



ORIGINAL

Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrícicos en dos sustratos



María C. Rentería-Chávez^a, Jesús Pérez-Moreno^{a,*}, Víctor M. Cetina-Alcalá^b,
Ronald Ferrera-Cerrato^a y Beatriz Xoconostle-Cázares^c

^a Microbiología, Edafología, Campus Montecillo, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México

^b Programa Forestal, Campus Montecillo, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México

^c Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV, Instituto Politécnico Nacional, San Pedro Zacatenco, México

Recibido el 16 de agosto de 2015; aceptado el 28 de junio de 2016

Disponible en Internet el 12 de marzo de 2017

PALABRAS CLAVE

Pino neotropical;
Viverización de
plantas;
Tipo de sustrato;
Micorrización
controlada;
Laccaria;
Hebeloma leucosarx

Resumen La ectomicorriza es una simbiosis mutualista de enorme importancia en la producción de árboles de valor forestal. Uno de los criterios de selección de hongos ectomicorrícicos de gran interés es su comestibilidad, por la importancia económica, ecológica y cultural de los hongos comestibles ectomicorrícicos como un producto forestal no maderable. En este estudio se evaluó el efecto de la inoculación con los hongos comestibles ectomicorrícicos, *Laccaria laccata*, *Laccaria bicolor* y *Hebeloma leucosarx*, en el crecimiento y el contenido nutricional de *Pinus greggii*, crecido en un sustrato experimental, o en un sustrato comercial enriquecido con un fertilizante de liberación lenta. Dos años después de la siembra, se observaron diferencias en el crecimiento aéreo y radical y en el contenido de macro- y micronutrientes entre plantas inoculadas y no inoculadas, independientemente de la especie fúngica y del sustrato utilizado. Las plantas crecidas en el sustrato comercial tuvieron mayor crecimiento y contenido de nutrientes; sin embargo, sus porcentajes de colonización fueron menores que los de plantas crecidas en el sustrato experimental. Existieron diferencias en la transferencia de nutrientes a la parte aérea de las plantas inoculadas, al comparar entre las especies fúngicas implicadas. Se observó transferencia de Ca por *L. laccata*, de Na por *L. bicolor* y de Mn por *H. leucosarx* en el sustrato experimental. La selección de sustratos constituye un factor clave en la producción de plantas ectomicorrizadas y las tres especies de hongos comestibles ectomicorrícicos evaluados tienen un potencial relevante para la micorrización controlada de *P. greggii*.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jperez@colpos.mx (J. Pérez-Moreno).

KEYWORDS

Neotropical pine;
Nursery plant
production;
Substrate type;
Controlled
mycorrhization;
Laccaria;
Hebeloma leucosarx

Nutrient transfer and growth of *Pinus greggii* Engelm. inoculated with edible ectomycorrhizal mushrooms in two substrates

Abstract An ectomycorrhiza is a mutualistic symbiosis of paramount importance in forestry and tree production. One of the selection criteria of ectomycorrhizal fungi that has currently gained importance is their edibility due to the economic, ecological and cultural relevance of edible ectomycorrhizal mushrooms as a non-timber forest product. The effect of the inoculation with three edible ectomycorrhizal mushrooms: *Laccaria laccata*, *Laccaria bicolor* y *Hebeloma leucosarx*, which are widely sold in Mexico, on the growth and nutrient contents of *Pinus greggii* grown in an experimental substrate and a commercial substrate enriched with a slow-release fertilizer, was evaluated. Two years after sowing, differences in terms of shoot and root biomass and macro and micronutrient contents between inoculated and non-inoculated plants, were recorded independently of the fungal species and the substrate. Despite the fact that plants grown in the commercial substrate had higher growth and nutrient contents, their ectomycorrhizal colonization percentages were smaller than those of the plants grown in the experimental substrate. The differences in the nutrient transfer to the inoculated plant shoots among the evaluated fungal species were recorded. Ca mobilization by *L. laccata*, Na by *L. bicolor* and Mn by *H. leucosarx* were observed in the plants growing in the experimental substrate. It has been demonstrated that the selection of substrates constitutes an important factor in the production of ectomycorrhizal plants and that the three evaluated species of edible ectomycorrhizal mushrooms have an enormous potential in the controlled mycorrhization of *P. greggii*.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La ectomicorriza es una simbiosis mutualista que se establece entre las raíces de gimnospermas y angiospermas y alrededor de 20.000 especies de hongos, principalmente basidiomycetes y ascomycetes⁵⁰. Los hongos ectomicorrízicos están involucrados en la movilización de nutrientes, tanto minerales como orgánicos, del suelo a las plantas hospedantes asociadas, así como en su protección contra patógenos y en el incremento de la tolerancia a factores de estrés, entre ellos sequía, presencia de metales pesados, salinidad y alta temperatura^{46,60}.

La bioinoculación con hongos ectomicorrízicos en la producción de plantas ha cobrado gran interés en países con tradición forestal, dado que se ha demostrado que plantas ectomicorrizadas tienen con frecuencia mayor crecimiento y contenido de nutrientes, y también mayor posibilidad de supervivencia al ser trasplantadas de vivero a campo^{4,19,55,57}. La selección de las combinaciones óptimas de micobiontes y fitobiontes es un factor clave en la inoculación exitosa de árboles de importancia forestal, dado que frecuentemente existen hongos que originan mayores beneficios en relación con otros, en una especie hospedera dada^{11,12,36}. Uno de los criterios de selección, que ha cobrado gran interés en las últimas décadas, es la comestibilidad de los cuerpos fructíferos de los micobiontes, debido a que los hongos comestibles silvestres constituyen un producto forestal no maderable de enorme importancia económica, ecológica y cultural en diversas partes del mundo^{17,43,45,70}.

La micorrización controlada de plantas requiere modificaciones de los métodos convencionales de producción en vivero, ya que la composición de los sustratos, la

fertilización química y la esterilización del medio de crecimiento, entre otros, son factores clave que afectan diferencialmente la colonización ectomicorrízica^{21,61,68}.

Diversos estudios han demostrado que la composición de los sustratos y la fertilización química afectan la micorrización y el crecimiento de plantas inoculadas con hongos ectomicorrízicos^{23-25,54,59,65}. Sin embargo, existe escasa información de cómo el contenido de nutrientes y la movilización, principalmente de micronutrientes, resultan afectados por la composición de los sustratos y la fertilización química en plantas micorrizadas artificialmente.

La mayor parte de la información generada con relación a la influencia de la composición del sustrato en el crecimiento de hospederos asociados y ectomicorrización se ha centrado en especies forestales de distribución boreal y templada; en contraste, las especies de importancia subtropical y tropical han sido escasamente estudiadas.

Pinus greggii Engelm. (pino neotropical nativo de Mesoamérica) es una especie de gran importancia económica y ecológica a nivel internacional por dos motivos: 1) su madera se utiliza ampliamente en la industria de aserrío; 2) tiene un rápido crecimiento, por lo que es muy utilizada en plantaciones comerciales y en reforestaciones para la recuperación de suelos degradados^{20,66,69}. Por estas características, se han establecido exitosamente plantaciones de esta especie tropical y subtropical en Brasil, Sudáfrica, India y Nepal^{16,22,26}.

La diversidad y funcionalidad de las ectomicorrizas de dicha especie arbórea han sido escasamente estudiadas. Por su parte, los géneros de hongos comestibles ectomicorrízicos utilizados, *Hebeloma* y *Laccaria*, tienen una distribución cosmopolita y una gran diversidad de especies. Mueller³³ reconoció 75 especies a nivel mundial para el género

Laccaria y, en el caso de *Hebeloma* se ha estimado que existen de 250 a 600 especies⁷. Las especies *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton, *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke y *Hebeloma leucosarx* P.D. Orton se seleccionaron debido a su enorme importancia social, económica y cultural en el centro de México^{10,44}. Adicionalmente, estas son especies pioneras que se asocian con estadios tempranos de sus hospederos y están adaptadas a condiciones de baja fertilidad^{34,63}.

En el presente trabajo se evaluó el efecto sobre el crecimiento, el contenido de macronutrientes (N, P, K, Ca y Mg) y micronutrientes (Na, Fe, Cu, Mn y Zn) y la micorrización controlada de la inoculación con tres hongos comestibles ectomicorrízicos ampliamente consumidos y de gran importancia económica, social y cultural en el centro de México: *L. laccata*, *L. bicolor* y *H. leucosarx*.

