

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA



Aislamiento e identificación de ectomicorrizas asociadas a *Pinus cembroides* Zucc. en diferentes medios de cultivo *in vitro*

Por:

MÓNICA GABRIELA VALENZUELA CARRIZALES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México.

Junio, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Aislamiento e identificación de ectomicorrizas asociadas a *Pinus cembroides* Zucc. en diferentes medios de cultivo *in vitro*

Por:

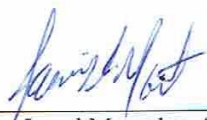
MÓNICA GABRIELA VALENZUELA CARRIZALES

TESIS

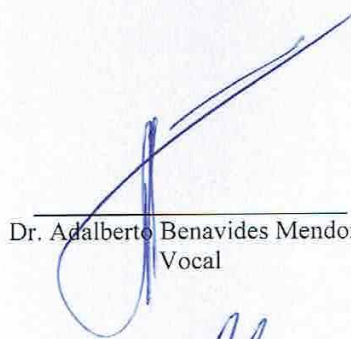
Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por:



Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Presidente



Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Vocal



Dra. Rebeca Casique Valdés
Vocal



Dra. Susana González Morales
Vocal



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México
Junio, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

Aislamiento e identificación de ectomicorrizas asociadas a *Pinus cembroides* Zucc. en diferentes medios de cultivo *in vitro*

Por:

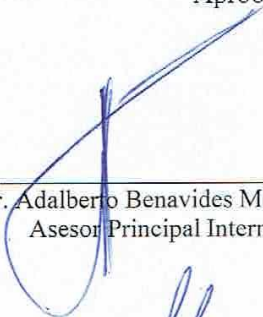
MÓNICA GABRIELA VALENZUELA CARRIZALES

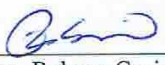
TESIS


Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

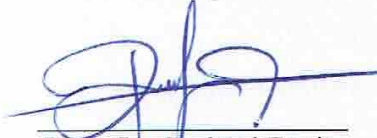
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:


Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor Principal Interno


Dra. Rebeca Casique Valdés
Asesora Principal Externa


Dra. Susana González Morales
Coasesor


Dr. Rufino Sandoval Garcia
Coasesor

Saltillo, Coahuila, México
Junio, 2024

Derechos de Autor y Declaración de no plagio

Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o el autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos del Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.

Autor principal



Mónica Gabriela Valenzuela Carrizales

Agradecimientos

A **Dios** por siempre darme la fortaleza para seguir adelante.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por brindarme una preparación académica, por darme las herramientas para seguir mi camino y perseguir mis sueños.

A mi asesora la **Dra. Rebeca Casique** por su disponibilidad, transmitirme sus conocimientos y pasión por la investigación, por siempre apoyarme y guiarme con paciencia para la realización de todo el proyecto.

A la **Dra. Susana González Morales** por dejarme formar parte de este proyecto y por su disposición durante todo el proceso.

A mis padres **Jesús Rodolfo Valenzuela García** y **Graciela Carrizales García** por apoyarme en todo lo que hago, por impulsarme a siempre dar lo mejor de mí y por creer en mi incluso cuando yo no lo hago.

Dedicatoria

A mis padres, a quienes debo todos mis éxitos, porque su dedicación permanente hacia mí implica que cada victoria y tropiezo es experimentado por ustedes también.

A mi madre **Graciela Carrizales García** por dedicar su vida a cuidarme, por darme una vida feliz y por siempre impulsarme a seguir mis sueños.

A mi padre **Jesús Rodolfo Valenzuela García** por dedicar su vida a darme lo mejor y siempre motivarme a desarrollar todo mi potencial.

A mi hermana **Rebeca Valenzuela Carrizales** quien ha sido mi compañera en cada etapa de mi vida y ha compartido mis alegrías y tristezas.

A mi novio **Cuitlahuac Magdaleno Magniales** por ser mi compañero y sostén en todo momento, siempre disfrutar de la vida conmigo e inspirarme a ser mejor persona.

A mi sobrino **Leonardo Martínez Peralta** quien me hace experimentar un amor que no sabía que existía.

A mis tías **Laura y Vicky** por su apoyo incondicional toda mi vida.

A mis amigas:

Judith Ibarra que ha estado a mi lado durante 11 años, durante los cuales hemos crecido y madurado juntas.

Verenise y Lenica quienes entraron a mi vida en el momento preciso en que lo necesitaba y pase los mejores momentos de mi etapa universitaria.

Abril del Razo Enríquez quien estuvo en la última etapa de mi carrera, me dio consejos no solo de trabajo sino de vida que guardo en mi corazón con agradecimiento

Índice general

I.	INTRODUCCIÓN.....	13
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	17
2.1	GÉNERO <i>PINUS</i>	17
2.2	<i>PINUS CEMBROIDES</i>	17
2.2.1	<i>Pinus cembroides</i> y su interacción con microorganismos.....	18
2.3	MICORRIZAS	19
2.4	RELACIÓN PLANTA-MICORRIZA.....	23
2.4.2	Especies de hongos ectomicorrícicos	28
2.4.3	Uso de ectomicorrizas para el cultivo del pino	29
2.5	CULTIVO DE HONGOS ECTOMICORRÍCICOS	30
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1	SITIOS DE MUESTREO.....	32
3.2	MUESTREO	34
3.3	AISLAMIENTO DE HONGOS ECTOMICORRÍCICOS.....	35
3.3.1	Selección y desinfección	35
3.4	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	36
3.4.1	Cuantificación de ADN por medio de absorbancia.....	37
3.4.2	Reacción en cadena de la polimerasa	37
3.4.3	Electroforesis con gel de agarosa	38
3.4.4	Secuenciación y análisis de secuencias	39
3.5	PRUEBA DE CRECIMIENTO EN MEDIOS DE CULTIVO.....	40
3.5.1	Determinación de crecimiento en diferentes medios de cultivo.....	41
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1	SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	43
4.2	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	44
4.3	CRECIMIENTO <i>IN VITRO</i>	53
V.	CONCLUSIONES.....	55
VI.	LITERATURA CITADA	56

Índice de cuadros

Cuadro 1. Ubicación geográfica y características de los sitios de muestreo.	32
Cuadro 2. Identificación molecular de cepas obtenidas de raíces de <i>Pinus cembroides</i>	45

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de ectomicorriza y endomicorriza. A) Ectomicorizas, B) Endomicorriza, C) Red de Hartig, D) Arbúsculos. Imagen tomada de Albornoz y del Valle (2021).....	21
Figura 2. Formas de ectomicorriza. A) Bifurcada formada por <i>Scleroderma texense</i> en <i>Pinus devoriana</i> . Imagen tomada de Valdés <i>et al.</i> , (2010). B) Forma coraloide en <i>Pinus engelmannii</i> por el hongo <i>Sclerodera citrinum</i> . Imagen tomada de Salcido-Ruiz <i>et al.</i> , (2020).	22
Figura 3. Morfología de Ectomicorizas. A) Dictómicas. B) Monopódicas. C) Ramificada-bifurcada. D) Ramificada-pinada E) Ramificada-bifurcada múltiple. Imagen extraída y modificada de Garibay-Orijel <i>et al.</i> , (2013).	26
Figura 4. Morfotipo de ectomicorriza formada por el hongo <i>Hebeloma mesophaeum</i> en <i>Pinus montezumae</i> . Modificada y extraída de Garibay-Orijel <i>et al.</i> , (2013).....	26
Figura 5. Morfotipo de ectomicorriza formada por el hongo <i>Hebeloma helodes</i> en <i>Pinus montezumae</i> . Modificada y extraída de Garibay-Orijel <i>et al.</i> , (2013).....	27
Figura 6. Morfotipo de ectomicorriza formada por el hongo <i>Cadophora finlandica</i> y Douglas <i>P. montezumae</i> . Modificada y extraída de Garibay-Orijel <i>et al.</i> , (2013).	27
Figura 7. Morfotipo de ectomicorriza formada por el hongo <i>Peziza</i> sp. y <i>P. montezumae</i> . Modificada y extraída de Garibay-Orijel <i>et al.</i> , (2013).....	28
Figura 8. Sitios de muestreo de raíces micorrizadas de <i>Pinus cembroides</i> en rodales ubicados en los estados de Coahuila y Nuevo León.....	33
Figura 9. Sitio de muestreo y herramienta utilizada para la obtención de raíces.	34
Figura 10. Raíces obtenidas con presencia de ectomicorizas.	34
Figura 11. Selección de raíces con morfología de ectomicorizas.	35
Figura 12. Desinfección de raíces de <i>Pinus cembroides</i>	36
Figura 13. Primera fase de la extracción usando nitrógeno líquido.....	37
Figura 14. Proceso de extracción de ADN de cepas aisladas.	38
Figura 15. Reacción en cadena polimerasa (PCR) punto final.	38
Figura 16. Gel de electroforesis en transiluminador.....	39

Figura 17. Establecimiento del cultivo *in vitro* de hongos endófitos y ectomicorrícicos en diferentes medios de cultivo.42

Figura 18. Medición del crecimiento radial del hongo a los 7, 14 y 21 días de incubación.42

Figura 19. Raíces de *P. cembroides* con morfología típica de ectomicorrizas. A) Pinada, B) bifurcada, C) y D) coraloide y E) dictómica ramificada.43

Figura 20. Amplificación de la región ITS para observar la calidad del ADN y el resultado de PCR. A. Carriles 1: CO6-1404 , 2: CO9-1405, 3: CO7-1403, 4: HE-0902, 5: RO-0902, 6: SF1-0504, 7: MO3-0404, 8: SF-2804. B. Carriles 1: CO8-1403, 2: M-0909, 3: ROJ-0404, 4: CO2-2804, 5: CO5-1403, 6: CO-2804, 7: CC-1702, 8: SJ-2804, 9: M2-2804, 10: CO1-1403, 11: R5-1402, 12: CA2-1602, 13: SE-1602, 14: CO12-1403, 15:CO11-1403, 16: CE-1703, 17: CO4-1403, 18: SE-21, 19: CE1-0504, 20: SJ1-0504 21: SE2-1602, 22: R3-1404, 23: SE3-1602, 24: CO10-1403, 25: SE3-1602.....44

Figura 21. Cladograma de consenso Bootstrap elaborado por el método de Neighbour Joining para el fragmento de ITS. Los números dentro de las ramas representan el número de veces que se repite ese arreglo para esa rama o ramas (100 repeticiones).47

Resumen

Los bosques son un factor clave en cuanto a la regulación del clima, además, proporcionan bienes y servicios de forma directa o indirecta. Sin embargo, los principales desafíos que actualmente se presentan en los bosques son los incendios forestales y la deforestación, ocasionando cambio climático y un aumento en los gases de efecto invernadero. Una de las soluciones que se han manejado para enfrentar este problema son los programas de reforestación; sin embargo, las plantas presentan un bajo índice de supervivencia ya que son abandonadas después de su establecimiento. En la zona árida de México podemos encontrar la especie *Pinus cembroides*, la cual es usada para repoblar bosques debido a su amplia adaptabilidad y resistencia a condiciones adversas. Además, su semilla es comestible y genera fuente de ingresos para las personas que la colectan, gracias a esto tiene un gran potencial para la restauración ecológica. Este género presenta una afinidad por la asociación micorrícica, la cual tiene efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas, la sanidad vegetal y la protección contra el estrés biótico y abiótico. Uno de los principales objetivos en la reforestación es lograr la supervivencia en campo y la resiliencia de las plantas en entornos difíciles, de allí radica la importancia de identificar hongos ectomicorrícicos asociados a esta especie para poder cultivarlos y llevarlos a la inoculación en invernadero. El objetivo de la presente investigación fue aislar e identificar hongos ectomicorrícicos de raíces de pino piñonero y determinar su crecimiento en diferentes medios de cultivo. Se realizó un muestreo de raíces de *P. cembroides* en 10 rodales ubicados en la sierra de Coahuila y Nuevo León. Las muestras de raíces se desinfectaron y se aislaron en PDA; posteriormente se identificaron molecularmente a través de la extracción de ADN, utilizando la PCR para la amplificación de la región ITS y finalmente, la secuenciación de dicha región para compararla e identificarla en bases de datos. Se evaluaron las cepas obtenidas en medios PDA, MNM y BAF para seleccionar el medio de cultivo que más favorecía el crecimiento de los hongos. Se obtuvieron un total de 34 cepas de las cuales, 8 se consideran endófitas, 5 ectomicorrizas, 3 ectomicorrizas no verdaderas, 6 saprófitos de madera y 12 patógenos. De las cepas evaluadas los medios que propiciaron su mayor crecimiento fueron: para el género *Podospora* sp. y *Russula* sp. fue PDA, para *Phialocephala fluminis* y *Tuber mexiusanum* fue MNM, para las cepas del género *Tuber* sp. y *Meliniomyces* sp. los medios BAF y MNM y para la cepa *Melanogaster ambiguus* presentó buen crecimiento en los medios PDA y BAF.

Los resultados obtenidos pueden ser utilizados en estudios posteriores tanto *in vitro*, invernadero y campo, para poder fortalecer el crecimiento y supervivencia de *P. cembroides* para ser utilizada en la restauración de bosques.

Palabras clave: *Pinus*, *in vitro*, ectomicorrizas, identificación, asilamiento, BAF, MNM, PDA.

I. INTRODUCCIÓN

México cuenta con 49 de las 120 especies del género *Pinus* identificadas en el mundo, 22 son endémicas y 10 corresponden a pino piñonero. Estas especies son de gran relevancia para las zonas áridas del país, ya que en ocasiones constituyen el único recurso forestal y son reconocidas por su amplia adaptabilidad y resistencia a condiciones adversas, lo que les confiere un estatus de especies con gran potencial para la restauración ecológica (Pérez *et al.*, 2019).

Los bosques desempeñan un papel clave en la regulación del clima en el planeta y brindan bienes y servicios de forma directa o indirecta, entre ellos tenemos la tala que es la actividad que tiene más presencia económica en México (Moctezuma y Flores, 2020), leña, madera que se utiliza para construcción de casa o muebles, resinas, pulpa y semillas comestibles que se recolectan en el bosque (Sánchez-González, 2008). Para el 2021 el Sistema Nacional de Información Forestal registró 48, 077 incendios sobre 3, 241, 191 hectáreas en toda la República Mexicana, la mayoría de ellos fue ocasionado por actividades agrícolas y por actividades ilícitas (SNIF, 2024). La deforestación es la segunda causa del cambio climático en el mundo, se le atribuye un aumento entre 25% y 30% de gases efecto invernadero a este proceso (Jarquín, 2022). La mayoría de las reforestaciones en México presentan un porcentaje bajo de supervivencia en campo debido a que las plantas son abandonadas después de su establecimiento (Sandoval-García *et al.*, 2023). Es por eso que resulta necesario utilizar plantas resistentes a las condiciones climáticas edafológicas, que posean buenas condiciones fenológicas y sean de rápido crecimiento (Castrejón *et al.*, 2021).

