

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO FORESTAL



Evaluación y Caracterización de Micorrizas Asociadas al Bosque de *Picea mexicana* Martínez en la Sierra el Coahuilón Arteaga, Coahuila

Por:

PATRICIA FERNÁNDEZ GUZMÁN

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO FORESTAL

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO FORESTAL

Evaluación y Caracterización de Micorrizas Asociadas al Bosque de *Picea mexicana* Martínez en la Sierra el Coahuilón Arteaga, Coahuila

Por:

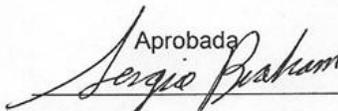
PATRICIA FERNÁNDEZ GUZMÁN

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

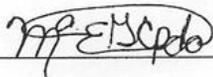
INGENIERO FORESTAL

Aprobada



Ing. Sergio Braham Sabag

Asesor Principal



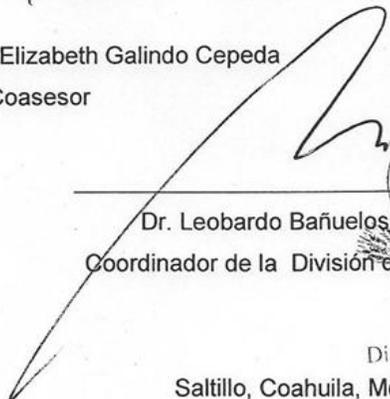
Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda

Coasesor



M.C. David Castillo Quiroz

Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera

Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2014

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Gracias por darme la vida, por enseñarme a seguir el camino correcto por darme salud y bienestar y por permitir culminar esta etapa de mi vida satisfactoriamente.

A mi “ALMA MATER”

Por darme alojamiento durante estos cinco años en los cuales recibí mi formación profesional y cada uno de los momentos inolvidables.

Al Ing. Sergio Braham Sabag por su colaboración disposición y sus aportaciones a este trabajo.

A la Draa. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda por el tiempo dedicado a la revisión de esta investigación y por sus aportaciones.

Al M.C David Castillo Quiroz

Por su tiempo invertido en las revisiones en el presente trabajo.

Al M.C Jorge David Flores Flores

Por sus valiosas aportaciones y el apoyo que siempre me brindó, por enseñarme ese gran espíritu de fortaleza.

A las laboratoristas Blanca y Cristy

Por su apoyo para poder llevar a cabo esta investigación.

A los maestros del departamento forestal por todo su apoyo y sus aportaciones a mi formación profesional.

A mis compañeros y amigos de la carrera: Ilse, Luis, Angelito, mi amigo (Juan Peña y García), Quique Paquirris, Trino, Anibal, Palma, Anita, Naza, Meli, Brianda.

DEDICATORIA

A mis padres: Maria Angela Guzmán Soto y Cosme Fernández López

Porque gracias a su cariño, el apoyo moral, comprensión y por guiar mi camino desde niña he llegado a realizar uno de los anhelos más grandes de mi vida fruto del inmenso amor y confianza que en mí se depositó y con los cuales he logrado terminar mis estudios profesionales que construyen el legado más valioso que pudiera recibir y por lo cual les viviré eternamente agradecida.

A mi hijo: Jaime AbdulTrejo Fernández y A mi esposo: Jaime Trejo Ceron

En Agradecimiento al apoyo y comprensión que me brindaron en todo momento, estimulando esta fase de mi vida de estudiante y alentando con su conducta el logro a mis aspiraciones. Por el tiempo que a ustedes pertenecía y que altruistamente me concedieron con Amor.

A mi querida abuelita: Enedina López Cruz por tu inmenzo cariño.

A mis hermanos: Ene, Toño, Male, Idalid y Aby quienes creyeron en mí. Mi carrera es un triunfo que deseo compartirles y mi satisfacción un sentimiento que deseo transmitirles con el más sincero agradecimiento.

A mis suegros: La Sra. María Teresa Cerón García y Al Sr. Sotero Trejo Baños Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su cariño, apoyo, comprensión y el calor de una bonita familia me alentaron a terminar mi carrera profesional.

A mis cuñados Mine, Leo, Cheli, Licho y Tere gracias por lo que he recibido de ustedes. Ahora más que nunca se acredita mi cariño, admiración y respeto.

Y a toda mi familia que comparte conmigo este triunfo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.	4
Antecedentes.....	4
Clasificación taxonómica de <i>Picea mexicana</i> Martínez (1961).	6
Descripción de <i>Picea mexicana</i> Martínez.	6
Descripción general de las micorrizas.	7
Tipos de micorrizas.....	9
Ectomicorriza.	10
Endomicorriza.	12
Función de las micorrizas.....	13
Absorción de agua y nutrientes.....	14
Producción de reguladores de crecimiento.	15
Protección de las raíces contra agentes patógenos.	15
Factores del suelo que afecta el desarrollo de micorrizas.....	16
Líneas de investigación micorrícica en México.	17
Principales fuentes de micorrización.	17
Hongos asociados.	17
Identificación por claves taxonómicas.	18
MATERIALES Y MÉTODOS.	19
Descripción del área de estudio.	19
Trabajo de campo.	20
Obtención de las muestras.	20
Aplicación de suelo a las plantas.	20
Tratamientos.	21
Diseño experimental.....	21
Modelo experimental.	22
Análisis de varianza.	23
Variables a medir.	23
Altura de la planta.	23

Diámetro de la planta.	23
Superficie de la raíz micorrizada.....	23
Longitud de la raíz.....	24
Riegos.....	24
Trabajo de laboratorio.	24
Preparación del medio de cultivo Papa, Dextrosa, Agar (PDA).....	24
Siembra de suelo.	26
Aislamiento de hongos.	27
Purificación de hongos.	28
Identificación de hongos.	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	30
Superficie de la raíz micorrizada.	30
Altura de la planta.	34
Diámetro del cuello de la planta.....	37
Taxones genéricos de hongos micorrícicos encontrados en el suelo de bosque de <i>Picea</i>	38
<i>Trichoderma sp.</i>	38
<i>Trichoderma harzianum.</i>	38
<i>Lycoperdon perlatum.</i>	41
CONCLUSIONES.	45
RECOMENDACIONES.	46
LITERATURA CITADA.	47
ANEXOS.	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Pág.
1	Tipos de micorrizas formadas por los principales géneros de especies forestales producidas en viveros.....	13
2	Tratamientos aplicados a <i>Picea mexicana</i> Martínez.....	21
3	Diseño y acomodo de los tratamientos experimentales en la investigación.....	22
4	ANVA para porcentaje de micorrización en <i>Picea mexicana</i>	30
5	Prueba de medias Tukey para porcentaje de micorrización.....	31
6	ANVA para altura en <i>Picea mexicana</i>	34
7	Prueba de medias Tukey para altura de las plantas.....	35
8	ANVA para diámetro de tallo en <i>Picea mexicana</i>	37
9	Prueba de medias Tukey para cuello de diámetro de tallo.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	<i>Picea mexicana</i> en la sierra el Coahuilón.....	7
2	Sitio de colecta de suelo de bosque de <i>Picea mexicana</i> en la Sierra el Coahuilón.....	20
3	Registro de peso de PDA en báscula de precisión.....	25
4	Medio de cultivo en reposo para alcanzar la temperatura de vaciado.....	26
5	Vertido de medio en cajas Petri.....	26
6	Siembra de suelo en cajas Petri.....	27
7	Microscopio estereoscópico.....	28
8	Laminillas semipermanentes de hongos.....	29
9	Superficie micorrizada de <i>Picea mexicana</i>	32
10	Características de altura y color de las agujas de las plantas de <i>Picea mexicana</i> en los diferentes tratamientos.....	33
11	Longitud de la raíz del Tratamiento 1 (30 g) de suelo y el testigo.....	34
12	Altura promedio en las plantas.....	36
13	Altura de las plantas de <i>Picea mexicana</i> a los 6 meses de aplicación de los tratamientos.....	36
14	Diámetro promedio en las plantas.....	38
15	Micelio, fialides y esporas de <i>Trichoderma harzianum</i> observadas al microscopio.....	40
16	Crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en PDA.....	40
17	Raíz de <i>Picea mexicana</i> colonizada de <i>Trichoderma harzianum</i> en asociación con el micelio hongo ectomicorrízico.	41
18	Crecimiento de <i>Lycoperdon perlatum</i> en PDA.....	42
19	Fotografía microscópica de <i>Lycoperdon perlatum</i>	42
20	Espora de <i>Lycoperdon perlatum</i>	43
21	Cuerpo fructífero de <i>Lycoperdon perlatum</i> creciendo en tratamiento.....	44
22	Raíz de <i>Picea mexicana</i> colonizada por micelio de <i>Lycoperdon perlatum</i>	44

RESUMEN

El presente trabajo consistió en micorrizar a *Picea mexicana* Martínez con suelo colectado en su hábitat natural, en la sierra el Coahuilón, Arteaga, Coahuila, evaluando el efecto de la micorrización y el porcentaje de la superficie de raíz micorrizada así como también caracterizar los géneros fúngicos micorrizadores presentes en el suelo del bosque de *Picea mexicana* Martínez. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con tres tratamientos y tres repeticiones, los tratamientos fueron: 30 g de suelo + 1000 g de Peat moos, 20 g de suelo+1000 g de Peat moos y 0 g de suelo +1000 g Peat moos. La investigación se realizó en dos etapas, trabajo de laboratorio y trabajo de campo, se inoculó a plantas de 3 años edad con suelo colectado en el bosque de *Picea mexicana* Martínez manteniéndose en observación durante 8 meses para analizar la respuesta a los tratamientos una vez concluidos se evaluó el diámetro y altura de la planta, longitud de la raíz y porcentaje de micorrización tomando en cuenta la red de Harting. En el laboratorio se caracterizaron los taxones de hongos micorrízicos encontrados en el suelo. Obteniendo como resultados un 77 % de micorrización para el T1, 23 % para el T2 en el T3 no se encontró presencia de micorrizas así como también se obtuvo mejor respuesta en incremento en diámetro, altura y longitud radicular en el T1, seguido del T2, el T3 no mostró efecto de respuesta. Los datos se procesaron en una tabla de análisis de varianza (ANVA) mostrando diferencias significativas. En la identificación taxonómica se encontraron un hongo ectomicorrízico: *Lycoperdon perlatum* y a *Trichoderma harzianum*.

PALABRAS CLAVE: Micorrización, sustratos, *Picea mexicana*, *Lycoperdon perlatum* y *Trichoderma harzianum*.

ABSTRACT

This paper consisted to mycorrhizal to *Picea mexicana* Martínez with soil collected in their natural habitat in the Sierra Coahuilon, Arteaga, Coahuila, evaluating the effect of mycorrhization, and the percentage of infected seedlings root surface as well as also to characterize fungal genera micorrizadores present in the soil of the forest of *Picea mexicana* Martínez. A design of completely randomized with three treatments and three replicates blocks was used, the treatments were: 30 g of ground + 1000 g of Peat moos, 20 g suelo +1000 g of Peat moos and 0 g of ground + 1000 g Peat moos. The research was carried out in two stages of laboratory and field work, was inoculated plants of 3 years of age with soil collected in the forest of *Picea mexicana* Martínez keeping under observation for 8 months to analyze the response to treatments once completed assessed the diameter and plant height, root length and percentage of mycorrhization taking into account the net of Harting. Found in soil mycorrhizal taxa were characterized in the laboratory. Obtaining results 77% of mycorrhization for T1, 23% for T2 in the T3 was found presence of Mycorrhizae as he was also obtained better response in increase in diameter, height, root length in the T1, T2, T3 followed showed no effect of response. The data were processed in a table of analysis of variance (ANOVA) showing significant differences. A prime fungus were found in taxonomic identification: *Lycoperdon perlatum* and *Trichoderma harzianum*.

KEY WORDS: Mycorrhization, substrates, *Picea mexicana*, *Lycoperdon perlatum* and *Trichoderma harzianum*.

Señor, ayúdame a decir la verdad delante de los fuertes.

Y a no decir mentiras para ganarme el aplauso de los débiles.

Si me das fortuna, no me quites la felicidad.

Si me das fuerza, no me quites la razón.

Si me das éxito, no me quites la humildad.

Si me das humildad, no me quites la dignidad.

Ayúdame siempre a ver el otro lado de la medalla.

No me dejes inculpar de traición a los demás por no pensar como yo.

Enséñame a querer a la gente como a mi mismo y a juzgarme como a los demás.

No me dejes caer en el orgullo si triunfo, ni en la desesperación si fracaso.

Mas bien recuérdame que el fracaso es la experiencia que precede al triunfo.

enséñame que perdonar es lo mas grande del fuerte y que la venganza es la señal primitiva del débil.

Si me quitas la fortuna, déjame la esperanza.

Si me quitas el éxito, déjame la fuerza para triunfar del fracaso.

Si yo fallara a la gente, dame valor para disculparme.

Si la gente fallara conmigo, dame valor para perdonar.

Señor, si yo me olvido de ti, no te olvides de mi.

Mahatma Gandhi

I. INTRODUCCIÓN

Entre las coníferas, el género *Picea* es una especie endémica y un elemento importante en los bosques de los sistemas montañosos del norte de México, hoy en día su distribución espacial se restringe a condiciones ambientales muy específicas y poco frecuentes (González *et al.*,2007) su distribución geográfica en el norte de México está limitada en tres poblaciones endémicas en la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental, en los estados de Chihuahua, Nuevo León y Coahuila con una superficie menor a 65 hectáreas (Ledig *et al.*,2002; Flores *et al.*,2005; Martínez, 1961).

Según Frankham, 1998, establece que las poblaciones fragmentadas y aisladas tienden a sufrir mayores niveles de endogamia, lo cual conlleva a una menor capacidad reproductiva y por lo tanto existe mayor riesgo de extinción con lo cual ponen en peligro la continuidad de la especie y sus poblaciones, *Picea mexicana* se encuentra incluida en la categoría de peligro de extinción en la NORMA OFICIAL MEXICANA 059 (SEMARNAT, 2003).

Las poblaciones de *Picea mexicana* en Coahuila se han visto amenazadas a diversos factores, principalmente por los incendios, así como la reducida capacidad reproductiva, por lo que es necesario establecer varias acciones para su conservación (Flores, 2004 y Martínez,1963). Desafortunadamente los problemas que ha venido enfrentando día a día han llevado a ser una especie vulnerable y de difícil adaptación aun en condiciones de vivero.

Se considera que los hongos micorrízicos fueron cruciales para que las plantas pudieran colonizar el medio terrestre y responder adecuadamente a los cambios de las condiciones ambientales (Smith y Read, 1997).

Duddridge, 1987 y Harley, 1986 mencionan que las micorrizas juegan un papel esencial del ecosistema forestal y tienen un potencial real de aplicación en los programas forestales de todo el mundo.