Materiales y métodos

Material vegetal y fúngico

Los bioensayos fueron efectuados en el Área de Microbiología del Colegio de Posgraduados, Texcoco, México. Los esporomas de *L. bicolor*, *L. laccata* y *H. leucosarx* empleados para producir el inóculo ectomicorrízico fueron adquiridos en el mercado de Ozumba, estado de México (fig. 1a). Estos esporomas fueron recolectados en los bosques de pinos aledaños a la comunidad de Ozumba, ubicada a 19°02' de latitud norte y 98°48'14" de longitud oeste. Se utilizaron semillas de *P. greggii* provenientes de bosques naturales de Xochicoatlán, Hidalgo.

Preparación de inóculo e inoculación controlada de plantas

El inóculo se obtuvo a partir de esporomas frescos, de los cuales se cortaron los píleos de sus estípites y se deshidrataron a 35 °C en un secador de frutas (JERSA, Cuautitlán Izcalli, México) (fig. 1b). Los píleos deshidratados de cada especie fúngica se molieron y el inóculo final así obtenido se almacenó en viales de 1,5 ml a 5 °C hasta su utilización. Las semillas se desinfectaron con H₂O₂ al 30% durante 20 min y luego se enjuagaron tres veces con agua estéril. Para el cultivo de las plantas se utilizaron contenedores (tubetes de plástico negro) de 130 cm³ (Merck, Baltimore, EE. UU.), previamente lavados y desinfectados con alcohol al 70%. Estos se llenaron con el sustrato (al 90% del volumen del contenedor) y se sembraron las semillas. Cuatro meses después se aplicó el inóculo fresco de esporomas efectuando una oquedad cilíndrica de 5 mm de diámetro por 20 mm de profundidad en la parte superior del sustrato, en cuyo interior se colocó el inóculo ectomicorrízico deshidratado. Finalmente se cubrió cada oquedad con el sustrato. Cada planta recibió 10⁷ a 10⁸ esporas de los hongos inoculados, según conteos previos realizados en cámara de Neubauer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania). En estas condiciones, se produjeron plantas micorrizadas de *P. greggii*, las cuales fueron mantenidas en un invernadero durante 12 meses bajo una temperatura media anual de 20 °C (9 °C y 31 °C de mínima y máxima, respectivamente), una humedad media anual de 47% (23 y 81% la humedad mínima y máxima, respectivamente) y un fotoperíodo promedio anual de 11,9 h (10,9 h y 13,1 h el fotoperíodo mínimo y máximo respectivamente).

Se seleccionaron plantas de *P. greggii* de 12 meses de viverización con un porcentaje de micorrización de 90% o superior, para ser trasplantadas a recipientes de 5 litros. Paralelamente, se produjeron plantas no micorrizadas, bajo las mismas condiciones. En esta etapa se utilizaron en los recipientes de 5 l dos tipos de sustrato: 1) una mezcla de arena, corteza de pino compostada y suelo forestal de textura franco arenosa, en una proporción 2:2:1; este fue el «sustrato experimental»; 2) una mezcla de 60% de *peat-moss*, 20% de vermiculita (Agrolita de México, ciudad de México), 15% de agrolita, 5% de corteza y el fertilizante de liberación lenta Osmocote®, en una proporción de 2 g/l, cuya composición N-P-K es 15-9-12 g/l; este fue el «sustrato comercial». Estos sustratos se esterilizaron en autoclave a 1,3 kg/cm³ y a 125 °C durante 5 h, se repitió la esterilización en tres días consecutivos, antes de montar el experimento.

Tanto las plantas inoculadas como las no inoculadas permanecieron 12 meses más en las macetas de 5 l, durante este tiempo fueron regadas cada tres días a capacidad de campo con agua destilada estéril.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar. Las plantas de *P. greggii* fueron inoculadas con tres especies de hongos: 1) *L. laccata*, 2) *L. bicolor*, 3) *H. leucosarx*; el tratamiento 4) correspondió a las plantas testigos sin inocular. Estos tratamientos se hicieron crecer en el sustrato experimental o en el sustrato comercial en las macetas de 5 l, de modo que se obtuvieron 8 tratamientos con 7 réplicas y un total de 56 unidades experimentales. Se realizó un análisis de varianza y cuando existieron diferencias entre tratamientos para las variables evaluadas, se analizaron los datos mediante la prueba de Tukey para la comparación de medias con un $p \leq 0,05$ ⁵³. El número de repeticiones que se consideraron para el análisis estadístico fue de cuatro para evaluar la altura, el diámetro del tallo y el peso seco; y de tres para evaluar el porcentaje de colonización ectomicorrízica y el contenido de macro- y micronutrientes.

Evaluación de variables

Todas las plantas de *P. greggii* fueron cosechadas 24 meses después de la siembra. Para ello se extrajeron las plantas de las macetas, separando la parte aérea de la parte radical (cepellón). Posteriormente, la mezcla de raíces y suelo contenida en los cepellones se lavó con agua corriente y se utilizó un tamiz de malla 16 (Grupo FIICSA, ciudad de México) de 1,18 mm de abertura, con la finalidad de recuperar la mayor cantidad posible de raíces. Se evaluó la totalidad de raíces cortas vivas micorrizadas, vivas no micorrizadas y muertas para estimar el porcentaje de colonización ectomicorrízica^{8,30}. El promedio de raíces cortas totales evaluadas por planta fue de 2.759. La parte aérea y la radical fueron deshidratadas en estufa de secado a 80 °C para evaluar su peso seco. Adicionalmente, se realizó un análisis de macro- (N, P, K, Mg y Ca) y micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Na y Cu). El N se determinó por digestión húmeda⁵; el P total, según el método de Allen et al.²; el K, mediante extracción con acetato de amonio y medición por fotometría de llama; y el Ca y el Mg mediante determinación