Pinus cembroides puede constituir una fuente complementaria de captura y almacenamiento de carbono, además, suministra bienes a los pobladores locales como leña y madera de corta dimensión, resina, árboles de ornato, alimento e ingresos económicos por la venta de su semilla (piñón). Por su amplia adaptabilidad y tolerancia a condiciones extremas, ha sido utilizada para proyectos de reforestación y restauración ecológica (Alatorre *et al.*, 2020;

Cuevas-Cruz y Aquino-Ramírez, 2020). Todas estas características hacen que esta especie sea considerada en la lista de especies prioritarias para la Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad con fines de conservación, reforestación y restauración (Castrejón *et al.*, 2021). Sin embargo, México presenta un acelerado proceso de deforestación y erosión, por lo que es de suma importancia buscar recursos para la restauración de bosques templados (Garibay-Orijel *et al.* 2013). El género *Pinus* tiene afinidad por la asociación micorrícica; en esta simbiosis, las raíces generan las condiciones propicias para el crecimiento de hongos (Carrillo-Saucedo *et al.*, 2022), los cuales promueven el crecimiento, la transferencia nutrimental y la supervivencia en campo de diversas especies vegetales de importancia forestal donde absorben, movilizan y translocan nutrientes como fósforo, nitrógeno, agua y micronutrientes del suelo hacia las plantas (Martínez 2010) y, de manera inversa, las plantas aportan monosacáridos a los hongos. Esta simbiosis tiene efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas, la sanidad vegetal y la protección contra el estrés biótico y abiótico (Carrillo-Saucedo *et al.*, 2022). Se han realizado estudios con aislamientos de micorrizas de raíces de pino para inocular plántulas en invernadero con el objetivo de reintroducir los hongos autóctonos de la región, debido a que funcionan como procesadores de los nutrientes del suelo en el bosque (Garza *et al.*, 2002).

En un estudio realizado con *Pinus pseudostrobus* Lindl., se observó que las plántulas inoculadas con micorrizas presentaron 86% de supervivencia a comparación del 62% en ausencia de estas (Gómez-Romero *et al.*, 2013). También se ha observado en cuanto a la biorremediación, que tienen la capacidad de degradar sustancias en suelos contaminados tales como contaminantes orgánicos persistentes y metales pesados (Otero-Blanca *et al.*, 2018; Assad *et al.*, 2020).

Otros estudios, han informado de la eficacia de las ectomicorrizas para superar los efectos perjudiciales del estrés abiótico, como la sequía y la salinidad (Guerrero-Galán *et al.*, 2019). Zúñiga (2018) inocularon plántulas de *Pinus cembroides* con *Laccaria proxima* y la bacteria *Conhella* sp. y observaron un incremento en el diámetro y la altura del tallo, así como un aumento en la tasa fotosintética y transpiración en comparación de plantas sin inocular.

P. cembroides ha sido utilizada para proyectos de reforestación y restauración ecológica, no obstante, las poblaciones de esta especie se ven amenazadas por las actividades antropogénicas y principalmente por la recolección excesiva de la semilla. Uno de los principales objetivos en la reforestación es lograr la supervivencia de *P. cembroides* en campo y la resiliencia de las plantas en entornos difíciles, por lo que es de gran importancia identificar hongos ectomicorrícicos asociados a esta especie. El objetivo de la presente investigación fue aislar e identificar ectomicorrizas de raíces de pino piñonero ubicados en el noreste de México y determinar su crecimiento en diferentes medios de cultivo.

1.2 Hipótesis

Se aislarán cepas de hongos ectomicorrícicos de raíces de *Pinus cembroides* y al menos un medio de cultivo generará mejor respuesta en el crecimiento y desarrollo *in vitro* de los hongos.

1.3 Objetivo general

Aislar e identificar ectomicorrizas asociadas a pino piñonero y reproducirlas en diferentes medios de cultivo.

1.3.1 Objetivos específicos

1. Aislar ectomicorrizas de raíces de *Pinus cembroides* y cuerpos fructíferos en rodales de esta especie ubicados en los estados de Coahuila y Nuevo León.
2. Identificar por métodos moleculares mediante la amplificación y secuenciación de la región ITS de las cepas de ectomicorrizas aisladas.
3. Cultivar las cepas de ectomicorrizas asociadas a pino piñonero aisladas en medios de cultivo BAF (biotina-aneurina- ácido fólico), MNM (Melin-Norkrans modificado) y PDA (agar papa-dextrosa).
4. Evaluar los medios de cultivo que inducen la mejor respuesta de crecimiento *in vitro* de las cepas de ectomicorrizas aisladas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Género *Pinus*

Las especies de pino son originarias del hemisferio norte y en el continente americano se localizan desde los 66°00'00"N en el norte de Canadá y hasta los 12°00'00"N hacia el sur de Nicaragua. En las sierras Madre Oriental y Occidental de México se asienta la mayor diversidad del género *Pinus* (Pinaceae) en el mundo, con alrededor de 400 taxones (Moctezuma y Flores, 2020).

Los árboles pertenecientes son perennifolios, más o menos resinosos, con hojas aciculares en forma de aguja, cuentan con ramas delgadas. Su altura varía con la especie y de la calidad del sitio, van desde árboles pequeños de 5-10 m como lo es el *P. cembroides* hasta 50 m o más como el *P. ponderosa*. La corteza generalmente es lisa y delgada en árboles jóvenes y gruesos, rugosos y ásperos en los viejos. Su color puede ser moreno a moreno rojizo, unas veces casi negro o ceniciento (Rodríguez-Trejo y Quiahua, 2021).

Los ecosistemas forestales son primordiales en el ciclo del agua, fijadores de nitrógeno, refugio natural de la flora y fauna y se les cataloga como una de las soluciones ante el cambio climático por su contribución a la mitigación de los efectos dañinos de dicho cambio. Se estima que 5.3 millones de personas viven y dependen de los bosques por lo que son de gran importancia ecológica (Moctezuma y Flores, 2020).

2.2 *Pinus cembroides*

El pino piñonero (*Pinus cembroides*) es una especie originaria de México y es una de las especies de pino con mayor distribución en este país, principalmente en zonas áridas. Se puede encontrar en los estados de Chihuahua, Durango, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, San Luis Potosí, Aguascalientes, Querétaro, Hidalgo, Zacatecas y Guanajuato; y crece en lugares con precipitación de 350 a 700 mm (Castrejón *et al.*, 2021; Alatorre *et al.*, 2020).

P. cembroides es un árbol de cinco a diez metros, posee ramas ascendentes, delgadas y distribuidas irregularmente en el tallo. Es una especie de lento crecimiento, tarda en

fructificar 36 meses y la producción de la semilla se da cada cinco o seis años (Alatorre *et al.*, 2020). Crece en laderas montañosas, lomeríos, cerros con pendientes secas y rocosas. Presenta tolerancia a la sequía (resiste hasta ocho meses), crece en suelos pobres, secos, pedregosos, calizos y calcáreos, pero bien drenados y soporta suelos con pH ácido o básico. Se adapta a climas con temperaturas entre 7 a 30°C con un promedio anual de 18°C.

El bosque de *P. cembroides* desempeña una función importante en el ecosistema y en el ciclo hidrológico al evitar la erosión, favorecer la infiltración del agua y restablecer los mantos acuíferos subterráneos. Al mismo tiempo, es el hábitat natural de la fauna silvestre, dado que el 90% del volumen de su semilla producida, constituye el alimento básico de muchas aves y mamíferos. La importancia maderera de *P. cembroides* es mínima, pero el piñón (semilla comestible) es de alto valor económico al constituir 90% de la cosecha de piñones en la República Mexicana, también se utiliza esta especie para reforestación de zonas áridas erosionadas (Constante *et al.*, 2009).

2.2.1 *Pinus cembroides* y su interacción con microorganismos

Pinus cembroides, comúnmente conocido como piñón mexicano o pino mexicano, forma asociaciones simbióticas con varios microorganismos incluidos los hongos micorrízicos y bacterias fijadoras de nitrógeno. Estas asociaciones juegan un papel crucial en la absorción de nutrientes del árbol y el funcionamiento general del ecosistema (Zúñiga, 2018). Al ser una especie que se desarrolla en ambientes con escasez de agua por baja precipitación, suelos pobres, secos y pedregosos, lleva a cabo asociaciones con microorganismos que hacen que el pino reciba principalmente fósforo y nitrógeno al actuar como extensión de su raíz y mejorar las condiciones nutricionales de los pinos en esta relación simbiótica (Castrejón *et al.*, 2021; Carrillo-Saucedo *et al.*, 2022).

Algunos hongos ectomicorrízicos comunes asociados con *P. cembroides* incluyen especies de los géneros *Rhizopogon*, *Suillus* y *Laccaria* (Garza *et al.*, 2002; Zúñiga, 2018).

P. cembroides puede establecer asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno, conocidas como diazótrofes. Estas bacterias convierten el nitrógeno atmosférico en una forma accesible para el árbol, enriqueciendo así el suelo con nitrógeno. Algunas bacterias diazotróficas, como las especies del género *Frankia*, son capaces de formar

asociaciones simbióticas con las raíces de *P. cembroides* y otros miembros de la familia Pinaceae (Teomitzi, 2014).

2.3 Micorrizas

Los hongos micorrízicos son microorganismos filamentosos que establecen asociaciones simbióticas con las raíces de aproximadamente el 90% de las especies de plantas terrestres (Brundrett y Tedersoo, 2018). Las dos asociaciones más importantes desde el punto de vista ecológico y económico son las micorrizas arbusculares (AM) y las ectomicorrizas (ECM). Los hongos AM que pertenecen al filo Mucoromycota (subfilo Glomeromycotina), probablemente desempeñaron un papel crucial en la colonización exitosa de la tierra por plantas hace al menos 450 millones de años (Feijen *et al.*, 2018). En la actualidad, los hongos AM colonizan aproximadamente el 72% de las especies de plantas, incluidos los cultivos más importantes desde el punto de vista agronómico (Brundrett y Tedersoo, 2018). Se le denomina micorrizas a la asociación de los hongos con las raíces de las plantas, considerándose mutualista ya que comienza siendo parasitismo y termina siendo beneficiosa tanto para el hongo como para la planta. Se estima que las micorrizas surgen desde el periodo devónico, se pueden encontrar actualmente en todos los ecosistemas terrestres, desde los polos hasta los desiertos y se estima que más de 80% de las plantas presentan este tipo de asociación. Las asociaciones pueden ser de seis tipos: arbusculares, orquideoides, arbutoides, monotropoides, ericoides y ectomicorrizas. Las más importantes por su abundancia y distribución en los ecosistemas son las micorrizas arbusculares y las ectomicorrizas. Las endomicorrizas son aquellas donde el micelio penetra tanto intra como intercelularmente en las células corticales de las raíces, p. ej., los hongos micorrízicos arbusculares del Phylum Glomeromycota. Por otro lado, las ectomicorrizas presentan un micelio que envuelve la raíz y forma un manto, p. ej., algunos hongos del Phyla Basidiomycota, Ascomycota y Mucoromycota (Pérez-Moreno y Read, 2004; Carrillo-Saucedo *et al.*, 2022):

La evidencia fósil de asociaciones ECM se remonta a hace 50 millones de años, pero los análisis del reloj molecular sugieren que probablemente evolucionaron hace al menos 130 millones de años (Cope *et al.*, 2019). Las especies de hongos ECM pertenecen a uno de los tres filos de hongos, incluidos Ascomycota (subfilo Pezizomycotina), Basidiomycota (subfilo Agaricomycotina) o Mucoromycota (subfilo Mucoromycotina), se asocian con el

2% de las especies de plantas, incluidas principalmente plantas leñosas, y desempeñan un papel crucial en varios ecosistemas forestales que cubren aproximadamente el 30% de la superficie terrestre mundial (Tedersoo *et al.*, 2010).

Tanto en asociaciones AM como ECM, los hongos micorrízicos no sólo proporcionan a su planta huésped nutrientes minerales extraídos del suelo, especialmente fósforo, nitrógeno y potasio, sino que también confieren protección contra una amplia gama de estreses bióticos y abióticos (García *et al.*, 2016). A cambio, la planta entrega al hongo diversas formas de carbono derivado de la fotosíntesis. Aunque los hongos AM y ECM ofrecen servicios de intercambio de nutrientes similares a sus plantas hospedantes, existen claras diferencias en las estructuras que utilizan para hacerlo. Los hongos AM utilizan hipopodios como estructuras de penetración para atravesar la pared celular de las células epidérmicas de la raíz y entrar en las raíces de las plantas donde proliferan tanto inter como intracelularmente (Figura 1B). En última instancia, forman estructuras hifales muy ramificadas llamadas arbuscúlos en las células corticales de la raíz (Figura 1D). Por el contrario, los hongos ECM (Figura 1A) forman una vaina o manto de hifas que recubre toda la punta de la raíz con una red subyacente de hifas llamada red de Hartig (Figura 1C) esta red rodea, pero no penetra las células epidérmicas y corticales de las plantas (Balestrini y Bonfante, 2014). Tanto el arbuscúlo como la red Hartig proporcionan interfaces para el intercambio de nutrientes entre el huésped y el hongo.

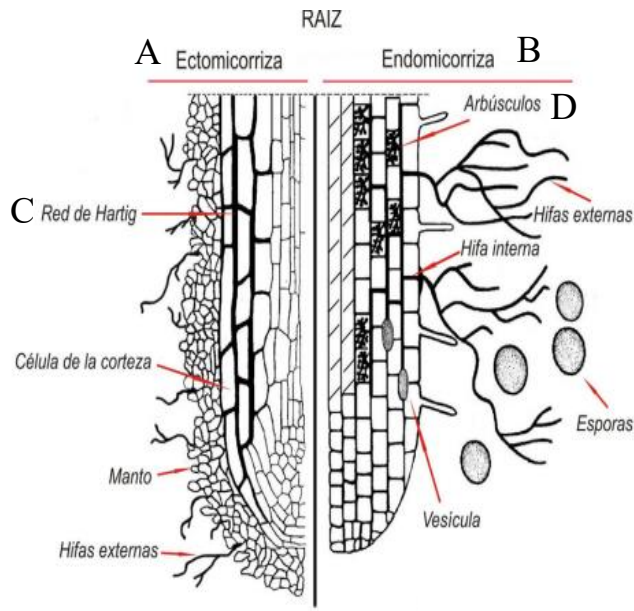


Figura 1. Estructura de ectomicorriza y endomicorriza. A) Ectomicorrizas, B) Endomicorriza, C) Red de Hartig, D) Arbúsculos. Imagen tomada de Albornoz y Catania (2021).

Algunas de las diferencias que encontramos entre la micorriza arbuscular y la ectomicorriza, es que la primera coloniza la mayoría de las plantas (herbáceas, árboles, antoceros y hepáticas, etc.) mientras que las ectomicorrizas colonizan coníferas, angiospermas (arbustos, árboles) y algunas hepáticas. Las ectomicorrizas distribuyen principalmente nitrógeno y son saprótrofos facultativos mientras que la micorriza arbuscular distribuye principalmente fósforo y son biotrofos obligados. Las micorrizas AM tienen arbúsculos como estructuras para intercambiar los nutrientes y tienen un tamaño microscópico mientras que las ectomicorrizas desarrollan la Red de Hartig y tienen un tamaño macroscópico (Carrillo-Saucedo *et al.*, 2022).

