

CRECIMIENTO Y CONTENIDO NUTRIMENTAL DE *Pinus greggii* Engelm. INOCULADO CON EL HONGO COMESTIBLE ECTOMICORRÍZICO *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél.

GROWTH AND NUTRIENT CONTENTS OF *Pinus greggii* Engelm. INOCULATED WITH THE EDIBLE ECTOMYCORRHIZAL MUSHROOM *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél.

Magdalena Martínez-Reyes¹; Jesús Pérez-Moreno^{1,2}¶; Luis Villarreal-Ruiz¹; Ronald Ferrera-Cerrato¹; Beatriz Xoconostle-Cázares³; J. Jesús Vargas-Hernández¹; Mario Honrubia-García⁴

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. km 36.5, Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. (¶Autor para correspondencia) Correos-e: jperezm@colpos.mx, jepemo@yahoo.com.mx.

²Animal and Plant Sciences Department, University of Sheffield, Sheffield S10, 2TN, ENGLAND, United Kingdom.

³Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional, Núm. 2508. San Pedro Zacatenco, C. P. 07360, México, D. F.

⁴Departamento de Biología Vegetal (Botánica), Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, C. P. 30100, Murcia, ESPAÑA.

RESUMEN

Se evaluó el crecimiento y contenido de macro y micronutrientes de *Pinus greggii* Engelm., cuando éste fue inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. Se tuvieron dos tratamientos: plantas inoculadas con *H. mesophaeum* y plantas sin inocular. Los resultados mostraron que tanto el peso seco de la parte aérea y de la raíz, altura y diámetro del tallo así como el contenido total de N, P, K, Ca y Mg, fueron mayores en las plantas inoculadas con respecto a las plantas no inoculadas. Los contenidos de P y Mg fueron, respectivamente, 6.7 y 6.9 veces mayor en la parte aérea de las plantas inoculadas que las no inoculadas. Adicionalmente, existió una eficiencia alta de *H. mesophaeum* para la traslocación de P, K y Mg a la parte aérea de las plantas. El porcentaje de micorrización fue alto (79.5 %), del cual, más de la mitad se observó en la parte media del cepellón. La inoculación con *H. mesophaeum* tiene entonces un gran potencial de uso en la producción de plantas de *P. greggii* en invernadero.

Recibido: 15 de noviembre, 2010
Aceptado: 2 de mayo, 2012
doi: 10.5154/r.rchscfa.2010.11.112
http://www.chapingo.mx/revistas

PALABRAS CLAVE: Macronutrientes, pinos, hongos silvestres comestibles, esporomas.

ABSTRACT

Growth and macro and micronutrient contents of *Pinus greggii* Engelm. inoculated with the edible ectomycorrhizal mushroom *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Quél. was evaluated. The experiment consisted of two treatments: plants inoculated with *H. mesophaeum* and non-inoculated plants. Results showed that shoot and root dry weight, shoot height, stem diameter, and total contents of N, P, K, Ca and Mg were higher in inoculated plants than in non-inoculated plants. P and Mg contents were 6.7 and 6.9 times respectively higher in the shoot of inoculated plants in comparison to non-inoculated plants. Additionally, *H. mesophaeum* originated a high translocation efficiency of P, K and Mg to the shoot. The percentage of mycorrhization was high (79.5 %); more than half of it being observed in the central part of the root ball in the plant containers. Therefore, inoculation with *H. mesophaeum* has a great potential to be used in the production of *P. greggii* plants under greenhouse conditions.

KEYWORDS: macronutrients, pines, edible wild mushrooms, sporomes.

INTRODUCCIÓN

La micorriza es una de las simbiosis de mayor importancia en la estructura y funcionamiento de los ambientes terrestres. Específicamente, las ectomicorrizas son un componente de calidad ecofisiológica para el mantenimiento de los bosques. Al incrementar el área de absorción de las raíces, los hongos ectomicorrízicos originan un efecto benéfico en las plantas asociadas, aumentando la absorción de nutrientes, principalmente N y P, en retribución, los hongos reciben carbono (C) de ellas (Read & Pérez-Moreno, 2003). Las ectomicorri-

INTRODUCTION

The mycorrhiza is one of the most important symbioses in the structure and functioning of terrestrial environments. Specifically, the ectomycorrhizae constitute a component of paramount ecophysiological importance in the maintenance of forests. By increasing the absorption area of roots, ectomycorrhizal mushrooms produce a beneficial effect in the associated plants, increasing the absorption of nutrients, mainly, N and P, and in return the mushrooms receive carbon (C) from the plants (Read & Pérez-Moreno, 2003). Ectomycorrhizae have

zas son de considerable interés, dado que algunos géneros de los grupos Basidiomycota y Ascomycota que las forman, producen hongos comestibles. Dichos hongos constituyen un recurso forestal no maderable, de enorme importancia a nivel internacional para la conservación forestal, ya que son una fuente alimenticia o una alternativa de ingreso económico para las comunidades locales. En el caso específico de México, se conocen más de 300 especies de hongos silvestres comestibles, de las cuales alrededor de 50 % establecen ectomicorrizas con árboles de importancia forestal (Boa, 2004; Sánchez, Pérez-Moreno, Mata, Salmones, & Leal-Lara, 2012).

Actualmente, la producción de inoculantes basados en hongos ectomicorrizicos ha cobrado una enorme importancia en los países con tradición forestal. En países como México, esta biotecnología ha recibido escasa atención, a pesar de su enorme potencial. Por tal motivo, es necesaria la generación de conocimientos vinculados con la utilización de hongos ectomicorrizicos nativos, con plantas de interés forestal. *Pinus greggii* Engelm es una especie forestal de gran importancia en los programas de reforestación del país (Ramírez-Herrera, Vargas, & López-Upton, 2005). Por su parte, *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. es un hongo ectomicorrizico que tiene una gran importancia como especie comestible en diversas partes del centro de México (Pérez-Moreno, Martínez-Reyes, Yescas-Pérez, Delgado-Alvarado, & Xoconostle-Cázares, 2008). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el crecimiento, la colonización radical, y contenido de N, P, K, Ca y Mg, en la raíz y parte aérea de *P. greggii*, cuando éste fue inoculado con el hongo comestible ectomicorrizico *H. mesophaeum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal e inóculo