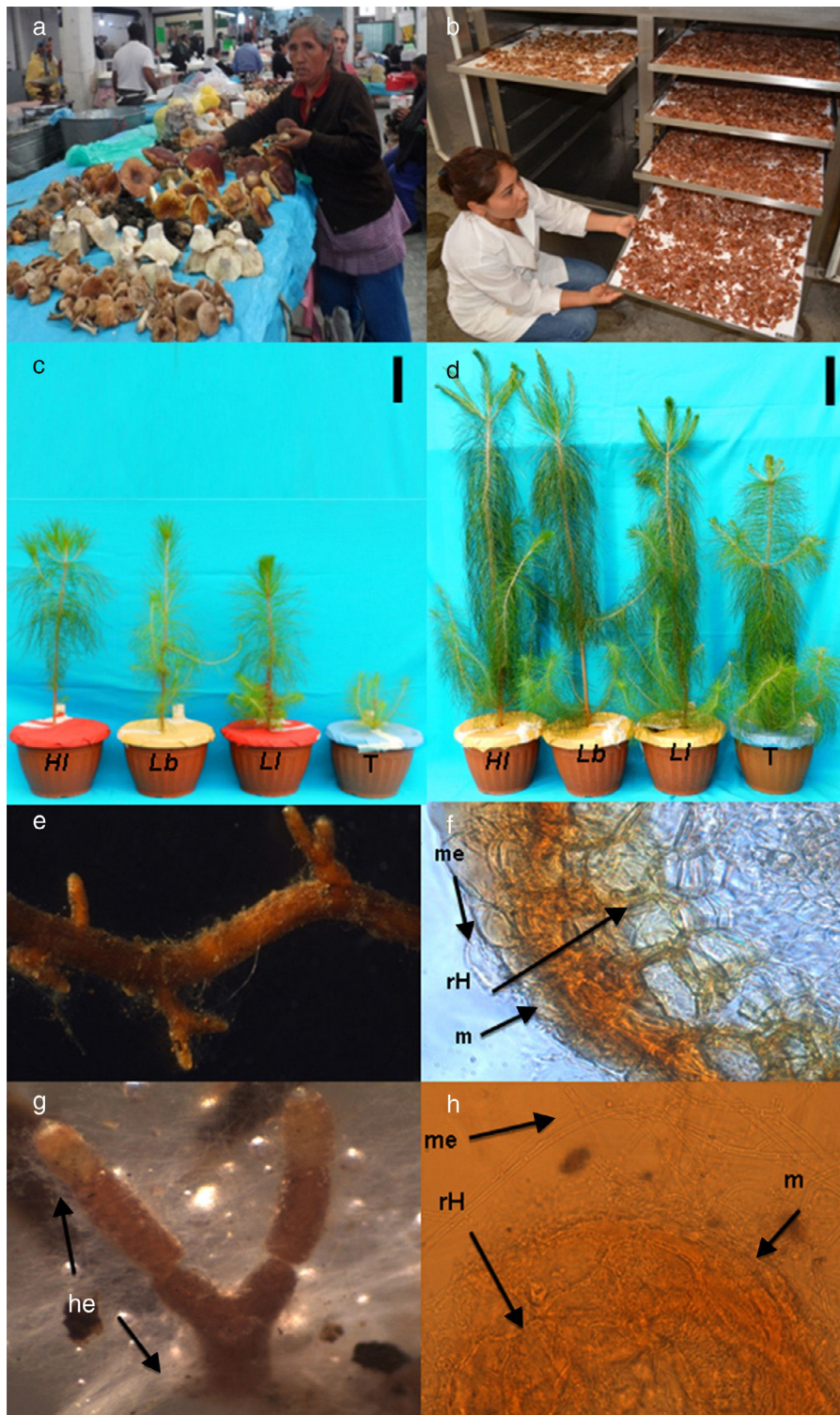


Figura 1 Aspectos generales del bioensayo. Venta de hongos comestibles ectomicorrícicos *Laccaria* spp. y *H. leucosarx* en el mercado de Ozumba, México a); preparación de inóculo en un deshidratador b); efecto de la inoculación ectomicorrícica con *H. leucosarx* (HI), *L. bicolor* (Lb) y *L. laccata* (LI) en comparación con plantas testigo (T) no inoculadas crecidas en el sustrato experimental c) o en el sustrato comercial d); ectomicorriza de *L. bicolor* mostrando la micromorfología de los morfotipos con textura gelatinosa e) y el manto (m), la red de Hartig (rH) y el micelio externo (me) f); ectomicorriza de *H. leucosarx* mostrando abundantes hifas emanantes (he) g) y micelio externo (me), manto (m) y red de Hartig (rH) h).

colorimétrica en un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian SpectraAA 220, Palo Alto, California, EE. UU.). Los micronutrientes Fe, Mn, Zn, Na y Cu fueron evaluados por absorción atómica, previa digestión con una mezcla de HNO₃ y HClO₄ en proporción 2:1.

Resultados

Altura, diámetro del tallo y peso seco

Independientemente de la especie de hongo utilizado en la inoculación, existió una mayor altura y diámetro del tallo en las plantas crecidas en el sustrato comercial con relación a aquellas crecidas en el sustrato experimental (figs. 1 c y d; tabla 1). Plantas de 24 meses de edad mostraron diferencias significativas en estas variables (Tukey $p \leq 0,05$) entre los dos tipos de sustratos para todos los tratamientos inoculados. Una tendencia similar se observó en las plantas no inoculadas. Adicionalmente, existió siempre mayor altura y diámetro del tallo en las plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas, independientemente del hongo ectomicorrízico empleado.

Se encontró mayor producción de biomasa aérea en plantas crecidas en el sustrato comercial en comparación con aquellas crecidas en el sustrato experimental, tanto en plantas inoculadas como no inoculadas. Estas diferencias fueron particularmente evidentes en plantas inoculadas con *H. leucosarx* y con *L. laccata*, tanto para la biomasa aérea como la biomasa total. Estas diferencias fueron menos evidentes en el caso de la biomasa radical, sobre todo en plantas crecidas en el sustrato experimental.

Hubo siempre mayor crecimiento en plantas inoculadas en comparación con aquellas no inoculadas, tanto en el sustrato comercial como en el sustrato experimental (tabla 1 y figs. 1 c y d).

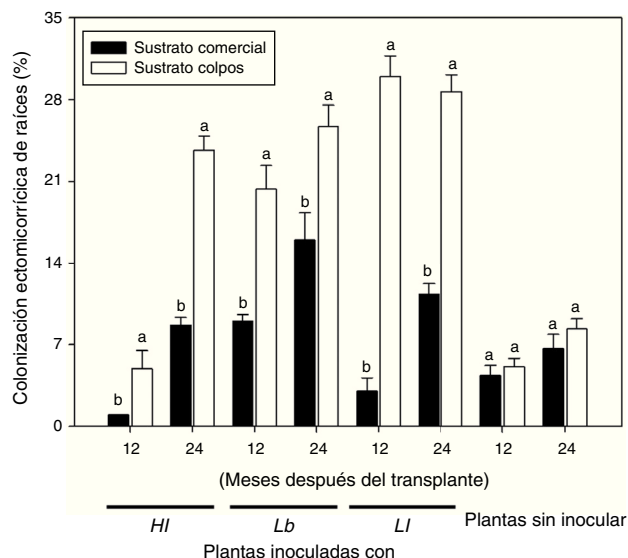


Figura 2 Porcentaje de colonización de plantas de *P. greggii* inoculadas con tres hongos comestibles ectomicorrízicos, a los 12 y 24 meses del trasplante a contenedores de 5 l. Hl=*H. leucosarx*; Lb=*L. bicolor* y Ll=*L. laccata*. Barras con la misma letra para cada fecha en cada tratamiento, son iguales de acuerdo con el test de Tukey ($p \leq 0,05$). Los valores son promedios \pm error estándar de la media ($n = 3$).

Colonización micorrízica

En general, existió mayor colonización ectomicorrízica (figs. 1e-h) en plantas inoculadas en comparación con plantas no inoculadas, independientemente del hongo empleado. Esto fue bien evidente 24 meses después del trasplante (figura 2). Un contraste se registró en el caso de plantas crecidas en el sustrato comercial, en las que de los tres hongos evaluados, solo *L. bicolor* presentó

Tabla 1 Peso seco de parte aérea y parte radical, altura y diámetro del tallo de *P. greggii*, de 24 meses de edad inoculado con tres hongos, crecido en dos sustratos

Tratamiento	Parte aérea (g)	Raíz (g)	Total (g)	Altura (cm)	Diámetro del tallo (mm)
Sustrato comercial					
Plantas inoculadas					
<i>H. leucosarx</i>	42,55 \pm 4,02 a	20,27 \pm 1,06 a	62,88 \pm 4,73 a	108,74 \pm 10,75 a	12,09 \pm 0,43 a
<i>L. bicolor</i>	41,39 \pm 1,26 b	14,93 \pm 0,23 b	56,32 \pm 1,49 b	100,50 \pm 3,88 a	13,30 \pm 2,19 a
<i>L. laccata</i>	42,59 \pm 2,64 a	11,73 \pm 2,13 b	54,37 \pm 3,09 b	90,00 \pm 6,54 a	10,85 \pm 0,27 a
Plantas sin inocular	3,55 \pm 0,70 c	3,20 \pm 3,14 c	6,75 \pm 3,80 c	61,33 \pm 7,53 b	7,22 \pm 0,64 b
Sustrato experimental					
Plantas inoculadas					
<i>H. leucosarx</i>	7,08 \pm 0,28 a	4,80 \pm 0,46 a	11,88 \pm 0,29 a	61,00 \pm 1,15 a	7,59 \pm 0,68 a
<i>L. bicolor</i>	6,95 \pm 0,28 a	3,73 \pm 0,26 a	10,69 \pm 0,16 a	56,33 \pm 5,23 a	7,12 \pm 0,47 a
<i>L. laccata</i>	6,74 \pm 0,85 a	4,80 \pm 0,46 a	11,54 \pm 1,27 a	57,00 \pm 7,03 a	7,65 \pm 1,18 a
Plantas sin inocular	2,13 \pm 0,26 b	2,13 \pm 0,27 b	4,26 \pm 0,52 b	30,66 \pm 5,81 b	4,08 \pm 0,34 b

Los datos son promedios \pm error estándar de la media, $n = 4$, valores con la misma letra en la misma columna, para cada tipo de sustrato, son iguales de acuerdo con Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabla 2 Contenido de macronutrientes de *P. greggii*, de 24 meses de edad, inoculado con tres hongos, crecidos en dos sustratos

