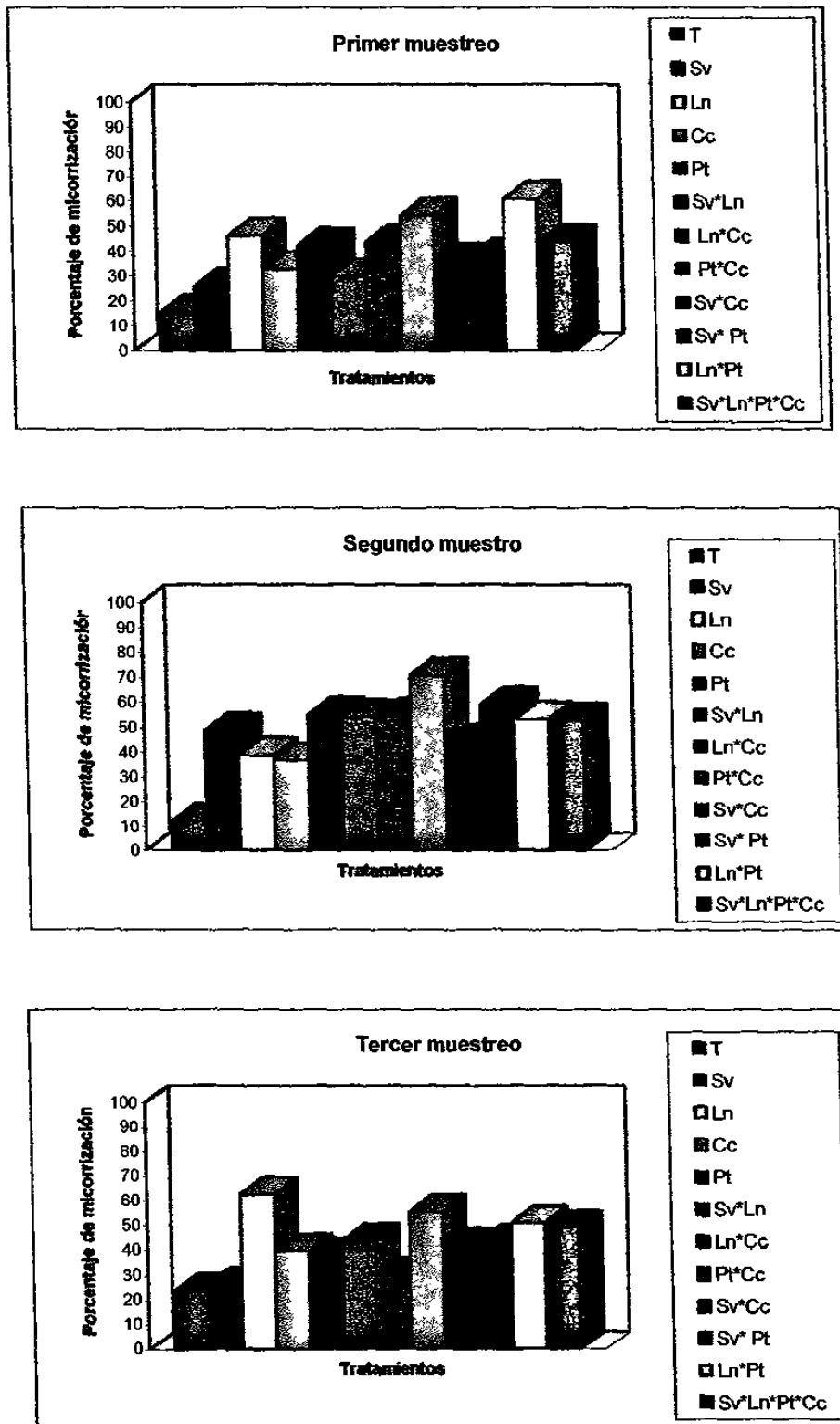


Figura 3.10 Porcentaje de micorrización de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados

### 3.5.1.2 Altura de las plántulas

**Primer muestreo** se encontró una mayor altura de las plántulas inoculadas con Sv x Ln, el menor crecimiento fue para el tratamiento de Sv x Pt, los otros tratamientos muestran el siguiente patrón de desarrollo de mayor a menor: Pt; Sv x Cc; Ln x Cc; Cc; todos; Pt x Cc; Ln; T; Sv (ver apéndice D tabla 1 Figura 3.11).