El presente estudio se efectuó en el laboratorio de Micorrizas y en el invernadero de Edafología del Colegio de Postgraduados, en Montecillo, Estado de México. Las semillas utilizadas de *P. greggii* fueron esterilizadas antes de la siembra con H₂O₂ al 30 % durante 20 minutos. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Los esporomas utilizados para el inóculo procedían de hongos adquiridos en el mercado de Ozumba, Estado de México (Figura 1a). El inóculo se obtuvo a partir de los píleos de *H. mesophaeum*, los cuales se cortaron de los estípites, se deshidrataron a 35 °C y se molieron. Posteriormente, el inóculo se tamizó a través de una malla de 1.19 mm de diámetro de abertura, para homogeneizar el tamaño de las partículas. El inóculo así obtenido se almacenó a 5 °C.

an additional importance because some genera of the Basidiomycota and Ascomycota groups which are involved in these symbioses, produce edible mushrooms. These mushrooms are a non-timber forest resource of enormous international importance for forest conservation, because they are either a source of food or an alternative economic income for local communities. In the specific case of Mexico, more than 300 species of wild edible mushrooms are known, of which about 50 % establish ectomycorrhizae with trees of economic importance (Boa, 2004, Sanchez, Perez-Moreno, Mata, Salmones, & Leal-Lara, 2012).

Currently, the production of inocula based on ectomycorrhizal mushrooms has enormous importance in countries with forestry tradition. However, in Mexico, this biotechnology has received little attention, despite its great potential. Therefore, it is necessary the generation of knowledge related to the use of native ectomycorrhizal mushrooms in plants with economic and social interest. *Pinus greggii* Engelm is a tree of great importance in reforestation programs in the country (Ramírez-Herrera, Vargas, & López-Upton, 2005). Meanwhile, *Hebeloma mesophaeum* (Pers.) Qué. is an ectomycorrhizal mushroom with great importance as an edible species in various parts of Central Mexico (Pérez-Moreno, Martínez-Reyes, Yescas-Pérez, Delgado-Alvarado, & Xoconostle-Cázares, 2008). The aim of this study was to evaluate the growth, root colonization, and N, P, K, Ca and Mg contents in the roots and shoots of *P. greggii* inoculated with the edible ectomycorrhizal mushroom *H. mesophaeum*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and inoculum

This study was conducted in the laboratory of mycorrhizae and at the Soil Science greenhouse of Colegio de Postgraduados, in Montecillos, Estado de México. *P. greggii* seeds were sterilized with 30 % H₂O₂ for 20 minutes, before sowing. Then, they were rinsed three times with sterile distilled water. The sporomes used as a source of inoculum were purchased in the Ozumba market, state of Mexico (Figure 1a). The inoculum was obtained from pilea of *H. mesophaeum*, which were cut out of the stems, dehydrated at 35 °C and ground. Subsequently, the obtained inoculum was sieved through a 1.9 mm mesh in order to homogenize the particle size. The obtained inoculum was stored at 5 °C.

Experimental design

The substrate used in the experiments consisted of a mixture of sand, bark and forest soil, in a 2:2:1 ratio. The substrate was sterilized with steam at 1.3 kg·cm⁻² at 125 °C during 5 h. The seeds were sown in black plastic

