

Anatomía

Caracterización morfológica y molecular de ectomicorrizas nativas de suelo forestal inoculadas en *Pinus montezumae* en condiciones de invernadero

Morphological and molecular characterization of native ectomycorrhizae from forest soil inoculated in Pinus montezumae under greenhouse conditions

Maryeli Aguirre-Zamora ^a, Julieta Álvarez-Manjarrez ^{b, *}, Irma Díaz-Aguilar ^a,
Jesús Pérez-Moreno ^c, Juan José Almaraz-Suárez ^d y Salvador Rodríguez-Zaragoza ^e

^a Colegio de Postgraduados, Posgrado en Edafología, Microbiología de Suelos, Laboratorio de Ecología de Suelos, Campus Montecillo, Montecillo, Carretera México-Texcoco Km 36.6, 56230 Montecillo, Estado de México, México

^b Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Laboratorio de Micología Integral, Tercer circuito, Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México

^c Colegio de Postgraduados, Posgrado en Edafología, Microbiología de Suelos, Laboratorio de Micorrizas, Campus Montecillo, Montecillo, Carretera México-Texcoco Km 36.6, 56230 Montecillo, Estado de México, México

^d Colegio de Postgraduados, Posgrado en Edafología, Microbiología de Suelos, Laboratorio de Fijación Biológica de Nitrógeno, Campus Montecillo, Montecillo, Carretera México-Texcoco Km 36.6, 56230 Montecillo, Estado de México, México

^e Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biotecnología y Prototipos, Laboratorio de Ecología Microbiana, Av. de los Barrios #1 Col. Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla de Baz, Estado de México, México

*Autor para correspondencia: julieta.alvarez@ib.unam.mx (J. Álvarez-Manjarrez)

Recibido: 27 octubre 2025; aceptado: 16 junio 2026

Resumen

Los hongos ectomicorrízicos representan parte importante de la diversidad fúngica de los bosques templados de México. Sin embargo, los estudios donde se caracterizan las ectomicorrizas sin la utilización de esporomas son escasos. Por ello, en este estudio se caracterizaron 3 ectomicorrizas presentes en las raíces de *Pinus montezumae* inoculadas con suelo forestal que contenía propágulos de ectomicorrizas nativas del Área Natural Protegida de Piedra Canteada, Tlaxcala. Se hicieron descripciones detalladas de las ectomicorrizas denominadas como morfotipo amarillo, blanco y negro y, posteriormente, se amplificó la región ITS2 de ADNr mediante PCR, utilizando los iniciadores ITS5 e ITS4. Mediante el enfoque combinado de técnicas morfológicas y moleculares, se identificaron los taxones de ectomicorrizas nativas que colonizan el sistema radical de *P. montezumae*. Las ectomicorrizas de los morfotipos amarillo y blanco se identificaron como *Tylospora* sp. y *Aureoboletus* sp., respectivamente. Ambos son nuevos registros de hongos ectomicorrízicos en México. Mientras que la caracterización morfológica fue

suficiente para la identificación del morfotipo negro como *Cenococcum geophilum*. Estos resultados contribuyen al conocimiento de la diversidad fúngica nativa del suelo forestal asociada a *P. montezumae*, cuya presencia y función ecológica favorecen la sostenibilidad de esta área protegida.

Palabras clave: Hongos ectomicorrízicos; ITS; Morfotipos; Piedra Canteada; Tlaxcala

Abstract

Ectomycorrhizal fungi represent an important component of the fungal diversity in Mexico's temperate forests. However, studies characterizing ectomycorrhizae without the use of fruiting bodies are scarce. Therefore, in this study, 3 ectomycorrhizal morphotypes present in the roots of *Pinus montezumae*, inoculated with forest soil containing native ectomycorrhizal mycelium, were characterized from the Piedra Canteada Protected Natural Area, Tlaxcala. Detailed descriptions of the morphotypes, designated as yellow, white, and black, were provided. The ITS2 region of rDNA was subsequently amplified by PCR using the ITS5 and ITS4 primers. Through a combined morphological and molecular approach, the native ectomycorrhizal taxa colonizing the root system of *P. montezumae* were identified. The yellow and white morphotypes were identified as *Tylospora* sp. and *Aureoboletus* sp., respectively. Both are new records of ectomycorrhizal fungi in Mexico. Morphological characterization was sufficient for the identification of the black morphotype as *Cenococcum geophilum*. These results contribute to the knowledge of the native fungal diversity of the forest soil associated with *P. montezumae*, whose presence and ecological function favor the sustainability of this protected area.

Keywords: Ectomycorrhizal fungi; ITS; Morphotypes; Piedra Canteada; Tlaxcala

Introducción

Los bosques templados de México son de gran importancia por conservar la biodiversidad, regular el clima, mejorar la calidad del agua y controlar la erosión, y son refugio de una gran cantidad de especies de flora y fauna silvestre, así como del reino Fungi (González-Ocampo, 2014). Los hongos ectomicorrízicos, parte crucial de la diversidad de hongos de estos bosques, tienen una simbiosis mutualista con coníferas y latifoliadas, que es común con los géneros *Abies*, *Quercus* y *Pinus*, entre otros (Smith y Read, 2008).