De acuerdo con Honrubia *et al.*, 1992 y Pereira *et al.*, 2007, la adecuada selección e identificación de las especies de hongos micorrízicos como simbioses y su posterior manipulación, tanto en laboratorio como en vivero, pueden ser aspectos claves para lograr con éxito el establecimiento de especies vegetales en campo.

Es por eso la importancia de la presente investigación con lo cual se busca micorrizar a *Picea mexicana* Martínez y de esta manera aumentar sustancialmente su vitalidad, así como obtener incremento de la productividad de la biomasa vegetal y por supuesto hacerla más resistente para aumentar la supervivencia en campo, mediante el efecto que tiene las micorrizas en su adaptación.

1.1 Objetivos

Objetivo general:

Micorrizar a *Picea mexicana* Martínez con suelo presente en su hábitat natural.

Objetivos específicos:

Evaluar el efecto de la micorrización en *Picea mexicana* Martínez y el porcentaje de la superficie de raíz micorrizada.

Caracterizar los géneros fúngicos micorrizadores presentes en el suelo del bosque de *Picea mexicana* Martínez.

1.2 Hipótesis

Ha: La inoculación con suelo colectado en el bosque de *Picea mexicana* Martínez produce un alto porcentaje de micorrización, incremento de altura y diámetro de las plántulas.

Ho: La inoculación con suelo colectado en el bosque de *Picea mexicana* Martínez no produce un alto porcentaje de micorrización, incremento de altura, y diámetro de las plántulas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes

Morte *et al.* (2001) sometieron plantas de *Pinus halepensis*, micorrizadas con el hongo *Suillus mediterraneensis* y plantas no micorrizadas, a un período de estrés hídrico de cuatro meses. La sequía inducida afectó al crecimiento de las plantas, y la ectomicorriza no pudo compensar dicho efecto. No obstante, cuando se reestableció la irrigación, los incrementos en altura, número de ramas, biomasa total y contenido en clorofila fueron mayores en las plantas micorrizadas. El descenso en el contenido hídrico del suelo disminuyó el potencial hídrico foliar y la conductancia estomatal en las plantas, aunque esta disminución fue mayor en las plantas no micorrizadas, indicando que la ectomicorriza permitía una mejor captación de agua en el suelo seco.

Pera *et al.*, 1994), utilizando tres tipos de inóculo del hongo ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Cok. & Couch [Pisolithus arhizus (Pers) micelio crecido en un suelo suplementado con medio nutritivo, micelio del hongo encapsulado en un polímero de alginato, y basidiosporas obtenidas de carpóforos recolectados en campo, para la micorrización de *Pinus pinaster* y *Pseudotsuga menziesii* en contenedor, demostraron que con la aplicación de micelio crecido en suelo se conseguía micorrizar el 80% de las plantas de *Pinus pinaster* inoculadas, mientras que era totalmente inefectivo para *Pseudotsuga menziesii*; con la encapsulación del micelio del mismo hongo en gel de alginato no se obtuvo ninguna planta micorrizada con ninguna de las dos especies arbóreas; finalmente, la introducción de basidiosporas de *Pisolithus tinctorius* en el sustrato de cultivo fue el método de inoculación que permitió la micorrización de ambas especies vegetales.

Torres y Honrubia (1994b) inocularon plantas de *Pinus halepensis*, cultivadas en sustrato desinfectado y no desinfectado, con basidiosporas de *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon roseolus* y *Suillus collinitus*. Los valores medios más

altos, tanto en el crecimiento de la planta (altura, peso seco) como en la proporción de ectomicorrizas en las raíces, se registraron en las plantas micorrizadas con *Pisolithus tinctorius* en sustrato desinfectado, aunque sin diferencias significativas entre las tres especies fúngicas inoculadas.

Duñabeitia *et al.* (2004a) inocularon plantas de *Pinus radiata*, producidas en un vivero de contenedor, con suspensiones de esporas de tres especies ectomicorrícicas: *Rhizopogon luteolus*, *Rhizopogon roseolus* y *citrinum* (106 - 107 esporas / planta). El efecto de la micorrización sobre el crecimiento de *Pinus radiata* dependía de la especie fúngica inoculada; las plantas micorrizadas con *Rhizopogon roseolus* mostraron un crecimiento de su parte aérea significativamente mayor que las plantas no micorrizadas. No obstante, los tres hongos inducían un incremento significativo de la biomasa radical, en comparación con las plantas control no inoculadas, y mejoraban el estado fisiológico de las plantas de vivero: aumentando la actividad enzimática radical, el contenido en nutrientes, la fotosíntesis neta y la eficiencia en el uso del agua.

Díez *et al.* (2000), inocularon plántulas de *Quercus suber* obtenidas de embriones somáticos con distintas cepas de *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma polyrhizum*. Dicha inoculación controlada facilitaba el desarrollo de raíces secundarias y la adaptación *ex vitro* de estas plantas.

Andrade *et al.* (2012) estudiaron morfológica y molecularmente las especies de hongos que forman micorriza con plántulas y adultos de *Pinus* spp y *Abies religiosa* (oyamel o abeto en bosque puro y mixto), y con plantas de bosque mesófilo y se caracterizaron sus morfotipos ectomicorrícicos para seleccionar especies que puedan usarse para micorrizar plántulas en vivero. Encontraron 43 especies de hongos que se asocian con especies de *Pinus* y 25 especies de hongos asociados con *A. religiosa*. Los géneros con mayor número de taxa son *Cortinarius* y *Russula*. Las especies más abundantes fueron *Lycoperdon perlatum* y *Amanita muscaria*.

2.2 Clasificación taxonómica de *Picea mexicana* Martínez (1961).

Reino: Plantae

División: Pinophyta

Clase: Pinopsida

Orden: Pinales

Familia: Pinaceae

Género: *Picea*

Especie: *mexicana*

2.2 Descripción de *Picea mexicana* Martínez.

De acuerdo con Martínez (1963) esta especie presenta una altura entre 25 a 28 metros, con un diámetro de 50 a 60 cm, es de corteza lisa con un grosor de 8 a 15 mm, las placas son café blanquecinas.

La ramificación inicia desde los dos o tres metros, presentan ramas verticiladas, las inferiores están extendidas y las superiores son ascendentes formando una copa piramidal.

Las ramillas son de color amarillo opaco y finamente pubescentes. Las hojas presentan forma cuadrangular de 18 a 36 mm de largo 1.0 mm de ancho la terminación de las hojas son córneas y pungentes, con tres y cuatro hileras de estomas en cada cara y no presentan canales resiníferos (Figura 1).

Los conos masculinos subterminales en grupos de tres ovoides de 15 mm de largo por dos de ancho, la prolongación escamiforme del conectoro romboidal de 2.5 mm de largo y 2.0 mm de ancho, borde superior desigual. Los conos femeninos de forma oval de 5 a 6 cm, de color amarillento opaco ya sea en la parte terminal o en la parte lateral del árbol.

Las escamas son rómbicas, estriadas con el ápice redondeado presentando borde superior con el ápice finamente desigual denticulados con una longitud de 14 mm y 10 a 12 de ancho. La bráctea dorsal es elíptica, acuminada Ledig *et al.*, 2004.

Los bosques de *Picea* se encuentran entre 2,000 a 3,200 m.s.n.m. en áreas con escasa radiación solar y alto contenido de humedad, en laderas de cañadas y barrancas, por lo que ocupan superficies muy reducidas.

Las poblaciones de *Picea mexicana* se localizan en la Sierra Madre Occidental, en el Cerro Mohinora, Chihuahua y en la Sierra Madre Oriental, entre los Estados de Coahuila y Nuevo León (Rzedowski, 1983). Según (Braham, 1995) los bosques de *Picea mexicana* en el estado de Coahuila se encuentran a una altitud de 3200-3700 m.s.n.m.



Figura 1. *Picea mexicana* en la sierra el Coahuilón.

2.3 Descripción general de las micorrizas.

Los hongos son seres vivos heterótrófos y por lo tanto incapaces de formar sustancias orgánicas a partir de materiales inorgánicos simples, como

el agua y anhídrido carbónico, utilizando como fuente de energía la luz solar. Para su alimentación requieren utilizar material orgánico producido por otros organismos. Esta dependencia alimentaria hace que se creen lazos ecológicos tan estrechos entre los hongos y los otros seres vivos, que pueden dar como resultado a la formación de relaciones tróficas y morfológicas de orden superior: hongos saprófitos, parásitos y simbioses como las micorrizas (Smith y Read, 1997). El Patólogo forestal alemán Frank, en 1885, al realizar estudios con algunas especies forestales, constituyó el término micorriza (del griego *myces*, hongo y *rhiza*, raíz) a la asociación entre algunos hongos y las raíces de las plantas (Agrios, 1999). La simbiosis micorrízica se considera la parte metabólicamente más activa de los órganos de absorción de nutrientes de las plantas (Honrubia, 1993). La planta aporta al hongo azúcares y otros productos derivados de la fotosíntesis, mientras que el hongo permite, por medio del micelio, hifas externas o rizomorfos, un aumento en la absorción de agua y macronutrientes por parte del vegetal, lo cual incrementa la resistencia de las plantas en zonas con estrés hídrico y nutricional (Ruiz-Lozano *et al.*, 1995) así como también algunos tipos de simbiosis permiten amortiguar la toxicidad debida a metales pesados (Smith y Read, 1988).

El nitrógeno es la principal limitante del crecimiento en los ecosistemas forestales, es absorbido en mayor medida si existe la simbiosis ectomicorrícica, de tal forma que la planta tiene así acceso a recursos nutricionales suplementarios. Las interacciones de la asociación hongo-planta con los microorganismos del suelo próximos a la rizósfera pueden ser muy diversas, desde incorporación de bacterias fijadoras de nitrógeno a la estructura de la micorriza y antagonismo con hongos potencialmente patógenos por fenómenos de antibiosis, fungicidas o simple competencia trófica por los nutrientes ya que al estar mejor en mejores condiciones, se promueve en éstas una mayor resistencia frente a organismos patógenos, mejorando su salud sin aplicación de agrotóxicos, con lo cual, el empleo de las micorrizas significa un ahorro de agroquímicos (pesticidas, fertilizantes, etc.) y una mejor protección, de hecho algunos tipos de micorrizas protegen a sus

huéspedes del ataque de patógenos como *Phytophthora* y *Fusarium* (que producen la pudrición de las raíces). Esto ofrece una gran resistencia ante posibles patógenos de la raíz (Pérez-Moreno y Read, 2001a y 2001b y Pérez-Moreno y Read, 2004).

Se considera que los hongos micorrizógenos (HM) fueron cruciales para que las plantas pudieran colonizar el medio terrestre y responder adecuadamente a las condiciones ambientales cambiantes (Smith y Read, 1998).

La introducción de manera controlada de ésta simbiosis contribuye a la conservación y establecimiento de los sistemas sostenibles, el control de enfermedades de las plantas, basada en el antagonismo entre organismos, y con el menor uso de sustancias químicas. Siempre que se encuentra ésta relación se va a obtener en la mayoría de los casos, un mayor crecimiento de la planta, así como una mejor predisposición de ésta ante las distintas condiciones de estrés producidas por el sitio (Agrios, 1999; Smith y Read, 1988).

2.4 Tipos de micorrizas.

Las micorrizas se han agrupado en micorrizas con manto fúngico y micorrizas sin manto fúngico. Los hongos micorrícicos (HM) asociados que, por su tamaño pueden clasificarse en micromicetos y macromicetos, pueden pertenecer a los Phylum Glomeromycota (*Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*), Ascomycota (*Peziza*, *Tuber*) y Basidiomycota (*Amanita*, *Cantharellus*). En el caso de las plantas hospedadas, la asociación puede presentarse en las gimnospermas y angiospermas, dependiendo del tipo de hongo involucrado en esta asociación y de la integración morfológica existente entre los hongos y las raíces de las plantas hospedadas, la asociación se ha clasificado como: Las micorrizas con manto fúngico, a su vez, se han clasificado en: a) Ectomicorrizas, b) Micorriza arbutoide y c) Micorriza monotrofoide. Por otra parte, las micorrizas sin manto fúngico se han clasificado en: (a) Micorriza

arbuscular, (b) Micorriza ericoide, y (c) Micorriza orquideoide. En la naturaleza, cada tipo de micorriza se presenta en un ecosistema y ambiente edáfico particulares y, en ocasiones, con familias de plantas específicas (Agrios, 2004).

La micorriza ericoide predomina en suelos localizados en altas latitudes y elevadas altitudes, de clima frío, en plantas de la familia Ericaceae; las especies ectomicorrizógenas predominan en ecosistemas forestales con gran acumulación de materia orgánica, ubicados en latitudes y altitudes intermedias, de clima templado-frío, principalmente en asociación con gimnospermas y la micorriza arbuscular prevalece en comunidades de clima cálido seco, cálido húmedo y templado-frío, dominadas por herbáceas y leñosas, en suelos minerales de bajas latitudes (Smith y Read, 1998).

2.4.1 Ectomicorriza.

Las ectomicorrizas son asociaciones simbióticas entre las raíces de diversas especies arbóreas o arbustivas y hongos pertenecientes en su gran mayoría a los Ascomicetes o a los Basidiomicetes. El micelio del hongo cubre a las pequeñas raíces y la zona de los pelos radicales, formando una estructura denominada red de Harting. De esta forma se presentan como intermediarios entre los tejidos del árbol y el suelo cercano a las raíces, aumentando en forma importante la absorción de nutrientes. También entre otras funciones, segregan determinadas sustancias que estimulan el desarrollo de raíces laterales y mejoran la absorción de nutrientes, entre ellos el fósforo y el nitrógeno (Guadarrama-Chávez *et al.*, 2004).

Se estima que existen más de 5 000 especies de hongos (pertenecientes a los Basidiomicetes y Ascomicetes) y alrededor de 2000 plantas (tanto angiospermas como gimnospermas) que forman simbiosis ectomicorrízicas (Agarwal y Sah, 2009). Las asociaciones de tipo ectomicorrízicas son las más importantes dentro de las coníferas.

La formación de la ectomicorriza es producida por esporas o hifas del hongo simbiote que se encuentran en la rizósfera radical. La infección es estimulada por exudaciones radicales, ya que éstas atraen al hongo quimotácticamente y promueven el desarrollo y crecimiento de las hifas sobre la superficie de las raíces cortas formando una cubierta compacta o manto.

Las hifas cubren completamente las raíces pequeñas y la zona de los pelos radicales, que poseen algunas conexiones al suelo que las rodea, y otras hifas que salen del centro del manto y se ramifican entre células de la epidermis y del tejido cortical (Agarwal y Sah, 2009).

Cuando una ectomicorriza se secciona y su anatomía interna es examinada bajo el microscopio, es posible observar la segunda característica principal de las ectomicorizas: el crecimiento intercelular del hongo entre las células epidérmicas y corticales, que forma la red de Hartig. En el interior de ésta extensiva zona de contacto entre hongo y células radiculares, es donde se realiza el intercambio de los nutrientes y el agua entre el hongo y el hospedante; el hongo capta y libera los nutrientes y el agua hacia su hospedante, recibiendo a cambio azúcares y otros productos de la fotosíntesis generados por la planta (Landis, 1990).