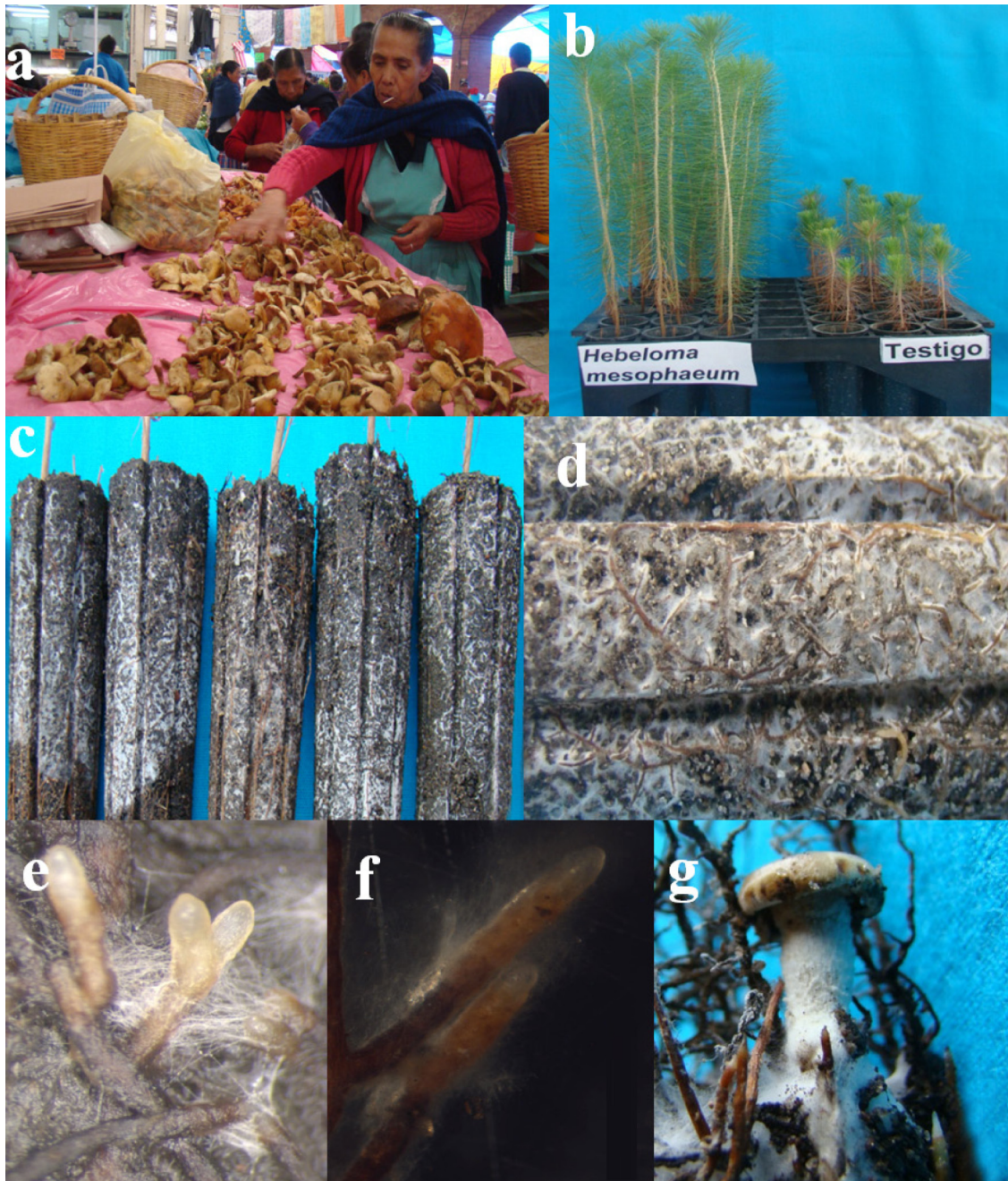


FIGURA 1. a-g) *H. mesophaeum* (Hm) y *P. greggii* (Pg). a) Venta del hongo comestible Hm en el mercado de Ozumba, Estado de México. b) Efecto de la inoculación de Hm en el crecimiento de Pg; plantas inoculadas (izquierda) o no (derecha). c-d) Plantas ectomicorrizadas con abundante micelio externo de Hm. e-f) Macromorfología de la raíz ectomicorrizada de Pg con Hm. g) Esporoma maduro de Hm asociado con las raíces de Pg. Barras b y c (4 cm), d y g (1 cm), e y f (1 mm).

FIGURE 1. a-g) *H. mesophaeum* (Hm) and *P. greggii* (Pg). a) Sale of the edible mushroom Hm in the Ozumba market, Estado de México. b) Effect of Hm inoculation in Pg growth; inoculated plants (left), non-inoculated plants (right). c-d) Ectomycorrhizal plants with abundant external mycelium of Hm. e-f) Macromorphological appearance of ectomycorrhizal roots of Pg with Hm. g) Mature sporomes of Hm associated with Pg roots. b and c bars (4 cm), d and g (1 cm), e and f (1 mm).

Diseño experimental

El sustrato se preparó a partir de una mezcla de arena, corteza y suelo forestal, en una proporción 2:2:1, el cual fue esterilizado con vapor de agua a 1.3 kg·cm⁻² y 125 °C durante 5 h. El material vegetativo se sembró en “tubetes” de plástico negro de 140 mL que contenían

forestry containers with 140 mL of this substrate. *P. greggii* was inoculated with an interval of 10⁷ to 10⁸ spores of *H. mesophaeum* per plant. The concentration of these spores was determined with a hemacytometer. Two inoculations with spores of the used ectomycorrhizal mushroom were conducted; the first inoculation was simultaneously carried out with the sowing and the second

el sustrato. *P. greggii* se inoculó con un intervalo de 10^7 a 10^8 esporas de *H. mesophaeum* por planta. La concentración de dichas esporas se determinó con un hematocitómetro. Se realizaron dos inoculaciones con las esporas del hongo ectomicorrízico; la primera se efectuó simultáneamente con la siembra y la segunda 90 días después.

Crecimiento vegetal *P. greggii*

La altura y el diámetro del tallo se midieron en 60 plantas. Se tomaron al azar 10 plantas inoculadas con *H. mesophaeum* y 10 plantas sin inocular para determinar el peso seco de la raíz y el de la parte aérea; las muestras se secaron a 70 °C por 48 h, hasta peso constante. Las mediciones se realizaron a los 421 días después de la siembra.

Caracterización macro y micromorfológica de la ectomicorriza *H. mesophaeum*

La evaluación de la colonización micorrízica es fundamental para explicar cualquier efecto en el crecimiento vegetal de las plantas, como consecuencia de la presencia de *H. mesophaeum* en las raíces de éstas. Se tomaron al azar tres plantas inoculadas con *H. mesophaeum* y tres plantas sin inocular, para la evaluación del porcentaje de micorrización. Posteriormente, se extrajeron los cepellones de los "tubetes". La parte radical se lavó bajo chorro de agua con baja presión y con ayuda de tres tamices de diferente diámetro de abertura (1.19, 0.180 y 0.085 mm), para reducir la pérdida de raíces cortas. La identificación de raíces vivas micorrizadas se realizó con un microscopio estereoscópico. Se contaron todas las raíces cortas del cepellón y se efectuaron cortes a mano para su análisis micromorfológico. El análisis se realizó con la toma de fotografías de las estructuras diagnósticas de la ectomicorriza: manto, red de Hartig y micelio externo (Agerer, 1994). Se evaluó la colonización en tres profundidades del cepellón: i) parte superior (0 - 5 cm), ii) parte media (5.1 - 10 cm), y iii) parte inferior (10.1 - 15 cm). Lo anterior, debido a que en ensayos preliminares se observó que la distribución de la colonización ectomicorrízica no es homogénea a diferentes profundidades en el "tubete". En cada una de estas profundidades, se evaluó el número de raíces vivas y muertas (en función de su turgencia y color), micorrizadas o no.

Análisis de nutrientes en tejido vegetal

Los análisis de nutrientes se realizaron en las plantas utilizadas para la evaluación del peso seco. El N se determinó por digestión húmeda (Bremner, 1965); el P total, según el método de Allen, Grimshaw, Parkinson, y Quarmby (1997); el K, mediante extracción con

one 90 days later. The inoculum was placed in contact with the roots, by doing a hole in the substrate, and subsequently it was covered with the same material. The inoculum was added at a depth of 3 cm while the seed was placed at a depth of 1.0 cm. The experiment comprised two treatments: plants inoculated with *H. mesophaeum* and non-inoculated plants. Each treatment consisted of 20 plants with three replications. Plants were kept in the greenhouse from the day of sowing until 421 days after the inoculation. They were watered every other day with purified water.

P. greggii plant growth

Stem diameter and height of 60 plants were measured. Ten plants inoculated with *H. mesophaeum* and 10 non-inoculated plants were randomly selected to determine shoot and root dry weight; samples were dried at 70 °C during 48 h until constant weight. Measurements were made 421 days after sowing.