2.3.1 Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas son las asociaciones más importantes desde el punto de vista ecológico y biogeográfico. El hongo cubre las raíces cortas formando un manto o vaina de micelio que engrosa las células vegetales (“tips”), las cuales pueden ser bifurcadas (Figura 2A), nodulares o coraloides (Figura 2B). El manto que se forma alrededor de las puntas de las raíces permite

que el micelio se extienda; al extenderse, accede a un mayor volumen de suelo y aumenta considerablemente el área de superficie efectiva para la absorción de nutrientes, en contraste con las raíces desnudas (Pérez y Read, 2004; Carrillo-Saucedo *et al.*, 2022).

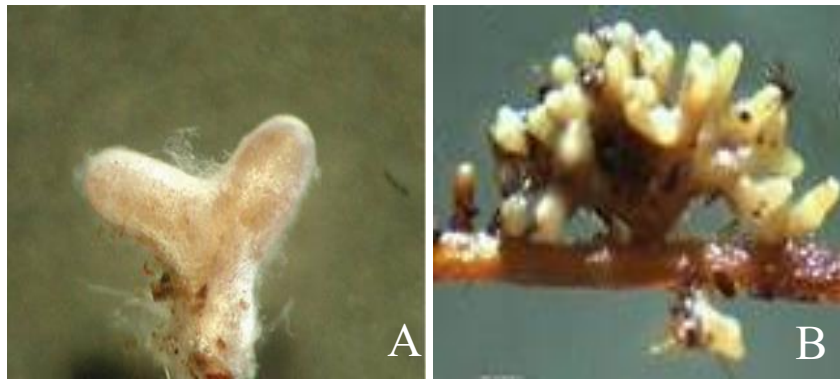


Figura 2. Formas de ectomicorriza. A) Bifurcada formada por *Scleroderma texense* en *Pinus devoriana*. Imagen tomada de Valdés *et al.*, (2010). B) Forma coraloide en *Pinus engelmannii* por el hongo *Scleroderma citrinum*. Imagen tomada de Salcido-Ruiz *et al.*, (2020).

Las hifas crecen de este manto hacia afuera en el substrato y hacia dentro entre los espacios intersticiales de las células corticales de la raíz, formando un complejo sistema intercelular denominado "red de Hartig" (Figura 1C) que transfiere nutrientes entre células fúngicas y vegetales (Pérez y Read, 2004) y actúa como una barrera mecánica que incrementa la resistencia de la planta a enfermedades.

Los hongos ectomicorrícicos (ECM) colonizan las raíces de plantas leñosas perennes donde mejoran la absorción de recursos del suelo a cambio de carbono fijado por sus huéspedes a través de interacciones físicas y bioquímicas. Las ECM pueden influir en los rasgos de las plantas y las respuestas ambientales, mejorar la capacidad de sus huéspedes para resistir, tolerar y recuperarse de la sequía; por ejemplo, pueden alterar la anatomía y las propiedades hidrófilas de las raíces, influyendo en la vía apoplástica de absorción de agua (Sevanto *et al.*, 2023). También pueden formar una extensa red de hifas en el suelo que concentra el suministro de agua hacia las raíces del huésped, particularmente en especies de hongos que forman cordones llamadas rizomorfos (Xu *et al.*, 2020). Si bien la colonización por ECM puede reducir la biomasa y la longitud de las raíces a medida que las puntas de las raíces se espesan y quedan envueltas por un manto de hifas fúngicas, el acceso al agua y la

conductancia estomática pueden aumentar y potencialmente permitir una mayor asimilación de carbono y supervivencia en condiciones de sequía (Gil-Martínez *et al.*, 2018).

Las principales estructuras que conforman las ectomicorrizas de acuerdo con lo reportado por Chávez-Aguilar *et al.*, (2021) son:

- Raíces modificadas (tejidos vegetales y fúngicos).
- Estructuras fúngicas reproductivas (cuerpo fructífero conspicuo).
- Micelio externo o extramatricial, el cual está compuesto de hifas absorbentes y cordones miceliales y rizomorfos que se desarrollan en el suelo circundante a las raíces.
- Red de Hartig, formada a partir del micelio alrededor de las raíces laterales cortas de la planta hospedera.

Ecológicamente, se ha encontrado que la asociación con hongos ectomicorrícicos incrementa la tolerancia de las plantas a la acidez, a la toxicidad por metales pesados y a las altas temperaturas del suelo; así mismo, contribuyen a generar resistencia a enfermedades (Dago *et al.*, 2023). Dicha simbiosis se forma en un 2% de las coníferas, ayudando a mantener la biodiversidad de microorganismos en los suelos y el correcto mantenimiento de los ecosistemas por la transferencia de agua y nutrientes, principalmente el nitrógeno (Carrillo-Saucedo *et al.*, 2022).

La formación de ECM depende de factores ambientales como la disponibilidad de nutrientes, el pH del suelo, la temperatura, la disponibilidad de agua, la aireación, la intensidad de la luz, la fisiología de la planta huésped, las interacciones con los microorganismos del suelo y la toxicidad de ciertos pesticidas (Bertoloazi *et al.*, 2010).

2.4 Relación planta-micorriza

Los hongos tienen un papel crucial para que las plantas puedan colonizar el medio terrestre y responder a las condiciones ambientales cambiantes, esto es porque al formar esta relación entre el hongo y la planta, ambos salen beneficiados.

La gran mayoría de las plantas, incluidos los árboles forestales, forman simbiosis con hongos micorrícicos donde más del 90% de las raíces de las plantas están conectadas principalmente

con los micelios de los hongos ectomicorrízicos (ECM) o arbusculares (AM). En el caso de las simbiosis con ECM, el extenso micelio extrarradical que prolifera en el suelo permite a los árboles forestales buscar alimento de manera eficiente y adquirir nutrientes, particularmente N y P (Paparokidou *et al.*, 2021). El P puede estar presente en formas orgánicas e inorgánicas, muchas de las cuales no son directamente accesibles a las raíces de las plantas; el micelio del hongo ECM tiene funciones especializadas para movilizar, adquirir, metabolizar, almacenar y transportar P de estas diversas fuentes (Nehls y Plassard, 2018).

Las ECM pueden mejorar el crecimiento de las plantas al aumentar la absorción de nutrientes minerales y agua y aumentar la resistencia a patógenos y estreses ambientales, puede mejorar la capacidad de las plantas para resistir el estrés salino mediante la acumulación de solutos compatibles y ajustando los equilibrios osmóticos e iónicos (Yin *et al.*, 2020).

La planta le transfiere a las ECM carbohidratos que son producto de la fotosíntesis y ácidos grasos para tener el requerimiento energético para llevar a cabo sus funciones vitales y poder formar las estructuras necesarias para la simbiosis, ya que ellos no pueden sintetizar estas moléculas nutritivas. Del total del producto de la fotosíntesis la planta le otorga entre el 5 y el 30% de carbono al hongo. A cambio, el árbol recibe fósforo (P), nitrógeno (N) y calcio (Ca) obtenidos del suelo, esto provoca que se evite usar abono o fertilizantes fosfatados, ayudando al medio ambiente y evitar gastos económicos (Rodríguez-Trejo, 2021; Carrillo-Saucedo *et al.*, 2022). El intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo está mediado por la actividad enzimática y se realiza en la periferia de la raíz mediante las siguientes estructuras: hifas extrarradicales, manto o vaina del micelio y red de Hartig (Carrillo-Saucedo *et al.*, 2022).

Las ECM protegen a las plantas de metales pesados como lo son el plomo (Pb), arsénico (As), cobre (Cu) y cadmio (Cd), ya que evitan que sean translocados en la planta. Las ECM cuentan con distintos mecanismos como la unión de los metales a componentes de la pared celular como la quitina y a ciertas proteínas como la metalotioneína. El micelio funciona como una barrera física contra los metales, la absorción intracelular y la desintoxicación de las vacuolas al reducir la absorción de metales en la planta (Bertolazi *et al.*, 2010).

Diversos estudios han demostrado que la salinidad del suelo suele afectar la asociación, pero hay especies ECM tolerantes a la salinidad que generan mecanismos que protegen a la planta de los iones los cuales son de exclusión y compartimentalización. Las hifas externas y el micelio regulan la entrada de los iones a la planta y las retienen en las vacuolas. Este mecanismo lo que hace es mantener altas concentraciones de K^+ y bajas concentraciones de Na^+ en el citosol en las células del hongo ECM (Aguilar-Aguilar *et al.*, 2009).

En las estructuras de la ECM, los nutrientes se transfieren desde el micelio extrarradical que explora el suelo a las hifas que se desarrollan en la planta, a través de una vaina fúngica que rodea las raíces. La colonización intrarradical por parte del hongo forma una estructura específica llamada red de Hartig. Esta red se desarrolla entre la epidermis de la raíz del huésped y la corteza, donde se expresan varias proteínas de transporte para impulsar el intercambio de nutrientes entre los dos socios (Becquer *et al.*, 2019). Se han identificado y caracterizado varias proteínas de hongos ECM involucradas en la asignación de nutrientes de las plantas (García *et al.*, 2017). Estudios transcriptómicos han identificado una gran cantidad de genes de hongos o plantas que están regulados durante la simbiosis; la regulación positiva o negativa de genes relacionados con vías de señalización, transporte de nutrientes y modificaciones de la pared celular (Tang *et al.*, 2021). Por ejemplo, la inducción del gen *LbMiSSP7* en *Laccaria bicolor* es necesaria para la colonización de las raíces de *Populus*, al interactuar con el factor de transcripción jasmonate zim domain (JAZ6), el efector simbiótico secretado *MiSSP7* actúa amortiguando las vías de defensa del huésped, recientes análisis han confirmado cierta especificidad de linaje de los *MiSSP* y se ha sugerido que estos genes específicos pueden desempeñar un papel en la especificidad del huésped de la ECM (Liao *et al.*, 2016).

2.4.1 Clasificación y morfotipos de ectomicorrizas

Las ectomicorrizas presentan distintas formas que pueden ser bifurcadas, trifurcadas, dicotómicas (Figura 3A), monopódicas (Figura 3B), ramificada-bifurcada (Figura 3C), ramificada pinada (Figura 3D) y coraloides o ramificada-bifurcada múltiple (Figura 3E). Cada especie presenta un tipo de forma y un color del micelio, a esto se le conoce como morfoespecie o morfotipo. Gracias a esto podemos realizar una caracterización morfológica que es un método que nos permite poder identificar macroscópicamente los tipos

ectomicorrícicos a nivel de género, y a través de observación microscópica determinar aspectos de la ectomicorriza como forma, color y estructura del manto (Garza *et al.*, 2002; Galindo-Flores *et al.*, 2015).

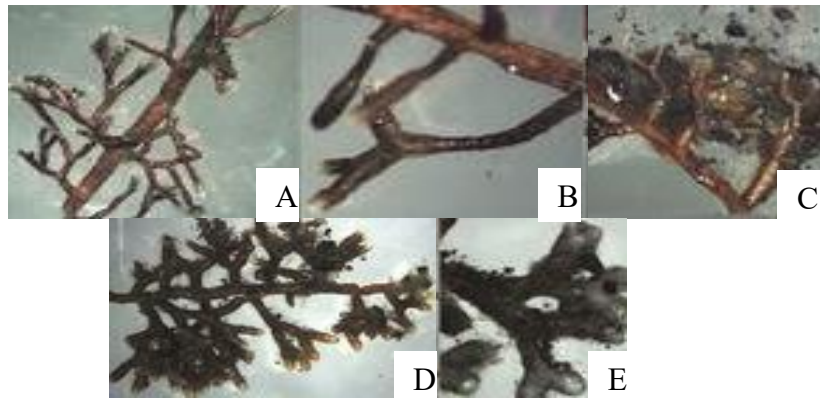


Figura 3. Morfología de Ectomicorrizas. A) Dictómicas. B) Monopódicas. C) Ramificada-bifurcada. D) Ramificada-pinada E) Ramificada-bifurcada múltiple. Imagen extraída y modificada de Garibay-Orijel *et al.*, (2013).

Existe una metodología de identificación que siguen la mayoría de los investigadores, la cual es llamada DEEMY que es un sistema de información para la determinación y caracterización de ectomicorrizas donde hay claves para determinar la longitud, morfotipo de la micorriza, el color, tipo de ramificación, entre otras características más que sirven como descriptores de las ectomicorrizas.

En la Figura 4 se observa una ectomicorriza formada por el hongo *Hebeloma mesophaeum* en *Pinus montezumae*, está formada por ramificaciones dicotómicas, se puede observar el manto semitransparente y las puntas son cilíndricas, blancuzcas no infladas. Las terminaciones no ramificadas tienen forma recta de color marrón a café oscuro.



Figura 4. Morfotipo de ectomicorriza formada por el hongo *Hebeloma mesophaeum* en *Pinus montezumae*. Modificada y extraída de Garibay-Orijel *et al.*, (2013).

En la Figura 5 se observa una ectomicorriza del hongo *Hebeloma helodes* formada en *P. montezumae* que tiene ramificaciones dicotómicas, sus terminaciones son ramificadas con forma recta de color café a claro. Su manto es delgado, liso y tiene textura felposa a algodonosa con hifas delgadas y blancas translucidas. Esta ectomicorriza se encuentra en el Popocatépetl e Iztaccíhuatl.



Figura 5. Morfotipo de ectomicorriza formada por el hongo *Hebeloma helodes* en *Pinus montezumae*. Modificada y extraída de Garibay-Orijel *et al.*, (2013).

En la Figura 6 se observa el morfotipo de una asociación ectomicorriza formada por el hongo *Cadophora finlandica* y *P. montezumae*, tiene forma monopodial pinada dicotómica, sus ramas tienen diferente longitud color café, las terminaciones tienen forma reta con puntas cilíndricas color verdusco. El manto está en las puntas y es fibroso a algodonoso con hifas de color gris. La distribución geográfica de esta ectomicorriza es en el nevado de Toluca Ajusco, Iztaccíhuatl, Popocatépetl y San Andrés.



Figura 6. Morfotipo de ectomicorriza formada por el hongo *Cadophora finlandica* y Douglas *P. montezumae*. Modificada y extraída de Garibay-Orijel *et al.*, (2013).

En la Figura 7 se encuentra el morfotipo de un sistema micorrícico formado por *Peziza* sp. y *P. montezumae*, se dividen 2 ramas color ámbar, pardo y café oscuro, las puntas están ligeramente infladas disminuyendo con la edad de color blancuzco, amarillento o grisáceo, en las zonas donde son evidentes, el manto tiene un color café grisáceo. Estas se reportaron en el Nevado de Toluca, Malinche e Iztaccíhuatl.



Figura 7. Morfotipo de ectomicorriza formada por el hongo *Peziza* sp. y *P. montezumae*.
Modificada y extraída de Garibay-Orijel *et al.*, (2013).

2.4.2 Especies de hongos ectomicorrícicos

Las asociaciones ectomicorrícicas se forman por hongos pertenecientes a los Phylum Basidiomycota y Ascomycota, los cuales se estima que son más de 5000 spp y el Phylum Zygomycota, con cerca del 3 al 5% del total de especies de gimnospermas y angiospermas. Estos hongos se asocian con plantas leñosas como lo son árboles del género *Pinus*, *Abies*, *Fagus*, *Quercus*, *Carpinus* y *Alnus*, entre otros (Gutiérrez *et al.*, 2019).