**Segundo muestreo** se observó una altura notablemente mayor en las plántulas inoculadas con el tratamiento individual de Cc, los otros mostraron en el siguiente orden de mayor a menor: Sv x Ln; Sv x Pt; Pt; todos; Ln x Cc; Ln; Sv; Pt x Cc; Sv x Cc; Ln x Pt y finalmente el tratamiento testigo (ver apéndice D tabla 2 y Figura 3.11).

**Tercer muestreo** se observaron valores muy similares para todos los tratamientos. Sin embargo tuvieron una mayor altura las plántulas inoculadas con el tratamiento mixto de Sv x Ln x Pt x Cc, el menor crecimiento ocurrió en el tratamiento Pt x Cc; los otros tratamientos mostraron el siguiente patrón de mayor a menor Sv; Ln; Sv x Cc; Ln x Cc; Cc; Sv x Ln; Pt; Sv x Pt; Ln x Pt; T (ver apéndice D tabla 5, Figura 3.11).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las alturas de las plántulas de los tres muestreos con  $Pr>F= .0367$  para el primero (ver apéndice F tabla 2), con  $Pr>F= .4183$  para el segundo (ver apéndice G tabla 2), y con  $Pr>F= .0010$  para el tercer muestreo (ver apéndice H tabla 2).