Macro and micromorphological characterization of the ectomycorrhiza of *H. mesophaeum*

The evaluation of the mycorrhizal colonization was crucial to explain any effect on plant growth, as a result of the presence of *H. mesophaeum* associated with the roots. Therefore, 3 plants inoculated with *H. mesophaeum* and three non-inoculated plants were randomly selected to evaluate the percentage of mycorrhization. Subsequently, root balls were removed from the containers. The roots were washed under running water at low pressure through 3 sieves with different diameter (1.19, 0.180 and 0.085 mm) in order to reduce the loss of feeding roots. The identification of living roots was performed using a stereoscopic microscope. All feeding roots were removed from the root ball and cuts made by hand were used in the micromorphological analysis. This analysis was carried out by taking pictures of the diagnostic structures of ectomycorrhiza including the mantle, the Hartig net and the external mycelium (Agerer, 1994). The colonization of the root ball was evaluated in three depths: i) the top (0 - 5 cm), ii) the central part (5.1 - 10 cm), and iii) the lower part (10.1 - 15 cm), because in preliminary experiments it was observed that the distribution of ectomycorrhizal colonization was not homogeneous at different depths. In each depth, the number of living and dead mycorrhizal or non-mycorrhizal roots (depending on their turgidness and color) was evaluated.

Analysis of nutrients in plant tissue

The nutrient analysis in plants were performed in all of the plants used for the evaluation of the dry weight. N was determined by wet digestion (Bremner, 1965); total P according to Allen, Grimshaw, Parkinson, and Quarmby (1997); K by extraction with ammonium ac-

acetato de amonio por fotometría de llama; y el Ca y Mg, mediante determinación colorimétrica en un espectrofotómetro de absorción atómica (Varian, Spectra-AA220).

Análisis estadístico

Los resultados de evaluación del crecimiento, y peso seco de la raíz y parte aérea de *P. greggii*, se analizaron en un diseño experimental completamente al azar. Para todas las variables se realizó un análisis de varianza mediante PROC GLM y se hizo una comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (SAS Institute, 1999). Los datos del porcentaje de colonización ectomicorrízica fueron transformados mediante la fórmula $(\% \text{ colonización} + 0.05)^{1/2}$ utilizada por Alves, Oliveira, y Germano (2010).

etate by means of flame photometry, and Ca and Mg by colorimetric determination using a spectrophotometer of atomic absorption (Varian, Spectra-AA220).

Statistical analysis

The results of growth and root and shoot dry weight of *P. greggii* were analyzed using a completely randomized design. An analysis of variance, by means of PROC GLM, for all variables was conducted, as well as a comparison of means using the Tukey's test ($P \leq 0.05$) (SAS Institute, 1999). Percentage data of ectomycorrhizal colonization were transformed by using the formula $(\% \text{ colonization} + 0.05)^{1/2}$ used by Alves, Oliveira, and Germano (2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento vegetal de *P. greggii*

El peso seco total de las plantas inoculadas fue 2.9 veces mayor que el de las plantas no inoculadas. Un fenómeno similar se observó en el caso de la altura de las plantas y el diámetro del tallo (Figura 1b y Cuadro 1). Efectos benéficos, en términos de la producción de biomasa de pinos, han sido reportados previamente como consecuencia de la inoculación con otros hongos ectomicorrízicos (Christophe *et al.*, 2010; Domínguez, Planelles, Rodríguez, & Saiz de Omeñaca, 2004; Duñabeitia *et al.*, 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

Plant growth of *P. greggii*

The total dry weight of the inoculated plants was 2.9 times greater than that of non-inoculated plants. A similar trend was observed in the case of plant height and stem diameter (Figure 1b and Table 1). Beneficial effects, in terms of pine biomass production, have been reported previously as a result of inoculation with other ectomycorrhizal mushrooms (Christophe *et al.*, 2010; Domínguez, Planelles, Rodríguez, & Saiz de Omeñaca, 2004; Duñabeitia *et al.*, 2004).

CUADRO 1. Peso seco, altura y diámetro del tallo en plantas de *P. greggii* inoculadas o no con *H. mesophaeum* 421 días después de la siembra.

Tratamiento	Peso seco (mg)		Total	Altura de las plantas (cm)	Diámetro del tallo (mm)
	Parte aérea	Raíz			
Plantas inoculadas	2.68 ± 0.98 a	2.11 ± 0.53 a	4.78 ± 0.86 a	26.74 ± 4.13 a	2.27 ± 0.27 a
Plantas no inoculadas	0.92 ± 0.57 b	0.71 ± 0.37 b	1.63 ± 0.90 b	11.15 ± 1.81 b	1.55 ± 0.20 b
C.V.	44.59	32.48	27.48	16.63	12.25

Los datos mostrados son promedios ± desviación estándar. n = 10 para peso seco y n = 60 para altura y diámetro del tallo. C.V. Coeficiente de Variación. Valores en la misma columna con la misma letra no son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

TABLE 1. Dry weight, height and stem diameter of non-inoculated *P. greggii* plants or inoculated with *H. mesophaeum*, 421 days after sowing.

Treatment	Dry weight (mg)			Plant height (cm)	Stem diameter (mm)
	Shoot	Root	Total		
Inoculated plants	2.68 ± 0.98 a	2.11 ± 0.53 a	4.78 ± 0.86 a	26.74 ± 4.13 a	2.27 ± 0.27 a
Non-inoculated plants	0.92 ± 0.57 b	0.71 ± 0.37 b	1.63 ± 0.90 b	11.15 ± 1.81 b	1.55 ± 0.20 b
C.V.	44.59	32.48	27.48	16.63	12.25

The data shown are means ± Standard deviation. n = 10 for dry weight and n = 60 for stem diameter and height. C.V. Coefficient of Variation. Values in the same column with the same letter are not different according to the Tukey test at $P \leq 0.05$.

CUADRO 2. Porcentaje de raíces cortas vivas y muertas, en plantas de *P. greggii* inoculadas o no con *H. mesophaeum* en tres profundidades del cepellón, 421 días después de la inoculación.