A nivel mundial se han identificado aproximadamente 300 especies de ectomicorrizas introducidas con al menos 54 géneros de ectomicorrizas registrados en plantaciones de pinos, entre ellos: *Amanita*, *Astraeus*, *Boletus*, *Clavulina*, *Cortinarius*, *Gautieria*, *Gomphidius*, *Hebeloma*, *Inocybe*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Ramaria*, *Russula*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Thelephora*, y *Tricholoma*. Taxones pertenecientes a *Wicoxina*, *Suillus*, *Rhizopogon*, *Laccaria*, *Pisolithus* y *Scleroderma* tienen adaptaciones ecológicas que les permiten establecerse en estadios tempranos asociados a hospederos de la familia Pinaceae, principalmente (Baeza *et al.*, 2021).

Laccaria es un género que muchas de sus especies son consideradas los principales hongos ectomicorrícicos en todo el mundo, son pioneras en su hábitat y se utilizan como modelo para el estudio de la simbiosis ectomicorrícica. Esta especie se ha utilizado para micorrizar a

géneros como *Betula*, *Pinus*, *Quercus*, *Pseudotsuga*, entre otros (Rodríguez- Gutierrez *et al.*, 2019).

De los géneros *Laccaria* y *Suillus* podemos encontrar las especies *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* las cuales se asocian a árboles juveniles en bosques templados permiten a la planta absorber y transportar nutrientes tales como P, K, NH₄, NO₃ y agua. Estas especies se utilizan como inoculantes del género *Pinus* y han dado resultados positivos en la colonización del hongo y en el crecimiento de la planta (Galindo-Flores *et al.*, 2015).

A pesar de su importancia, en México sólo se han descrito las micorrizas como: *Laccaria bicolor* en *Pinus montezumae*; *Boletus clavipes*, *Laccaria laccata* y *Suillus pseudobrevipes* en *P. patula* y *S. pseudobrevipes* en *P. greggii* (Carrera-Nieva y López-Ríos, 2004); *Pisolithus tinctorius* en *Eucalyptus urophylla* y *P. greggii*; *Boletus rubropunctus* en *Quercus* sp.; *P. tinctorius* y *Scleroderma texense* en *P. devoniana* y *P. pseudostrobus* (Valdés *et al.*, 2010); *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima*, *Hebeloma alpinum*, *H. leucosarx* y *H. mesophaeum* en *P. patula* y *P. pseudostrobus*. Ya que las ectomicorrizas tienen poca variación morfológica como para poder diferenciar especies cercanas, actualmente para su caracterización se emplea un esquema que combina la morfología y las secuencias de ADN (Garibay-Orijel, 2013).

2.4.3 Uso de ectomicorrizas para el cultivo del pino

En la repoblación forestal, la planta que se utiliza es de vital importancia, una planta de calidad se verá determinada por su origen y por el manejo al que se le dé en la fase de producción en el vivero, anteriormente para determinar si una planta tenía calidad, se verificaba su estado con el tamaño de la parte aérea, ahora se toma en cuenta la calidad del sistema radicular y como la mayoría de los árboles de los bosques tienen ectomicorrizas estas son tomadas a consideración para su valoración (Pera y Parladé, 2005).

Algunos estudios indican que en viveros donde la micorrización no está presente o se encuentra en baja densidad, existen problemas como baja disponibilidad de nutrientes y bajo crecimiento, por ende. En muchos viveros que no cuentan con una población natural de hongos, es necesario introducirlos y utilizar técnicas de inoculación con el fin de mejorar la

calidad de la planta destinada a reforestar, provocando altos costos y esfuerzos por lo que es importante elegir especies con mayor capacidad de colonización, dosis óptimas de inoculación y métodos más eficientes (Parladé, 2005; Martínez *et al.*, 2016):

Las técnicas que se han usado con mayor frecuencia para la inoculación son: micelio del hongo crecido en un sustrato enriquecido con solución nutritiva que consiste en la producción del micelio en condiciones libres de otros microorganismos y obtener suficiente micelio para aplicarlo en plantas, suspensiones de esporas en distintos medios que se obtienen de cuerpos fructíferos recolectados en bosques o en plantaciones, éstas se incorporan al agua para el riego o se mezclan en el sustrato del cultivo; algunas desventajas de estas últimas son el no saber si las esporas son viables y encontrarlas depende de las estaciones en donde se desarrolla el cuerpo fructífero (Pera y Parladé, 2005).

2.5 Cultivo de hongos ectomicorrícicos

Para poder estudiar las especies fúngicas, se utiliza el crecimiento de los hongos ectomicorrícicos en medios de cultivo sólidos, donde se pueden evaluar variables como el diámetro de las colonias y su velocidad de crecimiento para investigaciones y bioensayos. Conocer las características biológicas y fisiológicas de micelios y la afinidad que presentan con hospedantes, es importante para la producción del inóculo para elegir de manera adecuada las especies que se inocularan en los viveros (Chávez *et al.*, 2009). Si el objetivo es la micorrización en planta, se utilizan medios líquidos. El crecimiento de los hongos es afectado por el pH, temperatura y la composición de los medios (Chávez *et al.*, 2009). Se han utilizado diversos medios donde se hacen variaciones como las fuentes de nitrógeno, carbono y las vitaminas (Rodríguez *et al.*, 1992); entre los medios de cultivo más importantes están el BAF (biotina-aneurina-ácido fólico), PDA (papa-dextrosa-agar) y MNM (Melin-Norkrans modificado), estos medios se han utilizado en muchas especies obteniendo buenos resultados en el desarrollo del micelio y el crecimiento de este (Chávez *et al.*, 2009).

Diversos trabajos se han enfocado en comparar como se desarrollan los hongos en los diferentes medios de cultivo; Guin (2022) evaluó el crecimiento de 4 cepas de *Lactarius deliciosus* en medio PDA, MNM y BAF a distintos niveles de pH observándose que los mayores valores de velocidad media de crecimiento, producción de biomasa y crecimiento

radial se dieron utilizando el medio BAF. Guin-Po (2021) analizó 6 cepas de las especies *Suillus granulatus*, *S. luteus*, y *S. bellinii* evaluando la biomasa, velocidad media de crecimiento y crecimiento radial en medio BAF, MNM y PDA observándose un aumento en la biomasa en el medio PDA y BAF.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTO DE HONGOS ECTOMICORRÍCICOS

3.1 Sitios de muestreo

El muestreo de raíces se realizó en 10 rodales de *Pinus cembroides* ubicados en los estados de Coahuila y Nuevo León en los meses de enero-marzo del 2023 (Figura 8). Se realizó la búsqueda de ectomicorrizas asociadas a esta especie de pino en localidades separadas al menos 10 km de distancia entre sí. Para el estado de Coahuila se muestreó el Cañón de Caballos, ubicado en el municipio de Saltillo; Sierra Escondida, El Recreo, La Herradura, Cedritos y Montebello localizados en el municipio de Arteaga; para el estado de Nuevo León se muestreó la localidad de San Juanito, San Felipe, La Rosita, ubicados en el municipio de Aramberri y San Antonio de la Osamenta, ubicado en el municipio de Santa Catarina. Las coordenadas de colecta y algunas condiciones ambientales de cada sitio de muestreo se indican en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Ubicación geográfica y características de los sitios de muestreo.

Localidad	Latitud	Longitud	Estado	Temperatura media anual	Tipo de suelo
Cañón de Caballos	25°14'47.63465" N	100°53'07.84644" W	Coahuila	13.2°C	Franco-arenoso
Cedritos	25°28'12.31154" N	100°37'20.48448" W	Coahuila	13.3°C	Franco-limoso
El Recreo	25°16'24.74047" N	101°01'23.77704" W	Coahuila	17.0°C	Franco-limoso
Sierra Escondida	25°13'10.66620" N	100°45'21.14640" W	Coahuila	16.7°C	Franco-arenoso
La Herradura	25°21'30.50316" N	100°48'14.94360" W	Coahuila	15.4°C	Franco-limoso
La Rosita	24°10'40.62493" N	99°54'38.60914" W	Nuevo León	16.3°C	Franco-limoso
Montebello	25°17'18.78454" N	100°32'43.07064" W	Coahuila	12.3°C	Franco-limoso

San Antonio de la Osamenta	25°29'13.26275" N	100°32'50.59536" W	Nuevo León	12.1°C	Franco-limoso
San Felipe	24°34'55.21087" N	100°00'10.88604" W	Nuevo León	13.8°C	Franco-limoso
San Juanito	24°23'36.34544" N	99°55'10.09970" W	Nuevo León	15.3°C	Franco-limoso

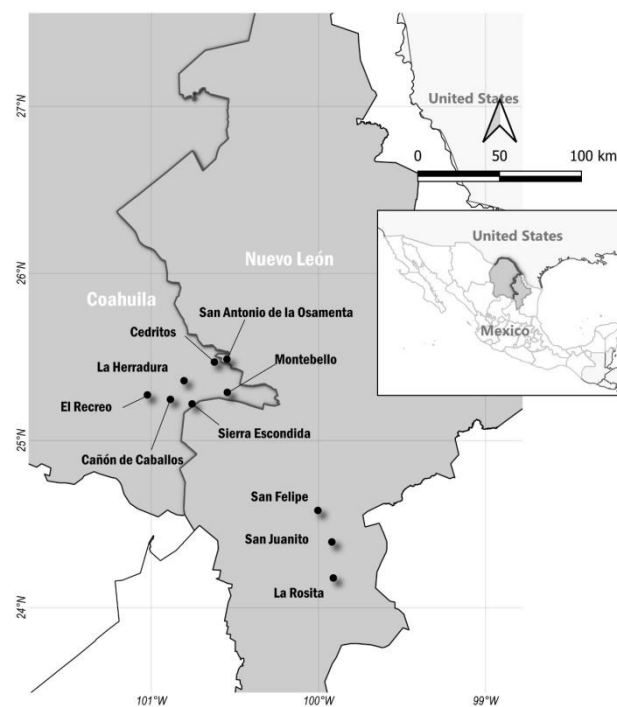


Figura 8. Sitios de muestreo de raíces micorrizadas de *Pinus cembroides* en rodales ubicados en los estados de Coahuila y Nuevo León.

3.2 Muestreo

Se seleccionaron los sitios de muestreo antes mencionados aproximadamente de 1.0 ha poco perturbados. Dentro de cada rodal, se seleccionaron 20 pinos piñoneros al azar separados por al menos 8 m entre sí. Debajo de cada árbol, a una distancia de 1.5 m de la base del árbol, se realizaron dos pozos de 5 cm de profundidad diametralmente opuestos siguiendo las indicaciones de Tedersoo *et al.*, (2010) con la ayuda de un pico (Figura 9). La herramienta se desinfectó previo al muestreo de cada rodal con sales cuaternarias de amonio Saniquat 10® y un paño. Se obtuvieron raíces de ambos lados del pino y se seleccionaron aquellas con morfología típica de ectomicorrizas (morfología coraloide, dicotómica, irregular pinnada o piramidal) tomando en total 40 muestras de raíces por rodal (Figura 10). Posteriormente se guardaron las muestras de raíces en una bolsa ziploc etiquetada con la fecha y el lugar de donde se extrajeron, se transportaron al laboratorio de Fisiología Vegetal en una hielera y se guardaron a 4°C para su posterior análisis y desinfección.



Figura 9. Sitio de muestreo y herramienta utilizada para la obtención de raíces.



Figura 10. Raíces obtenidas con presencia de ectomicorrizas.

3.3 Aislamiento de hongos ectomicorrícicos

3.3.1 Selección y desinfección

Las raíces se colocaron en un colador y se lavaron en agua potable corriente hasta eliminar trozos de suelo y rocas adheridas a la raíz; posterior a ello, se visualizaron con la ayuda de un estereoscopio con aumento de 5X y se seleccionaron aquellas raíces con morfología típica de ectomicorrizas con la ayuda de un bisturí, se cortaron a un tamaño no mayor a 5mm antes de llevarlos a desinfección (Figura 11).

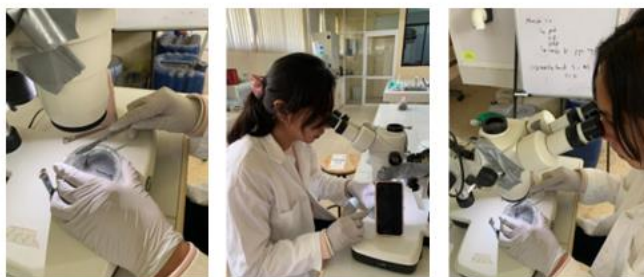


Figura 11. Selección de raíces con morfología de ectomicorrizas.

Las raíces se colocaron en cajas Petri estériles y se desinfectaron en serie dentro de la campana de flujo laminar. El primer paso consistió en agitarlas en solución de Tween 20 al 0.05% cuidadosamente por 1 minuto, seguido de esto, utilizando pinzas estériles, se pasaron a una solución de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% por 5 minutos, continuado con una solución de alcohol etílico al 96% por 3 minutos y por último a una solución de hipoclorito de sodio al 6% por 5 minutos. Entre cada una de las soluciones antes mencionadas (Figura 12), se realizó un lavado con agua destilada estéril, terminando el enjuague con dos lavados con agua destilada estéril. Se eliminó el exceso de humedad con papel filtro estéril. Para desinfectar las pinzas entre cada lavado, se realizó una inmersión en alcohol al 96% y flameado. Una vez desinfectadas las raíces, se colocaron entre 2 a 4 raíces de 2-4 mm de longitud por caja Petri de 90 mm de diámetro con medio agar papa dextrosa (PDA), y se incubaron a 25°C durante un mes, evaluando el crecimiento fúngico de cada raíz con la ayuda de un estereoscopio cada tercer día. Se desecharon aquellas raíces con presencia de hongos saprófitos (micelio abundante) y aquel crecimiento vegetativo lento adherido a la raíz del pino, parecido a una manga, se fue transfiriendo a nuevas cajas Petri con PDA para su

aislamiento; los hongos aislados fueron etiquetados con el código de la cepa (dos primeras iniciales de la localidad y la fecha de muestreo).



Figura 12. Desinfección de raíces de *Pinus cembroides*.

3.4 Identificación molecular

Para la identificación molecular, se utilizaron 3 cajas Petri con el crecimiento vegetativo de cada cepa a identificar; para ello, dentro de la campana de flujo laminar, se raspó con una hoja de bisturí estéril el micelio de cada caja y se colocó en un mortero previamente esterilizado, agregando nitrógeno líquido (Figura 13) hasta obtener polvo fino con la ayuda del pistilo. Se colocaron aproximadamente 300 mg de polvo en un tubo de 1.5 ml de capacidad etiquetado con el identificador de la cepa y se llevó al ultra congelador a -80°C para su resguardo antes de la extracción.

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Miniprep Kit de la compañía BIO BASIC (Amherst, NY, USA) de 50 muestras y se llevó a cabo con las especificaciones descritas en el manual.



Figura 13. Primera fase de la extracción usando nitrógeno líquido.

3.4.1 Cuantificación de ADN por medio de absorbancia

Para determinar la concentración de ADN se realizó la cuantificación de ADN por medio de espectrofotometría. Se tomaron 190 μL de agua inyectable previamente esterilizada y 10 μL de la muestra de ADN y se colocaron dentro de la microcubeta previamente enjuagada con agua inyectable, se tomaron dos lecturas a longitudes de onda de 260 y 280 nm. La concentración de ADN en $\text{ng}/\mu\text{L}$ se determinó multiplicando la absorbancia $A_{260} \times 10$ (factor de dilución) $\times 50$ (factor de conversión). Para la pureza del ADN se tomó el cociente A_{260}/A_{280} , dividiendo la absorbancia A_{260} entre la A_{280} (Velázquez *et al.*, 2014). Dependiendo del resultado fue la concentración tomada para la prueba de PCR.