En el Centro Ecoturístico Piedra Canteada, Nanacamilpa, Tlaxcala, que abarca 632 ha de bosque y ha sido reconocido como área natural protegida (ANP) desde 1990, se han llevado a cabo prácticas de conservación y restauración del suelo, así como reforestaciones en las zonas degradadas (Flores, 2020), que han permitido la conservación de los recursos naturales del sitio, incluyendo un reservorio significativo de hongos ectomicorrízicos nativos, cuya diversidad aún está poco estudiada. En Piedra Canteada es una práctica común utilizar suelo forestal no esterilizado como sustrato para la producción de plantas en vivero; el cual alberga comunidades de propágulos fúngicos (como micelio o fragmentos de raíces colonizadas) (Karlsen-Ayala et al., 2022). Aunque, al tratarse de un inóculo proveniente de suelo, no se garantiza una distribución homogénea del micelio inoculado y se

ha observado que la distribución de las ectomicorrizas en las raíces inoculadas es heterogénea (Pérez-Moreno y Martínez-Reyes, 2014). La inoculación con este suelo, que contiene propágulos de hongos ectomicorrízicos nativos, favorece la adaptación y el desarrollo de las plantas en campo, puesto que mejora significativamente la supervivencia después del trasplante (Pérez-Moreno y Martínez-Reyes, 2014; Simard et al., 2003). Si bien en Latinoamérica se ha utilizado suelo forestal como fuente de inóculo natural para la producción de planta en vivero y programas de reforestación (Guevara-Rojas, 2019; Gutiérrez-Arancibia, 2019), existe escasa información sobre la identidad de los hongos ectomicorrízicos que forman parte del microbioma edáfico utilizado.

En los bosques de Piedra Canteada predominan los oyameles, encinos y pinos (Herrera et al., 2022). Entre los pinos encontramos principalmente a *Pinus montezumae* Lamb. y sus bosques abarcan aproximadamente una superficie de 14,744.8 km² del territorio nacional, con registros en 18 estados (Aceves-Rangel et al., 2018). *Pinus montezumae* establece asociaciones mutualistas con hongos ectomicorrízicos presentes en suelos forestales, como *Suillus pseudobrevipes*, *Russula abietina*, *Inocybe praetervisa*, *Cenococcum geophilum*, *Clavulina* sp., *Inocybesp.*, *Tomentella* sp. y *Rhizopogon* sp. (Garay-Serrano et al., 2018; Reverchon et al., 2012). Adicionalmente, en años recientes, en el bosque de Piedra Canteada se han descrito nuevas especies de hongos ectomicorrízicos:

Hygrophorus russula, *Boletus erythropus* (Velasco-Bautista et al., 2010), *Laccaria squarrosa* (Herrera et al., 2022), *Xerocomellus piedracanteadensis* (Pérez-Moreno et al., 2025) y *Chalciporus piedracanteadensis* (Ayala-Vásquez et al., 2023), los cuales probablemente también se encuentren asociados a este pino.

La diversidad de hongos ectomicorrízicos en los bosques templados mexicanos ha sido documentada principalmente a partir de la colecta e identificación de esporomas en campo (Guzmán, 2009; Rodríguez-Gutiérrez et al., 2020), lo cual ha permitido ampliar el conocimiento taxonómico y biogeográfico de numerosos taxones ectomicorrízicos asociados a especies forestales. Sin embargo, la composición de especies detectada por este método puede diferir de la observada en las raíces (Horton y Bruns, 2001; Rodríguez-Gutiérrez et al., 2020). Por ello, en ausencia de esporomas, la identificación morfológica y/o molecular debe realizarse a partir de las ectomicorrizas formadas en las raíces o del micelio (Clasen et al., 2018; Sakakibara et al., 2002). Los estudios sobre la identificación, descripción y evaluación de las ectomicorrizas siguen siendo limitados. Esta brecha en el conocimiento representa un área de oportunidad, debido a que la evaluación de las estructuras ectomicorrízicas y el análisis de la colonización de las raíces es requerida para comprender la especificidad hongo-hospedero y su impacto ecológico (Tedersoo y Smith, 2013).

La sistematización de las descripciones morfológicas y anatómicas ha sido impulsada por el desarrollo de bases de datos especializadas que integran caracteres diagnósticos comparables entre taxones, como la Ectomycorrhizae Description Database (EDD) (Goodman et al., 2000) y la plataforma DEEMY (Agerer y Rambold, s.f.), además de diversos artículos internacionales especializados en el área (Janowski y Leski, 2023). No obstante, gran parte de este conocimiento se ha generado en ecosistemas templados de Europa y Norteamérica; mientras que, en México, las descripciones detalladas de ectomicorrizas siguen siendo limitadas y dispersas, lo que dificulta la comparación entre estudios y la identificación taxonómica precisa de las micorrizas presentes en suelos forestales nativos. Además, los factores ambientales y de desarrollo de la planta pueden influir en la expresión morfológica de las ectomicorrizas, introduciendo variabilidad adicional (Clasen et al., 2018).