Tratamientos	Vivas		Muertas	
	Micorrizadas	No Micorrizadas	Micorrizadas	No Micorrizadas
	%			
Plantas inoculadas				
Parte superior cepellón ¶	25.7 ± 2.74 b	1.5 ± 1.32 a	2.5 ± 1.84 a	5.0 ± 3.72 a
Parte media cepellón	40.5 ± 3.18 a	1.7 ± 1.99 a	1.8 ± 1.07 a	3.1 ± 2.04 a
Parte inferior del cepellón	13.3 ± 1.55 c	0.6 ± 0.48 a	1.8 ± 1.07 a	2.5 ± 1.92 a
Total	79.5	3.8	6.1	10.6
Plantas no inoculadas				
Parte superior cepellón	0.0	21.0 ± 16.70 a	0.0	0.5 ± 0.45 a
Parte media cepellón	0.0	45.2 ± 8.50 a	0.0	0.4 ± 0.43 a
Parte inferior del cepellón	0.0	32.1 ± 18.92 a	0.0	0.8 ± 0.67 a
Total	0.0	98.3	0.0	1.7

Los datos mostrados son promedios ± desviación estándar. n = 3. Valores en la misma columna, con la misma letra, para cada categoría de planta, no son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$, n = 3. ¶ = las partes del cepellón se refieren a su profundidad a partir del cuello de la raíz de la planta; superior = 0 - 5 cm, media = 5.1 - 10 cm e inferior = 10.1 - 15 cm.

TABLE 2. Feeding (living and dead) roots percentage in non-inoculated *P. greggii* plants or inoculated with *H. mesophaeum* at three depths of the root ball, 421 days after sowing.

Treatments	Living roots		Dead roots	
	Mycorrhizal	Non-mycorrhizal	Mycorrhizal	Non-mycorrhizal
	%			
Inoculated plants				
Top of root ball ¶	25.7 ± 2.74 b	1.5 ± 1.32 a	2.5 ± 1.84 a	5.0 ± 3.72 a
Central part of root ball	40.5 ± 3.18 a	1.7 ± 1.99 a	1.8 ± 1.07 a	3.1 ± 2.04 a
Lower part root ball	13.3 ± 1.55 c	0.6 ± 0.48 a	1.8 ± 1.07 a	2.5 ± 1.92 a
Total	79.5	3.8	6.1	10.6
Non-inoculated plants				
Top of root ball	0.0	21.0 ± 16.70 a	0.0	0.5 ± 0.45 a
Central part of root ball	0.0	45.2 ± 8.50 a	0.0	0.4 ± 0.43 a
Lower part root ball	0.0	32.1 ± 18.92 a	0.0	0.8 ± 0.67 a
Total	0.0	98.3	0.0	1.7

The data shown area means ± standard deviation. n = 3. Values in the same column with the same letter for each plant category are not different according to the Tukey test at $P \leq 0.05$, n = 3. ¶ = the parts of the root ball refer to its depth from the neck of the root, top = 0 to 5 cm, middle part = 5.1 - 10 cm and bottom = 10.1 - 15 cm.

Caracterización macro y micromorfológica de la ectomicorriza *H. mesophaeum*

Una colonización micorrízica alta (79.5 %) se observó únicamente en plantas inoculadas (Cuadro 2). También se han registrado porcentajes altos (hasta 80 %) de colonización micorrízica en plantas de pino inoculadas con hongos ectomicorrízicos de los géneros *Tuber*, *Rhizopogon* y *Suillus* (Duñabeitia et al., 2004; Parladé, Pera, & Álvarez, 1996) y valores más bajos han sido re-

Macro and micromorphological characterization of the ectomycorrhizal mushroom *H. mesophaeum*

A high mycorrhizal colonization (79.5 %) was recorded only in inoculated plants (Table 2). High percentages (until 80 %) of mycorrhizal colonization in pine plants inoculated with ectomycorrhizal mushrooms of the genera *Tuber*, *Rhizopogon* y *Suillus* have also been registered (Duñabeitia et al., 2004; Parladé, Pera, & Álvarez, 1996) and lower values have been registered by Kropp

gistrados por Kropp (1997). En el caso de las plantas inoculadas, se observó un porcentaje mayor (40.5 %) de raíces cortas micorrizadas en la parte central del cepellón. Este porcentaje fue 1.6 y 3.0 veces mayor que la parte superior e inferior del cepellón, respectivamente (Cuadro 2). En este estudio, se observó una dinámica mayor de renovación de raíces finas en las plantas inoculadas. Como consecuencia, en las plantas inoculadas se registró un porcentaje mayor de raíces cortas muertas (16.7 %) comparado con el de las plantas no inoculadas (1.7 %). Sin embargo, una proporción alta de las raíces cortas muertas en plantas inoculadas, correspondieron a raíces no micorrizadas (10.6 %).

Las micorrizas de *H. mesophaeum* fueron simples o dicotómicas, de 2 a 3 mm de longitud y 0.5 mm de diámetro. Las terminaciones tuvieron forma recta y cilíndrica en la punta, de color café y en algunas partes blanca (Figura 1e y 1f). No se observaron rizomorfos. La base de la ectomicorriza fue de 1 a 2 mm y el ápice de 0.5 a 1.4 mm, con hifas emanantes abundantes de color blanco a lo largo de todas las raíces ectomicorrizadas (Figura 1c y 1d). La red de Hartig penetró hasta tres capas de células corticales y el manto fue plectenquimatoso. Estas características morfológicas son similares a las reportadas por Deemy (2008) para *H. mesophaeum* con *Pinus strobus*.

Contenido de nutrientes

El contenido de los macro y micronutrientes evaluados fue mayor en las plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas (Cuadro 3). En el caso del N, los incrementos observados son de gran significancia ecofisiológica, debido a que es un elemento limitante en

(1997). In the case of inoculated plants, a higher percentage (40.5 %) of mycorrhizal feeding roots was observed in the central part of the root ball. This percentage was 1.6 and 3.0 times greater than that on the top or the bottom of the root ball, respectively (Table 2). In this study, a major replacement of feeding roots in inoculated plants was observed. As a result, a greater percentage (16.7 %) of dead feeding roots was registered in inoculated plants in comparison to the percentage recorded in non-inoculated plants (1.4 %). However, a high proportion of dead feeding roots in the inoculated plants consisted of non-mycorrhizal roots (10.6 %).