3.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Para la PCR se utilizaron dos concentraciones de ADN: 2 μL y 5 μL (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$) de acuerdo con la cuantificación de ADN en el paso anterior y se utilizaron los oligos para hongos ITS 1-f y ITS 4-r (Assad *et al.*, 2020). A continuación, se muestra las secuencias (5' a 3') de los primers utilizados: ITS 1-f TCCGTAGGTGAACCTGCGG (20 pb), ITS 4-r TCCTCCGCTTATTGATAGC (19 pb).

La reacción de PCR se llevó a cabo en tubos de 200 μL con un volumen final de 50 μL . En el caso de 2 μL de ADN, se añadieron 21 μL de agua inyectable previamente estéril, 25 μL de MyTaq™ Mix, 1 μL del primer reverse y 1 μL de primer forward (20mM) y 2 μL de ADN en

el tubo para PCR de capacidad de 200 μL . Cuando se utilizaron 5 μL de ADN se añadieron 18 μL de agua inyectable previamente estéril, 25 μL de MyTaq™ Mix, 1 μL del primer reverse y 1 μL de primer forward con una concentración de 20 mM y por último los 5 μL de ADN en el tubo de PCR.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos con paso de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, anillamiento a 54°C durante 30 segundos y extensión a 72°C un minuto, y una extensión final a 72°C por un minuto.



Figura 14. Proceso de extracción de ADN de cepas aisladas.



Figura 15. Reacción en cadena polimerasa (PCR) punto final.

3.4.3 Electroforesis con gel de agarosa

Para visualizar la correcta amplificación con los primers utilizados se realizó una electroforesis de los amplicones con gel de agarosa. Se utilizaron 150 mL de TAE 1X (Tris Acetato-EDTA buffer) compuesto de Tris-acetato 0.04 M y EDTA 1 mM con pH 8.0 que se

midieron con una probeta graduada y se colocaron dentro de un matraz Erlenmeyer de 150 mL. se pesaron 1.6 g de agarosa grado molecular. Se colocó el TAE en la parrilla de calentamiento y de agitación, se colocó la agarosa y se calentó hasta llevar a ebullición. Una vez que el agar estuvo a 50°C aproximadamente, se agregaron 7.5 μ L de bromuro de etidio mezclando con movimientos circulares el matraz. Antes de solidificar, se vertió el líquido en la cámara de electroforesis y se esperó a que solidificara. Se mezclaron 5 μ L de muestra amplificada con 5 μ L de buffer de carga (azul de bromotimol) en un papel encerado y se depositó un total de 10 μ l en cada pozo del gel, este se corrió a 70 voltios por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente se visualizó el gel en el transiluminador para observar las bandas (Figura 16).

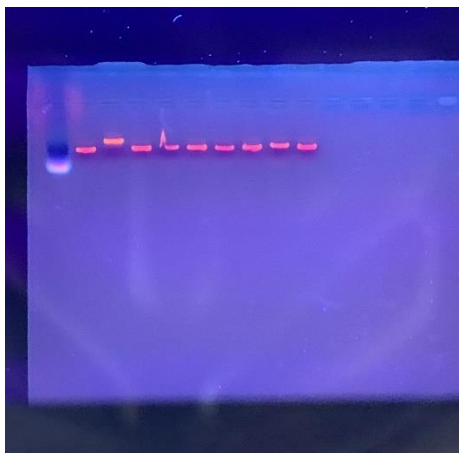


Figura 16. Gel de electroforesis en transiluminador.

3.4.4 Secuenciación y análisis de secuencias

Una vez corroborada la banda en el gel de agarosa, el producto de PCR (20 μ L), se cuantificó por espectrofotometría siguiendo la metodología anterior para ajustar la cantidad de ADN a 1ng/ μ L. Los tubos se sellaron y se enviaron al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) ubicado en San Luis Potosí S.L.P. Los datos de secuencias se compararon con la base de datos GenBank del portal NCBI (Sayers *et al.*, 2020) por medio de la herramienta BLAST. Aquellos hongos con 98% de identidad y 98% de cobertura al número de acceso del BLAST se identificaron de acuerdo con el género y

especie obtenido. Aquellas especies con baja cobertura e identificación se analizaron por el programa CLUSTAL x (Larkin *et al.*, 2007) en donde se alinearon los datos de secuencia con 1200 secuencias obtenidas de la base de datos del GenBank de la región ITS de hongos tanto ectomicorrícicos, saprófitos, patógenos y endófitos. La generación de cladogramas se trabajó con el software MEGA 7. Al generar el árbol filogenético de las muestras obtenidas se utilizó la herramienta Muscle y se empleó el método Neighbor-Joining y Bootstrap de 100 réplicas en el que el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud de ramas internas.

3.5 Prueba de crecimiento en medios de cultivo

De la identificación de hongos realizada por biología molecular, se escogieron aquellas cepas de hongos endófitos y ectomicorrícicos para evaluar el mejor crecimiento radial en los medios de cultivo Biotina-aneurina-ácido fólico-agar (BAF), Melin-Norkrans-modificado (MNM) y Agar papa dextrosa (PDA). A continuación, se indica la cantidad de nutrientes utilizada en cada medio de cultivo.

Biotina-aneurina-ácido fólico agar (BAF)

Se utilizó como fuente de carbono glucosa (30 g/L) y como fuente de nitrógeno, peptona (2 g/L). Como nutrientes se utilizó $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g/L), KH_2PO_4 (0.5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mg/L), MnSO_4 (5 mg/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mg/L). Como vitaminas se le adicionó myo-inositol (0.05 mg/L), ácido fólico (0.1 mg/L), tiamina HCl (0.05 mg/L), biotina (1 $\mu\text{g/L}$). Se utilizó extracto de levadura (0.2 g/L) y agar (15 g/L) (Moser, 1960).

Melin-Norkrans-modificado (MNM)

Se utilizó como fuente de carbono glucosa (5 g/L) y como fuente de nitrógeno $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0.25 g/L). Como nutrientes se utilizó CaCl_2 (0.05 g/L), KH_2PO_4 (0.5 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.31 g/L), NaCl (25 mg/L), FeCl_3 (12 mg/L). Se utilizó extracto de levadura (1 g/L) y extracto de malta (2 g/L) y agar (15 g/L) (Marx, 1969).

Agar de papa y dextrosa (PDA)

Se utilizó el agar papa dextrosa comercial de la marca Difco® y se siguieron las instrucciones del proveedor.

Para realizar los medios se pesaron los reactivos en una balanza analítica y para las vitaminas se realizaron stocks con la concentración requerida. Se agregaron los reactivos excepto las vitaminas a un matraz Erlenmeyer de 1000 mL, se aforó a 1000 mL de agua destilada y se llevó a la parrilla de calentamiento y de agitación hasta llevar a ebullición. Después se esterilizó en la autoclave (20 minutos/120°C) y al sacarlo se esperó a que bajara su temperatura para agregar las vitaminas (previamente esterilizadas por filtro de 0.25 µm) en el caso del BAF, después se vertió en las cajas Petri dentro de la campana de flujo laminar y se resguardaron en el refrigerador (4°C) para su posterior uso.

3.5.1 Determinación de crecimiento en diferentes medios de cultivo

Una vez obtenidos los resultados de secuenciación se eligieron las cepas *Melanogaster ambiguus* (CO6-1403), *Meliniomyces* sp. (SF1-0504), *Phialocephala fluminis* (CO5-1403), *Phialocephala fluminis* (CO8-1403), *Podospora* sp. (CC-1702), *Russula* sp. (HE-0902), *Tuber mexiusanum* (CO7-1403) y *Tuber* sp. (CO9-1405) para la evaluación de su crecimiento en los medios BAF, MNM y PDA. Para ello, de los aislamientos obtenidos (entre 4 y 5 cm de crecimiento radial) de los hongos elegidos, se tomó con la ayuda de un sacabocados y un asa bacteriológica una muestra del micelio de 0.5 cm de diámetro y se colocó en el centro de cada caja Petri con el medio estéril correspondiente (MNM, BAF y PDA) y se etiquetó con el código de la cepa (dos primeras iniciales de la localidad y la fecha de muestreo) y la fecha de cultivo. Se incubaron a 25°C durante tres semanas. Se realizaron 4 repeticiones de cada medio de cultivo (Figura 16).

El crecimiento fue medido en términos del diámetro radial del micelio por semana usando una regla milimétrica, se tomaron dos diámetros partiendo del centro y se realizó un promedio (Figura 17). Las medidas fueron tomadas a los 7, 14 y 21 días o cuando el micelio alcanzó la pared de la caja Petri. Se realizó un análisis de varianza usando el programa estadístico R cran versión 4.4.0 con los resultados de medias obtenidos del crecimiento radial de cada cepa acorde a los medios de cultivo evaluados (BAF, MNM y PDA) y se realizó una separación de medias a través de la prueba de Tukey o LSD ($p \leq 0.05$).

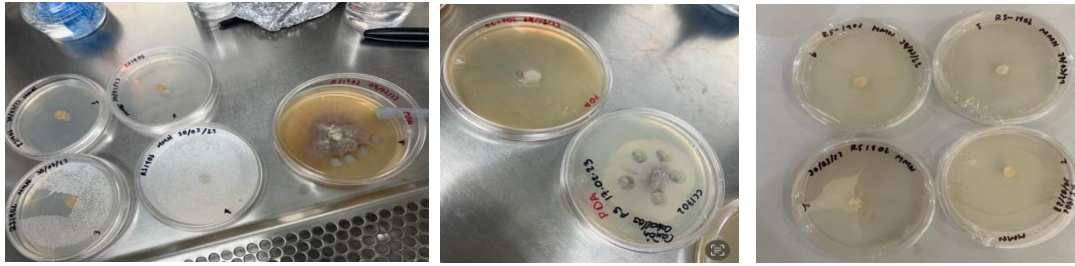


Figura 17. Establecimiento del cultivo *in vitro* de hongos endófitos y ectomicorrícicos en diferentes medios de cultivo.



Figura 18. Medición del crecimiento radial del hongo a los 7, 14 y 21 días de incubación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Selección e identificación

Para el aislamiento de hongos ectomicorrícicos, se procedió a sembrar aquellas raíces con morfología típica de manto fúngico. Se descartaron aquellas que estuvieran secas o con coloración muy oscura y delgada. En la Figura 18 se muestran raíces con morfología típica de hongos micorrícicos los cuales se eligieron para la etapa de desinfección y siembra. Las morfologías observadas en las puntas de raíces de *P. cembroides* fueron de tipo pinada (Figura 18 A), bifurcada (Figura 18 B), coraloide (Figura 18 C y D) y dicotómica ramificada (Figura 18E).

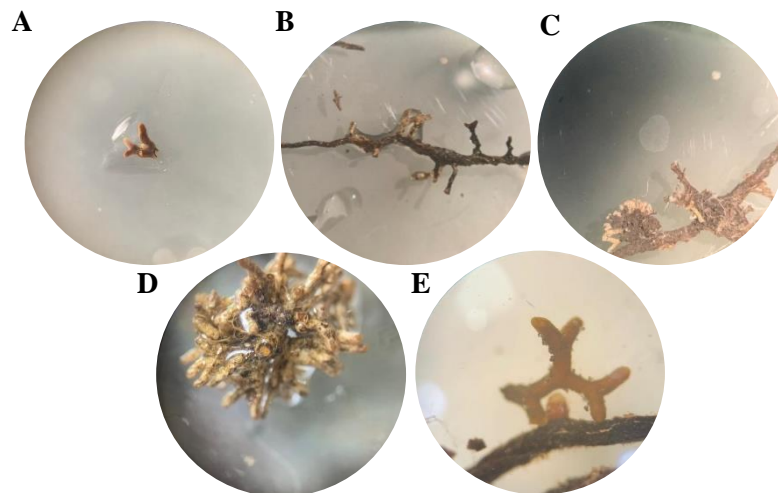


Figura 19. Raíces de *P. cembroides* con morfología típica de ectomicorrizas. A) Pinada, B) bifurcada, C) y D) coraloide y E) dictómica ramificada.

4.2 Identificación molecular

Los amplicones de la región ITS obtenidos, se observan en la Figura 19, las bandas nítidas y únicas, fueron las que se enviaron a secuenciar por el método SANGER al laboratorio LANBAMA de San Luis Potosí. En el gel de electroforesis se muestra un total de 34 cepas aisladas.

Aquellas muestras que no amplificaron se diluyeron diez veces y se volvió a correr la metodología antes descrita de PCR dando resultados positivos.

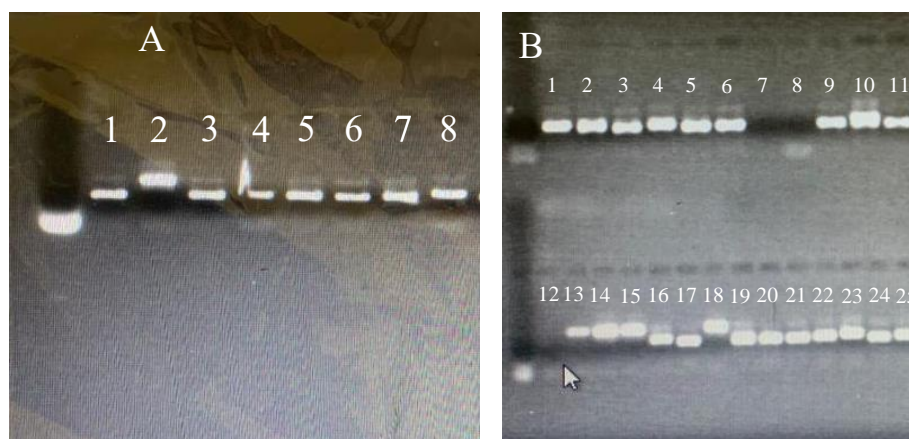


Figura 20. Amplificación de la región ITS para observar la calidad del ADN y el resultado de PCR. A. Carriles 1: CO6-1404 , 2: CO9-1405, 3: CO7-1403, 4: HE-0902, 5: RO-0902, 6: SF1-0504, 7: MO3-0404, 8: SF-2804. B. Carriles 1: CO8-1403, 2: M-0909, 3: ROJ-0404, 4: CO2-2804, 5: CO5-1403, 6: CO-2804, 7: CC-1702, 8: SJ-2804, 9: M2-2804, 10: CO1-1403, 11: R5-1402, 12: CA2-1602, 13: SE-1602, 14: CO12-1403, 15:CO11-1403, 16: CE-1703, 17: CO4-1403, 18: SE-21, 19: CE1-0504, 20: SJ1-0504 21: SE2-1602, 22: R3-1404, 23: SE3-1602, 24: CO10-1403, 25: SE3-1602

En el Cuadro 2 encontramos la información de las cepas aisladas de las raíces de *P. cembroides*, el sitio de colecta y el número de acceso que tuvo mayor porcentaje de identidad con la secuencia obtenida de acuerdo con el BLAST realizado. Del mismo modo, se muestra la clasificación ecológica del hongo dividiéndolo como saprófito, patógeno, endófito, ectomicorriza o ectomicorriza no verdadera según los datos de literatura.