Tratamientos	N	P	K	Ca	Mg
	(mg por planta)				
Sustrato experimental					
<i>Parte aérea</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	75,79 ± 3,09 a	7,79 ± 0,31 a	55,95 ± 2,28 a	375,4 ± 1,53 a	34,00 ± 1,38 a
Pi con <i>L. bicolor</i>	49,76 ± 2,01 b	8,35 ± 0,33 a	48,72 ± 1,96 a	29,23 ± 1,18 ab	16,70 ± 0,67 b
Pi con <i>L. laccata</i>	64,43 ± 8,18 ab	4,72 ± 0,59 b	42,05 ± 5,39 a	25,63 ± 3,25 b	14,84 ± 1,88 b
Psi	1,52 ± 0,10 c	0,20 ± 0,01 c	1,66 ± 0,11 b	0,69 ± 0,04 c	0,30 ± 0,02 c
<i>Raíz</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	22,08 ± 2,19 a	3,36 ± 0,32 a	11,52 ± 1,10 b	18,72 ± 1,80 a	15,84 ± 1,52 a
Pi con <i>L. bicolor</i>	29,49 ± 2,10 a	3,36 ± 0,24 a	19,41 ± 1,38 a	16,42 ± 1,17 a	15,30 ± 1,09 a
Pi con <i>L. laccata</i>	28,32 ± 2,27 a	3,36 ± 0,32 a	18,24 ± 1,75 a	18,72 ± 1,80 a	18,24 ± 1,76 a
Psi	13,55 ± 1,69 b	1,06 ± 0,13 b	12,16 ± 1,52 b	6,61 ± 0,83 b	0,66 ± 0,81 b
<i>Total</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	97,89 ± 1,92 a	11,15 ± 0,20 a	67,47 ± 1,57 a	56,26 ± 1,11 a	49,84 ± 0,95 a
Pi con <i>L. bicolor</i>	79,25 ± 1,24 a	11,71 ± 0,19 a	68,13 ± 1,15 a	45,95 ± 0,70 a	32,01 ± 0,66 b
Pi con <i>L. laccata</i>	92,75 ± 10,62 a	8,08 ± 0,89 b	60,74 ± 6,96 a	44,35 ± 4,89 a	33,08 ± 3,51 b
Psi	15,07 ± 1,74 b	1,25 ± 0,14 c	13,83 ± 1,57 b	7,30 ± 0,85 b	0,96 ± 0,09 c
Sustrato comercial					
<i>Parte aérea</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	658,58 ± 114,97ab	43,06 ± 7,51 b	218,92 ± 38,21 b	136,38 ± 23,80 ab	89,72 ± 15,66 a
Pi con <i>L. bicolor</i>	46,39 ± 22,36 b	36,96 ± 0,26 b	242,94 ± 11,62 b	89,78 ± 4,29 b	55,45 ± 2,65 a
Pi con <i>L. laccata</i>	785,90 ± 48,83 a	68,15 ± 4,23 a	455,78 ± 28,31 a	161,86 ± 10,05 a	89,45 ± 5,55 a
Psi	52,08 ± 11,58 c	5,57 ± 1,22 c	26,10 ± 5,72 c	9,68 ± 2,14 c	6,16 ± 1,35 b
<i>Raíz</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	293,86 ± 15,46 a	20,26 ± 1,06 b	62,82 ± 3,30 a	143,89 ± 7,57 a	204,69 ± 10,77 a
Pi con <i>L. bicolor</i>	174,72 ± 12,48 b	16,42 ± 0,00 b	41,81 ± 2,98 b	97,06 ± 6,93 b	150,82 ± 10,77 b
Pi con <i>L. laccata</i>	137,28 ± 24,96 b	93,88 ± 17,06a	28,16 ± 5,12 c	88,00 ± 16,00 b	92,69 ± 16,85 c
Psi	38,04 ± 0,00 c	5,44 ± 0,00 b	11,2 ± 0,00 d	15,36 ± 0,00 c	28,8 ± 0,00 d
<i>Total</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	359,44 ± 129,26 a	63,32 ± 8,50 b	281,74 ± 41,26b	280,27 ± 30,88 a	294,41 ± 25,88 a
Pi con <i>L. bicolor</i>	221,11 ± 10,04 a	53,38 ± 0,26 c	284,75 ± 8,66 b	186,84 ± 2,69 b	206,27 ± 8,13 b
Pi con <i>L. laccata</i>	923,18 ± 72,78 a	162,03 ± 21,09a	483,94 ± 33,17a	249,86 ± 25,68 ab	182,13 ± 22,15 b
Psi	91,2 ± 11,58 b	11,01 ± 1,22 c	37,3 ± 5,72 c	25,04 ± 2,10 c	34,96 ± 1,35 c

Pi : plantas inoculadas; Psi : plantas sin inocular.

Los valores son promedios ± error estándar de la media, n = 3. Valores con la misma letra en la misma columna, para cada parte vegetal, en cada sustrato, son iguales de acuerdo con Tukey ($p \leq 0,05$).

mayor colonización (Tukey $p \leq 0,05$) en comparación con *L. laccata* y *H. leucosarx* (figura 2). Existió una mayor colonización en las plantas crecidas en el sustrato experimental comparadas con aquellas crecidas en el sustrato comercial. Los porcentajes de colonización ectomicorrícica alcanzaron hasta el 30% (figura 2).

Contenido de nutrientes

Macronutrientes. En general se observó mayor contenido de macronutrientes tanto en la parte aérea como radicular en las plantas inoculadas a los 24 meses. Esta tendencia fue independiente, de la especie de hongo y del sustrato (tablas 2 y 3). El contenido de macro- y micronutrientes fue generalmente mayor cuando las plantas fueron crecidas en el

sustrato comercial en comparación con plantas crecidas en el sustrato experimental (tablas 2 y 3).

En las plantas crecidas en el sustrato experimental se observaron diferentes tendencias en el contenido de macronutrientes dependiendo de las especies de hongos ectomicorrícicos utilizados, de la parte de la planta analizada, y del macronutriente evaluado. En la parte aérea, el contenido de todos los macronutrientes excepto el K fue mayor en las plantas inoculadas con *H. leucosarx* que en las inoculadas con *L. bicolor* o *L. laccata*. Contrariamente, el contenido de macronutrientes no varió en la raíz de plantas inoculadas, excepto el K, cuyo contenido fue menor en plantas inoculadas con *H. leucosarx* en comparación con plantas inoculadas con *L. bicolor* o *L. laccata*.

En lo concerniente a macronutrientes totales, se observaron diferencias en el contenido de Mg en plantas inoculadas

Tabla 3 Contenido de micronutrientes de *P. greggii*, de 24 meses de edad inoculado con tres hongos, crecido en dos sustratos

Tratamientos	Na	Fe	Cu	Zn	Mn
(µg por planta)					
Sustrato experimental					
<i>Parte aérea</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	2,01 ± 0,08 a	1.055,41 ± 43,13 a	14,16 ± 0,57 a	1.870 ± 76,42 a	5.100,00 ± 208,44 a
Pi con <i>L. bicolor</i>	0,41 ± 0,016a	692,52 ± 27,97 b	6,96 ± 0,28 b	288,84 ± 11,66 b	3.908,04 ± 157,85ab
Pi con <i>L. laccata</i>	2,32 ± 0,29 a	576,84 ± 73,24 b	16,86 ± 2,14 a	209,16 ± 26,55bc	3.440,08 ± 436,90b
Psi	0,05 ± 0,03 c	17,25 ± 1,15 c	0,09 ± 0,06 c	8,04 ± 0,56 c	33,45 ± 2,23c
<i>Raíz</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	0,96 ± 0,09 a	18.712,08 ± 1.800,64 a	140,4 ± 1,38 c	1.471,02 ± 141,56 a	1.392,00 ± 133,94 b
Pi con <i>L. bicolor</i>	1,21 ± 0,08 a	14.897,86 ± 1.064,13ab	44,08 ± 3,20 a	190,04 ± 13,60 b	5.249,06 ± 374,93 a
Pi con <i>L. laccata</i>	0,40 ± 0,39 a	12.336,00 ± 1.187,03b	28,08 ± 2,77 b	156,00 ± 15,01b	1.116,00 ± 107,38 bc
Psi	0,67 ± 0,08 a	3.749,33 ± 468,66c	6,04 ± 0,26 d	89,06 ± 11,2 b	233,06 ± 29,2 c
<i>Total</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	2,97 ± 0,05 a	19.768,21 ± 1.766,85 a	28,56 ± 0,99 b	3.341,02 ± 94,00a	6.492,00 ± 131,91b
Pi con <i>L. bicolor</i>	1,62 ± 0,07 b	15.590,38 ± 1.041,37ab	51,76 ± 2,97 a	479,24 ± 7,83b	9.157,01 ± 262,01a
Pi con <i>L. laccata</i>	2,73 ± 0,35 a	12.912,84 ± 1.251,00 b	45,66 ± 4,74 a	365,14 ± 40,26b	4.556,08 ± 532,61c
Psi	0,67 ± 0,08 c	3.766,25 ± 469,24 c	7,03 ± 0,30 c	98,00 ± 11,49 c	266,51 ± 30,37 d
Sustrato comercial					
<i>Parte aérea</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	1,25 ± 0,21b	1.920,11 ± 335,20b	143,56 ± 25,06a	1.686,83 ± 294,48ab	8.344,42 ± 1.456,73b
Pi con <i>L. bicolor</i>	4,35 ± 0,20 a	1.175,09 ± 56,23b	66,01 ± 3,15b	1.082,67 ± 51,81b	4.898,43 ± 234,40b
Pi con <i>L. laccata</i>	1,49 ± 0,09b	40.019,56 ± 2.486,59 a	191,68 ± 11,91 a	1.916,85 ± 119,10 a	12.885,49 ± 800,63a
Psi	0,11 ± 0,02c	280,13 ± 61,48b	3,153 ± 0,69c	136,4 ± 29,93c	912,26 ± 200,22c
<i>Raíz</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	2,02 ± 0,10b	39.763,02 ± 20.292,08b	618,13 ± 32,53 a	1317,33 ± 69,33 a	1.742,93 ± 91,73 a
Pi con <i>L. bicolor</i>	2,53 ± 0,18 a	54.499,02 ± 3.892,08a	433,06 ± 30,93b	978,13 ± 69,86 a	1.351,46 ± 96,53 a
Pi con <i>L. laccata</i>	0,70 ± 0,12c	20.146,13 ± 3,66c	410,66 ± 74,66b	198,76 ± 191,02b	932,08 ± 169,09b
Psi	0,88 ± 7,85c	14.808,00 ± 0,00d	84,08 ± 0,00c	291,02 ± 0,00b	307,02 ± 0,00c
<i>Total</i>					
Pi con <i>H. leucosarx</i>	3,28 ± 0,31b	41.683,31 ± 2.403,18b	761,69 ± 56,37 a	3.004,16 ± 358,98 a	10.087,35 ± 1.541,07ab
Pi con <i>L. bicolor</i>	6,89 ± 0,03a	55.674,29 ± 3.836,88ab	499,08 ± 27,79b	2.060,80 ± 19,13b	6.249,09 ± 138,78b
Pi con <i>L. laccata</i>	2,19 ± 0,21c	60.165,70 ± 6.059,29 a	602,35 ± 85,95ab	2.115,61 ± 126,3ab	13.818,29 ± 961,73 a
Psi	0,99 ± 0,02d	15.088,13 ± 61,48c	87,95 ± 0,69c	427,06 ± 29,93c	1219,46 ± 200,22c