*Pinus pseudostrobus*

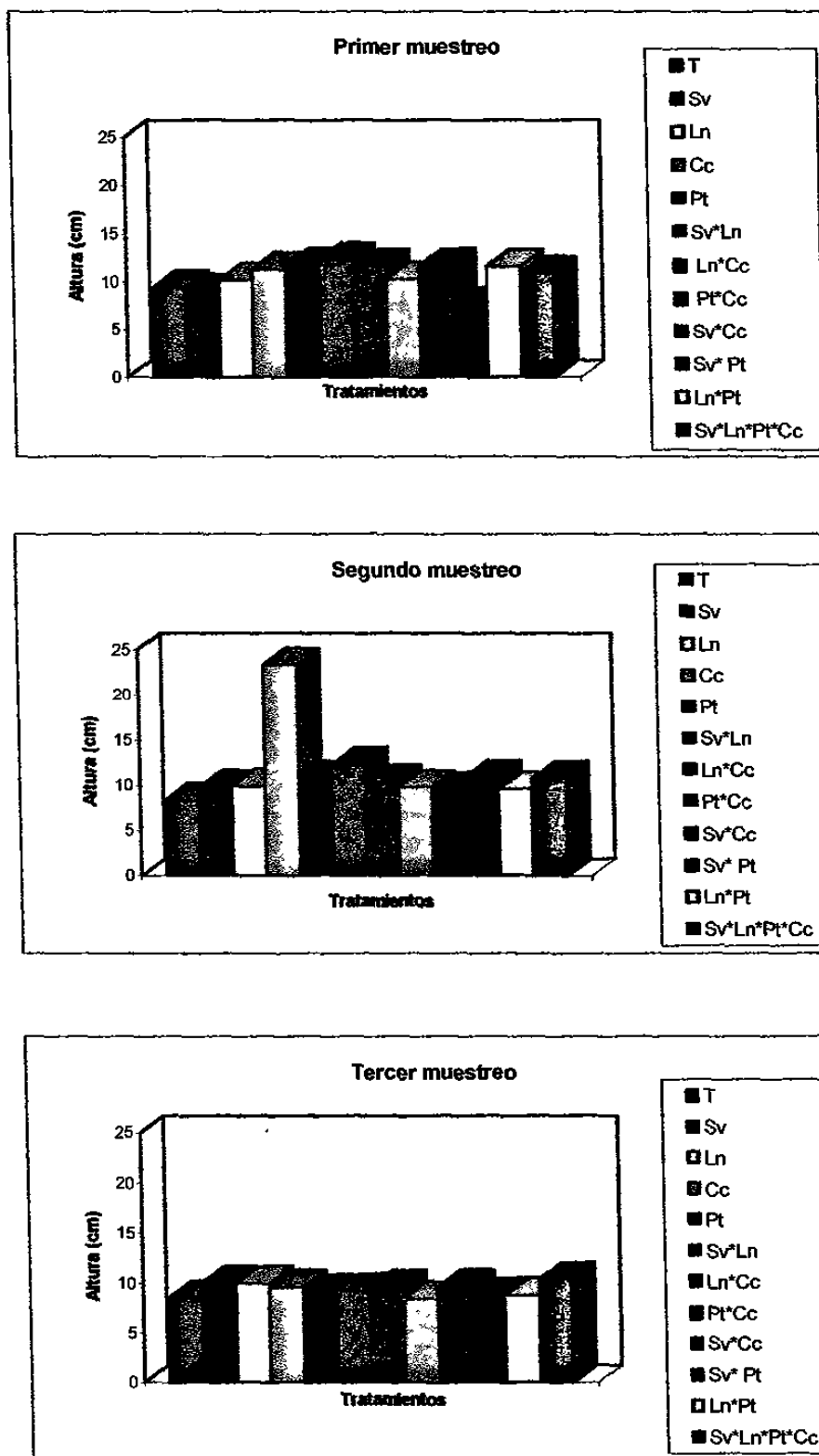


Figura 3. 11 Altura de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados

### 3.5.1.3 Diámetro del cuello de la raíz

**Primer muestreo** se observó un patrón muy similar entre los tratamientos ocurriendo el mayor valor del diámetro del cuello de la raíz en las plántulas inoculadas con el tratamiento de Ln x Pt y el valor más bajo del diámetro del cuello de la raíz en Sv x Pt, los otros tratamientos siguieron el siguiente orden de mayor a menor: Ln; Sv; Pt; Ln x Cc; Pt x Cc; Sv x Cc; T; Cc; Sv x Ln; y todos (ver apéndice D tabla 1 Figura 3.12).

**Segundo muestreo** el mayor valor del diámetro del cuello de la raíz en las plántulas inoculadas fue obtenido por el tratamiento de Sv y el valor más bajo del diámetro del cuello de la raíz en Ln, los otros tratamientos mostraron el siguiente orden descendente: Sv x Ln; Sv x Pt; T; Pt; todos; Cc; Pt x Cc; Ln x Cc; Sv x Cc y Ln x Pt ( ver apéndice D tabla 2 y Figura 3. 12 ).

**Tercer muestreo** se observó el mayor diámetro del cuello de la raíz las inoculadas con los tratamientos de Ln y Sv x Cc y un valor menor del diámetro del cuello de la raíz en el tratamiento testigo, en los otros tratamientos se observó el siguiente orden descendente: Pt x Cc; todos; Sv; Sv x Pt; Ln x Pt; Sv x Ln; Cc; Pt; Ln x Cc (ver apéndice D tabla 3, Figura 3.12).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el diámetro del cuello de la raíz en los tres muestreos con  $Pr>F= .1673$  en el primer muestreo (ver apéndice F tabla 3), con  $Pr>F= .2705$  en el segundo (ver apéndice G tabla 3), y con  $Pr>F= .2438$  en el tercero (ver apéndice H tabla 3).