Cuadro 2. Identificación molecular de cepas obtenidas de raíces de *Pinus cembroides*.

Cepa	Localidad	Género/especie	Numero acceso Blast	Clasificación
CO6-1404	Los Compadres	<i>Melanogaster ambiguus</i>	MK397157.1	Ectomicorriza
CO9-1405	Los Compadres	<i>Tuber</i> sp.	HM485414.1	Ectomicorriza
CO7-1403	Los Compadres	<i>Tuber mexiusanum</i>	HM485411	Ectomicorriza
HE-0902	Herradura	<i>Russula</i> sp.	MHM087 EU569267	Ectomicorriza
RO-2804	La Rosita	<i>Gymnopus</i> sp.	AF505784.1	Ectomicorriza
SF1-0504	San Felipe	<i>Meliniomyces</i> sp.	GQ996160	Ectomicorriza no verdadera
MO3-0404	Montebello	<i>Meliniomyces</i> sp.	GQ996160	Ectomicorriza no verdadera
SF-2804	San Felipe	<i>Meliniomyces</i> sp.	GQ996160	Ectomicorriza no verdadera
CO8-1403	Los Compadres	<i>Phialocephala fluminis</i>	AF486124	Endófito
M-0909	Montebello	<i>Phialocephala fortinii</i>	JQ711837.1	Endófito
ROJ-0404	La Rosita	<i>Mycoleptodiscus</i> sp.	EF672300	Endófito
CO2-2804	Los Compadres	<i>Phialocephala fluminis</i>	AF486124	Endófito
CO5-1403	Los Compadres	<i>Phialocephala fluminis</i>	AF486124	Endófito
CO-2804	Los Compadres	<i>Phialocephala fluminis</i>	AF486124	Endófito
CC-1702	Cañón de Caballos	<i>Podospora</i> sp.	JF927155	Endófito
SJ-2804	San Juanito	<i>Halokirschsteiniotelia</i>	AF373057.1	Endófito
M2-2804	Montebello	<i>Pochonia</i> sp.	HE605243	Parásito de nematodos
CO1-1403	Los Compadres	<i>Phomopsis</i> sp.	KC007266	Patógeno
R5-1402	El Recreo	<i>Myrotecium</i>	JN859396.1	Patógeno
CA2-1602	Castillo	<i>Cadophora</i>	JN859259.1	Patógeno
SE-1602	Sierra Escondida	<i>Phaeoacremonium</i> sp.	JQ388264.1	Patógeno
CO12-1403	Los Compadres	<i>Phoma medicaginis</i>	FJ224118	Patógeno
CO11-1403	Los Compadres	<i>Phomopsis</i> sp..	KC007266	Patógeno
CE-1703	Cedritos	<i>Phomopsis</i> sp.	KC007266	Patógeno
CO4-1403	Los Compadres	<i>Fusarium</i>	X94169.1	Patógeno
SE-21	Sierra Escondida	<i>Phomopsis</i> sp.	KC007266	Patógeno
CE1-0504	Cedritos	<i>Phaeoacremonium</i> sp.	JX042828	Patógeno
SJ1-0504	San Juanito	<i>Pochonia</i> sp.	LT623990.1	Patógeno de nemátodos
SE2-1602	Sierra Escondida	<i>Thelonectria</i> sp.	HM054146.1	Saprófito de madera
R3-1402	El Recreo	<i>Ascotaiwania lignícola</i>	HQ446341	Saprófito de madera
SE3-1602	Sierra Escondida	<i>Nectria</i>	KF428599.1	Saprófito de madera
CO10-1403	Los Compadres	<i>Lophiostoma</i> sp.	JN859335	Saprófito de madera
SE3-1602	Sierra Escondida	<i>Nectria</i>	KF428599.1	Saprófito de madera

En el Cuadro 2, se muestran los hongos aislados de raíces de *P. cembroides* en el período enero-mayo de 2023. Se obtuvieron un total de 34 cepas, de las cuales, 8 se consideran endófitas, 5 ectomicorrizas, 3 ectomicorrizas no verdaderas, 6 saprófitos de madera y 12 patógenos.

Los géneros de ectomicorrizas aisladas fueron *Gymnopus*, *Melanogaster*, *Meliniomyces*, *Tuber* y *Russula*. De los géneros mencionados de ectomicorrizas, el que se aisló con mayor frecuencia fue *Meliniomyces* y *Tuber*. De los hongos endófitos aislados, se encontraron especies de los géneros *Phialocephala*, *Mycoleptodiscus* y *Podospora*. Se aisló un parásito de nemátodos (*Pochonia*) y saprófitos de madera de los géneros *Ascotaiwania*, *Lophiostoma*, *Nectria* y *Thelonectria*. Otros hongos encontrados colonizando la raíz de *P. cembroides* dentro de la clasificación de patógenos fueron los géneros *Fusarium*, *Phaeoacremonium*, *Phoma* y *Phomopsis*.

El género que se presentó mayor número de veces en los aislamientos fue el endófito *Phialocephala* con presencia en Los Compadres y Montebello, mientras que los sitios con mayor número de aislamientos de ectomicorrizas fueron Los Compadres (Arteaga Coahuila), San Felipe, La Rosita (Aramberri, Nuevo León), Montebello y la Herradura (Arteaga Coahuila). El hongo ectomicorrícico con mayor frecuencia fue el género *Meliniomyces* seguido de *Tuber* sp.

La Figura 20 muestra un árbol filogenético realizado para la cepa CO91405. Cada cepa se realizó por separado con las secuencias más cercanas en el GenBank y además con un banco de muestras de 1200 secuencias de hongos. La secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados mediante el método de Sanger sirvió para la generación del árbol filogenético mediante el software libre MEGA 7, con el cual se realizó el árbol con el método de Neighbor-Joining. Como se muestra en la Figura 20, la distancia entre la cepa CO71403 y *Tuber mexiusanum* es muy estrecha.



Figura 21. Cladograma de consenso Bootstrap elaborado por el método de Neighbour Joining para el fragmento de ITS. Los números dentro de las ramas representan el número de veces que se repite ese arreglo para esa rama o ramas (100 repeticiones).

El Cuadro 3 muestra el crecimiento radial del hongo en los medios Biotina-aneurina-ácido fólico- Agar (BAF), Melin-Norkrans-modificado (MNM) y Agar de papa y dextrosa (PDA).

Cuadro 3. Crecimiento *in vitro* de hongos endófitos y ectomicorrícicos aislados de raíces de *Pinus cembroides* después de 21 días de incubación en diversos medios de cultivo. Literales diferentes en cada fila indican una diferencia significativa Tukey o LSD ($p \leq 0.05$).

Cepa	Hongo	BAF (cm)	MNM (cm)	PDA (cm)
CO6-1404	<i>Melanogaster ambiguus</i>	4.12±0.47 a	3.20±0.46 b	4.05±0.17 a
SF1-0504	<i>Meliniomyces</i> sp.	7.03±0.10 a	6.78±0.16 a	6.27±0.33 b
CO5-1403	<i>Phialocephala fluminis</i>	2.36±0.45 ab	2.60±0.27 a	1.67±0.37 b
CO8-1403	<i>Phialocephala fluminis</i>	2.80±0.21 a	6.02±4.60 a	1.88±0.22 a
CC-1702	<i>Podospora</i> sp.	3.16±0.30 b	1.95±0.41 c	4.32±0.51 a
HE-0902	<i>Russula</i> sp.	5.01±0.14 b	4.60±0.46 b	10±0 a
CO7-1403	<i>Tuber mexiusanum</i>	2.08±0.28 b	2.60±0.10 a	1.50±0.19 c
CO9-1405	<i>Tuber</i> sp.	2.68±0.41 a	2.41±0.22 a	1.25±0.1 b

Melanogaster ambiguus desarrolló un mejor crecimiento tanto en medio BAF con 4.12 ± 0.47 cm como en PDA con un crecimiento de 4.05 ± 0.17 cm presentando valores de medias estadísticamente similares; esta misma especie presentó menor desarrollo en medio MNM con una media de 3.20 ± 0.46 cm. Los valores de crecimiento para la cepa SF10504 de *Meliniomyces* sp. fueron estadísticamente igual en los medios BAF y MNM; el medio de cultivo que indujo un menor desarrollo radial de este género fue el PDA. El hongo *Phialocephala fluminis* tuvo un mayor crecimiento en el medio de cultivo MNM con un crecimiento de 2.60 ± 0.27 cm (cepa CO51403) en comparación de 2.36 ± 0.45 en el medio BAF y 1.67 ± 0.37 en medio PDA, no se presentaron diferencias significativas para estos dos medios de cultivo; sin embargo, la cepa CO81403 de esta misma especie, no mostró diferencias significativas entre los tres medios evaluados. El hongo *Podospora* sp. tuvo mayor media de crecimiento radial en el medio de cultivo PDA (4.32 ± 0.51 cm) en comparación de 3.16 ± 0.30 en el medio BAF y 1.95 ± 0.41 en medio MNM, todos los tratamientos para esta especie fueron estadísticamente distintos entre sí. La cepa de *Russula* sp. se desarrolló mejor en el medio PDA con un crecimiento de 10 ± 0 cm a diferencia de 5.01 ± 0.14 y 4.60 ± 0.46 en el medio BAF y MNM respectivamente, estos últimos presentaron valores estadísticamente similares. La cepa de *Tuber* sp. se desarrolló mejor tanto en el medio

BAF como en MNM (2.68 ± 0.41 y 2.41 ± 0.22 respectivamente); el medio PDA indujo menor crecimiento para esta cepa (1.25 ± 0.1 cm) en comparación con la cepa CO71403 de *Tuber mexiusanum*, el medio MNM fue el que indujo mejor desarrollo radial seguido del medio BAF y por último PDA.

De un total de las 34 cepas aisladas de raíces colonizadas por hongos, se encontraron 8 cepas consideradas endófitas 5 ectomicorrizas y 3 ectomicorrizas no verdaderas. De las cepas endófitas, se aisló *Phialocephala fluminis*, *Fortinii*, *Podospora*, *Halokirschsteiniiothelia* y *Mycoleptodiscus* sp.

Phialocephala fortinii, es un hongo abundante en ecosistemas forestales y zonas ricas en materia orgánica, pertenece al grupo de hongos endófitos septados oscuros que presentan hifas melanizadas, en medios de agar forman colonias oscuras y tienen la capacidad de colonizar raíces de plantas. Este hongo actúa similar a las micorrizas con las plantas en las que se hospeda. Mejora la absorción de nitrógeno y fósforo degradando las formas poliméricas de estas macromoléculas como celulosa, proteínas y almidón, gracias a esto tiene un papel importante en la descomposición de la materia orgánica presente en el ecosistema forestal. Se han observado como hospedantes de árboles coníferos como *Pinus contorta*, *Pinus sylvestris*, *Abies alba* y *Picea abies* (Narisawa, 2017). Narisawa (2021) puso a prueba la capacidad de este hongo de degradar celulosa y promover el crecimiento de plantas, en su estudio, utilizó tres hongos aislados de distintos ecosistemas forestales identificándolos como promotores de crecimiento, observaron que *Brassica oleracea* aumentó su crecimiento hasta un 92.5% y *Spinacia oleracea* en un 303%, respectivamente, dentro de sus conclusiones mencionan que este hongo es un potencial degradador de celulosa, promueve el crecimiento de plantas y no causa síntomas en plantas no micorrizadas. En este estudio las cepas aisladas se tenían en medio PDA. El endófito septado oscuro *Phialocephala fluminis* incluye abundantes colonizadores de raíces vivas y finas de coníferas en bosques templados del norte, una hipótesis sobre su naturaleza sugiere que provoca un comportamiento endofítico a un comportamiento patógeno resultante de cambios en la salud y resistencia de la planta huésped (Menkis *et al.*, 2004).

Las especies del género *Podospora* sp. son endófitos saprofitos que podemos encontrar en pastos, suelo y árboles. Cuando el suelo está sano, son abundantes en él y pueden suprimir el marchitamiento en plantas de tomate causado por *Verticillium*. A este género pertenecen 64 especies en todo el mundo (Zhao *et al.*, 2021; Eo *et al.*, 2022). Para combatir síntomas de estrés por salinidad y síntomas de sequía, Kazerooni *et al.*, (2022) aislaron cepas de suelo de plantas de tomate sano y las identificaron como *Podospora bulbilosa* y *Actinomucor elegans*, estas cepas de hongos se utilizaron en un experimento de invernadero donde inocularon mediante suspensiones las plantas durante 12 días, las cuales fueron expuestas ante estrés hídrico y salino, finalmente se demostró que la aplicación de los hongos aumentó la supervivencia de las plantas, el contenido de clorofila, aminoácidos, carotenoides, y un menor metabolismo de lípidos y peróxido de hidrógeno comparándolas con las plantas control, dentro de sus conclusiones indican que estos hongos pueden ser utilizados como biofertilizantes y para aumentar la resistencia en plantas ante el estrés.

En 2012, se determinó un nuevo género nombrado *Halokirschsteiniotelia*, donde pertenece la especie marina *Kirschsteiniotelia marítima* (Heuchert, 2018).

Kirschsteiniotelia se caracteriza por ascomatas cilíndricos-clavadas, de superficie semiinmersa, hemisférica o subglobosa, de color marrón oscuro a negro, que se desarrollan entre numerosas pseudoparáfisis y, en su mayoría, ascosporas monoseptadas. Es un género de Dothideomycetes, aunque su ubicación ordinal y familiar es incierta y actualmente está clasificado como Dothideomycetes. Este género se ubica en Pleosporaceae, mientras que sus anamorfos hifomicetos conocidos se refieren a Pleomassariaceae, fue encontrada e introducida de madera en descomposición (Boonmee *et al.*, 2012).

Mycoleptodiscus se ha reportado como agente de control biológico de inundación para el manejo de la hidrilla, una de las peores malezas acuáticas del mundo. Dado que no produce conidios en cultivo líquido, se evaluaron diversas condiciones nutricionales como medio para producir altas concentraciones de propágulos de hongos estables como los microesclerocios (Shearer y Jackson, 2006). Los hongos producen metabolitos fitotóxicos que pueden utilizarse en el desarrollo de bioherbicidas. Estos extractos fueron aplicaron por Portela *et*

al., (2024) a semillas, hojas desprendidas y plantas vivas de *C. sativus* para evaluar los efectos de fitotoxicidad.

Se ha reportado el uso de *Melanogaster ambiguus* inoculado en abeto Douglas (Pera *et al.*, 1999) indicando que el hongo persistió durante muchos años en el campo e intensificaron la supervivencia y el crecimiento de los árboles. Por lo tanto, el establecimiento de plantaciones forestales colonizadas por ECM presentan una alternativa para fortalecer la sostenibilidad de los bosques plantados y reducir la dependencia de fertilizantes químicos de fuentes no renovables. Los esporocarpos de hongos hipogeos contienen diversos nutrientes como proteínas, grasas, complejos nitrogenados, vitaminas, microelementos (p. ej. cobre, zinc, sodio, calcio, hierro, potasio, selenio) los cuales son de utilidad para algunos mamíferos en épocas de hibernación o sequía (Komur *et al.*, 2021).