Mycorrhizae of *H. mesophaeum* were simple or dichotomous, 2 to 3 mm in length and 0.5 mm in diameter. The ends were straight shaped and cylindrical at the top and brown colored with some whitish parts (Figure 1e and 1f). No rhizomorphs were observed. The basis of the ectomycorrhizae was 1 to 2 mm and the apex 0.5 to 1.4 mm, with whitish emanating hyphae very abundant along all of the ectomycorrhizal roots (Figure 1c and 1d). The Hartig net penetrated up to three layers of cortical cells and the outer mantle layer had a plectenchymatous organization. These morphological features are similar to those reported by Deemy (2008) for *H. mesophaeum* with *Pinus strobus*.

Nutrient contents

The evaluated macro and micronutrient contents were higher in inoculated plants in comparison to non-inoculated plants (Table 3). In the case of N, the recorded increases are of great ecophysiological significance, because this is a conspicuous limiting element in forest ecosystems. The N contents in shoot and root was, res-

CUADRO 3. Contenido de nutrientes en el tejido de plantas de *P. greggii* inoculadas o no con *H. mesophaeum*, 421 días después de la siembra.

Parte de la planta	Contenido de nutrientes				
	N	P	K	Ca	Mg
mg por planta					
Aérea					
Plantas inoculadas	21.61 ± 7.90a	0.60 ± 0.22a	10.61 ± 3.87a	5.15 ± 1.88a	3.82 ± 1.40a
Plantas no inoculadas	10.09 ± 6.29b	0.09 ± 0.06b	3.94 ± 2.46b	2.29 ± 1.43b	0.55 ± 0.34b
C.V.	45.5	46.10	44.62	44.90	46.55
Radical					
Plantas inoculadas	13.04 ± 3.27a	0.56 ± 0.14a	0.88 ± 0.22a	8.34 ± 2.09a	1.93 ± 0.48a
Plantas no inoculadas	4.92 ± 2.59b	0.12 ± 0.06b	0.61 ± 0.32b	2.61 ± 1.37b	0.54 ± 0.28b
C.V.	32.83	31.95	37.18	32.29	32.19
Total					
Plantas inoculadas	34.65 ± 6.92a	1.16 ± 0.19a	11.48 ± 3.77a	13.49 ± 2.09a	5.75 ± 1.24a
Plantas no inoculadas	15.01 ± 8.55b	0.21 ± 0.11b	4.55 ± 2.73b	4.91 ± 2.68b	1.09 ± 0.60b
C.V.	31.33	23.30	41.07	25.80	28.41

Los datos mostrados son promedios ± desviación estándar. n = 10. Valores en la misma columna con la misma letra no son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$. C.V. Coeficiente de Variación.

TABLE 3. Nutrient contents in tissue of non-inoculated *P. greggii* plants or inoculated with *H. mesophaeum*, 421 days after sowing.

Part of the plant	Nutrient Contents				
	N	P	K	Ca	Mg
	mg per plant				
Shoot					
Inoculated plants	21.61 ± 7.90a	0.60 ± 0.22a	10.61 ± 3.87a	5.15 ± 1.88a	3.82 ± 1.40a
Non-inoculated plants	10.09 ± 6.29b	0.09 ± 0.06b	3.94 ± 2.46b	2.29 ± 1.43b	0.55 ± 0.34b
C.V.	45.5	46.10	44.62	44.90	46.55
Root					
Inoculated plants	13.04 ± 3.27a	0.56 ± 0.14a	0.88 ± 0.22a	8.34 ± 2.09a	1.93 ± 0.48a
Non-inoculated plants	4.92 ± 2.59b	0.12 ± 0.06b	0.61 ± 0.32b	2.61 ± 1.37b	0.54 ± 0.28b
C.V.	32.83	31.95	37.18	32.29	32.19
Total					
Inoculated plants	34.65 ± 6.92a	1.16 ± 0.19a	11.48 ± 3.77a	13.49 ± 2.09a	5.75 ± 1.24a
Non-inoculated plants	15.01 ± 8.55b	0.21 ± 0.11b	4.55 ± 2.73b	4.91 ± 2.68b	1.09 ± 0.60b
C.V.	31.33	23.30	41.07	25.80	28.41

The data are means ± standard deviation. n = 10. Values in the same column with the same letter are not different according to Tukey's test at $P \leq 0.05$. C.V. Coefficient of Variation.

los ecosistemas forestales. El contenido de N en la parte aérea y radical fue, respectivamente, 2.1 y 2.6 veces mayor en las plantas inoculadas que en las no inoculadas. Esto concuerda con reportes previos que han registrado el incremento del contenido de N en plantas inoculadas con *Hebeloma* (Tibbet & Sanders, 2002) o con otros hongos ectomicorrízicos (Read & Pérez-Moreno, 2003). En las hifas externas de *Hebeloma* se han identificado transportadores de amonio (la fuente preferida de N por los microorganismos), y enzimas que lo metabolizan, como la glutamina sintetasa y el glutamato deshidrogenasa (Javelle et al., 2003).

Los contenidos totales de P, Mg y K, fueron 5.5, 5.2 y 2.5 veces mayor ($P \leq 0.05$), respectivamente, en las plantas inoculadas que en las no inoculadas (Cuadro 3). Se ha demostrado, que el micelio externo ectomicorrízico tiene un papel activo importante en la adquisición de P inorgánico y orgánico, a partir de fuentes no accesibles a la raíz (Pérez-Moreno & Read, 2000; Read & Pérez-Moreno, 2003). Recientemente, se ha demostrado que *Hebeloma* libera fosfatasa ácida, lo cual facilita la translocación de los ortofosfatos (Louche et al., 2010). La translocación de Mg y K, en términos generales, ha sido escasamente estudiada para muchos hongos ectomicorrízicos. Sin embargo, se ha demostrado que especies como *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. o *Scleroderma bermudense* Coker, son importantes para la translocación de dichos nutrimentos, respectivamente (Bandou, Lebailly, Muller, Dulormne, & Toribio, 2006; Jentscke, Brandes, Kuhn, Schröder, & Godbold, 2001; Jentscke et al., 2000). El contenido de P, K y Mg en la relación parte aérea:raíz, fue 1.43, 1.87 y 1.94 veces mayor, respectivamente, en plantas inoculadas que las no inoculadas. Este es un indicador importante de la alta eficiencia de *H. mesophaeum*, no sólo para tomar del suelo estos nu-

pectivamente 2.1 and 2.6 times greater in inoculated plants than in non-inoculated plants. Similarly, previous reports have also registered an increment of N contents in plants inoculated with *Hebeloma* (Tibbett & Sanders, 2002) or with other ectomycorrhizal mushrooms (Read & Pérez-Moreno, 2003). Ammonium transporters (the preferred source of N by microorganisms), and enzymes that metabolize it, such as glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase have been found in the external hyphae of *Hebeloma* (Javelle et al., 2003).