La amplificación selectiva del ADN fúngico a partir de la región “internal transcribed spacer” (ITS) del ADN ribosomal se ha establecido como el marcador de código de barras estándar para la identificación taxonómica de hongos, incluidos los ectomicorrízicos (Smith et al., 2007). Este marcador permite discriminar numerosos linajes y facilita la comparación con secuencias de

referencia disponibles en bases de datos especializadas (Horton et al., 2002; Smith et al., 2007). Esto es posible incluso cuando el ADN fúngico se encuentra mezclado con el ADN vegetal —como en las raíces micorrizadas— gracias al uso de cebadores específicos como ITS1-F, el cual fue diseñado para unirse selectivamente al ADN de hongos, evitando la amplificación del ADN vegetal (Gardes y Bruns, 1993; Rodríguez-Tovar et al., 2004).

Estos cebadores pueden ser utilizados para estudiar las comunidades de hongos a partir de micelio o de las ectomicorrizas bajo condiciones no controladas, como en campo. En estos escenarios, es común la coexistencia de múltiples especies ectomicorrízicas en las raíces de una misma planta, lo que hace necesario el uso de herramientas moleculares específicas para su identificación (Gardes y Bruns, 1993). Además, es recomendable complementar su identificación con descripciones morfológicas y anatómicas detalladas (Horton y Bruns, 2001; Janowski y Leski, 2023). Esta integración metodológica no solo permite confirmar la identidad taxonómica de las especies presentes, sino también conocer la morfología y anatomía de las ectomicorrizas, que no presentan esporomas visibles, y comprender su papel ecológico en los sistemas radicales.

En este contexto y considerando la relevancia de combinar la caracterización morfológica y molecular para el estudio de las ectomicorrizas nativas, el objetivo del presente trabajo fue caracterizar 3 ectomicorrizas presentes en las raíces de *P. montezumae*, que fueron inoculadas con suelo forestal con propágulos de hongos ectomicorrízicos nativos del ANP de Piedra Canteada, Tlaxcala.

Materiales y métodos

El Centro Ecoturístico y el Área Natural Protegida Piedra Canteada se localiza en la comunidad de San Felipe Hidalgo, en el municipio de Nanacamilpa, estado de Tlaxcala, México (19°27'27" N, 98°36'32" O), ubicado en la Faja Volcánica Transmexicana a 2,800 m snm (INEGI, 2021a) (fig. 1). En esta zona el clima dominante es templado subhúmedo (Cw) (INEGI, 2021b), con una temperatura media anual de 14 °C (1.5 °C min. - 25 °C max.) y una precipitación media de 720 mm anuales (INEGI, 2021a).

Es un área forestal montañosa compuesta de bosques templados donde se pueden encontrar encinos, así como diversas especies de pino, entre ellas *P. montezumae* (Herrera et al., 2022). Su ecosistema, al albergar una gran diversidad de flora y fauna, es reconocido a nivel nacional por ser el principal santuario de las luciérnagas (*Photinus palaciosi*) en Tlaxcala, México, con una superficie de 632

ha, lo que resalta la conservación de su entorno natural (INEGI, 2021a).

Para la producción de las plantas en los viveros comunitarios, se recolecta suelo forestal en áreas donde *P. montezumae* crece de forma natural y se coloca en tubetes de plástico. Sobre este sustrato siembran las semillas de *P. montezumae* y otras especies forestales. De estos viveros se obtuvieron árboles jóvenes de *P. montezumae* (de 5 años de edad), en los que se observaron diferencias visibles en la morfología de las ectomicorrizas presentes en los cepellones, lo que permitió una primera diferenciación por color, textura y forma de las hifas del micelio fúngico. Con base en estos criterios, se reconocieron y se separaron 3 tipos de ectomicorrizas predominantes y se nombraron como morfotipo amarillo, blanco y negro (fig. 2), para ser utilizados como inóculos. Se seleccionó a *P. montezumae* por ser una especie endémica de México, su capacidad de adaptación al clima y suelo local, rápido crecimiento y beneficios ecológicos (Aceves-Rangel et al., 2018; Herrera et al., 2022; Semarnat, 2009); lo que la ha convertido en una especie forestal ideal en el programa de reforestación de Piedra Canteada.

Para la siembra de las semillas de *P. montezumae* se utilizó el sustrato COLPOS, que es una mezcla de arena, corteza de pino y suelo forestal en una proporción 2:2:1 (Rentería-Chávez et al., 2017). Antes de establecer el experimento, el sustrato se esterilizó 3 veces (con un día de descanso entre cada esterilización) con vapor a una presión de 1.3 kg·cm² a 125 °C durante 5 h. Este sustrato ha demostrado favorecer la colonización ectomicorrízica por proporcionar las condiciones óptimas para el crecimiento del hongo y la interacción con las raíces, en comparación con otros sustratos comerciales (Arteaga-León et al., 2018; Barragán-Soriano et al., 2018; Rentería-Chávez et al., 2017).

Las semillas de *P. montezumae* se adquirieron en el banco de germoplasma forestal “Semillas Poblanas Forestales”, ubicado en el Ejido Peñuelas Pueblo Nuevo, Chignahuapan, Puebla. Antes de la siembra, las semillas fueron desinfectadas mediante inmersión en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% durante 20 min, seguido de un enjuague con agua destilada; este procedimiento se realiza para escarificar y desinfectar las semillas (Wenny y Dumroese, 1987).