Tuber sp. es un género del orden Pezizales que produce trufas que son cuerpos fructíferos subterráneos (Marozzi *et al.*, 2017). Se caracteriza por sus hábitos hipogeos con ascosporas alveoladas y por sus aromas. A este género pertenecen hongos que ectomicorrizan gimnospermas y angiospermas sobre todo de géneros como *Quercus*, *Carva*, *Pinus* y algunas especies de orquídeas. Tiene un papel relevante respecto al ciclo de nutrientes en el bosque y a nivel comercial por su sabor y aroma, se comercializan para la gastronomía gormuet (De La Fuente *et al.*, 2024). *Tuber mexiusanum* tiene ascomatas que produce una reacción verdosa y olor a acetona cuando se cortan y presenta células terminales en el peridio (De La Fuente *et al.*, 2024). *T. mexiusanum* se describe desde México hasta el este y medio oeste superior de Estados Unidos. Guevara *et al.*, (2013) lo reportan en Coahuila y Tamaulipas, regularmente las especies del género *Tuber* son económicamente importantes porque algunas de ellas han sido cultivadas para consumo humano, crecen en asociación simbiótica micorrízica con árboles de gimnospermas y angiospermas y sus especies forman parte de la dieta de pequeños mamíferos roedores, así como de venados, osos, jabalíes y de invertebrados, como insectos y caracoles, entre otros dispersores importantes para la diseminación de sus propágulos (Guevara *et al.*, 2013).

El género *Russula* pertenece a la familia Russulaceae, es un grupo con pileos de colores brillantes y basidocarpos frágiles no lácticos. A este género pertenecen más de 780 especies que crecen en casi todos los bosques, desde la tundra ártica hasta bosques tropicales y muchos de estos son ectomicorrícicos. De estos, la mayoría son comestibles, pero existen venenosos que pueden llegar a ser letales (Li *et al.*, 2019). Este hongo podemos encontrarlo en ambientes con condiciones climáticas donde la degradación de materia orgánica se hace más lenta y se limita la absorción de nutrientes de la planta. Jean y Bordreau (2021) inocularon este hongo, *P. fortinnii*, y *R. ericae* en el arbusto *Salix planifolia* y se sembró con rocas de mina ya que se ha recomendado en los relaves de minas la inoculación de microbiontes para restaurar la cubierta vegetal. Los autores concluyeron que este hongo tuvo un efecto positivo en los esquejes cultivados ya que aumentaron la producción de biomasa. Esto demostró que este tipo de microorganismos promueven el establecimiento y la productividad de plantas en rocas abandonadas, también se puede utilizar para la restauración ecológica de la minería en ecosistemas boreales.

Mohan (2015) estudió el efecto inhibitorio de hongos ectomicorrícicos entre ellos *Russula parazurea* contra hongos fitopatógenos como *Botrytis* sp., *Lasiodiplodia theobromae*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Se demostró que la especie *R. parazurea* fue antagonista contra *S. vesiculosum* en un 52.22%.

El género *Gymnopus* sp. se caracteriza por tener basidiomas colibioides, en ocasiones tricolomatoides o marasmioides, laminillas libres casi siempre apiladas, presenta una base estrigosa con esporas blancas, basidiosporas elipsoides a oblongas cortas, forma hifas coraloides o algunas veces hifas diverticuladas. Dentro de las especies encontramos con valor económico a *G. ocior* y *G. erythropus* y también dentro de este género existen hongos venenosos como lo es *G. densilamellatus* (Hu *et al.*, 2022).

El género *Meliniomyces* sp. pertenece a la división de los ascomicetos. Sus especies se han encontrado en raíces de coníferas como *Picea abies* y *Pinus pinaster* (Santolamazza-Carbone *et al.*, 2021). De este género se ha estudiado su actividad antifúngica, en donde Nayak *et al.*, (2021) demostraron que la especie *Meliniomyces variabilis* ha tenido efectos inhibitorios al exponerlo con *F. oxysporum*. Aunque los hongos coasociados con ECM comprenden un amplio espectro de simbiontes fúngicos, dos asociaciones parecen ser más frecuentes en los

bosques templados y boreales del hemisferio norte: miembros del agregado de *Rhizoscyphus ericae* y el grupo septado oscuro de endófitos que muestran afinidades o pertenecen al complejo de especies *Phialocephala fortinii*, ambos grupos contienen especies capaces de formar ectomicorrizas con red de Hartig desarrollada, *Meliniomyces bicolor* produce el morfotipo ECM de *Piceirhiza bicolorata* (Vohnik *et al.*, 2013).

4.3 Crecimiento *in vitro*

Trabajar con cultivos miceliales de hongos requiere conocimientos sobre nutrición fúngica. Deacon (2013) definió los requisitos mínimos de nutrientes (MNR) para el crecimiento de hongos como la concentración y composición mínima de nutrientes para la mayoría de las especies de hongos. Las excepciones son hongos que necesitan ser suplementados con vitaminas, con requerimientos específicos de su hábitat y que no pueden utilizar nitrato ni amonio, necesitando tener aminoácidos como fuente de nitrógeno (N), como muchos Basidiomycota (Ito y Reishi, 2014). El nitrógeno y las fuentes de carbono influyen en gran medida en el crecimiento de los hongos y estableciéndose en condiciones controladas, especialmente los organismos más exigentes como los hongos EC. La utilización de carbohidratos depende directamente de la presencia y cantidad de fuentes de nitrógeno, por lo que es esencial tener en cuenta la cantidad y la fuente de cada uno de estos nutrientes cuando se trabaja con macrohongos saprobios y ECM (Ito y Reishi, 2014).

Muchos hongos ECM no son capaces de metabolizar disacáridos, como la sacarosa que producen las plantas. Esto debido a la falta de una invertasa, una enzima vegetal que hidroliza la sacarosa en monosacáridos, fructosa y glucosa. Por lo tanto, la adición de monosacáridos como la glucosa al medio de cultivo es fundamental para el crecimiento óptimo de los hongos. Se ha informado con frecuencia que el amonio es una fuente de N inorgánico fácilmente utilizable y más adecuado que las fuentes de nitrógeno orgánico como los aminoácidos. Existen varios medios de cultivo para el crecimiento de organismos como hongos y plantas en cultivos puros. Los medios de cultivo más comunes para ECM y hongos saprobios son el agar papa dextrosa (PDA), el Melin-Norkrans modificado (MMN) (Marx,

1969), el ácido biotina-aneurina-ácido fólico (BAF) (Moser 1960) y el agar extracto de malta (MEA) (Martins *et al.*, 2016).

A pesar de que los hongos tienen diferentes estilos de vida y diferentes requisitos nutricionales, un medio de cultivo integral con varias formas (en cuanto a complejidad) de nutrientes orgánicos, como el medio Papa Dextrosa Agar (PDA), demostró satisfacer los requisitos de casi todos los hongos endófitos. Por otro lado, un medio de cultivo específico como el medio modificado Melin-Norkrans (MNM) demostró un medio adecuado para algunas especies de ectomicorrizas como *Tuber mexiusanum* y *Tuber* sp. A pesar de la evidencia de crecimiento fúngico en medio BAF, todos los hongos mostraron una baja respuesta de crecimiento en el mismo cuando se comparó con PDA o MNM, lo complicado de este medio es la esterilización de las vitaminas ya que deben ser filtradas por membrana menor a 0.25 μm a diferencia de los otros medios de cultivo utilizados.

Hernández-Cuevas, (2023) aisló cepas del bosque de *Juniperus deppeana* para su propagación *in vitro* en 3 medios: papa dextrosa y agar (PDA), extracto de malta agar (EMA), agar lignina Kraft (A-L) y medio mineral (MM), reportando que el medio en el que las dos cepas de *Gymnopus* crecieron de mejor manera fue en medio PDA con 4.34 mm y 5.32 mm por día.

V. CONCLUSIONES

Se logró aislar e identificar 34 cepas obtenidas de raíces micosadas de *Pinus cembroides* de las cuales, 8 cepas se identificaron como ectomicorrizas pertenecientes a los géneros *Gymnopus*, *Melanogaster*, *Meliniomyces*, *Tuber* y *Russula*, y 8 cepas de hongos endófitos pertenecientes a los géneros *Phialocephala*, *Mycoleptodiscus* y *Podospora*; además 6 cepas saprófitos de madera y 12 cepas patógenas a través de identificación molecular. El género que se presentó con mayor frecuencia fue el endófito *Phialocephala*, con presencia en los sitios Los Compadres y Montebello. Mientras que los sitios con mayor número de aislamientos de ectomicorrizas fueron Los Compadres (Arteaga, Coahuila), San Felipe, La Rosita (Aramberri, Nuevo León) Montebello y la Herradura (Arteaga, Coahuila). El hongo ectomicorrícico con mayor frecuencia fue el género *Meliniomyces* seguido de *Tuber* sp.

El medio en el que se tuvo un mejor crecimiento y desarrollo de *Podospora* sp. y de *Russula* sp. fue el PDA. Para las cepas de *Phialocephala fluminis* y *Tuber mexiusanum* el medio que propició más su crecimiento fue MNM. Para las cepas del género *Tuber* sp. y *Meliniomyces* sp. fue indistinto el crecimiento en los medios BAF y MNM y en la cepa *Melanogaster ambiguus* presentó igual crecimiento en los medios PDA y BAF.

El presente trabajo muestra las bases para futuras investigaciones con hongos ectomicorrícicos tanto en estudios *in vitro*, invernadero y en campo. Si bien, los aislamientos de cepas de ectomicorrizas fueron pocos, se han encontrado estudios limitados sobre el cultivo de estos hongos y su relación con hongos endófitos. Se hace patente la búsqueda de organismos benéficos para fortalecer el crecimiento y supervivencia en campo, así mismo se expresa la importancia de preservar el material biológico y seguir apoyando a la búsqueda de especies para mejorar la restauración en bosques comprometidos por actividades derivadas de mal manejo e incendios forestales.

VI. LITERATURA CITADA

- Agerer R. y Rambold G. (2007) DEEMY - An information system for determination and characterisation of ectomycorrhizae. - www.deemy.de. München, Germany.
- Albornoz, P. L., y Catania, M. D. V (2021): *Relación entre hongos y raíces de plantas (Micorrizas)*. Universo Tucumano (1° ed). 75: 8.
- Aguilar-Aguilar, S., Pérez-Moreno, J., Ferrera-Cerrato, R., Grimaldo-Juárez, O., Cervantes-Díaz, L. y González-Mendoza, D. (2009) Hongos ectomicorrícicos y la tolerancia a la salinidad en plantas. *Revista chilena de historia natural* 82(1): 163-168.
- Alatorre Cejudo, L. C., Torres Olave, M. E., Sanchez Flores, E., Granados-Olivas, A., Bravo Peña, L. C., y Maldonado Marín, J. D. (2020). GEOINFORMÁTICA, EPIDEMIOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD. Dinámica temporal de la actividad vegetal en zonas degradadas por *Ips confusus* en bosque de *Pinus cembroides*: región central de Chihuahua (2000-2014) (1°ed). Universidad Autónoma de Ciudad Juárez: 111-114.
- Assad, R.; Reshi, Z.A.; Rashid, I. y Mir, S.H. (2020). Restoration of heavy metal-contaminated environs through ectomycorrhizal symbiosis. *Bioremediation and Biotechnology*; Bhat, R.A., Hakeem, K.R., Eds.; *Springer Nature*: 313–330.
- Baeza Guzmán, Y., Dorantes López, J., Medel Ortiz, R., y Trejo Aguilar, D. (2021). Morfotipos de ectomicorrizas en una cronosecuencia de rodales de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. & Cham. en la zona este de México. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 12(66), 141-164.

- Balestrini, R., y Bonfante, P. (2014). Cell wall remodeling in mycorrhizal symbiosis: a way towards biotrophism. *Frontiers in plant science*, 5, 237
- Becquer, A., Guerrero-Galán, C., Eibensteiner, J. L., Houdinet, G., Bücking, H., Zimmermann, S. D., et al. (2019). The ectomycorrhizal contribution to tree nutrition,. *Advances in Botanical Research*. 89: 77–126.
- Bertolazi, A. A., Canton, G. C., Azevedo, I. G., Cruz, Z. M. A., Soares, D. N. E. S., Conceição, J. M., ... y Ramos, A. C. (2010). O papel das ectomicorrizas na biorremediação de metais pesados no solo. *Natureza on line, Santa Teresa*, 8(1): 24-31.
- Boonmee, S., Ko, T. W. K., Chukeatirote, E., Hyde, K. D., Chen, H., Cai, L., ... y Hassan, B. A. (2012). Two new kirschsteiniiotheli a species with dendryphiopsis anamorphs cluster in kirschsteiniiotheliaceae fam. nov. *Mycologia*, 104(3): 698-714.
- Brundrett, M. C., y Tedersoo, L. (2018). Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytologist*, 220(4): 1108-1115.
- Carrillo-Saucedo, S. M., Puente-Rivera, J., Montes-Recinas, S., y Cruz-Ortega, R. (2022). Las micorrizas como una herramienta para la restauración ecológica. *Acta botánica mexicana*, 129: 22.
- Castrejón, J. Z., Pacheco, B. G., Nieto, J. R., Ramos, L. Á., y Ávila-Ramos, F. (2021). El árbol *Pinus cembroides* como alternativa para reforestar ciudades, parques y jardines. *Abanico Agroforestal*, 3: 1-12.
- Chávez-Aguilar, G., Pérez-Suárez, M., y Burrola-Aguilar, C. (2021). Ectomicorrizas, su papel potencial en la mitigación del cambio climático. *Revista Ciencia UANL*, 24(106): 25-32.

- Chávez, D., Pereira, G. y Machuca, A. (2009). Crecimiento in vitro de *Lactarius deliciosus* en medio de cultivo BAFy MNM. En: 4° Congreso Chileno de Ciencias Forestales. Universidad de Talca, Chile: 8.
- Constante García, V., Villanueva Díaz, J., Cerano Paredes, J., Cornejo Oviedo, E. H. y Valencia Manzo, S. (2009). Dendrocronología de *Pinus cembroides* Zucc. y reconstrucción de precipitación estacional para el Sureste de Coahuila. *Ciencia forestal en México*, 34(106): 17-39.
- Cope, K. R., Bascaules, A., Irving, T. B., Venkateshwaran, M., Maeda, J., Garcia, K., ... y Ané, J. M. (2019). The ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* produces lipochitoooligosaccharides and uses the common symbiosis pathway to colonize *Populus* roots. *The Plant Cell*, 31(10): 2386-2410.
- Cuevas Cruz, J. C., y Aquino-Ramírez, A. (2020). Ecuaciones de aditividad para la estimación de biomasa aérea de *Pinus cembroides* Zucc. *Madera y bosques*, 26(1).
- Dago Dueñas, Y., Calzadilla Reyes, K., Redonet Miranda, M. D. L. Á., y Suarez Mesa, A. G. (2023). Especies de hongos ectomicorrízicos en dos ecosistemas de la localidad Plan Café. *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 11(1): 1-6.
- De la Fuente, J. I., Rosales-Rosales, W., Martínez-González, C. R., Martínez-Reyes, M., Elizondo-Salas, A. C., y Pérez-Moreno, J. (2024). *Tuber itzcuinzapotl* sp. nov. (Tuberaceae, Pezizomycetes), the first edible truffle reported from Mexico with traditional biocultural importance. *Phytotaxa*, 635(3): 206-216.
- Deacon, J. W. (2013), *Fungal Biology* (4°ed). Blackwell Publishing: 258.
- Eo, J. K., Choi, J., Lee, S. W., y Kim, N. Y. (2022). *Podospora leporina* (Podosporaceae): an unrecorded endophytic fungus isolated from *Cypripedium guttatum*. *The Korean Journal of Mycology*, 50: 362.