*Pinus pseudostrobus*

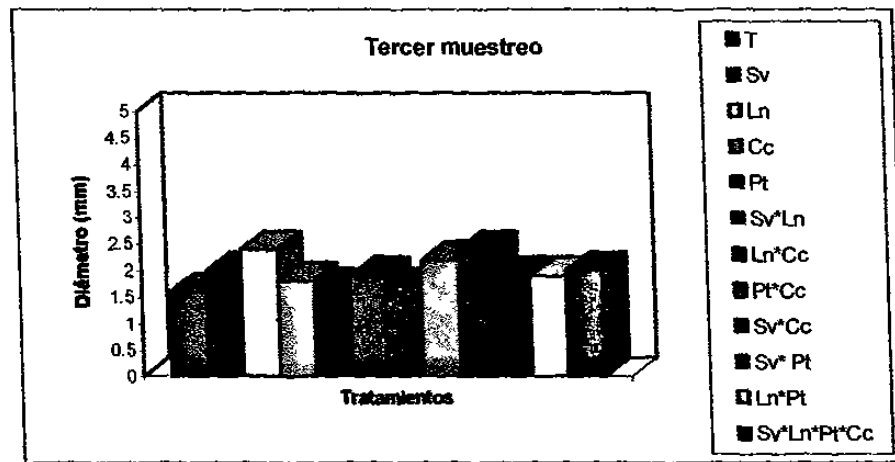
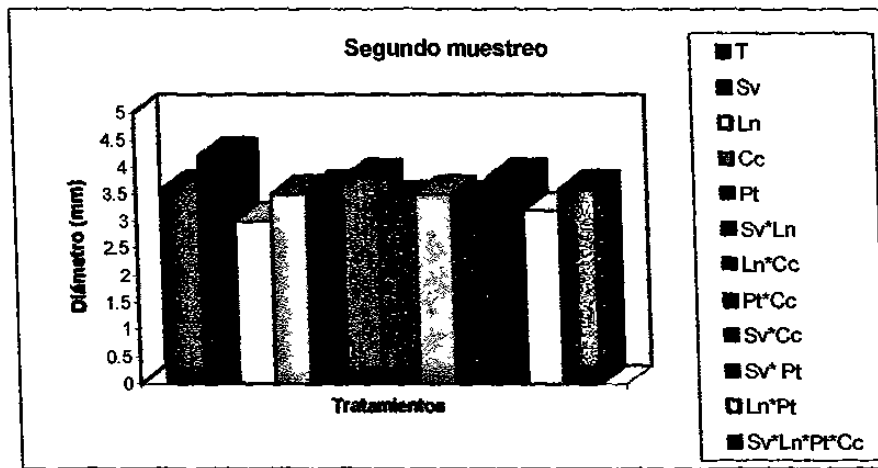
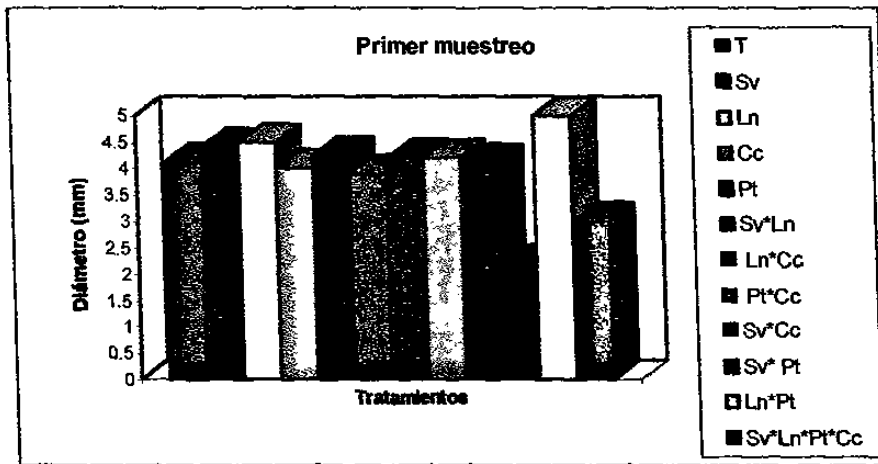


Figura 3.12 Diámetro del cuello de la raíz de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados

#### 3.5.1.4 Largo del sistema radicular

**Primer muestreo** el valor mayor se observó en las plántulas inoculadas con el tratamiento de Pt x Cc, el menor crecimiento de la raíz se observó notoriamente el tratamiento de Sv x Pt, los otros tratamientos mostraron el siguiente orden descendente: Ln x Cc; Ln; Pt; Sv x Ln; Sv; Cc; todos; T; Ln x Pt; Sv x Cc (ver apéndice D tabla 1 Figura 3.13).

**Segundo muestreo** el mayor valor se observó en las plántulas inoculadas con el tratamiento de Pt x Cc, el menor crecimiento de la raíz se observó en el tratamiento de Sv x Ln, los otros tratamientos resultaron semejantes, mostrando el siguiente orden de mayor a menor: Pt; todos; Cc; Sv x Pt; Ln; T; Ln x Cc; Ln x Pt; Sv; Sv x Cc (ver apéndice D tabla 2 y Figura 3.13 ).

**Tercer muestreo** los tratamientos mostraron mucha variación en sus valores, sin embargo el mayor se observó en las plántulas inoculadas con el tratamiento de Ln, y el menor crecimiento de la raíz se observó notoriamente en el tratamiento de Sv x Ln, los otros tratamientos mostraron el siguiente patrón descendente: Cc; Ln x Pt; Sv; todos; T; Pt x Cc; Sv x Pt; Sv x Cc; Pt; Ln x Cc (ver apéndice D tabla 3, Figura 3.13).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas del largo del sistema radicular para cada uno de los tratamientos en los tres muestreos realizados con  $Pr > F = .0004$  en el primer muestreo (ver apéndice F tabla 4), con  $Pr > F = .4292$  en el segundo muestreo (ver apéndice G tabla 4) y con  $Pr > F = .1649$  en el tercer muestreo (ver apéndice H tabla 4).