2.4.1.1 Arbutoide.

Es un tipo de ectoendomicorriza, pues se observa que simultáneamente el hongo penetra las células radicales de la planta y forma la red de Hartig. Se presenta en plantas de los géneros *Arctostaphylos*, *Arbutus* y *Pyrola*, integrantes del orden Ericales, comúnmente conocidas como madroños. Los hongos asociados son siempre Basidiomycotina; se han reportado especies de los géneros *Hebeloma*, *Laccaria*, *Poria*, *Rhizopogon*, *Pisolithus*, *Thelephora*, *Piloderma*, *Cenococcum* y *Lactarius*. Generalmente los hongos que forman micorriza arbutoide son capaces de formar ectomicorriza si interactúan con plantas del género *Pinus* (Peterson y Farquhar, 1994).

2.4.1.2 Monotropoide.

Este tipo de micorriza la desarrollan especies aclorófilas, es decir, que no producen clorofila y los hongos involucrados forman ectomicorrizas con plantas autotróficas cercanas, transfiriendo así carbono orgánico, su distribución es en zonas templadas las plantas hospedadas son: monótropas los hongos formadores son: Ascomicetos y Basidiomicetos (Álvarez y Ramos, 2004).

2.4.2 Endomicorriza.

Las endomicorrizas o vesículo-arbusculares (VA) no forman ni manto ni red de Harting, ni los ovillos. En su lugar, en el interior de las células de la raíz presentan unas estructuras muy ramificadas que asemejan unos diminutos árboles llamados arbusculos que absorben el almidón de la célula vegetal y es donde se produce el intercambio entre el hongo y la planta, también presentan unas estructuras globosas con material lipídico que actúan tanto de reserva del hongo como órganos de reproducción asexual, llamadas vesículas.

Algunas hifas emergen de la raíz y se desarrollan formando el micelio externo, cuya función es absorber los nutrimentos (Cruz , 1992 y Brundrett 1996). La micorriza vesícula-arbuscular cambia poco la morfología de la raíz. La infección se origina por la propagación del micelio en la raíz, o por la germinación de clamidosporas o esporas de resistencia que forman apresorios (hifa vegetativa que se adhiere en la superficie del hospedante) sobre la superficie de la raíz y posteriormente penetra en ella. Las hifas no invaden la endodermis, los tejidos vasculares, ni meristemas.

2.4.2.1 Ericoide.

Se establece principalmente en plantas de breznales, con altos niveles de carbono y nitrógeno y bajo pH. Los hongos tienen capacidades saprobias, por lo que son capaces de asimilar formas complejas de nitrógeno y fósforo,

así como retener iones metales tóxicos de los vástagos de las plantas que pueden interferir en la fotosíntesis, se distribuye en zonas polares y alpinas. Las plantas hospederas son: ericales. Los hongos formadores son endófilos: Bascomicetos y Basidiomicetos (Bruns y Shefferson, 2004).

2.4.2.2 Orquideoide.

Las orquídeas en sus primeros estadios, no contienen clorofila. En éstas etapas los hongos con los que se asocian, al ser saprobios o parásitos de otras plantas, son capaces de transferir a la orquídea compuestos orgánicos de carbono y otros nutrimentos. Generalmente al llegar a la edad adulta son fotosintéticas y ya no requieren el beneficio del hongo micorrízico. Se distribuyen en zonas templadas y tropicales, las plantas hospederas son las orquídeas. Los hongos formadores son los endófilos: Basidiomicetos (Álvarez y Ramos, 2004). En el Cuadro 1 se puede observar un listado de especies vegetales y los tipos de micorrizas producidas en viveros (Landis, 1993).

Cuadro.1 Tipos de micorrizas formadas por los principales géneros de especies forestales producidas en viveros.

Ectomicorrizas	Ectomicorrizas y micorrizas vesiculares-arbusculares	Micorrizas vesiculares-arbusculares
<i>Betula</i> (Abedul)	<i>Eucalyptus</i> (Eucalipto)	<i>Fraxinus</i> (Fresno)
<i>Pseudotsuga</i> (Abeto Douglas)	<i>Juniperus</i> (Enebro)	<i>Prunus</i> (Capulín)
<i>Abies</i> (Oyamel)	<i>Populus</i> (Álamo)	<i>Acer</i> (Maple)
<i>Tsuga</i> (Abeto)	<i>Juglans</i> (Nogal)	<i>Secolla</i> (Secolla)
<i>Larix</i> (Alerce)	(Liquidámbar)	<i>Liquidambar</i>
<i>Quercus</i> (Encino)		<i>Platanus</i> (Sicomoro)
<i>Pinus</i> (Pino)		<i>Thuja</i> (Thuja)
<i>Picea</i> (Abeto)		<i>Liriodendron</i> (Tulipán)

2.5 Función de las micorrizas.

Aunque la función benéfica que desarrollan los hongos micorrícicos con respecto a las plantas infectadas se refleja en muchos sentidos, los aspectos

más destacados, por la importancia y trascendencia de sus efectos, son la absorción de agua y nutrientes, producción de reguladores de crecimiento y la protección de las raíces contra agentes patógenos(Bruns y Shefferson, 2004).

Una planta micorrizada presenta un mayor valor de adaptación al ambiente; desarrollando un crecimiento vigoroso, un aumento considerable de su sistema radicular, mayor resistencia a los organismos patógenos y adaptaciones importantes ante un estrés de tipo climático. Por otra parte, los hongos que se asocian simbióticamente, presentan una baja potencialidad de descomposición de la materia orgánica; por lo que resulta que sus requerimientos nutricionales son fácilmente satisfechos con el consumo de los productos elaborados por el árbol en el proceso de fotosíntesis. De ésta forma compiten con los hongos saprófitos en suelos con bajo contenido de carbono orgánico, estimulando de esta forma la estabilización de suelos someros (Camargo- Ricalde, 2009; 2001 y 2002).

2.5.1 Absorción de agua y nutrientes.

De la particular estructura de las ectomicorrizas se derivan muchas de sus funciones, en este sentido el amplio terreno explorado por las hifas del hongo, por medio de rizomorfos, o por cordones miceliares o hifas que proporcionan a las plantas micorrizadas una mayor facilidad para la absorción de agua y de nutrientes, funciones que se realizan conjuntamente, ya que generalmente los nutrientes se absorben disueltos en agua. Además se ha demostrado un considerable aumento de la longevidad de las raíces finas nutridoras con lo que la función de absorción se ve beneficiada (Camargo-Ricalde, 2009; 2001 y 2002).

Las micorrizas solubilizan el fósforo (P) mineral, produciendo ácidos orgánicos y anhídrido carbónico (CO₂) durante la respiración. Las micorrizas expanden el volumen de suelo desde el cual se absorbe el fósforo, puesto que crecen a partir de las raíces que se extienden por la superficie disponible para el contacto con los minerales.

La adquisición de (P) puede producirse en menores concentraciones del nutriente en las micorrizas que en las raíces de las plantas. Algunas micorrizas pueden liberar fosfatasas que mineralizan fósforo orgánico en el suelo (Guadarrama-Chavez *et al.*, 2004 y Finlay, 2008).

2.5.2 Producción de reguladores de crecimiento.

Adquiere importancia en la producción de metabolitos por los hongos micorrícicos, en particular los compuestos reguladores del crecimiento, ya que influyen decisivamente en muchos procesos relacionados con el desarrollo de las plantas. Actúan sobre la translocación de los nutrientes y sobre el desarrollo de los cloroplastos, e inciden especialmente en la zona radical, promoviendo que inicie el crecimiento, la dicotomía, la inhibición de la formación de los pelos radicales y evitando la suberización de las raíces cortas nutritivas, incrementando, por lo tanto, su tiempo de funcionalidad (Pérez-Moreno, 2004).

Las micorrizas producen sustancias reguladoras del crecimiento (auxinas), especialmente ácido indolacético, citoquininas y giberelinas. También se ha comprobado la producción de vitaminas como biotina, tiamina y ácido pantoténico (Van der Heijden, 2002).

2.5.3 Protección de las raíces contra agentes patógenos.

De acuerdo con Finlay, 2008; Smith y Read, 1997 la acción protectora que las micorrizas ejercen contra los hongos patógenos del suelo, sobre todo por sus implicaciones económicas y ecológicas, atribuye los mecanismos de resistencia de las micorrizas a las infecciones de patógenos a las siguientes causas:

- El manto fúngico actúa como barrera física.
- Producción de sustancias antibióticas por la micorriza.

- Producción de compuestos fungistáticos, como fenoles, terpenos, ácido isobutírico y etileno entre otros.
- Modificaciones en los exudados de la raíces micorrizadas que dificultan el establecimiento de patógenos en la rizósfera.

En la presencia de poblaciones microbianas en la rizósfera, antagonistas a los agentes patógenos. Más de 100 micorrizas son capaces de producir antibióticos, lo que genera una capacidad de protección y control contra patógenos de las raíces del huésped (Arango, 1988).

2.6 Factores del suelo que afecta el desarrollo de micorrizas.

Después de la formación de una raíz arbórea receptiva, los principales factores que influyen en la infección son el potencial fotosintético y la fertilidad del suelo de baja a moderada ponen en riesgo el desarrollo de las micorrizas, en tanto que las condiciones opuestas pueden reducir e incluso impedir dicho desarrollo. Estos factores pueden influir en la condición bioquímica de la raíz controlando el nivel de azúcares reductores, o pueden afectar la formación de raíces alimentadoras nuevas. Cuando las altas concentraciones de fósforo y nitrógeno son absorbidas fácilmente desde el suelo y traslocadas hacia la fuente de fotosintatos, los carbohidratos solubles son asimilados rápidamente durante la formación de protoplasma y paredes celulares nuevas en las yemas (Camargo-Ricalde,2009).

Las temperaturas óptimas para el crecimiento de micelios se encuentran entre los 18° C y los 27° C para la mayoría de las especies. En caso de muchas ectomicorrizas, el crecimiento se suspende sobre los 35° C y debajo de los 5° C (Prittchet, 1985) sostiene que varios factores afectaran el proceso de micorrización:

- El estatus fisiológico de la planta, su edad y posiblemente la presencia de otros hongos.

- Las condiciones fisiológicas del hongo y la disponibilidad que tengan de recursos de carbono.
- El contenido de nutrientes y agua del suelo, el pH, estructura y aireación, y la fauna microbiana tienen una gran influencia en la formación micorrícica.

2.7 Líneas de investigación micorrícica en México.

Las principales líneas de investigación sobre micorrizas que se desarrollan en México son en: a) Agronomía, efecto de la micorrización en plantas de importancia económica, alimentaria y cultural; b) Ecología, dinámica de las poblaciones de ectomicorriza e importancia de la micorriza en el crecimiento de especies silvestres y en la dinámica de las comunidades vegetales y ecosistemas; c) Taxonomía y Sistemática, inventario de la diversidad de HM en México y especificidad que pudiera haber con determinadas especies vegetales; d) Biología Molecular, herramienta para el conocimiento de la sistemática y la ecología de los HM, y de las micorrizas para determinar las relaciones filogenéticas de los HM y las coevolutivas con las plantas; e) Biotecnología y Ciencias Genómicas, manejo genómico de las cepas de los HM en beneficio del ser humano, y f) Ciencias Ambientales, biorremediación, restauración, rehabilitación o reasignación de ecosistemas deteriorados (Revista Digital Universitaria UNAM, 2012).

2.9 Principales fuentes de micorrización.

Las tres principales fuentes para la micorrización e inoculación con micorrizas en los viveros que producen en contenedor son: el suelo, las esporas y los micelios vegetativos (Landis, 1993).

2.10 Hongos asociados.

Recientemente, se tenía conocimiento que *Trichoderma* era un tipo de micorriza, pero actualmente que aunque se instala en las raíces de las

plantas, no establece una relación de simbiosis (asociación en beneficio de ambos participantes), sino que *Trichoderma* es mucho más altruista, sólo beneficia a las plantas, sin obtener nada a cambio, no intercambia nutrientes con las raíces, sino que lo protege de patologías producidas por *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* sp entre otras (De la Cruz *et al.*, 1995; Ezziyyani *et al.*, 2004; Agrios, 2004; Rey *et al.*, 2000).

Su función consiste en digerir la materia orgánica que rodea a la raíz de la planta, es un hongo muy resistente y de rápida propagación, produce enzimas que aumentan el crecimiento de las plantas, acelera la germinación de las semillas, protege a las semillas contra los hongos no benéficos, aumenta la producción y peso de los frutos, degrada productos químicos tóxicos como el DDT o el glifosato, aumenta la resistencia de la planta, mejora la vida microbiana del sustrato, evita la pudrición de semillas, raíces y tallos (Domsch *et al.*, 1980, Grondona *et al.*, 1997; Carsolio *et al.*, 1999).

Ha sido considerada como buen agente de control biológico contra un amplio rango de hongos fitopatógenos en invernadero y en campo. Sin embargo, la eficacia de estos hongos en suelos naturales puede estar limitada por la fungistasis del suelo, competencia por otros microorganismos del suelo, una pobre colonización de las raíces de la planta, o condiciones ambientales desfavorables (Bae y Knudsen, 2000).

2.11 Identificación por claves taxonómicas.

A pesar de que las características morfológicas de las esporas han sido usadas por años para su determinación, no existen claves taxonómicas suficientes y actualizadas que lleven a una fácil y correcta determinación, por lo cual se necesita de expertos dedicados a esta labor para la correcta determinación de un morfo tipo, y aún entre ellos existen discrepancias sobre género y especies reportadas es to de acuerdo con (Hormilla, 1997).

III.MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Descripción del área de estudio.

El sitio dónde se colectaron las muestras de suelo de *Picea mexicana* Martínez fue en la Sierra el Coahuilón, municipio Arteaga, Coahuila, ubicada las coordenadas geograficas 25°14.8"N y 100°21.2"W, una altitud de 3500 m.s.n.m.(Figura 2). De acuerdo con la clasificación climática de Köppen modificado por García,1964, el tipo de clima en el área se define como C x"b (e") g, que corresponde a un clima templado subhúmedo, con una temperatura media anual de 12.7 °C y una precipitación media anual de 470.6 mm, con heladas que pueden que ocurrir en cualquier mes del año, sin embargo, se acentúan en los meses de octubre a marzo, con temperaturas extremas de - 8°C; las épocas más cálidas se presentan antes del mes de Junio.Cabe mencionar que los datos de temperatura se tomaron de la estación meteorológica más cercana que fue la de San Antonio de las Alazanas. Por lo que se puede determinar que las condiciones climáticas sean muy diferentes ya que la diferencia en la altitud es de más de mil metros de diferencia.

Su sistema rocoso es de origen sedimentario marino de tipo calizo, lutita y arenizca, el tipo de suelo es Litozol, Rendzina, y Regosol-eutrico de textura media (Hernández, 2009).