- Feijen, F. A., Vos, R. A., Nuytinck, J., y Merckx, V. S. (2018). Evolutionary dynamics of mycorrhizal symbiosis in land plant diversification. *Scientific Reports*, 8(1): 1-7.
- Galindo-Flores, G., Castillo-Guevara, C., Campos-López, A. y Lara, C. (2015). Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences*, 93(4): 855-863.
- García, K. , Chasman, D. , Roy, S. , Ané, J.-M. (2017). Physiological responses and gene co-expression network of mycorrhizal roots under K⁺ deprivation. *Plant Physiol.* 173: 1811–1823.
- García, K. , Chasman, D. , Roy, S. , Ané, J.-M. (2017). Physiological responses and gene co-expression network of mycorrhizal roots under K⁺ deprivation. *Plant Physiol.* 173: 1811–1823.
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, M., y Flores-García, A. (2013). Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84(1): 153-169.
- Garza Ocañas, F., García Jiménez, J., Estrada Castellón, A. E., y Villalón Mendoza, H. (2002). Macromicetos, ectomicorrizas y cultivos de *Pinus culminicola* en Nuevo León. *Ciencia UANL*, 5(2).
- Gil-Martínez, M., López-García, Á., Domínguez, M. T., Navarro-Fernández, C. M., Kjølner, R., Tibbett, M., Marañón, T. (2018). Ectomycorrhizal fungal communities and their functional traits mediate plant–soil interactions in trace element contaminated soils. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1682.

- Gómez-Romero, M., Villegas, J., Sáenz-Romero, C., y Lindig-Cisneros, R. (2013). Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. *Madera y bosques*, 19(3): 51-63.
- Guerrero-Galán, C.; Calvo-Polanco, M.; Zimmermann, S.D. (2019) Ectomycorrhizal symbiosis helps plants to challenge salt stress conditions. *Mycorrhiza*, 29: 291–301
- Guevara, G., Bonito, G., y Cázares, E. (2013). Revision of the genus *Tuber* (Tuberaceae: Pezizales) from Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84: 39-49.
- Guin-Po, P. C. (2021). Influencia de diferentes medios de cultivo y niveles de pH en el crecimiento in vitro de 6 cepas del género *Suillus*. *Ciencia & Investigación Forestal*, 27(3):17-33.
- Gutiérrez, C. D. I. R., y Endoqui, P. B. A. P. (2019) Diversidad y Ecología de morfotipos ectomicorrizicos de *Abies religiosa* (Kunth) Schltdl. & Cham. *Academia Journals*,11(3): 1366-1371.
- Kazerooni, E. A., Maharachchikumbura, S. S., Al-Sadi, A. M., Rashid, U., Kang, S. M., y Lee, I. J. (2022). *Actinomucor elegans* and *podospora bulbilosa* positively improves endurance to water deficit and Salinity Stresses in tomato plants. *Journal of Fungi*, 8(8): 785.
- Komur, P., Chachuła, P., Kapusta, J., Wierzbowska, I. A., Rola, K., Olejniczak, P., y Mleczko, P. (2021). What determines species composition and diversity of hypogeous fungi in the diet of small mammals? A comparison across mammal species, habitat types and seasons in Central European mountains. *Fungal Ecology*, 50.
- Hernández-Cuevas, L. V., Tomasini, A., Ortiz-Ortiz, E., y Montiel-González, A. M. (2023). Hongos saprófitos neotropicales de bosque de *Juniperus deppeana* (Cupressaceae): aislamiento, identificación, cultivo in vitro y preservación. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 94(3):11.

- Heuchert, B., Braun, U., Diederich, P., y Ertz, D. (2018). Taxonomic monograph of the genus *Taeniolella* s. lat.(Ascomycota). *Fungal Systematics and Evolution*, 2(1): 69-261.
- Hu, J. J., Song, L. R., Tuo, Y. L., Zhao, G. P., Yue, L., Zhang, B., y Li, Y. (2022). Multiple evidences reveal new species and a new record of smelly *Gymnopus* (Agaricales, Omphalotaceae) from China. *Frontiers in Microbiology*, 13, 968617.
- Ito, Z. A. y Reshi, Z. A. (2014), 'Effect of different nitrogen and carbon sources and concentrations on the mycelial growth of ectomycorrhizal fungi under in-vitro conditions', *Scandinavian Journal of Forest Research*, 29(7):619-628.
- Jarquín, P. A. A. (2022). El planeta amenazado y amenazante por el cambio climático. *Revista Humanismo y Cambio Social: revista electrónica de humanidades y ciencias sociales*, 19: 152-169.
- Jean, R., Khasa, D. P., y Boudreau, S. (2021). Effects of one dark septate endophytic fungal and two Helotiales strains on the growth of plane-leaved willow (*Salix planifolia*) cuttings on iron ore waste rock. *Botany* 99: 725–733.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007 Nov 1;23(21):2947-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404. Epub 2007 Sep 10. PMID: 17846036.
- Li, GJ, Zhao, RL, Zhang, CL y Lin, FC (2019). Una selección preliminar de códigos de barras de ADN para el género *Russula* (Russulales, Basidiomycota). *Micología*, 10 (2): 61-74.
- Liao, H. L., Chen, Y., y Vilgalys, R. (2016). Metatranscriptomic study of common and host-specific patterns of gene expression between pines and their symbiotic ectomycorrhizal fungi in the genus *Suillus*. *PLoS Genetics*, 12(10).

- Marozzi, G., Sánchez, S., Benucci, G. M. N., Bonito, G., Falini, L. B., Albertini, E., y Donnini, D. (2017). Mycorrhization of pecan (*Carya illinoensis*) with black truffles: *Tuber melanosporum* and *Tuber brumale*. *Mycorrhiza*, 27: 303-309.
- Martins, R. F. D. R. M. A. (2016). Ectomycorrhizal associations of edible fungi and *Cistus* spp.: from field studies to in vitro synthesis [Tesis de maestría, Universidad de Coimbra]. Repositório científico da UC: 1-108.
- Martínez Nevárez, L. E., Sarmiento López, H., Sigala Rodríguez, J. Á., Rosales Mata, S., y Montoya Ayón, J. B. (2016). Respuesta a la inoculación inducida de *Russula delica* Fr. en plantas de *Pinus engelmannii* Carr. en vivero. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 7(33): 108-117.
- Martínez Reyes, M. (2010). Micorrización, crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* y *P. montezumae* inoculados con tres hongos comestibles. [Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados] Colpos digital: 19.
- Marx, D. H. (1969), 'The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria', *Phytopathology* 59: 153–163.
- Menkis, A., Allmer, J., Vasilias, R., Lygis, V., Stenlid, J., y Finlay, R. (2004). Ecology and molecular characterization of dark septate fungi from roots, living stems, coarse and fine woody debris. *Mycological Research*, 108(8):965-973.
- Moctezuma López, G., y Flores, A. (2020). Importancia económica del pino (*Pinus* spp.) como recurso natural en México. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 11(60): 161-185.
- Mohan, V., Nivea, R., y Menon, S. (2015). Evaluation of ectomycorrhizal fungi as potential bio-control agents against selected plant pathogenic fungi. *JAIR*, 3(9): 408-412.
- Moser, M. (1960), 'Die Gattung *Phlegmacium*', *Die Pilze Mitteleuropas* 4, 134–135.

- Narisawa, K. (2017). The dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* is a potential decomposer of soil organic compounds and a promoter of *Asparagus officinalis* growth. *Fungal Ecology*, 28: 1-10.
- Narisawa, K. (2021). The cellulolytic activity and symbiotic potential of dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii* to promote non-mycorrhizal plants growth. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 648(1).
- Nayak, S., Samanta, S., Sengupta, C., y Swain, S. S. (2021). Rice crop loss due to major pathogens and the potential of endophytic microbes for their control and management. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 9(5): 166-175.
- Nehls, U., y Plassard, C. (2018). Nitrogen and phosphate metabolism in ectomycorrhizas. *New Phytologist*, 220(4): 1047-1058.
- Otero-Blanca, A.; Folch-Mallol, J.L.; Lira-Ruan, V.; del Rayo Sánchez Carbente, M.; Batista-García, R.A., (2018) Phytoremediation and fungi: An underexplored binomial. Approaches in Bioremediation: The New Era of Environmental Microbiology and Nanobiotechnology; Prasad, R., Aranda, E., Eds.; *Springer*: 79–95.
- Paparokidou, C., Leake, J.R. y Beerling, D.J. *et al* (2021). Phosphate availability and ectomycorrhizal symbiosis with *Pinus sylvestris* have independent effects on the *Paxillus involutus* transcriptome. *Mycorrhiza* 31: 69–83.
- Pera, J.; Álvarez, I.F.; Rincón, A. y Parladé, J. (1999) Field performance in northern Spain of Douglas-fir seedlings inoculated with ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 9: 77–84.
- Pera, J., y Parladé, J. (2005). Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria, Sistemas y Recursos Forestales*, 14(3): 419-433.

- Pérez Miranda, R., Romero Sánchez, M. E., González Hernández, A., Rosales Mata, S., Moreno Sánchez, F., y Arriola Padilla, V. J. (2019). Modelado de la distribución actual y bajo cambio climático de pinos piñoneros endémicos de México. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 10(56): 218-237.
- Pérez-Moreno, J., y Read, D. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29(5): 239-247.
- Portela, V. O., da Rosa, O. R., Souza, M., de Oliveira Adolpho, L., Dalcol, I. I., y Jacques, R. J. S. (2024). Chemical composition and bioherbicidal activity of metabolites of *Mycoleptodiscus indicus* produced in three culture media. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 58.
- Rodríguez, A., Fernández de Ana Magán, F. J., y Rodríguez Fernández, R. J. (1992). Estudio de la variabilidad intraespecífica de un hongo ectomicorrízico de *Castanea* sp.: *Boletus fragans* Vitt. *Revista Mexicana de Micología* 30: 1-7.
- Salcido-Ruiz, S., Prieto-Ruíz, J., García-Rodríguez, J. L., Santana-Aispuro, E., y Chávez-Simental, J. A.. (2020). Micorrizas y fertilización: efecto en la producción de *Pinus engelmannii* Carr. en vivero. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 26(3): 327-342.
- Sandoval-García, R., Jiménez-Pérez, J., Yereña-Yamallel, J. I., Aguirre-Calderón, O. A., Alanís-Rodríguez, E., y Gómez-Meza, M. V. (2022). Estrategias de restauración ecológica asociadas a reforestaciones de *Pinus cembroides* Zucc., en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey. *Madera y bosques*, 28(2).
- Sevanto, S., Gehring, C. A., Ryan, M. G., Patterson, A., Losko, A. S., Vogel, S. C., ... y Kuske, C. R. (2023). Benefits of symbiotic ectomycorrhizal fungi to plant water relations depend on plant genotype in pinyon pine. *Scientific Reports*, 13(1): 1-9.

Sistema Nacional de Información Forestal, Programa de Manejo del fuego (2024).
<https://snif.cnf.gob.mx/estadisticas-de-incendios/>. Recuperado 26 de mayo de 2024.

Robles Villanueva, F., Rodríguez Trejo, D. A., y Villanueva Morales, A. (2017). Calidad de planta y supervivencia en reforestación de *Pinus montezumae* Lamb. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 8(42): 55-76.

Rodríguez-Gutiérrez, I., Ramírez-Martínez, D., Garibay-Orijel, R., Jacob-Cervantes, V., Pérez-Moreno, J., Ortega-Larrocea, M., y Arellano-Torres, E. (2019). Sympatric species develop more efficient ectomycorrhizae in the *Pinus-Laccaria* symbiosis. *Revista mexicana de biodiversidad*, 90: 1-11.

Rodríguez-Trejo, D. A., y L. Quiahua B.(2021). *Pinus* L. (Pinaceae). In: Rodríguez-Trejo, D. A. (coord.). Semillas de Especies Forestales. Dicifo, UACH:223-245.

Santolamazza-Carbone, S., Iglesias-Bernabé, L., Sinde-Stompel, E., y Gallego, P. P. (2021). Ectomycorrhizal fungal community structure in a young orchard of grafted and ungrafted hybrid chestnut saplings. *Mycorrhiza*, 31(2): 189-201.

Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K.D., Karsch-Mizrachi, I. GenBank, Nucleic Acids Research, Volume 48, Issue D1, 08 January 2020, Pages D84–D86.

Shearer J.F., Jackson M.A. 2006. Liquid culturing of microsclerotia of *Mycocleptodiscus terrestris*, a potential biological control agent for the management of hydrilla. *Biological control*, 38(3): 298-306.

Tang, N., Lebreton, A., Xu, W., Dai, Y., Yu, F., y Martin, F. M. (2021). Transcriptome profiling reveals differential gene expression of secreted proteases and highly specific gene repertoires involved in *Lactarius–Pinus* symbioses. *Frontiers in Plant Science*, 12: 1-14.

- Tedersoo, L. , May, T.W. , Smith, M.E. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20: 217–263.
- Teomitzi Cuamatzi, D. A., Cuamatzi, T., y Damaris, A. (2014). Aislamiento y caracterización de bacterias gram negativas asociadas al suelo raíz de Pinus cembroides [Tesis doctorado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio Institucional BUAP: 16.
- Valdés Ramírez, María, Ambriz Parra, Enrique, Camacho Vera, Alejandro, y Fierros González, Aurelio M.. (2010). Inoculación de plántulas de pinos con diferentes hongos e identificación visual de la ectomicorriza. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 1(2): 53-63.
- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., y Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 1: 1-26.
- Vohník, M., Mrnka, L., Lukešová, T., Bruzone, M. C., Kohout, P., and Fehrer, J. (2013). The cultivable endophytic community of Norway spruce ectomycorrhizas from microhabitats lacking ericaceous hosts is dominated by ericoid mycorrhizal *Meliniomyces variabilis*. *Fungal Ecol.* 6: 281–292.
- Xu, H., y Zwiazek, J. J. (2020). Fungal aquaporins in ectomycorrhizal root water transport. *Frontiers in Plant Science*, 11: 1-6.
- Yin, D., Halifu, S., Song, R., Qi, J., Deng, X., y Deng, J. (2020). Effects of an ectomycorrhizal fungus on the growth and physiology of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* seedlings subjected to saline–alkali stress. *Journal of forestry research*, 31(3): 781-788.
- Zhao, Y., Fu, W., Hu, C., Chen, G., Xiao, Z., Chen, Y., ... y Cheng, H. (2021). Variation of rhizosphere microbial community in continuous mono-maize seed production. *Scientific reports*, 11(1).

Zúñiga Cruz, A. J (2018). Inoculación de *Pinus cembroides* Zucc. con un hongo ectomicorrízico comestible y una bacteria auxiliadora de la micorrización en dos sustratos [Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados]. Colpos digital: 42.