Para la siembra, se emplearon tubetes de plástico negro de 125 cm³, previamente lavados y desinfectados con alcohol al 70%. Estos fueron llenados hasta 75% de su capacidad con el sustrato COLPOS. Como inóculo se utilizaron rodajas de aproximadamente 5 cm de ancho, tomadas de la parte media de los cepellones de cada tratamiento previamente seleccionados, las cuales se colocaron dentro de cada tubete y, posteriormente, se

cubrieron con una capa adicional de sustrato estéril para proteger el material inoculado (fig. 3A, B). Se obtuvieron 3 tratamientos de inoculación con ectomicorrizas nativas denominadas: morfotipo blanco, morfotipo amarillo y morfotipo negro. Posteriormente, se sembraron 5 semillas de *P. montezumae* por tubete (fig. 3C); obteniendo 135 tubetes por ectomicorriza, los cuales se cubrieron con una estructura de madera cubierta de plástico para evitar contaminación entre tratamientos y se distribuyeron al azar en 2 bancales en el invernadero. Dos meses después de la germinación, se realizó el aclareo, dejando una sola plántula por tubete para optimizar el crecimiento de la raíz y la parte aérea (Pérez-Alavez et al., 2025) (fig. 3D).

Durante el año que duró el experimento, las plantas fueron regadas con agua destilada cada 3 días. Además, durante los primeros 3 meses a partir de la germinación, las plántulas fueron regadas con Captan al 2%, 1 vez a la semana, como método de prevención de hongos patógenos que suelen causar daños severos en etapas tempranas del desarrollo de los pinos. A los 6 meses de crecimiento, se aplicó el insecticida Confidor (Bayer) en una solución de 2 mL del producto en 20 L de agua destilada, para combatir el inicio de la infestación de mosca blanca.

El sistema radical de 5 plántulas, escogidas al azar de cada tratamiento fue caracterizado al año de crecimiento. Las puntas ectomicorrizadas se separaron del resto de la raíz y se colocaron en tubos Eppendorf con agua destilada para su conservación. Posteriormente, se realizaron secciones transversales y longitudinales de forma manual de cada una de las 3 ectomicorrizas. Estas secciones fueron colocadas en portaobjetos y teñidas con rojo Congo al 2% para facilitar la observación de las estructuras características de las ectomicorrizas. Las muestras fueron examinadas mediante microscopía óptica (CX23 Olympus) y microscopía de fluorescencia (Cientec) y se capturaron imágenes que sirvieron de base para llevar a cabo la caracterización morfológica a nivel de género o especie, considerando los rasgos distintivos de cada micorriza.

Para la descripción morfológica de las ectomicorrizas se utilizó la caracterización y medición de las estructuras propuestas por Agerer y Rambold (s.f.); macroscópicamente, se consideró el color del micelio externo, el tipo de ramificación, la longitud de la ectomicorriza y la presencia de rizomorfos. Mientras que las mediciones microscópicas incluyeron el grosor, la organización y disposición del manto, de la red de Hartig y el diámetro, forma y disposición de las hifas.

Para la extracción de ADN, la PCR y la secuenciación, se utilizaron fragmentos de ectomicorrizas representativas de cada uno de los morfotipos, los cuales se separaron y colocaron individualmente en tubos Eppendorf estériles



Figura 1. Ubicación del Centro Ecoturístico y Área Natural Protegida Piedra Canteada, Nanacamilpa, Tlaxcala.



Figura 2. Cepellones colonizados con micelio de hongos ectomicorrízicos de distinta coloración y morfología. A) Morfotipo amarillo; B) morfotipo blanco; C) morfotipo negro.

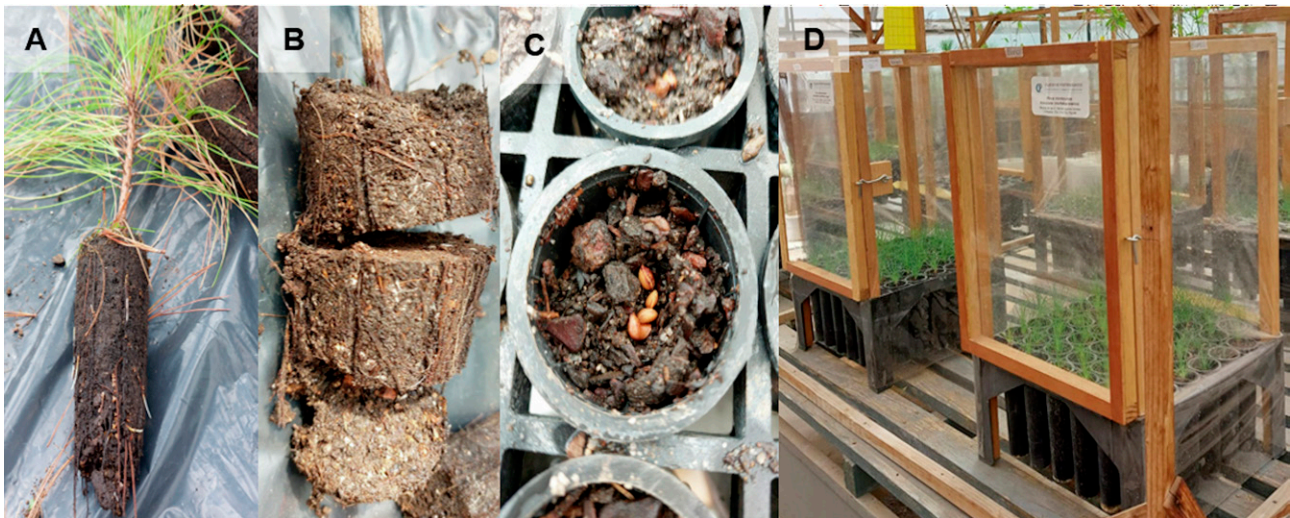


Figura 3. Montaje del experimento. A) Cepellones utilizados como fuente de inóculo; B) corte de secciones en los cepellones para colocarse en los tubetes como inóculo; C) siembra de semillas de *Pinus montezumae*; D) vista de las plántulas después del aclareo por tratamiento, dentro de los prototipos para su protección.