La vegetcion la contituyen relictos de *Abies* sp, *Pseudotsuga macrolepis*, Flous y *Picea mexicana* Martínez (Braham, 1995).

La vegetación en el bosque está constituida por los siguientes taxones: *Abies vejarii*, *Populus tremuloides*, *Pinus rudis*, *Picea mexicana*, *Pseudotsuga mensiezii* y *Pinus reflexa* según testimonio de Braham (2014).



Figura 2. Sitio de colecta de suelo de bosque de *Picea mexicana* en la Sierra el Coahuilón.

3.2 Trabajo de campo.

3.2.1 Obtención de las muestras.

La recolección de suelo se realizó a una profundidad de 15 cm, se efectuó de forma manual, utilizando un cucharón de metal colocando el suelo en bolsas de papel con su respectiva etiqueta anotando los datos pertinentes de el lugar (paraje, localidad, municipio, coordenadas, altitud y fecha de colecta) para no perder su identidad, posteriormente se llevaron al invernadero del Departamento Forestal de la UAAAN y se guardaron en un lugar fresco y oscuro para su posterior aplicación a las plantas.

3.2.2 Aplicación de suelo a las plantas.

Para el presente trabajo se utilizaron plantas de *Picea mexicana* Martínez de 3 años de edad, las cuales se transplantaron a bolsas de polietileno de 20 por 40 cm, se utilizó sustrato Peat moss y suelo colectado en el bosque de

Picea mexicana Martínez, el suelo se aplicó en cada uno de los tratamientos con las cantidades como se muestra en el cuadro 2.

3.3 Tratamientos.

Cuadro.2 Tratamientos aplicados a *Picea mexicana* Martínez.

Tratamientos	Sustrato Peat-moss	Dosis de suelo colectado en el bosque de <i>Picea</i>
T1	1000 g	30 g
T2	1000 g	20 g
T3	1000 g	0 g

T1. Mezcla de sustrato Peat moss con 30 g

T2. Mezcla de sustrato Peat moss con 20 g

T3. Sustrato Peat moss (testigo).

3.4 Diseño experimental.

El diseño que se utilizó fue el de Bloques Completamente al Azar debido a que las condiciones del área de estudio son homogéneas. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) el arreglo de los tratamientos quedó de la siguiente manera (cuadro 3).

Cuadro. 3 Diseño y acomodo de los tratamientos experimentales en la investigación.

TRATAMIENTOS	REPETICIONES		
T1 (30 g)	R1	R3	R2
T2 (2 g)	R2	R1	R3
T3 (0 g)	R3	R2	R1

3.5 Modelo experimental.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, 2, 3, \dots, t$$

$$j = 1, 2, 3, \dots, n$$

Dónde:

Y_{ij} = Variable respuesta en la j-ésima repetición del i-ésimo tratamiento

μ = Media general

τ_i = Efecto del tratamiento i.

ε_{ij} = Error aleatorio, donde $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

Lo que nos indica el Análisis de la Varianza para el modelo que:

Ho: $\tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_t$

Ha: al menos un efecto de un tratamiento es diferente de los demás.

3.6 Análisis de varianza.

A las variables de respuesta se les efectuó un análisis de varianza con el auxilio del programa de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) versión 2.5, determinándose así la existencia o no existencia de diferencia significativa entre los tratamientos, posteriormente se realizó una prueba de medias usando el comparador de Tukey al 5% de probabilidad de error.

3.7 Variables a medir.

3.7.1 Altura de la planta.

La altura de la planta se midió en cm a lo largo de la planta desde la base del tallo hasta la yema apical, utilizando una regla graduada en cm. Se tomaron dos lecturas, una al inicio del experimento y a la otra a los ocho meses que fue la duración del experimento.

3.7.2 Diámetro de la planta.

Registró el diámetro de todas las plantas de los diferentes tratamientos, las lecturas del diámetro se efectuaron en la base del tallo, con la ayuda de un calibrador digital vernier de 0.01 mm de precisión.

3.8.3 Superficie de la raíz micorrizada.

Debido a la importancia que tiene la especie en varios aspectos (endémica, en peligro de extinción, la dificultad para cultivarla, su alta mortalidad, entre otros) se determinó por sugerencia del asesor principal no desmenuzar el sistema radicular al analizar el grado de micorrización para no sacrificar la planta y posteriormente usarlas en plantaciones por lo que con

ayuda de una malla de puntos se determinó el área de la raíz micorrizada, colocando la malla en el cepellón que mostraba la red de Harting de esta manera se obtuvo el porcentaje del área en la cual hubo presencia de micorrizas en cada una de las plantas de los diferentes tratamientos .

3.8.4 Longitud de la raíz.

Se tomó una planta al azar, del testigo y una del tratamiento en el cual se observó la red de Harting con mayor superficie para desmenuzar la raíz y tomar el área radicular de estas plantas para tener una referencia del crecimiento radicular.

3.8.5 Riegos.

A las plantas en los contenedores se aplicaron riegos con agua destilada cada tercer día, en una proporción de 25 mm por planta así como también se realizaron cada 15 días labores de remoción de malezas ya que las semillas de estas, están contenidas en el sustrato canadiense Peat moss y aparecen como hierbas indeseables.

3.9 Trabajo de laboratorio.

Se realizó en el laboratorio del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

3.10.1 Preparación del medio de cultivo Papa, Dextrosa, Agar (PDA).

Este medio de cultivo es el que más se utiliza para el crecimiento de hongos y levaduras y el cual se utilizó para aislar los hongos en la presente investigación. Para la preparación del medio de cultivo se tomaron 8 g de PDA deshidratado, el peso se registró en una báscula de precisión (Figura.3), el medio se colocó en un matraz Erlen Meyer de 500 ml, y se agregó 200 ml de

agua destilada; ésta solución se envasó en un matraz de 500 ml y se tapó con una porción de papel aluminio, finalmente se esterilizó en una autoclave de presión a 15 libras por pulgada cuadrada por espacio de 20 min a una temperatura de 121 °C, una vez transcurrido el tiempo indicado se espera que baje la presión hasta cero para poder retirar la tapa.



Figura 3. Registro de peso de PDA en báscula de precisión.

Posteriormente se esperó a que el medio de cultivo alcanzara una temperatura de 48-50 °C (Figura.4) para vaciar en cajas Petri, a razón de 25 ml por caja (Figura. 5). Por último se sellaron las cajas con cinta parafilm y permanecieron en la campana de flujo laminar por 24 h para asegurarse que no presentaran síntomas de contaminación.



Figura.4 Medio de cultivo en reposo para alcanzar la temperatura de vaciado.



Figura. 5 Vertido de medio en cajas Petri.

3.10.2 Siembra de suelo.

De las muestras obtenidas se utilizaron 500 g de suelo el cual fue tamizado para separar partes gruesas (piedras, terrones, gravas), para trabajar con las partes más finas que es donde se encuentran las esporas o parte del micelio, posteriormente se desinfectó con hipoclorito de sodio al 3% por dos minutos, concluido el tiempo indicado se enjuagó en agua destilada esteril por un minuto y se colocó en un papel de estraza esteril para su secado y de ésta manera quedar listo para la siembra, se realizó la siembra en 20

cajas Petri tomando pequeñas partículas de suelo con una aguja de disección y dispersándolas en las cajas (Figura.6) la siembra se realizó en una campana de flujo laminar con luz ultravioleta para evitar la contaminación, para finalizar se sellaron las cajas Petri con cinta parafilm, se registró la fecha y se llevó a una incubadora de 28°C durante una semana hasta que se presentó el crecimiento micelial de las muestras sembradas y esporuló de forma uniforme.



Figura. 6 Siembra de suelo en cajas Petri.

3.10.3 Aislamiento de hongos.

Cuando se presentó el crecimiento de los hongos se realizó el aislamiento de las diferentes especies que se tenían con ayuda de una aguja de disección, se reunieron los morfo tipos tomando en consideración la similitud en forma, color y tamaño del micelio, se hicieron transferencias del hongo en desarrollo a una nueva caja de Petri y nuevamente se incubaron a la temperatura antes mencionada en la cual permaneció durante una semana para que desarrollara el crecimiento micelial y finalmente se realizó la purificación.

3.10.4 Purificación de hongos.

La purificación de especies de hongos micorrícicos se realizó con ayuda de un microscopio estereoscópico (Figura. 7) para tener una mayor seguridad que se tomó el micelio de interés. Se utilizó la técnica por punta de hifa, propuesta por (Harley y Waid 1955) se esterilizó el asa con en el mechero Fischer, se dejó enfriar y se tomó la muestra de una colonia se colocó en la caja, se cerró la caja con cinta parafilm y se flameó girarando la caja Petri, y por ultimo se incubaron a 35°C durante 48 horas.



Figura. 7 Microscopio estereoscópico.

3.10.5 Identificación de hongos.

Para la identificación de los hongos se realizó el montaje de laminillas semipermanentes (Figura 8), para lo cual, se tomó una muestra (pequeña parte del micelio) y se colocó en un portaobjetos limpio, sobre una gota de lactofenol, la muestra se tomó con una aguja de disección raspando ligeramente el tejido del hongo y se situó cuidadosamente sobre el portaobjetos dentro de la gota, posteriormente se cubrió con un cubreobjetos. Finalmente las lamillas se llevaron al microscopio y se examinó la muestra a

diferentes enfoques 10x, 40x y 100x y de esta manera se realizó la identificación morfológica utilizando claves taxonómicas (anexo 1) y por comparación de manera microscópica con una cepa previamente identificada.



Figura. 8 Laminillas semipermanentes de hongos.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

De acuerdo con el trabajo de investigación, las variables observadas se lograron obtener los siguientes resultados:

4.1 Superficie de la raíz micorrizada.

En el cuadro 4 se muestran los resultados del Análisis de Varianza (ANVA) obtenidos para la variable de respuesta porcentaje de micorrización, con un nivel de confianza de 0.95 y 0.99.

Cuadro.4 ANVA para porcentaje de micorrización en *Picea mexicana*.

FV	G.L	S.C	C.M	Fc	P>F
					0.05 0.01
Tratamientos					
Bloques	2	9399	4699	357	0.000**
Error	2	8.21	4.10	0.312	0.749
Total	4	52.53	13.13		
	8	9459.94			

Lo cual nos indica que la micorrización con suelo de bosque de *Picea mexicana* es altamente significativa en por lo menos alguno de los tratamientos con una confiabilidad del 99 % y 95 %. Por lo cual se realizó una comparación de medias con la Prueba de Tukey cuadro 5.

Cuadro 5. Prueba de medias Tukey para porcentaje de micorrización.

TRATAMIENTO	MEDIA	
1	77.1667	A
2	23.3000	B
3	0.0000	C

De acuerdo con la prueba de Tukey el Tratamiento 1, fue en el que presentó mejores resultados ya que como se puede apreciar en la Figura 9 en promedio se cubrió el 77 % del área, en el Tratamiento 2 se logró micorrizar en menor proporción con una superficie en promedio del 20% del área total y en el Tratamiento 3 como se esperaba no se obtuvieron resultados de micorrización los resultados obtenidos son similares a los de *Pera et al.*, 1994, ya que demostraron que con la aplicación de micelio crecido en suelo se conseguía micorrizar el 80% de las plantas de *Pinus pinaster* inoculadas, sin embargo no para todas las especies funciona este método de inoculación ya que estos mismos autores encontraron que para *Pseudotsuga menziesii* es totalmente inefectivo el método. Es difícil generalizar el comportamiento que cabe esperar de las plantas micorrizadas; cada combinación planta - hongo-suelo responde de forma distinta, de ahí la importancia de seleccionar los hongos más adecuados (Trappe, 1977)

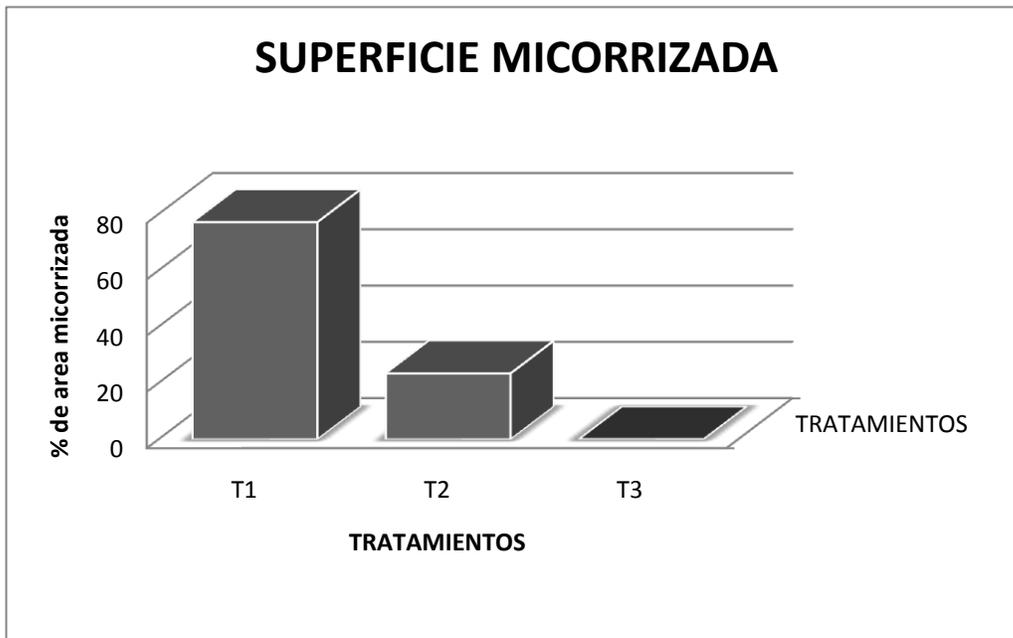


Figura. 9 Superficie micorrizada de *Picea mexicana*.

En la Figura 10 se observan las características de la planta y del cepellón, en el Tratamiento 1 que fue el que mayor porcentaje de micorrización obtuvo se desarrolló el cuerpo fructífero de un hongo micorrícico, así como también se distingue claramente la red de Harting en cada uno de los cepellones de las plantas micorrizadas, una característica importante que se refleja es la altura y el color del follaje en el Tratamiento 1 donde se aplicaron los 30 g de suelo de bosque de *Picea*, el color es verde intenso así como también se puede apreciar una planta vigorosa, en el Tratamiento 2 en el cual se aplicaron 20 g de suelo el color del follaje es un poco menos intenso, en relación a la altura también es un poco menor a la del Tratamiento 1, en la planta testigo del Tratamiento 3 no se observa la red de Harting, así como también las condiciones de la planta son diferentes a las plantas donde se aplicó suelo.