Pi : plantas inoculadas; Psi : plantas sin inocular.

Los valores son promedios ± error estándar de la media, n=3. Valores con la misma letra en la misma columna, para cada parte vegetal, son iguales de acuerdo con Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabla 4 Relaciones parte aérea: raíz de macro- y micronutrientes de *P. greggii*, de 24 meses de edad inoculado con tres hongos, crecido en dos sustratos

Tratamientos	N	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Cu	Zn	Mn
<i>Sustrato experimental</i>										
Pi con <i>H. leucosarx</i>	3,43	2,31	4,85	2,00	2,14	2,09	0,05	0,10	1,27	3,66
Pi con <i>L. laccata</i>	1,68	2,48	2,53	2,51	1,09	0,33	0,04	0,15	1,51	0,74
Pi con <i>L. bicolor</i>	2,27	1,40	2,30	1,36	0,81	5,08	0,04	0,60	1,34	3,08
Psi	0,11	0,18	0,13	0,10	0,45	0,07	0,004	1,49	0,09	0,14
Pi con <i>H. leucosarx</i> :Psi	31,18	12,83	37,31	20,0	4,74	29,86	12,5	0,07	14,11	26,14
Pi con <i>L. laccata</i> :Psi	0,74	13,78	19,46	25,1	2,42	4,71	10,0	0,10	16,78	5,29
Pi con <i>L. bicolor</i> :Psi	20,64	7,78	17,69	13,60	1,80	82,86	10,0	0,40	14,89	22,00
<i>Sustrato comercial</i>										
Pi con <i>H. leucosarx</i>	0,22	2,12	3,48	0,94	0,43	0,61	0,04	0,23	12,28	4,74
Pi con <i>L. laccata</i>	0,24	2,25	5,81	0,92	0,36	1,71	0,02	0,15	1,10	3,62
Pi con <i>L. bicolor</i>	5,72	0,72	16,18	1,83	0,96	2,12	1,98	0,46	9,64	13,82
Psi	1,36	1,02	2,33	0,63	0,21	0,12	0,01	0,03	0,46	2,97
Pi con <i>H. leucosarx</i> :Psi	0,16	2,08	1,49	1,49	2,05	5,08	4,00	7,67	26,70	1,60
Pi con <i>L. laccata</i> :Psi	0,18	2,21	2,49	1,49	1,71	14,25	2,00	5,00	2,39	1,22
Pi con <i>L. bicolor</i> :Psi	4,21	0,71	6,94	2,90	4,47	17,67	198	15,33	20,96	4,65

Pi : plantas inoculadas; Psi : plantas sin inocular.

Los valores son promedios \pm error estándar de la media, n = 3. Valores con la misma letra en la misma columna, para cada parte vegetal, son iguales de acuerdo con Tukey ($p \leq 0,05$).

con *H. leucosarx* en comparación con plantas inoculadas con *L. bicolor* o *L. laccata* (tabla 2). No existieron diferencias en el contenido total de N, K y Ca entre plantas inoculadas con diferentes hongos crecidas en sustrato experimental.

El contenido de macronutrientes de las plantas crecidas en el sustrato comercial mostró una tendencia distinta a aquellas crecidas en el sustrato experimental. El contenido de macronutrientes en la parte aérea en este caso fue mayor en plantas inoculadas con *L. laccata* en comparación con plantas inoculadas con *L. bicolor* y *H. leucosarx*, excepto el Mg. El mayor contenido de macronutrientes en la raíz de plantas crecidas en el sustrato comercial se registró en aquellas inoculadas con *H. leucosarx*, pero el contenido más alto de P no se registró en estas plantas, sino en las inoculadas con *L. laccata*.

No se observaron diferencias entre plantas inoculadas con diferentes hongos en el contenido de N. Las plantas inoculadas con *L. laccata* presentaron los mayores contenidos de P y K en comparación con plantas inoculadas con los otros dos hongos, y las plantas inoculadas con *H. leucosarx* presentaron mayor contenido de Mg que plantas inoculadas con *L. bicolor* o *L. laccata* (tabla 2).

Micronutrientes. En la parte aérea de plantas crecidas en el sustrato experimental, el contenido de Fe y Zn fue mayor cuando fueron inoculadas con *H. leucosarx*, en comparación con las plantas inoculadas con alguno de los otros dos hongos y con plantas no inoculadas. El mayor contenido de Cu y Zn de la raíz se registró en plantas inoculadas con *H. leucosarx*. Se observó una mayor cantidad total de Zn en plantas inoculadas con *H. leucosarx* comparadas con plantas inoculadas con *L. bicolor* o *L. laccata*, y un mayor contenido de Mn en plantas inoculadas con *L. bicolor* en comparación con plantas inoculadas con cualquiera de los otros dos hongos y con plantas no inoculadas.

En las plantas crecidas en el sustrato comercial se observó una tendencia similar a la registrada en las plantas crecidas en el sustrato experimental. El contenido de Fe y Mn en la parte aérea fue mayor en plantas inoculadas con *L. laccata* en comparación con plantas inoculadas con *L. bicolor* y *H. leucosarx*. El mayor contenido de Na y Fe se observó en plantas inoculadas con *L. bicolor* y la mayor cantidad de Cu se registró en plantas inoculadas con *H. leucosarx* en comparación con plantas inoculadas con *L. laccata*, *L. bicolor* o con el testigo sin inocular. Se observó mayor contenido total de Na en plantas inoculadas con *L. bicolor* en comparación con plantas inoculadas con *L. laccata* o *H. leucosarx*.

Relaciones de nutrientes parte aérea: raíz

El análisis de las relaciones del contenido de nutrientes entre la parte aérea y la raíz nos permite comparar plantas inoculadas versus plantas no inoculadas y conocer así la eficiencia de translocación de nutrientes medida por los hongos ectomicorrízicos, no solo a la raíz, sino también a la parte aérea. Según estas relaciones, en el caso de translocación de macronutrientes en plantas crecidas en el sustrato experimental las proporciones fueron mayores que las observadas en plantas crecidas en sustrato comercial (tabla 4). Adicionalmente, existieron claras diferencias en la transferencia nutricional a la parte aérea de los pinos inoculados con las distintas especies fúngicas. Las mayores translocaciones de macronutrientes a la parte aérea se observaron en plantas inoculadas con *H. leucosarx*, las cuales translocaron principalmente N, K y Mg cuando las plantas fueron crecidas en sustrato experimental. *L. laccata* translocó principalmente Ca en dicho sustrato. Una tendencia similar se observó en el caso de algunos micronutrientes como Na con *L. bicolor*, y Mn con *H. leucosarx*, en el sustrato experimental (tabla 4).