con 3 mL de alcohol al 70% para su conservación. La extracción del ADN genómico se realizó con el kit CTAB (Martínez-González et al., 2017), a partir de 2-3 mg de ectomicorizas. La región ITS2 de ADN_r se amplificó mediante PCR, utilizando los iniciadores ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990). Para la PCR, se utilizó el kit XNAP Redextract, siguiendo las instrucciones del fabricante, con el siguiente programa en el termociclador: 95 °C por 15 s (35 ciclos); 51 °C por 15 s (35 ciclos); 72 °C por 30 s (35 ciclos); 72 °C por 8:00 y 4 °C (infinito). Los productos de PCR se limpiaron con EXOSAP-IT y se verificaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con GelRed (Biotium, EE. UU.). Posteriormente, los productos de la amplificación se purificaron con el kit ExoSAP (Affymetrix, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante para posteriormente ser cuantificados y secuenciados con tecnología Sanger en la empresa Fikus S.A de C.V.

Las secuencias obtenidas se analizaron y editaron con el programa Geneious Prime versión 2025.0.3. Finalmente, se determinó la identidad taxonómica de las ectomicorizas por la similitud nucleotídica de sus secuencias, comparada con las bases de datos de GenBank con 97% de similitud, utilizando la herramienta BLASTn (Altschul et al., 1997).

Resultados

Caracterización morfológica de las ectomicorizas

Ectomicoriza de *Tylospora* sp. con *Pinus montezumae*. El micelio extraradical se encuentra bien

desarrollado y concentrado principalmente en el ápice de las ectomicorizas evaluadas, con exploración de larga distancia, formando una capa de micelio extensa en los cepellones (fig. 4A). Las ectomicorizas presentan un color marrón oscuro con ramificaciones dicotómicas o monopodiales, cuya longitud varía de 3 a 6 mm; son abundantes y se desarrollan de forma homogénea a lo largo de las ramificaciones de las raíces secundarias (fig. 4B). A partir de la superficie del manto algodonoso, se desarrollan abundantes hifas medianamente laxas, de color amarillento hialino, con un grosor de aproximadamente 4 µm, no ramificadas, frecuentemente curvas, con presencia de fíbulas de forma irregular (fig. 4C). La organización y disposición del manto es plectenquimatoso; tiene un grosor de aproximadamente 9 µm, compuesta por 4 capas de hifas cilíndricas entrelazadas, donde se aprecia un manto interno y externo, y recubre completamente hasta la punta de la raíz. La red de Hartig se desarrolla en las primeras 3 capas de células corticales de manera periepidermal y forma lobulada, con hifas septadas (fig. 4D).

Ectomicoriza de *Aureoboletus* sp. con *Pinus montezumae*. El conjunto de hifas conforma un micelio extraradical formando parches en los cepellones (fig. 5A), con exploración de mediana distancia. Las ectomicorizas son de color marrón claro con ramificaciones dicotómicas y coraloides, cuya longitud varía de 4 a 5 mm; son abundantes y se desarrollan de forma agrupada en las raíces secundarias (fig. 5B). Desde el manto externo emergen hifas cilíndricas poco abundantes, con un grosor de 4 µm, no ramificadas, dispuestas de forma laxa, de color blanco-hialino, sin septos ni fíbulas (fig. 5C). El