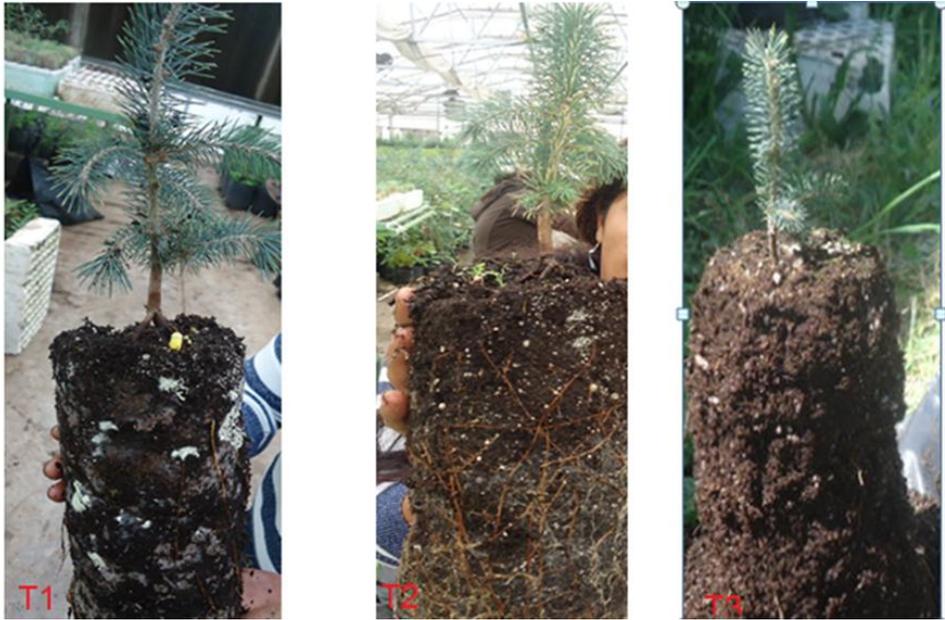


Figura. 10 Características de altura y color de las agujas de las plantas de *Picea mexicana* en los diferentes tratamientos.

De las plantas que se tomaron al azar la del Tratamiento 1 alcanzó una longitud radicular de 60 cm (Figura 11) y la del testigo como se puede apreciar en su longitud fue menor alcanzando tan solo 20 cm. Violeta Carrasco *et al* encontró características similares a las que se encontraron en este trabajo de investigación una raíz micorrizada con longitud mayor a la de las plantas no micorrizada.



Figura. 11 Longitu de la raíz del Tratamiento 1 (30 g) de suelo y el testigo.

4.2 Altura de la planta.

En el cuadro 6 se muestran los resultados del Análisis de Varianza para la variable de respuesta, altura de las plantas.

Cuadro. 6 ANVA para altura en *Picea mexicana*.

FV	G.L	S.C	C.M	Fc	P>F
					0.05 0.01
Tratamientos					
Bloques	2	287.54	143.7	84.39	0.002*
Error	2	8.45	4.22	2.48	0.199
Total	4	6.81	1.70		
	8	302.81			

Lo cual nos indica es altamente significativa en por lo menos alguno de los tratamientos con una confiabilidad del 99 % y 95 %. Por lo cual se realizó la prueba de Tukey (cuadro 7).

Cuadro 7. Prueba de medias Tukey para altura de las plantas.

TRATAMIENTO	MEDIA

1	21.0500 A
2	12.4667 B
3	7.3500 C

Como se mencionó anteriormente el Tratamiento 1 fue en el cual se observó mayor presencia de micorriza y de igual manera fue en el cual las plantas alcanzaron una mayor altura, seguido del Tratamiento 2, en el Tratamiento 3 las plantas obtuvieron menor crecimiento en las Figuras 12 y 13 se muestra claramente la diferencia por cada tratamiento demostrando que las plantas micorizadas fueron las que tuvieron mayor crecimiento durante los ocho meses de evaluación. Morte *et al.* (2001) sometieron plantas de *Pinus halepensis*, micorizadas con el hongo *Suillus mediterraneensis* y plantas no micorizadas, a un periodo de estrés hídrico de cuatro meses. Cuando se reestableció la irrigación, los incrementos en altura y número de ramas, fueron mayores en las plantas micorizadas, Bucking *et al.*, 2002 menciona que la infección micorrízica aumenta la obtención de nutrientes por lo cual hay un mayor crecimiento en las plantas, por lo cual el crecimiento se puede atribuir a las micorrizas.

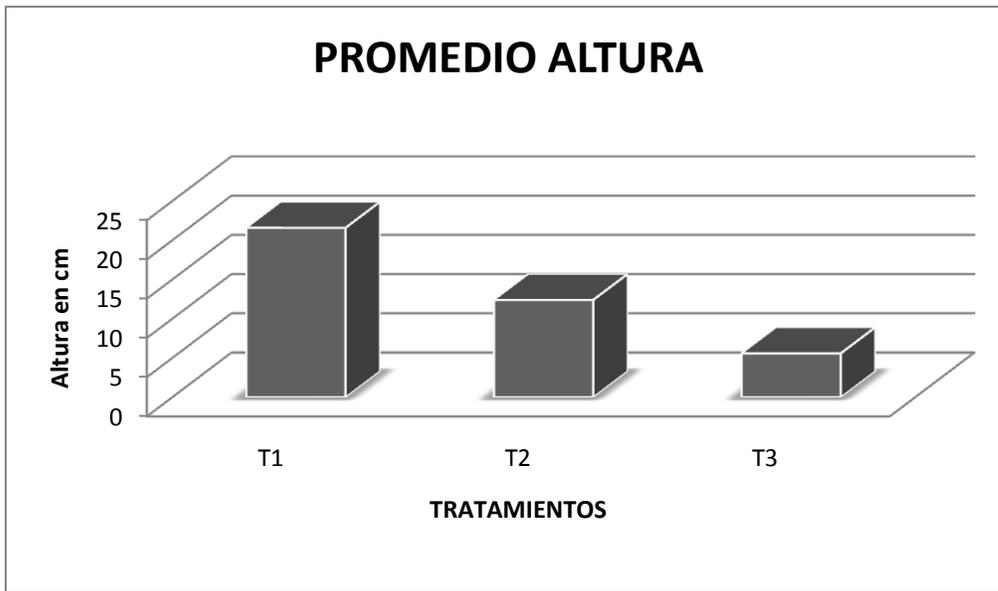


Figura .12 Altura promedio en las plantas.



Figura. 13 Altura de las plantas de *Picea mexicana* a los 6 meses de aplicación de los tratamientos.

4.3 Diámetro del cuello de la planta.

Cuadro 8. ANVA para diámetro de tallo en *Picea mexicana*.

FV	G.L	S.C	C.M	Fc	P>F	
					0.05	0.01
Tratamientos						
Bloques	2	1.91	0.95	49.26	0.003*	
Error	2	0.03	0.01	0.79	0.515	
Total	4	0.07	0.01			
	8	2.02				

Como se puede apreciar en el cuadro 8 hay diferencia significativa en los tratamientos utilizados en la investigación realizada, en cuestión al diámetro de las plantas por lo cual se realizó la comparación de medias con la prueba de Tukey.

Cuadro 9. Prueba de medias Tukey para cuello de diámetro de tallo.

```

-----
TRATAMIENTO  MEDIA
-----
1              1.5300 A
2              1.2333 B
3              0.4367 C
-----

```

En la prueba de medias Tukey, el Tratamiento 1 fue el mejor ya que se registraron los mayores diámetros de las plántulas seguido por el Tratamiento 2 y por último el Tratamiento 3 el cual obtuvo un menor promedio.

En la Figura 14 se muestra el promedio de los diámetros de los diferentes tratamientos destacando el Tratamiento 1.

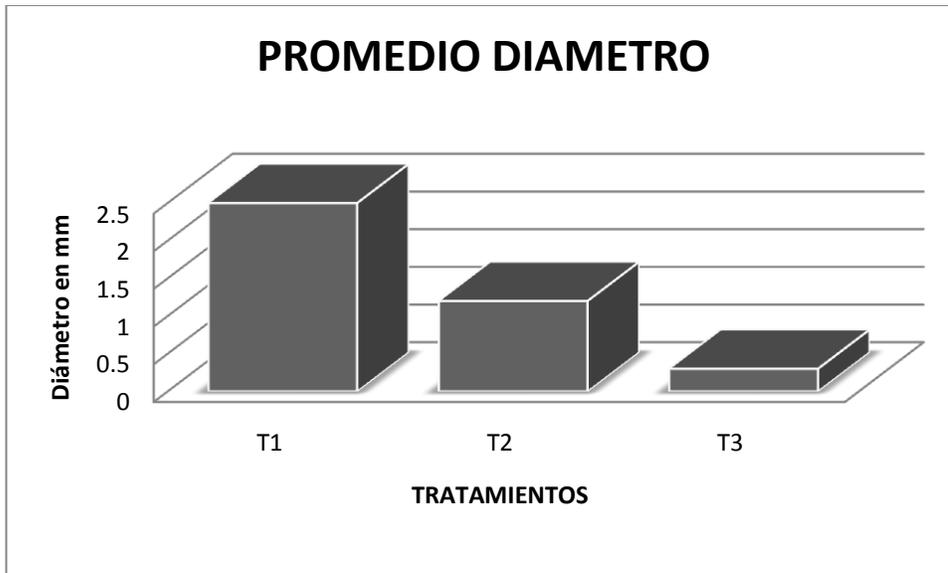


Figura. 14 Diámetro promedio en las plantas.

4.4 Taxones genéricos de hongos micorrícicos encontrados en el suelo de bosque de *Picea*.

4.4.1 *Trichoderma* sp.

Uno de los hongos encontrados en el suelo de bosque de *Picea mexicana* fue el género *Trichoderma*, las colonias se reconocen fácilmente por su crecimiento rápido y su coloración, blancas-verdes, amarillo– verdosas; las áreas con conidias se presentan con anillos concéntricos coincidiendo con (Arango *et al.*, 1988; Barnett y Hunter, 1972). Son hongos anamórficos aislados principalmente del suelo y de materia orgánica en descomposición (Grondona *et al.*, 1997).

4.4.2 *Trichoderma harzianum*.

Fue identificada por el porcentaje del crecimiento micelial y la apariencia de la colonia, también por las características morfológicas a nivel

microscópico, incluyendo las fiálides y fialósporas. En la etapa temprana de *T. harzianum* el color del micelio es blanco y eventualmente desarrolla un color verde oscuro después de la esporulación Figura 16. Las colonias de *T. harzianum* crecen y maduran rápidamente a los cinco días de incubación en medio de cultivo PDA a 25°C. Las especies de éste género generalmente prefieren un pH ácido de 4.5-5 y, además se desarrolla en áreas con un excesivo contenido de humedad y un estancamiento del bióxido de carbono en la atmósfera. El ciclo de vida de *T. harzianum* inicia cuando el organismo crece y se ramifica como una hifa fúngica típica que mide de 5-10 μ de diámetro. La esporulación asexual ocurre cuando las esporas de 3-5 μ de diámetro son liberadas en un gran número. También se forman clamidosporas intercaladas, de forma individual, aunque a veces dos o más clamidosporas se pueden fusionar. El tamaño de los conidióforos es de 62,5-69 x 3-4,7 μ m. Los conidióforos son de color verde, presentan diversas ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres, ubicadas en un ángulo amplio. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal Figura.15. Las fiálides son largas y delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con un tamaño de 6,3-15,6 x 2,7-3,4 μ m., con verticilos terminales de hasta 4 conidios de un tamaño aproximado de 3,8-4 x 3,1-3,7 μ m, con forma citriforme y subglobosos. Sus clamidosporas son intercalares y formadas por el micelio sumergido, subglobosas, de pared dentada, color verde claro y un tamaño de 12,5-10.

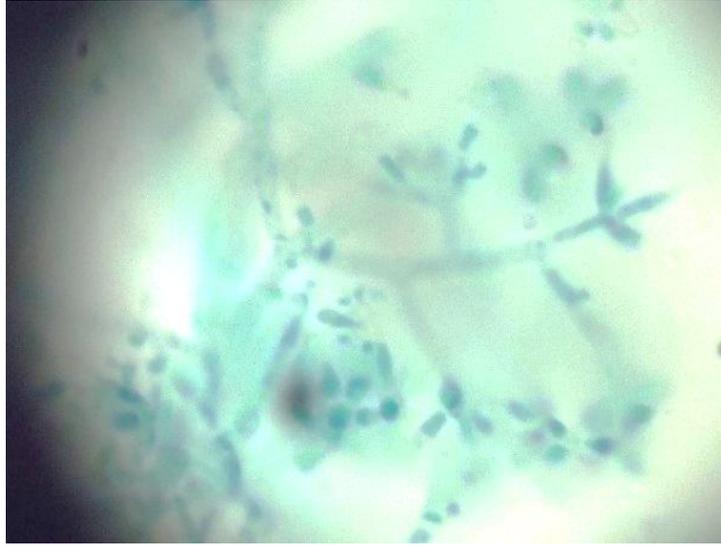


Figura. 15 Micelio, fialides y esporas de *Trichoderma harzianum* observadas al microscopio.

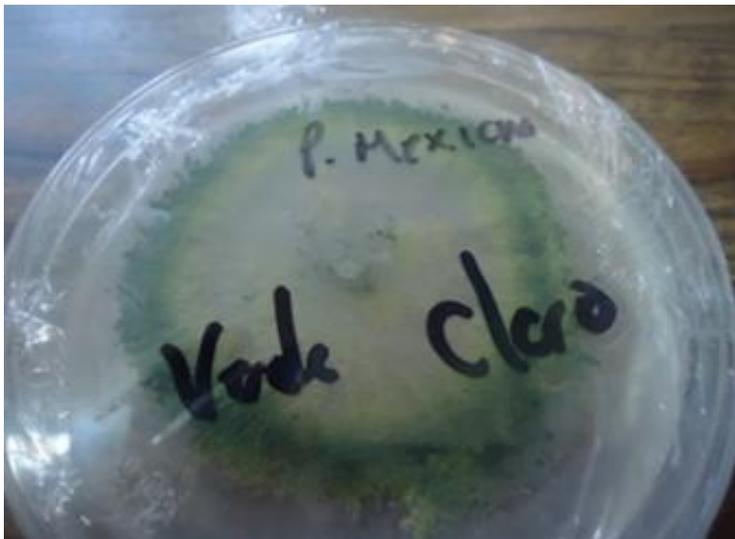


Figura. 16 Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en PDA.

En la Figura 17 se puede apreciar una raíz de *Picea mexicana* colonizada por *Trichoderma* sp y el micelio del hongo ectomicorrízico.