Discusión

En el presente trabajo se registró un efecto favorable en el crecimiento y contenido nutricional de la especie neotropical *P. greggii* cuando se realizó la micorrización controlada con cualquiera de las dos especies de *Laccaria* empleadas y con *H. leucosarx*. Estos resultados muestran el gran potencial que podría tener el inóculo esporal estas tres especies en la producción de plantas micorrizadas de *P. greggii*.

El hecho de que las especies de hongos aquí estudiados son ampliamente comercializadas en el centro de México^{10,44} simplifica la producción de inóculo esporal con los métodos empleados en este estudio, ya que es fácil conseguir estos hongos en los mercados locales. El efecto favorable en términos de crecimiento y contenido nutricional como consecuencia de la inoculación con especies de los géneros *Laccaria* y *Hebeloma* en otras gimnospermas, principalmente de distribución boreal y templada, ha sido documentado previamente en *Pinus pinaster* inoculado con *L. laccata*⁴¹; *Pseudotsuga menziesii*^{37,39,40}, *Pinus pinea*^{39,47}, *P. pinaster*^{39,40,42} y *Pinus sylvestris*¹³ inoculadas con *L. bicolor*; y en *Pinus pseudostrabus* inoculado con *Hebeloma mesophaeum*, *L. bicolor* y *L. laccata*⁹.

La importancia de la inoculación ectomicorrícica como un factor en la producción de plantas de interés forestal, para el incremento del contenido de macro- y micronutrientes, ha sido ampliamente documentada¹¹. Se han informado incrementos en el contenido de macronutrientes (N, P, K y Mg) como consecuencia de la inoculación ectomicorrícica^{1,4,14,19,67}. Los estudios referidos a los micronutrientes son más escasos; sin embargo, se ha documentado la transferencia de Fe y Zn como consecuencia de la inoculación ectomicorrícica^{6,51}.

En el presente trabajo se comprobó la transferencia de Ca, Na y Mn en plantas de *P. greggii* inoculadas con *L. laccata*, *L. bicolor* y *H. leucosarx*, respectivamente. Después de 24 meses, las colonizaciones ectomicorrícicas fueron bajas en comparación con registros previos^{9,30,44}. En plantas crecidas en el sustrato comercial (con adición de Osmocote®), las colonizaciones fueron de hasta 15%. Se observaron mayores colonizaciones, de hasta 30%, en plantas inoculadas crecidas en el sustrato experimental.

Se han documentado niveles de colonización similares a los encontrados en el presente estudio con la inoculación de diversas especies de hongos ectomicorrícicos. Trocha et al.⁶³ informaron una colonización de 18 a 22% en raíces de *Betula pendula* con *H. mesophaeum*, en tanto que Rincón et al.⁴⁸ registraron un 34% de micorrización por *L. laccata* en *P. pinea*. Por su parte, Jonsson et al.²⁵ reportaron colonizaciones de 0 a 2,8% en *P. sylvestris* inoculado con *Cenococcum geophilum*. Barroetaveña et al.³ reportaron colonizaciones de 11,4, 34,9 y 38,4% al inocular *Pinus ponderosa* con *H. mesophaeum*, *Rhizopogon roseolus* y *Suillus luteus*, respectivamente. Sin embargo, también se documentaron niveles de colonización superiores. Jonsson et al.²⁵ registraron colonizaciones de 55 a 78% y de 95 a 99% en *P. sylvestris* inoculados con *Hebeloma crustuliniforme* y *L. bicolor*, respectivamente. Rincón et al.⁴⁸ reportaron una colonización de 81,3% en *P. pinea* inoculado con *Rhizopogon roseolus*, mientras que Parladé et al.³⁸ observaron colonizaciones de 50 a 80%, 84 y 90% por *Tuber maculatum*, *Scleroderma*

citrinum y *R. roseolus* en *P. pinaster*, y Duñabeitia et al.¹⁵ comunicaron un porcentaje de colonización de 50 a 80% por *R. roseolus* en *Pinus radiata*.

La composición del sustrato puede influir en la colonización micorrícica. Al respecto, Rincón et al.⁴⁸ encontraron que los porcentajes de colonización de diversos hongos ectomicorrícicos en plantas de *P. pinea* crecidas en turba y corteza fueron significativamente menores en comparación con plantas crecidas en turba y vermiculita. Estos autores reportaron reducciones significativas en la micorrización de pinos inoculados con *Melanogaster ambiguus*, *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma verrucosum*, las que pasaron de 30,9, 58 y 65,7%, respectivamente, a 0% en todos los casos como consecuencia del tipo de sustrato.

En el presente trabajo, se constató que las plantas crecidas en el sustrato con fertilizante de liberación lenta presentaron en general mayor biomasa aérea y radical, así como mayor contenido de macro- y micronutrientes en comparación con las plantas crecidas en el sustrato experimental, pero su colonización ectomicorrícica fue significativamente menor. Molina y Trappe³² informaron que la adición del fertilizante de liberación lenta Osmocote® originó reducciones en la colonización ectomicorrícica de *P. menziesii* inoculada con esporas de *Rhizopogon vinicolor* y *Rhizopogon colossus*. También se registraron reducciones moderadas (de 100 a 81%) en los porcentajes de colonización por *P. tinctorius* en *Populus tremuloides* con la aplicación de Osmocote®, en relación con plantas no fertilizadas²⁸.

Diversas publicaciones dan cuenta de que la fertilización química en términos generales, reduce la colonización de diversos hongos ectomicorrícicos^{25,35,52,58,64}. Sin embargo, Mason et al.³¹ reportaron que la reducción de la colonización ectomicorrícica de *Hydnangeum carneum* y *Laccaria fraterna* en *Eucalyptus globulus* depende principalmente de las dosis de fertilización fosfatada, más que de la fertilización nitrogenada. Estos autores encontraron que altas dosis de fertilización con P originaron reducciones en la colonización ectomicorrícica, independientemente de la fertilización nitrogenada, lo cual deja en claro la importancia de la interacción entre nutrientes minerales disponibles en la solución del suelo. Rincón et al.⁴⁹ encontraron que la fuente de fertilización, incluyendo fertilizantes de liberación lenta o solubles, fue un factor que afectó diferencialmente la colonización ectomicorrícica de *P. tinctorius* y *M. ambiguus* en *P. pinea*, una especie de pino mediterráneo. Sin embargo, existen también estudios en los que la fertilización no fue un factor que no modificara los porcentajes de colonización ectomicorrícica, por ejemplo, los de *R. roseolus* en *P. ponderosa*²⁹ y los de *Hebeloma longicaudum*, *L. bicolor*, *Paxillus involutus*, y *P. tinctorius* en diferentes especies de *Pinus*, *Picea* y *Larix*²⁷. Esto podría demostrar que otro factor implicado en la influencia de la fertilización en la colonización ectomicorrícica sería la combinación de micobiontes y fitobiontes, dado que es poco probable que todas las combinaciones ectomicorrícicas presenten las mismas respuestas a la fertilización química.

Se ha demostrado previamente que la influencia de la fertilización en la colonización ectomicorrícica puede estar influenciada por diversos factores, dentro de los que se incluyen los siguientes: 1) las diferentes combinaciones de micobiontes-fitobiontes; 2) la interacción entre nutrientes,

por ejemplo, relaciones N-P; y 3) las fuentes de fertilización, ya sean fertilizantes de liberaciones lentas o solubles. Asimismo, la frecuencia incrementada de fertilización puede modificar la estructura de las comunidades ectomicorrícicas presentes, dado que, por ejemplo, existen especies nitrofilicas que toleran altas tasas de fertilización, o que resultan beneficiadas con dicha práctica, tal es el caso de *Thelephora terrestris*, *Hebeloma* spp. y *C. geophilum*^{18,62}. Ciertas especies como *Piloderma* spp. pueden resultar no afectadas, mientras que otras pueden ser más sensibles y reducir su abundancia relativa bajo dicha fertilización, como *Suillus* spp. y *Cortinarius* spp.²⁴.