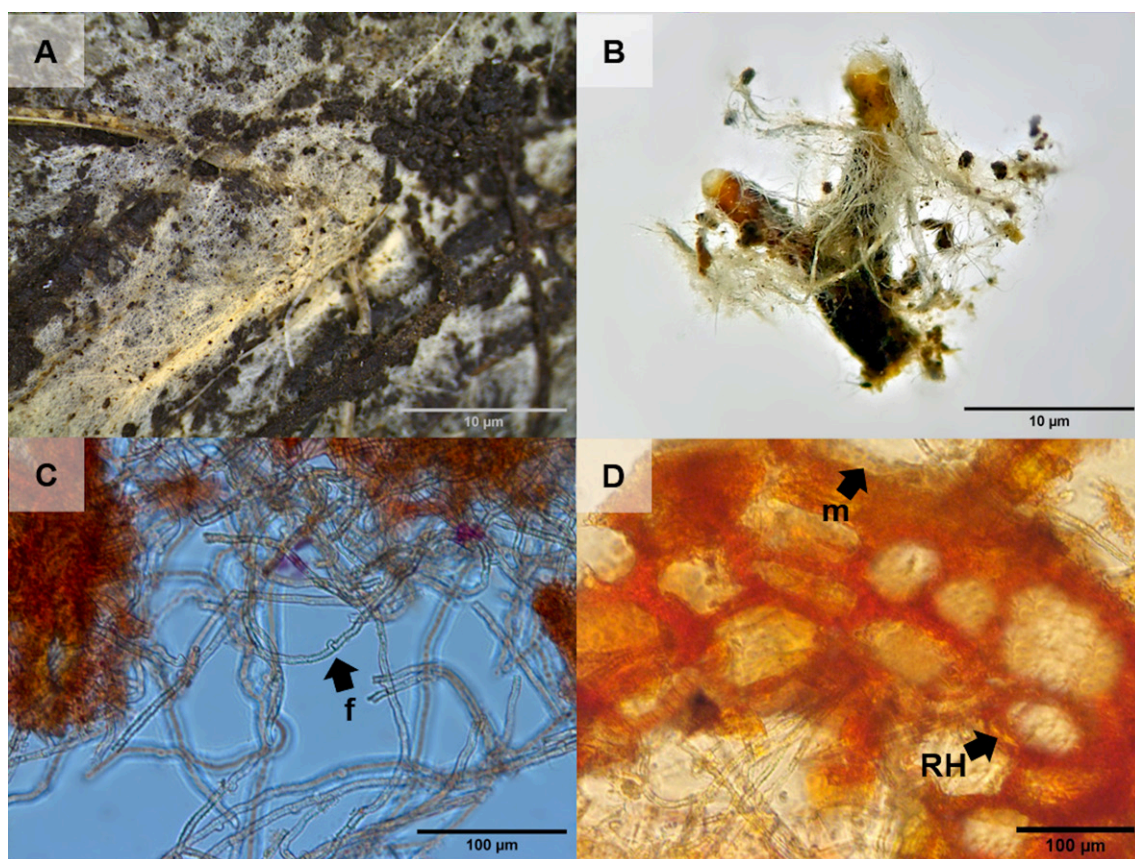


Figura 4. Ectomicorriza de *Tylospora* sp. con *Pinus montezumae*. A) Micelio externo en los cepellones; B) ramificación dicotómica (4 X); C) hifas hialinas desordenadas que conforman el micelio externo: fibulas (f); D) corte transversal de la raíz micorrizada: manto (m), red de Hartig (RH) (40 X).

manto presenta una organización plectenquimatosa, caracterizada por hifas densamente entrelazadas; tiene 3-4 µm de grosor, compuesto por 2 capas de hifas diferenciadas que recubren parcialmente hasta la punta de la raíz o en ocasiones sí la recubren completamente. La red de Hartig se forma en las primeras 2 capas de células corticales, de manera paraepidermal y forma lobulada, con hifas sin septos de paredes delgadas (fig. 5D).

Ectomicorriza de *Cenococcum geophilum* con *Pinus montezumae*. El conjunto de hifas forma un micelio extraradical denso que se observa en todo el cepellón (fig. 6A), con exploración de corta distancia. Las ectomicorrizas son de color negro intenso, con ramificaciones repetidamente dicotómicas, cuya longitud va de 3 a 5 mm; son abundantes y se desarrollan de forma homogénea a lo largo de las ramificaciones de las raíces secundarias (fig. 6B). A partir del manto externo emanan hifas cilíndricas muy abundantes, con grosor de aproximadamente 2 µm, sin ramificaciones, dispuestas de forma laxa a compacta, de color marrón oscuro, con

presencia de septos a distancia irregular (fig. 6C). El manto tiene una organización y disposición plectenquimatosa de hifas densamente entrelazadas, formando un manto grueso de aproximadamente 19 µm. La red de Hartig se forma en las primeras 3 capas de células corticales, de manera periepidermal y forma lobulada, con hifas septadas de paredes gruesas (fig. 6D). Además, hubo presencia de esclerocios, con consistencia firme, de color negro y de forma esférica (fig. 6E).

Caracterización molecular de las ectomicorrizas

Se obtuvieron secuencias de ADN únicamente para las ectomicorrizas de los morfotipos amarillo y blanco, lo que permitió confirmar su identidad. El amarillo fue identificado como *Tylospora* sp., mientras que el blanco correspondió a *Aureoboletus auriporus* (tabla 1); ambos pertenecientes al filo Basidiomycota. *Aureoboletus auriporus* ha sido reportado en EUA, Europa y Asia (Tedersoo et al., 2010). Sin embargo, esta especie no ha sido reportada previamente en México y debido a que no