The total contents of P, Mg, and K were 5.5, 5.2 and 2.5 times respectively higher ($P \leq 0.05$), in inoculated plants in comparison to non-inoculated plants (Table 3). It has been shown that the ectomycorrhizal external mycelium plays an important role in the acquisition of organic and inorganic P, from sources not accessible to the root (Pérez-Moreno & Read, 2000; Read & Pérez-Moreno, 2003). Recently, it has been shown that *Hebeloma* releases acid phosphatases, which facilitates the translocation of orthophosphates (Louche et al., 2010). The translocation of Mg and K, in general, for many ectomycorrhizal mushrooms has been poorly studied. However, it has been demonstrated that species as *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. or *Scleroderma bermudense* Coker are important for the translocation of Mg and K, respectively (Bandou, Lebailly, Muller, Dulormne, & Toribio, 2006; Jentscke, Brandes, Kuhn, Schröder, & Godbold, 2001; Jentscke et al., 2000). The contents of P, K and Mg in the shoot:root ratio was 1.43, 1.87 and 1.94 times higher, respectively, in inoculated plants in comparison to non-inoculated plants. This is an important indicator of the high efficiency of *H. mesophaeum*, not only for obtaining these nutrients from the soil, but also to mobilize them to the shoots. Jentschke et al. (2001) demonstrated a strong interaction between the flows

trimentos, sino también para movilizarlos hacia la parte aérea de las plantas inoculadas. Jentschke et al. (2001) demostraron que existe una fuerte interdependencia entre los flujos de N, K y Mg y la translocación de P dentro de las células del micelio ectomicorrízico. Esto se debe a que los fosfatos movilizados por el micelio externo de los hongos ectomicorrízicos, usualmente se incorporan en las vacuolas fúngicas como polifosfatos, los cuales se encuentran cargados negativamente. Todo esto origina un desbalance electrónico en las células fúngicas que facilita el flujo de cationes tales como K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} o aminoácidos básicos (como arginina). Dado que la deficiencia de Mg y K ha sido reportada previamente en bosques centrales de Europa (Jentschke et al., 2000; Ubel & Heinsdorf, 1997), los datos generados en el presente trabajo sugieren que la inoculación de árboles con *H. mesophaeum* podría contribuir a reducir la deficiencia de dichos nutrimentos.

En el presente trabajo se observó la formación de esporomas de *H. mesophaeum* (Figura 1g), 392 días después de la inoculación. Diversos estudios han reportado la producción de esporomas de hongos comestibles ectomicorrízicos, tales como *Cantharellus cibarius* Fr., *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke, *Hebeloma cylindrosporum* Romagn. and *H. sarcophyllum* (Peck) Sacc. (Danell & Camacho 1997; Debaud & Gay 1987; Wang & Hall, 2004).

CONCLUSIONES

Las plantas inoculadas presentaron incrementos conspicuos en biomasa de parte aérea, raíz y contenido de N, P, K, Ca y Mg, respecto a las plantas no inoculadas. *H. mesophaeum* fue particularmente eficiente en la movilización de P y Mg a la parte aérea de las plantas de *P. greggii*. Un alto porcentaje de colonización por *H. mesophaeum*, se observó principalmente en la parte central del cepellón. La formación de esporomas del hongo, 392 días después de la inoculación, también fue observada. Debido a los porcentajes altos de micorrización y al efecto benéfico registrado, se considera que el hongo comestible ectomicorrízico *H. mesophaeum* tiene potencial para su utilización en programas de inoculación de *P. greggii* en invernadero.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece el financiamiento del CONACYT por la beca otorgada. JPM agradece el apoyo del proyecto FOMIX-VERACRUZ Núm. 108654 por el financiamiento otorgado para el análisis nutricional.

LITERATURA CITADA

Agerer, R. (1994). Caracterización de ectomicorriza. In J. R. Norris, D. J. Read, & A.K. Varma (Eds.), *Techniques for the Study of Mycorrhiza* (pp. 25–73). London: Academic Press.

of N, K, and Mg and the translocation of P inside the ectomycorrhizal mycelial cells. This interaction can be explained because phosphates mobilized by the external mycelium of ectomycorrhizal mushrooms, are usually incorporated in fungal vacuoles as polyphosphates, which are negatively charged. As a consequence there is an electronic imbalance in fungal cells facilitating the flow of cations such as K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} or basic aminoacids (such as arginine). Since the deficiency of Mg and K has been previously reported in central forests in Europe (Jentschke et al., 2000; Ubel & Heinsdorf, 1997), the data generated in this study suggest that trees inoculated with *H. mesophaeum* could contribute in the amelioration of deficiency of these nutrimentos.

In the present contribution, the formation of sporomes of *H. mesophaeum* (Figure 1g) was observed 392 after inoculation. The sporome production of edible ectomycorrhizal mushrooms such as *Cantharellus cibarius* Fr., *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke, *Hebeloma cylindrosporum* Romagn. and *H. sarcophyllum* (Peck) Sacc. has been previously reported (Danell & Camacho 1997; Debaud & Gay 1987; Wang & Hall, 2004).