En el presente trabajo, se observó una reducción significativa en la colonización de las tres especies fúngicas en presencia del fertilizante de liberación lenta Osmocote®. La importancia de este hecho es que si las plantas crecidas en el sustrato comercial con el fertilizante químico Osmocote® son luego trasplantadas a áreas deforestadas, que carecen de propágulos ectomicorrícicos, a pesar de su mayor biomasa sus posibilidades de supervivencia serían más reducidas en comparación con las de aquellas plantas con menor biomasa crecidas en ausencia de Osmocote®, las cuales, por sus mayores porcentajes de colonización, tendrían mayores posibilidades de sobrevivir al ser trasplantadas a condiciones de campo. Como ya se ha demostrado la colonización ectomicorrícica es un factor crucial en la supervivencia de pinos al ser llevados de vivero a campo⁵⁶.

En conclusión, las plantas del árbol neotropical *P. greggii* inoculadas con *L. laccata*, *L. bicolor* y *H. leucosarx* presentaron mayor altura, mayor diámetro del tallo y mayor biomasa aérea y radical en comparación con plantas no inoculadas, independientemente del sustrato de crecimiento. Una tendencia similar se observó en el contenido de macronutrientes, principalmente de N, K y Ca, y de micronutrientes, principalmente Na, Zn y Mn. A pesar de que las plantas crecidas en el sustrato comercial presentaron mayor biomasa aérea y radical, así como mayor contenido nutricional, tuvieron una colonización ectomicorrícica menor. Plantas crecidas en el sustrato experimental presentaron una mayor transferencia nutricional a la parte aérea, principalmente de N, P, Ca, K, Na y Mg, en comparación con las plantas crecidas en el sustrato comercial.

Los resultados de este estudio demuestran que las tres especies de hongos comestibles ectomicorrícicos evaluados, especies ampliamente comercializadas en el centro de México, constituyen una importante fuente potencial de inóculo ectomicorrícico para la producción de plantas de *P. greggii*, un pino nativo de Mesoamérica con gran potencial en el establecimiento de plantaciones y reforestaciones en áreas tropicales y subtropicales.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo financiero del proyecto CONACyT 246674.

Bibliografía

- Ahangar MA, Dar HG, Bhat ZA. Growth response and nutrient uptake of blue pine (*Pinus walllichiana*) seedlings inoculated with rhizosphere microorganisms under temperate nursery conditions. *Ann For Sci.* 2012;55:217–27.
- Allen SE, Grimshaw HM, Parkinson JA, Quarmby C. *Chemical analysis of ecological materials.* Oxford, UK Blackwell: Scientific Publications; 1997. p. 206.
- Barroetaña C, Bassani NV, Rajchenberg M. Inoculación micorrícica de *Pinus ponderosa* en la Patagonia Argentina: colonización de las raíces, descripción de morfotipos y crecimientos de las plántulas en vivero. *Bosque.* 2012;33:163–9.
- Becquer A, Trap J, Irshad U, Ali MA, Plassard C. From soil to plant, the journey of P through trophic relationships and ectomycorrhizal association. *Front Plant Sci.* 2014;5, artículo 548:1-7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/eresources.shef.ac.uk/pmc/articles/PMC4197793/pdf/fpls-05-00548.pdf>
- Bremner JM. Total nitrogen. En: Black CA, editor. *Methods of soil analysis.* Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy; 1965. p. 1149–78.
- Bricking H, Heyser W. The effect of ectomycorrhizal fungi on Zn uptake and distribution in seedlings of *Pinus sylvestris* L. *Plant Soil.* 1994;167:203–12.
- Cairney JWG, Chambers SM. *Ectomycorrhizae fungi: key genera in profile.* Berlin, Germany: Springer; 1999. p. 89.
- Carrasco-Hernández V, Pérez-Moreno J, Espinosa-Hernández V, Almaraz Suárez JJ, Quintero Lizaola R, Torres Aquino M. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Rev Mec Cienc Agric.* 2010;1:567–77.
- Carrasco-Hernández V, Pérez-Moreno J, Espinosa-Hernández V, Almaraz-Suárez JJ, Quintero-Lizaola R, Torres-Aquino M. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrícicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 2011;84:83–96.
- Carrasco-Hernández V, Pérez-Moreno J, Quintero-Lizaola R, Espinosa-Solares T, Lorenzana-Fernández A, Espinosa HV. Edible species of the fungal genus *Hebeloma* and two Neotropical pines. *Pak J Bot.* 2015;47:319–26.
- Castrillon M, Leon JD, Carvajal D, Osorio NW. Effectiveness of single and combined ectomycorrhizal inocula on three species of *Pinus* at nursery. *Commun Soil Sci Plant Anal.* 2015;46:169–79.
- Chávez MD, Pereira CG, Machuca H. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. *Bosque.* 2009;30:4–9.
- Christophe C, Turpault M, Uroz S, Leclerc E, Kies A, Frey-Klett P. *Laccaria bicolor* S238 N improves Scots pine mineral nutrition by increasing root nutrient uptake from soil minerals but does not increase mineral weathering. *Plant Soil.* 2010;328:145–54.

14. Diaz G, Carrillo C, Honrubia M. Mycorrhization, growth and nutrition of *Pinus halepensis* seedlings fertilized with different doses and sources of nitrogen. *Ann For Sci.* 2010;67:405.
15. Duñabeitia MK, Hormilla S, Garcia-Plazaola J, Txarterina K, Arteche U, Becerril JM. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza.* 2004;14:11–8.
16. Dvorak WS, Kietzka JE, Donahue JK. Three-year survival and growth of provenances of *Pinus greggii* in the tropics and subtropics. *For Ecol Manage.* 1996;83:123–31.
17. Fernández VM, Barroetaveña C, Bassani V, Ríos F. Rentabilidad del aprovechamiento del hongo comestible *Suillus luteus* para productores forestales y para familias rurales de la zona cordillerana de la provincia del Chubut, Argentina. *Bosque.* 2012;33:43–52.
18. Fransson PMA, Taylor AFS, Finlay RD. Effects of continuous optimal fertilization on belowground ectomycorrhizal community structure in a Norway spruce forest. *Tree Physiol.* 2000;20:599–606.
19. Garcia K, Zimmermann DS. The role of mycorrhizal associations in plant potassium nutrition. *Front Plant Sci.* 2014;5:337, 1-9. [Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00337/full>].
20. Gómez-Romero M, Soto-Correa JC, Blanco-García JA, Sáenz-Romero C, Villegas J, Lindig-Cisneros R. Estudio de especies de pino para restauración de sitios degradados. *Agrociencia.* 2012;46:795–807.
21. Guerin-Laguette A, Conventi S, Plassard RC, Mousain D. The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of an rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza.* 2003;13:17–25.
22. Hodge GR, Dvorak WS. Growth potential and genetic parameters of four Mesoamerican pines planted in the Southern Hemisphere. *South For.* 2012;74:27–49.
23. Jamuna I, Singh MS, Pandey RR. Effect of chemical fertilizers on ectomycorrhiza formation and growth of *Pinus kesiya* seedlings inoculated with *Scleroderma verrucosum*. *The Indian Forester.* 2006;132:1195–9.
24. Jones DM, Phillips AL, Treu R, Ward V, Berch MS. Functional responses of ectomycorrhizal fungal communities to long-term fertilization of lodgepole pine (*Pinus contorta* Dougl. ex Loud. var. *latifolia* Engelm.) stands in central British Columbia. *Appl Soil Ecol.* 2012;60:29–40.
25. Jonsson LM, Nilsson DA, Zachrisson O. Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos.* 2001;93:353–64.
26. Kanzler A, Payn K, Nel A. Performance of two *Pinus patula* hybrids in southern Africa. *South For.* 2012;74:19–25.
27. Khasa PD, Sigler L, Chakravarty P, Dancik BP, Erickson L, Curdy MD. Effect of fertilization on growth and ectomycorrhizal development of container-grown and bare-root nursery conifer seedlings. *New Forests.* 2001;22:179–97.
28. Mahony CP. Effects of native ectomycorrhizal fungi on aspen seedlings in greenhouse studies. Master Thesis. Bozeman, MO, USA: Montana State University; 2005.
29. Martínez DB, Barroetaveña C, Rajchenberg M. Influencia del régimen de fertilización y del momento de inoculación en la micorrización de *Pinus ponderosa* en la etapa de vivero. *Bosque.* 2007;28:226–33.
30. Martínez-Reyes M, Pérez-Moreno J, Villareal-Ruiz L, Ferrera-Cerrato R, Xoconostle-Cázares B, Vargas-Hernández J, Honrubia-García M. Crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. *Rev Chapingo ser cienc for ambient.* 2012;18:183–92.
31. Mason PA, Ibrahim K, Ingleby K, Munro RC, Wilson J. Mycorrhizal development and growth of inoculated *Eucalyptus globulus* (Labill.) seedlings in wet and dry conditions in the glasshouse. *For. Ecol. Manag.* 2000;128:269–77.
32. Molina R, Trappe J. Mycorrhiza management in bareroot nurseries. En: Duryea ML, Landis TD, editores. *Forest nursery manual: Production of bareroot seedlings.* The Hague: Martinus Nijhoff, Junk Publishers; 1984. p. 211–23.
33. Mueller GM. Numerical taxonomic analyses on *Laccaria* (Agaricales). *Mycologia.* 1985;77:121–9.
34. Obase K, Tamai Y, Yajima T, Miyamoto T. Mycorrhizal associations in woody plant species at the Mt. Usu volcano, Japan. *Mycorrhiza.* 2007;17:209–15.
35. Oliveira RS, Franco RA, Vosátka M, Castro LMP. Management of nursery practices for efficient ectomycorrhizal fungi application in the production of *Quercus ilex*. *Symbiosis.* 2010;52:125–31.
36. Oliveira RS, Franco AR, Castro PML. Combined use of *Pinus pinaster* plus and inoculation with selected ectomycorrhizal fungi as an ecotechnology to improve plant performance. *Ecol. Eng.* 2012;43:95–103.
37. Parladé J, Álvarez IF. Inoculation of aseptically grown Douglas fir with pairs of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 1993;3:93–6.
38. Parladé J, Pera J, Alvarez IF. Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 1996;6:237–45.
39. Parladé J, Pera J, Álvarez IF. The mycorrhization controlée du Douglas dans le nord de l'Espagne: Premières résultats en plantation. *Revue Forestière Française.* 1997;49:163–73.
40. Parladé J, Álvarez IF, Pera J. Coinoculation of containerized Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings with the ectomycorrhizal fungi *L. bicolor* and *Rhizopogon* spp. *Mycorrhiza.* 1999;8:189–95.
41. Pera J, Parladé J. Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria: Sist. Rec. For.* 2005;14:419–33.
42. Perrin R, Pera J, Parladé X. Réceptivité des sols forestiers à l'association ectomycorhizienne. *Acta Bot. Gallica.* 1994;141:541–5.
43. Pereira G, Chávez D, Machuca A, Martínez SL, Honrubia M. Trufas. Alternativa de cultivo para agroforestadores de la provincia del Bío Bío. Chile: Universidad de Concepción; 2010. p. 46.
44. Pérez-Moreno J, Lorenzana-Fernández A, Carrasco-Hernández V, Yescas-Pérez A. Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos. Montecillo, Texcoco, Estado de México: Colegio Postgraduados, SEMARNAT, CONACYT; 2010. p.167.
45. Pérez-Moreno J, Martínez-Reyes M. Edible ectomycorrhizal mushrooms: Biofactories for sustainable development. En: Guevara-Gonzales R, Torres-Pacheco I, editores. *Biosystems engineering: Biofactories for food production in the century XXI.* Springer International Publishing; 2014. p. 151–233.
46. Read DJ, Pérez-Moreno J. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems a journey towards relevance. *New Phytol.* 2003;157:475–92.
47. Rincón A, Álvarez IF, Pera J. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 2001;11:265–71.
48. Rincón A, Parladé J, Pera J. Effects of ectomycorrhizal inoculation and the type of substrate on mycorrhization, growth and nutrition of containerised *Pinus pinea* L. seedlings produced in a commercial nursery. *Ann. For. Sci.* 2005;62:1–6.
49. Rincon A, Parladé J, Pera J. Influence of the fertilisation method in controlled ectomycorrhizal inoculation of two Mediterranean pines. *Ann. Sci.* 2007;64:577–83.
50. Rinaldi AC, Comandini O, Kuyper TW. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Divers.* 2008;33:1–45.