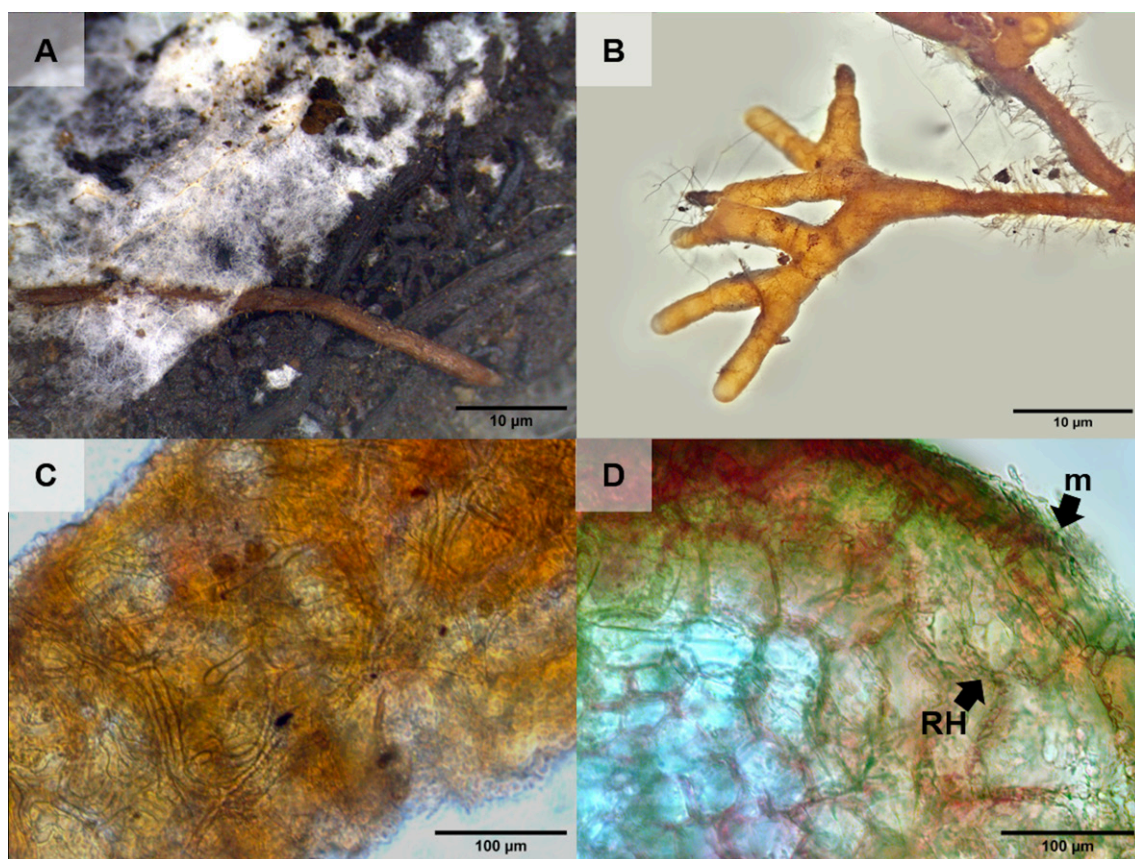


Figura 5. Ectomicorriza de *Aureoboletus* sp. con *Pinus montezumae*. A) Micelio externo en los cepellones; B) ramificación dicotómica (4 X); C) conjunto de hifas hialinas y compactas que conforman el micelio externo; D) corte transversal de la raíz micorrizada mostrando el manto (m) y la red de Hartig (RH) (40 X).

Tabla 1

Identificación de los morfotipos mediante BLASTn en la base de datos de GenBank. %QC = Cobertura de alineamiento; %Id = porcentaje de similitud; GenBank1 = código de acceso de nuestras secuencias; GenBank2 = código de acceso de las secuencias similares a las nuestras; PG = procedencia geográfica de las secuencias similares a las nuestras; cita: citas de los casos donde las secuencias están publicadas.

Morfotipo	GenBank1	Hongo	%QC	% Id	GenBank2	PG/cita
Amarillo	PX579130.1	<i>Tylospora</i> sp.	96	90.07	OL436818.1	Idaho, EUA
			96	81.09	KP814142.1	Florida, EUA/ Rosenthal et al., 2017
			95	90.23	MK131601.1	Nueva Escocia, Canadá
			94	91.12	MN364484.1	Ohio, EUA
Blanco	PX579131.1	<i>(Aureoboletus</i> sp.) <i>Aureoboletus auriporus</i> *	98	89.24	OP749148.1	Indiana, EUA
			97	89.49	OR242630.1	Florida, EUA
			93	90.43	MK560093.1	Indiana, EUA
			90	96.93	JQ924302.1	Costa Rica/Dentinger et al., 2010