*Pinus pseudostrabus*

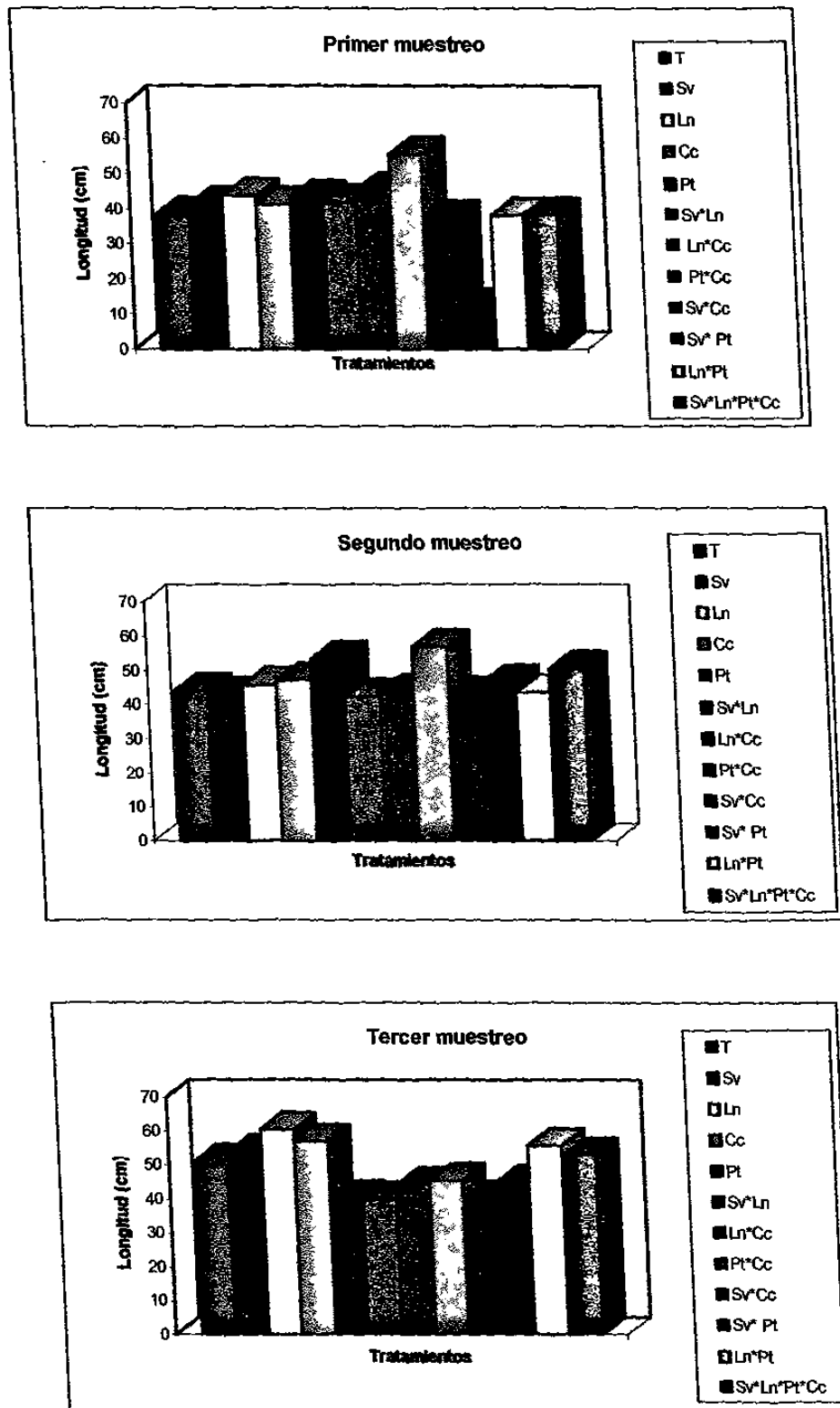


Figura 3.13 Largo del sistema radicular de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados

### 3.5.1.5 Peso fresco aéreo

**Primer muestreo** el valor mas alto del peso fresco aéreo fue el de Ln; proporcionando el valor mas bajo nuevamente el tratamiento Sv x Pt los otros tratamientos fueron muy similares observándose el siguiente orden descendente: Ln x Pt; T; Sv x Ln; Ln x Cc; Sv; Pt; Pt x Cc; Sv x Cc; todos; Cc (ver apéndice D tabla 1 Figura 3.14).