51. Rineau F, Pierre-Emmanuel C, Uroz S, Buée M, Garbaye J. Simple microplate assays to measure iron mobilization and oxalate secretion by ectomycorrhizal tree roots. *Soil Biol.* 2008;40:2460–3.
52. Ruehle LJ. Ectomycorrhizal colonization of container-grown northern red oak as affected by fertility. USDA Forest Service Research Note Southeastern 297:1-5 [consultado 20 Jun 2016]. Disponible en http://www.srs.fs.usda.gov/pubs/rn/rn_se297.pdf.
53. SAS. Statistical Analysis System Institute. SAS User's guide. Version 9. Cary, NC, USA: SAS Institute; 2002.
54. Salomón SM, Rajchenberg M, Barroetaveña C. Evaluación del estado micorrízico de plántulas de *Pinus ponderosa* producidas bajo fertirriego, sin manejo de la micorrización. *Bosque.* 2009;30:127–34.
55. Sánchez-Zabala J, Majada J, Martín-Rodríguez N, González-Murua C, Ortega U, Alonso-Graña M, Arana O, Duñabeitia KM. Physiological aspects underlying the improved outplanting performance of *Pinus pinaster* Ait. seedlings associated with ectomycorrhizal inoculation. *Mycorrhiza.* 2013;8:627–40.
56. Sánchez-Zabala J, Majada J, Martín-Rodríguez N, González-Murua C, Ortega U, Graña MA, Arana O, Duñabeitia KM. Physiological aspects underlying the improved outplanting performance of *Pinus pinaster* Ait. seedlings associated with ectomycorrhizal inoculation. *Mycorrhiza.* 2013;23:627–40.
57. Sousa RN, Franco RA, Oliveira SR, Castro MLP. Ectomycorrhizal fungi as an alternative to the use of chemical fertilisers in nursery production of *Pinus pinaster*. *J Environ Manage.* 2012;95:269–74.
58. Sun Y, Gu JC, Zhuang HF, Wang ZQ. Effects of ectomycorrhizal colonization and nitrogen fertilization on morphology of root tips in a *Larix gmelinii* plantation in northeastern China. *Ecol. Res.* 2010;25:295–302.
59. Smail SJ, Walbert K. Fertilizer and fungicide use increases the abundance of less beneficial ectomycorrhizal species in a seedling nursery. *Appl Soil Ecol.* 2013;65:60–4.
60. Smith SE, Read DJ. *Mycorrhizal symbiosis*. 3.ª ed. New York, USA: Academic Press; 2008. p. 349–85.
61. Teste PF, Lieffers JV, Strelkov ES. Ectomycorrhizal community responses to intensive forest management: thinning alters impacts of fertilization. *Plant Soil.* 2012;360:333–47.
62. Trocha KL, Rudawska M, Leski T, Dabert M. Genetic diversity of naturally established ectomycorrhizal fungi on Norway spruce seedlings under nursery conditions. *Microb Ecol.* 2006;52:418–25.
63. Trocha LK, Oleksyn J, Turzanska E, Rudawska M, Reich PB. Living on the edge: ecology of an incipient *Betula*-fungal community growing on brick walls. *Trees.* 2007;21:239–47.
64. Vaario LM, Tervonen A, Haukioja K, Haukioja M, Pennanen T, Timonen S. The effect of nursery substrate and fertilization on the growth and ectomycorrhizal status of containerized and outplanted seedlings of *Picea abies*. *Can J For Res.* 2009;39:64–75.
65. Valenzuela FE, Barría AD, Martínez AO, Godoy BR, Oyarzún BC. Influencia de la fertilización nitrogenada sobre la abundancia y diversidad de basidiocarpos Agaricales s.l. en un bosque templado de *Nothofagus obliqua*. *Bosque.* 2013;34:63–70.
66. Villegas-Jiménez D, Rodríguez-Ortiz G, Velasco-Velasco V, Ruiz-Luna J, Carrillo-Rodríguez J, Ramírez-Sánchez S. Partición de biomasa aérea en procedencias de *Pinus greggii* plantadas en el sur de México. *Rev Fitotec Mex.* 2013;36:421–7.
67. Walker RF, McLaughlin SB, West DC. Establishment of sweet birch on surface mine spoil as influenced by mycorrhizal inoculation and fertility. *Restoration Ecology.* 2004;12:8–19.
68. Walker JKM, Jones MD. Little evidence for niche partitioning among ectomycorrhizal fungi on spruce seedlings planted in decayed wood versus mineral soil microsites. *Oecologia.* 2013;173:1499–511.
69. Wyk G van. *Pinus greggii*. En: Burdon RD, editor. *Pines of silvicultural importance*. Forestry Compendium Global Module, CAB International. Nueva York: 2002. p. 144-5.
70. Zambonelli A, Bonito GM, editores). *Edible ectomycorrhizal mushrooms*. Current knowledge and future prospects. Berlin:Ed. Springer Verlag; 2012. p. 409.