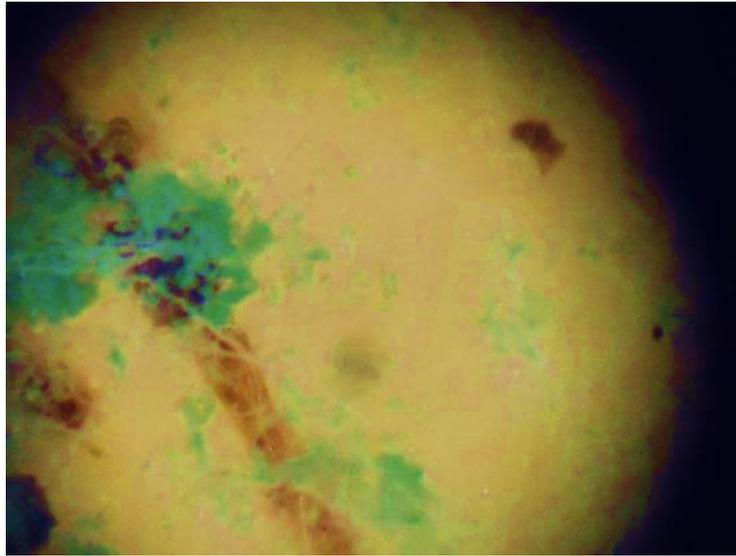


Figura .17 Raíz de *Picea mexicana* colonizada de *Trichoderma harzianum* en asociación con el micelio hongo ectomicorrízico.

4.4.3 *Lycoperdon perlatum*.

La descripción del micelio presentó numerosas características morfológicas similares a las del micelio de ésta misma especie que ha sido descrito por Hormilla, 1995; y por Torres 2012 en el Estudio de la interacción micorrízica en bosque de *Pinus-Abies* y bosque mesófilo de montaña (Figura 18) micelio blanco, blanco-crema, micelio aéreo muy escaso, de aspecto pruinoso, margen regular, finamente lobulado a dentado, reverso color crema Figura 19, el diámetro de la colonia tras cuatro semanas de crecimiento es de 1,5-2,5 cm, hifas hialinas de paredes delgadas, hasta 5 μm de diámetro, aparecen numerosos grupos de hifas flexuosas, con gran cantidad de pequeños engrosamientos intercalares de hasta 5,5 μm . También presenta algunos grupos de hifas de aspecto, moniliforme ramificaciones sencillas y algunas complejas, sin fíbulas. Las esporas son globosas, con verrugas de 3-4,5 micras, el color varía del amarillo oliváceo al marrón oscuro (Figura 20).

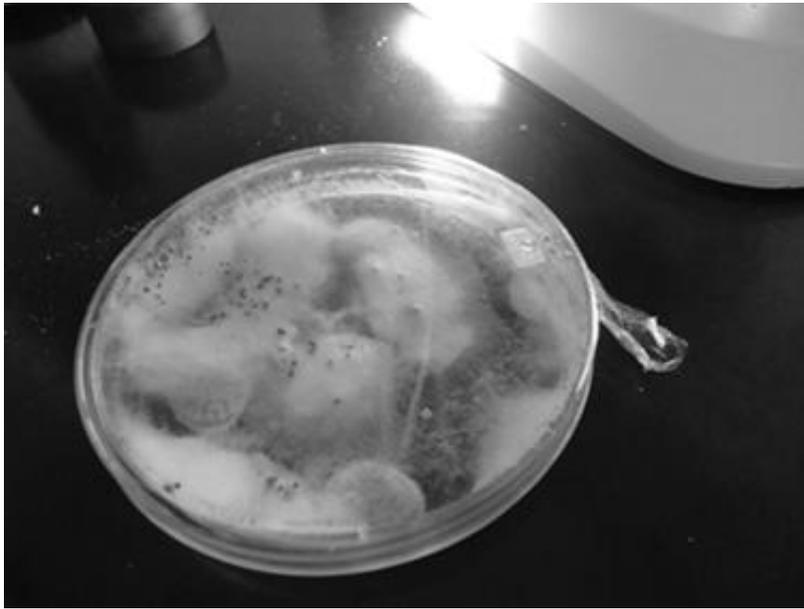


Figura. 18 Crecimiento de *Lycopodium perlatum* en PDA.

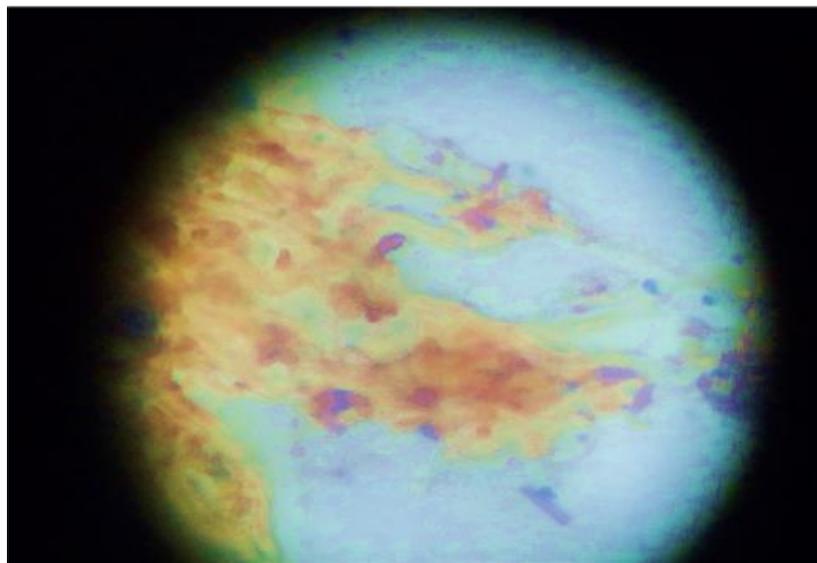


Figura. 19 Fotografía microscópica de *Lycopodium perlatum*.

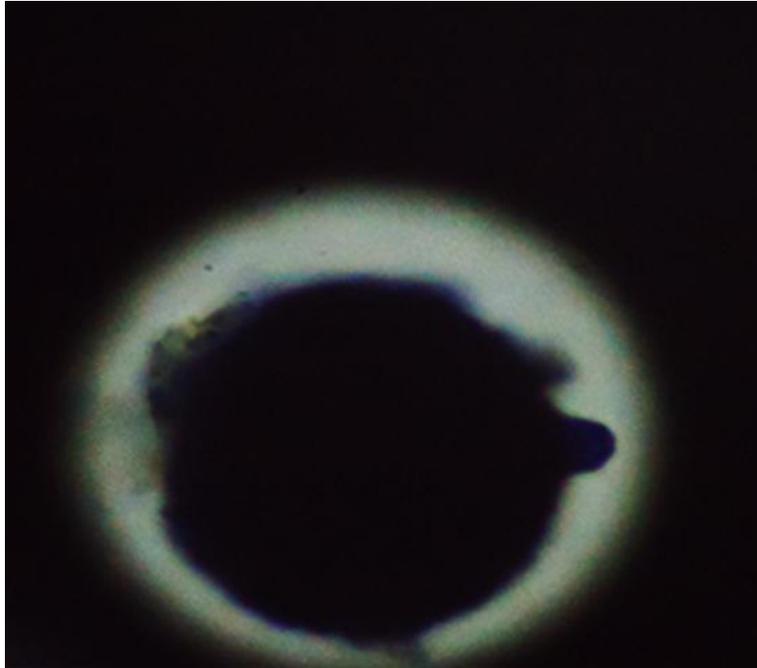


Figura. 20 Espora de *Lycoperdon perlatum*.

Descripción macroscópica:

Carpóforo: con forma de pera o de bombilla, Figura 21 con una altura que puede llegar a superar los 5 cm, y un ancho en la zona superior de 3 o 4 cm. Tiene un color uniforme blanco cuando es joven, derivando a tonos grisáceos o parduzcos de maduro. Toda la zona engrosada superior es fértil, siendo la parte inferior más estrecha y estéril.

Exoperidio: blanco, grisáceo con el tiempo, simple, recubierto por una serie de prominencias verrucosas coronadas por una especie de espinas, dando al conjunto un aspecto perlado. Con la edad y el efecto de la lluvia, éstas espinas se van desprendiendo del exoperidio dejándolo liso y con unas marcas donde estuvieron las espinas. Finalmente todo el exoperidio termina por desprenderse.

Endoperidio: blanquecino y casi liso, aunque suele presentar unas marcas irregularmente reticuladas dejadas por el exoperidio. La dehiscencia se

produce en la parte más alta, donde se abre un pequeño agujero llamado poro apical, a través del cual se esparcen al aire las esporas.

Gleba: esponjosa de color blanco en los especímenes jóvenes, con la maduración se vuelve primero de color amarillento, después verdoso, y finalmente pardo amarillenta.

En la figura 22 se aprecia una raíz de *Picea mexicana* rodeada por micelio de *Lycoperdon perlatum*.



Figura. 21 Cuerpo fructífero de *Lycoperdon perlatum* creciendo en tratamiento.

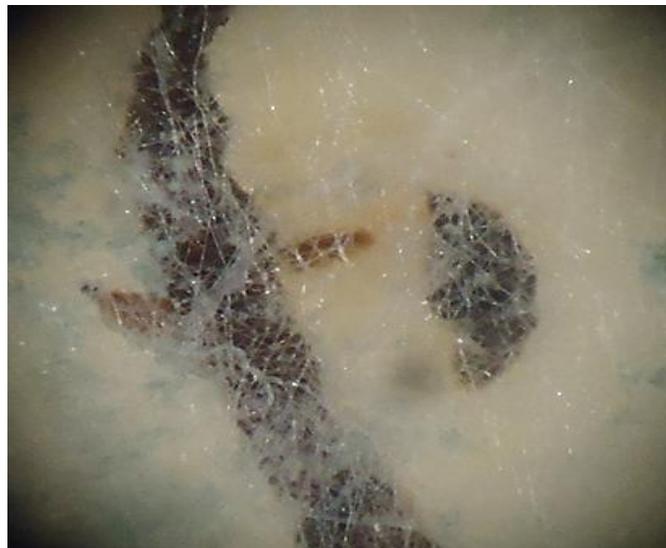


Figura. 22 Raíz de *Picea mexicana* colonizada por micelio de *Lycoperdon perlatum*.

VI. CONCLUSIONES.

De acuerdo con los resultados obtenidos se tiene las siguientes conclusiones.

- En cuanto a la micorrización de *Picea* con suelo colectado en el bosque de ésta especie, en el análisis estadístico (ANVA), los datos indican que al menos un tratamiento es diferente de los demás con resultado altamente significativo, por lo que se rechaza la H_0 . El suelo del bosque de *Picea mexicana* micorriza a ésta especie mediante el Tratamiento 1, en donde se aplicó una mayor cantidad de suelo (30 g), en éste se observaron mejores resultados que en el Tratamiento 2 donde se aplicaron 20 g y que también hubo micorrización en menor grado, en el Tratamiento 3 (testigo) como era de esperarse, no hubo inoculación de algún hongo.
- El suelo colectado en el bosque de *Picea mexicana* es un buen complemento para el sustrato donde se trasplantan las plántulas de esta pinácea.
- En cuanto a los hongos ectomicorrícicos encontrados en el suelo, se encontró que *Lycoperdon perlatum* es la especie que micorrizó a *Picea mexicana*.
- *Trichoderma harzianum* es un hongo de gran importancia para ésta especie ya que este hongo se encontró en la raíz en asociación con el micelio del hongo ectomicorrícico.

VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la supervivencia y el establecimiento de las plantas micorrizadas en campo.
2. Evaluar otras variables como biomasa radicular, biomasa foliar, coloración, concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en tejidos.
3. Realizar el experimento con inoculó de *Lycoperdon perlatum* y *Trichoderma harzianum* por separado para evaluar cuál de los dos aporta mejores beneficios a las planta.
4. Caracterizar la especies de hongos por medio de marcadores moleculares.

VIII. LITERATURA CITADA

- Agarwal, P. and Sah, P. 2009. Ecological importance of ectomycorrhizae in world forest ecosystems. *Nature and Science* 7(2):107-116pp.
- Agrios, G. 1999. *Fitopatología*. Academic Press Inc. México, D.F. 838 pp.
- Agrios, G. 2004. *Fitopatología*. Editorial Limusa. Noriega Editores 838 pp.
- Álvarez, J. y Ramos Zapata J. 2004. "Hongos y Plantas". Beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares. 39-45pp.
- Arango, M., Ordoñez, N., Castañeda, E., y Restrepo, A. 1988. Manual hongos contaminantes del laboratorio. Instituto Nacional de Salud. Corporación para Investigaciones Biológicas. Instituto Nacional de Salud 127 pp.
- Andrade, T., Oros O., Lara, Fernández , Hernández , Sánchez , Flores, Noa., Carrazana. Estudio de la interacción micorrícica en bosque de *Pinus-Abies* y bosque mesófilo de montaña. VII Symposium Nacional y IV Reunión Iberoamericana de la Simbiosis Micorrízica Universidad Veracruzana.
- Bae, Y. y Knudsen, G. 2000. Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with β - glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66 No 2. 810 – 815 pp.
- Barnett, H. y Hunter, B. 1972. *Illustrated Genera of imperfect fungi*. Third Edition. Burgess Publishing Company. 241 pp.
- Braham. S.B. 1995 Regeneración natural de *Picea engelmannii* var. Mexicana en Arteaga, Coahuila y Rayones, N.L. Tesis Profesional Licenciatura UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coah. México. 46 pp.
- Brundrett M. 1996. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol.Rev.* (79):473-495 pp.
- Bücking, H., A.J. Kuhn, W.H. Schröder y W. Heyser. 2002. The fungal sheath ectomycorrhizal pine roots: An apoplastic barrier for the entry of calcium, magnesium and potassium into the root cortex? *Journal of Experimental Botany* 53: 1659-1669 pp.

- Bruns T. D. y Shefferson R. P. 2004. Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Can. J. Bot.* 1122-1132 pp.
- Camargo R. 2001. Some biological aspects of the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 68: 15-32 pp.
- Camargo R. 2002. Dispersal, distribution and establishment of arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*; 71: 33-44 pp.
- Camargo R. 2009. Micorrizas. COSMOS. Enciclopedia de las Ciencias y la Tecnología en México. Tomo Ciencias Biológicas. CONACYT, UAM y ICyTDF. México. 110-113 pp.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutiérrez A., Chet, I. And Herrera–Estrella, A. 1999. Role of *Trichoderma harzianum* Endochitinase gene, ech42, in Mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 65, No. 3. 929 – 935 pp.
- Cruz B. 1992. Micorrizas un caso de simbiosis entre plantas y hongos. Tesis. Colegio de Ciencias y Humanidades. UNAM. México. 247 pp.
- De La Cruz, J., Pinto –Toro, J., Benitez, T. And Llobell, A. 1995. Purification and characterization of an Endo - β - 1,6 – Glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *Journal of Bacteriology*. Vol. 177. No 7. p. 1864 – 1871 pp.
- Díez J., Manjón J.L., Kovács G.M., Celestino C.Toribio M., 2000. Mycorrhization of vitroplants raised from somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.) *Applied Soil Ecology* 15: 119-123 pp.
- Domsch, K., Gams, W. And Traute – Heide, A. 1980. *Compendium of Soil fungi*. Vol. 1. Academic Press. London, U.K. 430 pp.
- Duddridge, J.A. 1987. Specificity and recognition in ectomycorrhizal associations. *In: Fungal Infection of Plants*. Br. Mycol. Soc. Symp., 13: 25-44 pp.
- Duñabeitia M., Rodríguez N., Salcedo I., Sarrionandia E., 2004b. Field mycorrhization and its influence on the establishment and development of the seedlings in a broadleaf plantation in the Basque Country. *Forest Ecology and Management* 195: 129-139 pp.
- Ezziyiani, M., Pérez, C., Ahmed, A., Requena, M. y Candela, M. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de

Phytophthora capsici en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.).
Anales de Biología. Vol. 26. 35 –45 pp.