CONCLUSIONS

Inoculated plants showed conspicuous increases in terms of biomass of shoot, root and N, P, K, Ca and Mg content, in comparison to non-inoculated plants. *H. mesophaeum* was particularly efficient in the mobilization of P and Mg to the shoot of *P. greggii* plants. A high percentage of colonization by *H. mesophaeum* mainly in the central part of the root ball in the plant containers was observed. The formation of sporomes, 392 days after inoculation, was also recorded. Due to the high percentages of mycorrhization and the beneficial effect registered, it is considered that the edible ectomycorrhizal mushroom *H. mesophaeum* has a potential to be used in programs of inoculation of *P. greggii* under greenhouse conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author thanks the financial support provided by CONACYT. JPM acknowledges the FOMIX-VERACRUZ Project No. 108654 the financial support for, employed for the nutritional analysis.

End English version

Allen, S. E., Grimshaw, H. M., Parkinson, J.A. & Quarmby, C. (1997). *Chemical analysis of ecological materials*. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications.

Alves, L., Oliveira, V. L., & Germano, N. S. F. (2010). Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of

- eucalypt. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 676–684. doi:10.1590/S1517-83822010000300018
- Bandou, E., Lebailly, F., Muller, F., Dulormne, M., & Toribio, A. (2006). The ectomycorrhizal fungus *Scleroderma bermudense* alleviates salt stress in seagrape (*Coccoloba uvifera* L.) seedlings. *Mycorrhiza*, 16, 559–565. doi: 10.1007/s00572-006-0073-6
- Boa, E. (2004). *Wild edible fungi: A global overview of their use and importance to people*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO).
- Bremner, J. M. (1965). Total nitrogen. In C. A. Black (Ed.), *Methods of soil analysis* (pp. 1149-1178). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy.
- Christophe, C., Turpault, M., Uroz, S., Leclerc, E., Kies A., & Frey-Klett P. (2010). *Laccaria bicolor* S238N improves Scots pine mineral nutrition by increasing root nutrient uptake from soil minerals but does not increase mineral weathering. *Plant Soil*, 328, 145–154. doi: 10.1007/s11104-009-0092-0
- Danell, E., & Camacho, F. J. (1997). Successful cultivation of the golden chanterelle. *Nature*, 385, 303. doi:10.1038/385303a0
- Debaud, J. C., & Gay, G. (1987). In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with *Pinus pinaster*. *New Phytologist*, 105, 429–436. doi: 10.1111/j.1469-8137.1987.tb00880.x
- Deemy. (2008). Characterization and determination of ectomycorrhizae. Consultado 13-02-2012 en <http://www.deemy.de/>
- Domínguez, N. J. A., Planelles, R., Rodríguez, B. J. A., & Saiz de Omeñaca, J. A. (2004). Influencia de la micorrización con trufa negra (*Tuber melanosporum*) en el crecimiento, intercambio gaseoso y nutrición mineral de plántulas de *Pinus halepensis*. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*, 13, 317–327.
- Duñabeitia, M. K., Hormilla, S., García-Plazaola, J. I., Txarterina, K., Arteche, U., & Becerril, J. M. (2004). Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza*, 14, 11–18. doi:10.1007/s00572-003-0270-5
- Javelle, A., Morel, M., Rodríguez-Pastrana, B. R., Botton, B., André B., Marini A. M., Brun A., & Chalot, M. (2003). Molecular characterization, function and regulation of ammonium transporters (Amt) and ammonium-metabolizing enzymes (GS, NADP-GDH) in the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Molecular Microbiology*, 47, 411–430. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03303.x
- Jentschke, G., Brandes, B., Kuhn, A. J., Schröder, W. H., Becker, J. S., & Godbold, D. L. (2000). The mycorrhizal fungus *Paxillus involutus* transports magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. *Plant and Soil*, 220, 243–246. doi: 10.1023/A:1004727331860
- Jentschke, G., Brandes, B., Kuhn, A. J., Schröder, W. H., & Godbold D. L. (2001). Interdependence of phosphorus, nitrogen, potassium and magnesium translocation by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *New Phytologist*, 149, 327–337. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00014.x
- Kropp, B. R. (1997). Inheritance of the ability for ectomycorrhizal colonization of *Pinus strobus* by *Laccaria bicolor*. *Mycologia*, 89, 578–585.
- Louche, J., Arif, A. M., Cloutier-Hurteau, B., Sauvage, F. X., Quiquampoix, H., & Plassard, C. (2010). Efficiency of acid phosphatases secreted from the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* to hydrolyse organic phosphorus in podzols. *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 323–335. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.00899.x
- Parladé, J., Pera, J., & Alvarez, I. F. (1996). Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*, 6, 237–245. doi: 10.1007/s005720050131
- Pérez-Moreno, J., & Read, D. J. (2000). Mobilization and transfer of nutrients from litter to tree seedlings via the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. *New Phytologist*, 145, 301–309. doi: 10.1046/j.1469-8137.2000.00569.x
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Yescas-Pérez, A., Delgado-Alvarado, A., & Xoconostle-Cázares, B. (2008). Wild mushroom markets in Central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany*, 62, 425–436. doi: 10.1007/s12231-008-9043-6
- Ramírez-Herrera, C., Vargas H. J. J., & López-Upton J. (2005). Distribución y Conservación de las poblaciones naturales de *Pinus greggii*. *Acta Botánica Mexicana*, 72, 1–16.
- Read, D. J., & Pérez-Moreno, J. (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytologist*, 157, 475–492. Doi: 10.1046/j.1469-8137.2003.00704.x
- Sánchez, J. E., Pérez-Moreno, J., Mata G., Salmones, D., & Leal-Lara, H. (2012). Los hongos comestibles en México. In J. Álvarez-Sánchez, A. Alarcón, & M. P. Rodríguez-Guzmán (Eds.), *Biodiversidad microbiana de México*. México, D.F.: UNAM (en prensa).
- Statistical Analysis System Institute (SAS). (1999). *SAS User's Guide, versión 8.0*. Cary, N. C.: SAS Institute Inc.
- Tibbett, M., & Sanders, F. E. (2002). Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany*, 89, 783–789. doi: 10.1093/aob/mcf129
- Übel, E., & Heinsdorf, D. (1997). Results of long-term K and Mg fertilizer experiments in afforestation. *Forest Ecology Management*, 91, 47–52. doi:10.1016/S0378-1127(96)03882-0
- Wang, Y., & Hall, I. R. (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: Challenges and achievements. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1063–1073. doi:10.1139/B04-051