**Segundo muestreo** el valor mas alto del peso fresco aéreo fue el del tratamiento testigo; el valor mas bajo fue el tratamiento Ln x Cc, los tratamientos otros mostraron el siguiente patrón: todos; Cc; Sv x Cc; Sv x Ln; Sv; Ln; Pt x Cc; Pt; Sv x Pt; Ln x Pt (ver apéndice D tabla 2 y Figura 3.14).

**Tercer muestreo** no hubo mucha variación respecto a los valores de cada uno de los tratamientos sin embargo, el valor mas alto del peso fresco aéreo fue el del tratamiento individual Cc; proporcionando el valor mas bajo el tratamiento Ln x Pt (ver apéndice D tabla 3, Figura 3.14).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso fresco aéreo en los tres muestreos para cada uno de los tratamientos. En el primer muestreo con  $Pr>F=.0042$  (ver apéndice F tabla 5), con  $Pr>F=.3188$  en el segundo muestreo (ver apéndice G tabla 5), y con  $Pr>F=.3464$  en el tercer muestreo (ver apéndice H tabla 5).

*Pinus pseudostrobus*

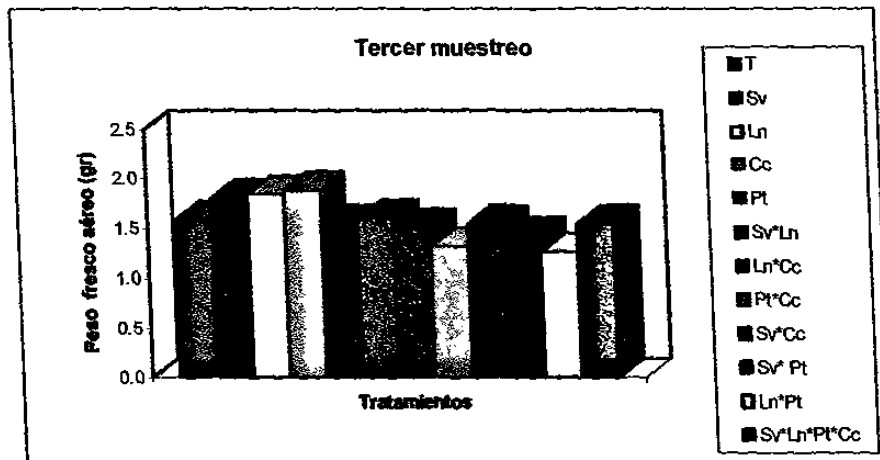
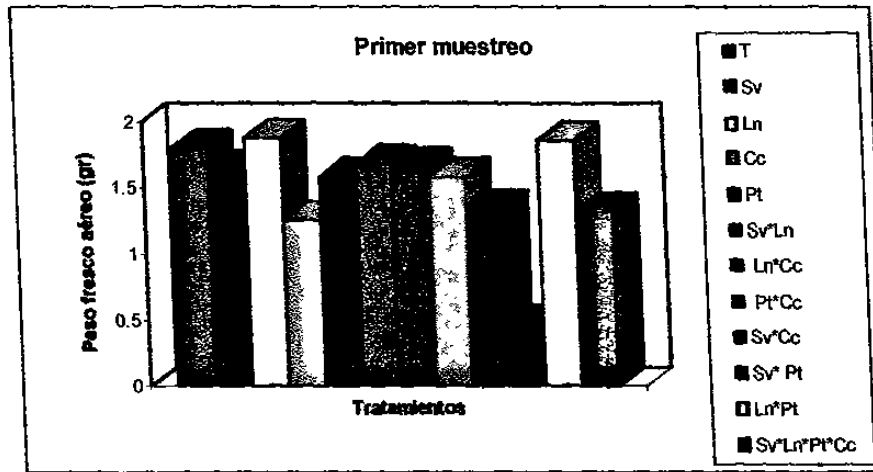


Figura 3.14 Peso fresco aéreo de las plántulas por tratamiento en los muestreos realizados