- Finlay R.D. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extra radical mycelium. *Journal of Experimental Botany*; 59:1115-1126 pp.
- Flores L., C. 2004. Indicadores reproductivos en tres poblaciones de *Picea mexicana* Martínez de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. 49 p.
- Flores L., C., J. López-Upton y J.J. Vargas-Hernández. 2005. Indicadores reproductivos en poblaciones naturales de *Picea mexicana* Martínez. *Agrociencia*. 39 (1): 117-126 pp.
- González. E.M.S., M. González E. y M.A. Márquez L., 2007. Vegetación y Ecorregiones de Durango. Plaza y Valdés S. A. de C. V. México D.F. 219 pp.
- Grondona, I., Hermosa, R., Tejada, M., Gomis, M., Mateos, P. 1997. Physiological and Biochemical Characterization of *Trichoderma harzianum*, a Biological Control Agent against Soilborne Fungal Plant Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63. No 8. 3189 – 3198 pp.
- Guadarrama-Chávez P., Sánchez-Gallén I., Álvarez-Sánchez J. y Ramos-Zapata J. 2004. Hongos y plantas: beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares. *Ciencias Biológicas* 73: 38-45 pp.
- Harley, J.L. 1986. Mycorrhizal studies: past and future. *In: Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* (edited by V. Gianinazzi-Pearson and S.Gianinazzi). 1st European Symposium on Mycorrhizae, Dijon, INRA, Paris, 25-33 pp.
- Honrubia, M.; Torres, P.; Díaz, G. y Cano, A. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA. 47 pp.
- Hormilla S., Peña J.I., Duñabeitia M.K., 1997. influencia de la ectomicorrización en la respuesta de plantas de *Quercus robur* L. a la deficiencia nutricional. II Congreso Forestal Español. I Congreso Forestal Hispano Luso. Pamplona junio de 1997. Libro de Actas Tomo III.313-318 pp.

- Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant disease*. Vol 87 No 1. 4 – 10 pp.
- Kullnig, C., Mach, R., Lorito, M., And Kubicek, C. 2000. Enzyme Diffusion *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a Prerequisite for Triggering of *Trichoderma* ech42 Gene Expression before Mycoparasitic Contact. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 66, 5, 2232 – 2234 pp.
- Landis, T. 1993. Nursery pests and mycorrhizae. Washington, US. USDA, Forest Department. 5:171
- Landis, T.D., Tinus, R.W., McDonald, S.E. y Barnett, J.P. 1990. The Biological component: Nursery Pest and Mycorrhizae. *In: The Container Tree Nursery Manual*. USDA Forest Service. Washington. 1239-1345 pp.
- Ledig, F. Thomas; Hodgskiss, Paul D.; Jacob-Cervantes, Virginia 2002. Genetic diversity, mating system, and conservation of a s Mexican subalpine relict, *Picea Mexicana* Martínez. *Conservation Genetics* 3:113-122 pp.
- Ledig, F.T., P.D. Hodgskiss, K. V. Krutovskii, D.B. Neale y T. Eguiluz-Piedra. 2004. Relationships among the spruces (*Picea*, Pinaceae) of southwestern North America. *Systematic Botany* 29 (2): 275–295 pp.
- Martínez, M. 1961. Una nueva especie de *Picea* en México. *Anales del Instituto de Biología*. 32: 137-142 pp.
- Martínez, M. 1963. Las pináceas mexicanas. 3ª Ed. Instituto de Biología. UNAM. México, D. F. 401 pp.
- Morte A., Díaz G., Rodríguez P., Alarcón J.J., Sánchez-Blanco M.J. 2001. Growth and water relations in mycorrhizal and nonmycorrhizal *Pinus halepensis* plants in response to drought. *Biologia Plantarum* 44 (2): 63-267 pp.
- Peña V., Cardona G. I., Mazorra A., Arguellez J. H., Arcos A. L. 2006. Micorrizas arbusculares de la amazonia colombiana. *Catalogo Ilustrado*. 208 pp.
- Pereira, G.; Herrera, J.; Machuca, A. y Sánchez, M. 2007. Efecto del pH sobre el crecimiento en *Pinus radiata*. *Bosque*. 28(3):215-219 pp.

- Pérez M.; J. and Read, D. J. 2001a. Exploitation of pollen by mycorrhizal mycelial systems with special reference to nutrient recycling in boreal forests. *Proceedings of the Royal Society of London*. 268:1329-1335 pp.
- Pérez M.; J. and Read, D. J. 2001b. Nutrient transfer from soil nematodes to plants: A direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. *Plant Cell Environ*. 24:1219-1226 pp.
- Pérez M.; J. y Read, D. J. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*. 29(5):239-247 pp.
- Pérez M.; J.; Martínez-Reyes, M.; Yesca-Pérez, A.; Delgado-Alvarado, A. y Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico an a case study at Ozumba. *Econ. Bot*. 62(3):425-436 pp.
- Peterson, R. L. y M. L. Farquhar 1994; "Mycorrhizas-Integrated development between roots and fungi", *Mycologia*, 86 (3), 311-326.
- Rey, M., Delgado Jarana, J., Rincón, A., Limón, C. y Benítez, T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. *Revista Iberoamericana de micología*. Vol.17 31 – 36 pp.
- Ruiz-Lozano, J. M., Azcón, R. 1995. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiologia Plantarum* 95 (3), 472–478 pp.
- Rzedowski, J. 1983. *Vegetación de México*. Limusa. México. 432 pp.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York, USA. 787 pp.
- Smith, S. E., and Gianinazzi-Pearson, V. 1988. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 39, 221-244pp.
- Smith, S.E., and Read, D. J. 1997. Mutualism and Parasitism: biodiversity in function and structure in the arbuscular (VA) mycorrhizal symbiosis.
- Torres P., Honrubia M., 1994b. Inoculation of containerized *Pinus halepensis* (Miller) seedlings with basidiospores of *Pisolithus arhizus* (Pers) Rauschert, *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th M Fr and *Suillus collinitus* (Fr) O Kuntze. *Ann Sci For* 51: 521-528. *ADV. Bot* 22: 1-43 pp.

- Trappe J.M., 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Ann Rev Phytopathol* 15:203-222 pp.
- Van der Heijden M.G.A. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi as a determinant of plant diversity: in search of underlying mechanisms and general principles. *Ecological Studies*, 157: 243-265 pp.
- Violeta H, Jesús Pé, Vicente E, Juan J., Roberto Q. y Margarita T. 2010 caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México, *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.1 Núm.4 1 . 567-577 pp.
- http://www.inia.es/gcontrec/pub/PERA-PARLADE_%28SRF143%29_1162283009796.pdf (consulta marzo 2014)
- SEMARNAT-2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059.
http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/435/1/NOM_059_SEMARNAT2013.pdf.(Consulta Noviembre de 2013).
- Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista Digital Universitaria UNAM* <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/>. (Consulta Diciembre 2013).
- Vegetación y flora de un bosque relictual de *Picea chihuahuana* Martínez del norte de México. www.redalyc.org (consulta Diciembre 2013).

IX ANEXOS

Anexo 1

DICHOTOMOUS KEYS

Key to *Hypocrea* species with green ascospores based on teleomorphs 1

1. Stromata formed of loosely interwoven hyphae, readily forming in culture; no Conidiophores observed in culture *H. spinulosa* (28)

Stromata formed of pseudoparenchymatous tissue, perithecia rarely formed in culture; rarely on herbaceous substrata.....2

2. Part-ascospores on average $\geq 8.5 \mu\text{m}$ diam.....3

Part-ascospores on average $< 8.5 \mu\text{m}$ diam4

3. Stromata pulvinate, with whitish tomentum on the surface, 1.0–2.5 mm diam; distal part-ascospores $11.4\text{--}13.0 \times 11.0\text{--}12.5 \mu\text{m}$, proximal part-ascospores $11.5\text{--}13.5 \times 10.8\text{--}13.2 \mu\text{m}$ *H. macrospora* (22)

Stromata tuberculate, hirsute, 0.6–0.9 mm diam; distal part-ascospores $10.2\text{--}11.5 \times 9.5\text{--}10.5 \mu\text{m}$, proximal part-ascospores $9.5\text{--}10.7 \times 8.5\text{--}9.0 \mu\text{m}$ *H. tuberosa* (37)

4. Distal part-ascospore on average $> 7.0 \mu\text{m}$ long 5

Distal part-ascospore on average $< 7.0 \mu\text{m}$ long 8

5. Stromata light orange, KOH–; ascospores dimorphic, distal part subglobose to ellipsoidal, $(6.0\text{--})7.0\text{--}8.2\text{--}(9.0) \times (5.5\text{--})6.5\text{--}7.0\text{--}(8.5) \mu\text{m}$; proximal part wedge-shaped to ellipsoidal, $(6.2\text{--})7.0\text{--}8.0\text{--}(10.0\text{--}) \times (5.0\text{--})5.7\text{--}7.0\text{--}(8.5) \mu\text{m}$; known only from Czech Republic *H. velenovskyi* (38)

- Stromata and ascospores not as above; known from Asia or Neotropics 6
6. Stromata greyish-yellow to yellow-orange, KOH+; ascospores monomorphic, globose to subglobose, distal part-ascospores 7.0–7.5 × 6.5–7.0 μm, proximal part-ascospores 6.7–7.5 × 6.2–6.7 μm; Neotropical ***H. virescentiflava* (40)**
- Stromata and ascospores not as above; Asia 7
7. Stromata pale greyish yellow, 1–2 mm diam, KOH+; distal part-ascospores 7.3–8.0 × 5.8–6.0 μm, proximal part-ascospores 7.1–7.6 × 5.5–6.0 μm..... ***H. centristerilis* (6)**
- Stromata greyish yellow to greyish orange, 2–12 mm diam, KOH–; distal part-ascospores 7.2–8.2 × 6.2–7.0 μm, proximal part-ascospores 7.5–8.5 × 5.7–6.5 ***H. albocornea* (9)**
8. Distal part-ascospores 6.5–7.0 μm long, proximal part-ascospore 7.0–7.7 μm long; stromata brownish-orange, KOH+ ***H. cuneispora/T. cuneisporum* (17)**
- Distal and proximal part-ascospores on average <6.5 μm long 9
9. Part-ascospores monomorphic, almost globose; stromata in various shades of yellow10
- Part-ascospores dimorphic, globose, subglobose, wedge-shaped, or subcylindrical;stromata of various colours14
10. Part-ascospores on average 3.3–4.0 μm diam 11
- Part-ascospores on average 4.5–5.7 μm diam 12
11. Stromata yellow to brownish orange, 1.5–2.5 mm diam, somewhat flattened; ascospores slightly warted, part-ascospores 3.5–4.0 μm diam; known

only from Northern Europe *H. aureoviridis/T. aureoviride* (3)

Stromata pale greyish yellow, 0.7–1.0 mm diam, pulvinate; ascospores warty, part-ascospores 3.3–3.5 µm diam; known only from Costa Rica *H. candida/T. candidum* (4)

1 Values given represent 95% confidence intervals

12. Stromata yellowish, opaque, KOH+; anamorph gliocladium-like *H. virens/T. virens* (39)

Stromata yellowish, waxy, somewhat transparent, KOH–; anamorph not gliocladium-like, with sinuous conidiophores and branches **13**

13. Stromata generally gregarious, with a constricted base; distal part-ascospores 5.5–5.7 × 5.0–5.5 µm, proximal part-ascospores 5.5–5.7 × 4.7–5.0 µm; conidiophores and branches narrow, phialide L/W 2.0–2.2, conidia length 4.5–4.7 µm, conidia L/W 1.2–1.3; colony radius on SNA after 3 d at 25 °C 29–36 mm, at 30 °C 29–39 mm..... *H. sinuosa/T. sinuosum* (27)

Stroma generally not gregarious, not constricted at the base; distal part-ascospores 5.0–5.2 × 4.8–5.2 µm, proximal part-ascospores 5.0–5.3 × 4.5–4.7 µm; conidiophores and branches somewhat wide, phialide L/W 1.9–2.0, conidial length 4.0–4.3 µm, conidial L/W 1.1–1.2; colony radius on SNA after 3 d at 25 °C 40–46 mm, at 30 °C 43–47 mm*H. chlorospora/ T. chlorosporum* (9)

14. Distal part-ascospores on average < 4.0 µm diam **15**

Distal part-ascospores on average > 4.0 µm diam **18**

15. On decaying leaves of *Clusia* sp.; stromata KOH+; distal part-ascospores 2.8–3.0 × 2.5–2.7 μm.....***H. clusiae* (12)**
 Not on leaves; stromata KOH–; distal part-ascospores 2.5–3.7 μm dia..... **16**
16. Stromata dark brown almost black, 6–15 mm diam, surface glabrous, coriaceous, tissue composed of very thick-walled cells; distal part-ascospores 3.5–3.7 × 3.0–3.1 μm ***H. cornea* (13)**
 Stromata whitish to pale yellow, 0.6–7.8 mm diam, surface smooth or tomentose, tissue not coriaceous**17**
17. Stromata white, 1.8–7.8 mm diam, surface tomentose, distal part-ascospores 2.5–3.3 μm diam; distinct macroconidia present; on wood; known from Indonesia ***H. sulawesensis* (32)**
- Stromata pale yellow, 0.6–0.8 mm diam, surface hirsute, distal part-ascospores 3.5–3.7 μm diam; anamorph gliocladium-like, not forming macroconidia; on hymenium of *Thelephoraceae*; known from U.S.A. ***H. thelephoricola/ T. thelephoricola* (36)**
18. Stromata very dark brown or green, often appearing black **19**
- Stromata in pale shades of yellow, brown and orange **21**
19. Stromata 2.5–5.0 mm diam; distal part-ascospores 5.0–5.0 × 4.5–4.8 μm; anamorph gliocladium-like (similar to *G. viride*)..... ***H. melanomagna/T. melanomagnum* (23)**
- Stromata on average < 1.5 mm diam**20**

20. Stromata 1.0–1.5 mm diam, surface smooth; distal part-ascospores 4.3–4.4 × 3.9–4.0 μm; anamorph pachybasium- to trichoderma-like, conidia subglobose ***H. lixii/T. harzianum* (21)**
- Stromata 0.5–1.0 mm diam, surface tuberculate; distal part-ascospores 6.0–6.5 × 5.5–6.0 μm; anamorph gliocladium-like ***H. nigrovirens/T. nigrovirens* (24)**
21. Stromata yellow to yellow-orange, cylindrical, surface flat to somewhat concave, seated on a thick subiculum ***H. substipitata* (31)**
- Stromata yellow to brown, not on a thick subiculum and not cylindrical **22**
22. Stromata in shades of brown (but not appearing black) **23**
- Stromata in shades of yellow **30**
23. Stromata reddish brown, deeply furrowed or wrinkled; distal part-ascospores 5.2–5.5 × 4.7–5.0 μm, proximal part-ascospores 5.0–6.0 × 4.5–4.7 μm; known only from India and Sri Lanka ***H. rugulosa* (26)**
- Stromata not deeply furrowed or wrinkled; not known from Sri Lanka or India **24**
24. Distal part-ascospores on average 5.3–6.5 long **25**
- Distal part-ascospores on average < 5.3 μm lon **26**
- Hypocrea/Trichoderma* with green ascospores **34**
25. Stromata KOH+, brownish orange; distal part-ascospores 5.8–6.5 × 4.0–5.0 μm; anamorph pachybasium-like ***H. atrogelatinosa* (2)**

Stromata KOH–, brown, violet-brown, or dark reddish brown; distal part-ascospores 5.3–5.5 × 4.5–5.0 μm; anamorph verticillium-like ***H. tawa/T. tawa* (34)**

26. Stromata brownish orange, 0.5–0.7 mm diam, waxy, somewhat transparent; distal part-ascospores 4.3–4.5 × 4.0–4.2 μm, proximal part-ascospores 4.8–5.2 × 3.5–3.7 μm; anamorph gliocladium-like, phialides 10.5–11.5 × 3.3–3.5 μm (L/W 3.1–3.5), conidia conspicuously held in drops of clear green liquid ***H. gelatinosa/T. gelatinosum* (19)**

Stromata characters not in above combination; conidia apparently held in dry heads **27**

27. Stromata reddish brown (brick red), opaque, 0.8–1.7 mm diam; distal part-ascospores 3.9–4.7 × 3.4–4.2 μm, proximal part-ascospores 4.2–5.2 × 3.1–3.7 μm; anamorph pachybasium-like, conidia 3.3–3.7 × 2.7–3.0 (L/W 1.1–1.3) ***H. ceramica/T. ceramicum* (8)**

Stromata and anamorph characters not in above combination **28**

28. Stromata brown to light brown, KOH–, opaque; phialides 9.0–10.3 × 3.7–4.0 μm, conidia 4.2–4.5 × 3.3–3.5 μm ***H. cinnamomea/ T. cinnamomeum* (11)**

Stromata brownish orange or pale to dark reddish brown, KOH+, waxy, semitransparent; phialides 6.5–8.0 μm long, conidia 3.0–3.7 × 2.3–3.2 μm ... **29**

29. Distal part-ascospores 4.5–4.7 × 4.0–4.2 μm, proximal part-ascospores 4.8–5.0 × 3.5–3.7 μm; anamorph pachybasium- to gliocladium-like, conidia 3.4–3.7 × 3.0–3.2 μm; known only from U.S.A. ***H. ceracea/T. ceraceum* (7)**

Distal part-ascospores 3.5–4.0 × 3.5–4.0 μm, proximal part-ascospores 4.0 × 3.0–3.5 μm; anamorph pachybasium-like, conidia 3.0 × 2.3–2.5 μm; known only from France ***H. phyllostachydis/ T. phyllostachydis* (25)**

30. Stromata KOH+	31
Stromata KOH–	36
31. Distal part-ascospores on average < 4.5 µm long, proximal part-ascospores 4.2–4.7 × 3.5–3.8 µm	32
Distal part-ascospores on average ≥ 4.5 µm long, proximal part-ascospores on average > 4.5 µm diam	33
32. Stromata generally gregarious, pale yellow, 0.9–1.2 mm diam; distal part-ascospores 4.2–4.3 × 4.0–4.2 µm, proximal part-ascospores 4.2–4.5 × 3.6–3.8 µm; anamorph with few phialides formed; phialides hooked or twisted; conidia pale green; known only from U.S.A.	<i>H. chromosperma/</i>
<i>T. chromospermum</i> (10)	
Stromata not gregarious, yellowish brown, 1.4–2.1 mm diam; distal part-ascospores 4.0–4.3 × 3.8–4.0 µm, proximal part-ascospores 4.5–4.7 × 3.5–3.7 µm; anamorph with pachybasium- and gliocladium-like branches, abundant phialides; phialides straight, conidia green; known only from Thailand	<i>H. thailanT. thailandicum</i> (35)
33. Distal part-ascospores 4.5–5.0 × 3.7–4.0 µm, proximal part-ascospores 4.5–5.3 × .2–3.7 µm	37
Distal part-ascospores 5.0–5.5 µm diam, proximal part-ascospores 5.0–6.2 × 4.2–5.2 µm	35
34. Stromata 1–4 mm diam, greyish yellow to greyish orange; known only from Brazil	<i>H. gyrosa</i> (20)
Stromata 0.1–1.0 mm diam, pale yellow to greyish yellow; known only from Sri Lanka.....	<i>H. straminea/T. stramineum</i> (29)

35. Phialides 14.7–18.2 × 2.5–3.0 µm (L/W 5.4–7.9); conidia 4.0–4.2 × 3.2–3.5 µm ***H. estonica/T. estonicum* (18)**

Phialides 7.2–7.7 × 4.0–4.2 µm (L/W 1.8–2.0); conidia 4.5–4.7 × 3.5–3.7 µm
.....***H. strictipilosa/T. strictipile* (30)**

36. Anamorph verticillium-like; phialides 16.0–25.5 × 2.7–4.0 µm (L/W 5.5–7.2)
.....***H. costaricensis* (14)**

Anamorph trichoderma- or pachybasium-like; phialides 5.5–13.0 × 2.7–4.2 µm
(L/W 1.4–4.2) **37**

37. Phialides 5.5–7.2 × 3.2–4.2 µm (L/W 1.4–2.2); conidia 3.5–4.0 × 2.3–2.7 µm (L/W 1.4–1.6)***H. catoptron/T. catoptron* (5)**

Phialides 8.5–13.0 × 2.7–4.0 µm (L/W 2.2–4.2); conidia 4.0–5.0 × 3.5–4.0 µm
(L/W 1.1–1.3)**38**

38. Stromata 0.9–1.2 mm diam; distal part-ascospores 5.5–6.0 × 5.2–5.5 µm,
proximal part-ascospores 5.7–6.2 × 4.7–5.2 µm; phialides 10.5–12.7 × 2.7–3.2 µm
(L/W 3.5–4.2); conidia 4.0–4.5 × 3.5–3.7 µm (L/W 1.1–1.2)
..... ***H. cremea/T. cremeum* (6)**

Stromata 1.5–2.6 µm; distal part-ascospores 5.0–5.5 × 5.0–5.5 µm, proximal
part-ascospores 4.7–5.2 × 4.5–4.7 µm; phialides 8.5–9.5 × 3.7–4.0 µm (L/W
2.2–2.6); conidia 4.5–5.0 × 3.7–4.0 µm (L/W 1.2–1.3) ***H. surrotunda/
T. surrotundum* (3)**

Key to *Hypocrea* species with green ascospores based on anamorph characters

1. Conidia on average > 5 µm long, green **2**

Conidia on average < 5 µm long, green **6**

2. Anamorphs gliocladium-like; conidia 6.0–6.5 × 4.5–5.0 µm**3**

Anamorphs verticillium- or pachybasium-like; conidia 5.0–6.0 × 3.2–4.0 μm..... 4

3. Conidiophores generally arising from the surface of the agar; phialides 13.5–15.5 × 3.5–4.0 μm (L/W 3.5–4.0); stromata black, strongly tuberculate***H. nigrovirens/T. nigrovirens* (24)**

Conidiophores arising from aerial hyphae; phialides 13.5–15.7 × 4.3–4.6 (L/W 3.1–3.6); conidia 6.0–6.5 × 4.7–5.0 μm (L/W 1.3); pustulate anamorph sometimes formed; phialides from pustulate anamorph 4.4–9.5 × 3.0–4.2 μm; conidia from pustulate anamorph 3.7–5.3 × 2.6–3.7 μm; stromata yellowish, pulvinate, not tuberculate ***H. crassa/T. crassum* (15)**

4. Anamorph pachybasium-like, conidiophore elongations present, fertile or not, verticillium-like synanamorph rarely present; phialides 6.0–7.2 × 3.7–4.0 μm***H. cuneispora/T. cuneisporum* (17)**

Anamorphs verticillium-like, conidiophore elongations absent; phialides 14–26 × 2.7–4.0 μm.....5

5. Phialides 16.0–25.5 × 2.7–4.0 μm (L/W 5.5–7.2); conidia 5.2–6.0 × 3.2–4.0 μm(L/W 1.5–1.8); abundant chlamydo spores formed; stromata pale yellow ***H. costaricensis* (14)**

Phialides 14.0–16.0 × 3.0–3.2 μm (L/W 4.7–5.5); conidia 5.2–6.0 × 3.5–3.7 μm (L/W 1.4–1.6); no chlamydo spores formed; stromata brown, brown-violet or orange-brown***H. tawa/T. tawa* (34)**

6. Anamorph forming micro- and macro-conidia; micro-conidia green, aseptate, ellipsoidal; macro-conidia hyaline, subulate, with a rounded, somewhat thick-walled basal cell, often multiseptate ***H. sulawesensis* (32)**

Anamorphs not forming macro-conidia 7

7. Anamorphs gliocladium-like 8

Anamorphs trichoderma-, pachybasium-, or verticillium-like 11

8. Conidiophores formed in irregular fascicles throughout the plate; phialides $10.5\text{--}11.5 \times 3.3\text{--}3.5 \mu\text{m}$ (L/W 3.1–3.5); conidia $4.0\text{--}4.3 \times 3.3\text{--}3.5 \mu\text{m}$ (L/W 1.2–1.3), held in drops of clear green liquid ***H. gelatinosa/T. gelatinosum* (19)**

Conidiophores not in fascicles, rather arising singly from the agar or from aerial hyphae; phialides on average $>11.5 \mu\text{m}$ long9

Hypocrea/Trichoderma with green ascospores

5. Conidiophores generally arising from aerial hyphae; phialides $8.8\text{--}9.2 \times 4.0\text{--}4.2 \mu\text{m}$ (L/W 2.2–2.3); conidia $4.5\text{--}4.7 \times 3.8\text{--}4.0 \mu\text{m}$ (L/W 1.2), held in drops of clear Green liquid; abundant chlamydospores formed ***H. virens/T. virens* (39)**

Phialide L/W > 4.5 ; conidia $3.2\text{--}3.7 \times 2.5\text{--}3.2 \mu\text{m}$ 10

10. Discrete conidiophore, branching 3–4 times (penicillus ter- to quaterverticillate); phialides $11.5\text{--}13.0 \times 1.7\text{--}2.0 \mu\text{m}$ (L/W 5.8–6.8); conidia $3.3\text{--}3.7 \times 2.5\text{--}2.7 \mu\text{m}$ (L/W 1.3–1.4); anamorph similar to *Gliocladium viride*; stromata black, 2.5–5.0 mm diam; on decorticated wood ***H. melanomagna/ T. melanomagnum* (23)**

More or less discrete conidiophores, branching 2–3 times (penicillus bi- to terverticillate); phialides $12.0\text{--}13.5 \times 2.5\text{--}2.7 \mu\text{m}$ (L/W 4.6–5.3); conidia $4.0\text{--}4.5$

× 2.8–3.0 µm (L/W 1.4–1.6); stromata yellowish, 0.6–0.8 mm diam; on hymenium of *Thelephoraceae****H. thelephoricola/***

***T. thelephoricola* (36)**

11. Anamorph odd gliocladium-like; conidiophores with verrucose base, generally very few phialides formed; phialides lageniform, more often hooked or twisted, 6.9–14.5 × 2.5–3.5 µm (L/W 2.5–4.8); conidia pale green, 4.0–6.5 × 3.7–3.8 µm (L/W 1.4–1.7); found in Eastern U.S.A.***H.***

***chromosperma/ T. chromospermum* (10)**

Anamorph characteristics not in the above combination**12**

12. Pachybasium-like anamorphs with conidial L/W > 1.4 on average**13**

Various types of anamorphs with conidial L/W < 1.4 on average **15**

13. Conidia 3.0–3.2 × 2.0–2.2 µm (L/W 1.4–1.5); sinuous conidiophore elongations present; verticillium-like synanamorph present; phialides 4.7–5.0 × 3.0–3.2 µm; known only from Sri Lanka ***H.***

***straminea/ T. stramineum* (29)**

Conidia on average > 3.5 µm long and >2.5 µm wide **14**

14. Gliocladium-like synanamorph formed abundantly in aerial hyphae; phialides from pustulate anamorph 4.4–9.5 × 3.0–4.2 µm; conidia 3.7–5.3 × 2.6–3.7 µm (L/W 1.4); phialides from gliocladium-like anamorph 13.5–15.7 × 4.3–4.6 µm; conidia 5.9–6.4 × 4.7–4.9 µm ***H.***

***crassa/ T. crassum* (15)**

Verticillium-like synanamorph formed in areas of effuse conidiation; phialides of pachybasium-like anamorph 5.5–7.2 × 3.2–4.2 µm; conidia 3.5–4.0 × 2.3–2.7 µm (L/W 1.4–1.6) ***H. catoptron/ T. catoptron* (5)**

15. Phialides on average > 8.5 µm long **16**

Phialides on average < 8.5 µm long **21**

16. Phialides on average <15 µm long**17**

Phialides 14.7–18.2 × 2.5–3.0 µm (L/W 5.4–7.9); conidia 4.0–4.2 × 3.2–3.5 µm

(L/W 1.2–1.3); stromata pale yellow to greyish yellow, KOH+ ...***H. estonica/T. estonicum*** (18)

17. Anamorph pachybasium-like; phialide L/W < 2.9 on average 18

Anamorph trichoderma-like; phialide L/W > 2.9 on average 19

18. Phialides 9.0–10.3 × 3.7–4.0 µm (L/W 2.4–2.8), conidia 4.2–4.5 × 3.3–3.5 µm (L/W 1.2–1.3); colony radius on PDA at 25 °C after 3 d 2–6 mm; stromata brown to light brown.....***H. cinnamomea/T. cinnamomeum*** (11)

Phialides 8.5–9.5 × 3.7–4.0 µm (L/W 2.2–2.6); conidia 4.5–5.0 × 3.7–4.0 µm (L/W 1.2–1.3); colony radius on PDA at 25 °C after 3 d 26–32 mm; stromata pale yellow***H. surrotunda/T. surrotundum*** (33)

19. Phialides 10.5–12.7 × 2.7–3.2 µm; conidia 4.0–4.5 × 3.5–3.7 µm (L/W 1.1–1.2); colony radius on PDA at 25 °C after 3 d 63–72 mm; stromata pale yellow***H. cremea/T. cremeum*** (16)