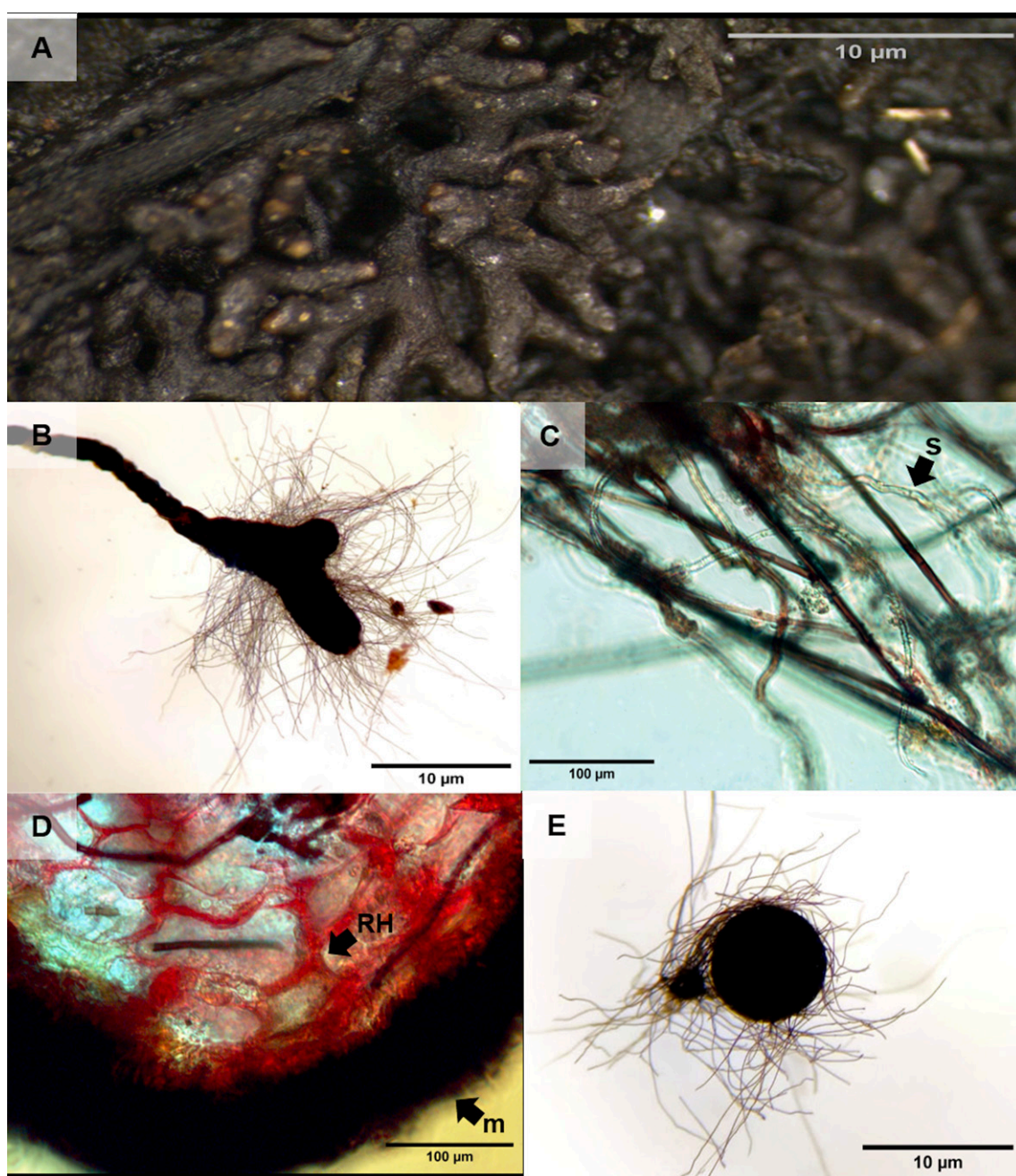


Figura 6. Ectomicorriza de *Cenococcum geophilum* con *Pinus montezumae*. A-B) Morfotipos observados en los cepellones (4 X); C) conjunto de hifas oscuras de septo simple (s) que conforman el micelio externo; D) corte transversal de la ectomicorriza: manto (m), red de Hartig (RH) (40 X); E) esclerocio (4.5 X).

se cuenta con el respaldo taxonómico de un esporoma que permita identificarlo a nivel de especie, se optó por la identificación a nivel de género, es decir, se registró como *Aureoboletus* sp.

Discusión

El aprovechamiento de los recursos naturales en los bosques de Piedra Canteada, mediante la producción, industrialización y comercialización de bienes y servicios, busca generar beneficios colectivos sin comprometer la conservación de los recursos forestales. En este sentido, la caracterización de ectomicorrizas nativas asociadas a *P. montezumae* contribuye al conocimiento de los recursos fúngicos locales (especialmente los hongos ectomicorrízicos nativos) y su potencial aplicación en viveros forestales comunitarios.

La inoculación mediante tierra de monte y/o micelio activo proveniente de los cepellones de plantas en vivero se perfila como una estrategia viable para la producción de plántulas micorrizadas en viveros comunitarios. Este enfoque representa ventajas operativas importantes, ya que el procedimiento es más rápido y eficiente en comparación con la inoculación a partir de esporomas secos (esporas) o la producción de micelio *in vitro* (Pérez-Moreno et al., 2020), cuya preparación requiere infraestructura y equipo de laboratorio que no siempre están disponibles para los habitantes de zonas forestales. Además, la inoculación con micelio activo constituye una práctica potencialmente replicable por los ejidatarios al ser de bajo costo y con alta eficiencia en la micorrización (Pérez-Moreno et al., 2020). Aunado a esto, la disponibilidad de micelio en los cepellones también facilita la caracterización de las ectomicorrizas.

En esta investigación, la inoculación a partir de micelio activo fue crucial para la descripción morfológica de las ectomicorrizas en *P. montezumae*, debido a que 2 de ellas (*Tylospora* sp. y *C. geophilum*) no producen esporomas (Almaraz-Llamas et al., 2019; Baeza-Guzmán et al., 2017; Massicotte et al., 1992), mientras que *Aureoboletus* sp. no ha sido descrito en Piedra Canteada y la caracterización de sus ectomicorrizas aún no está documentada. En micología, la descripción e identificación de especies de hongos se basa principalmente en la morfología de los esporomas y las esporas que estos producen (Janowski y Leski, 2023). No obstante, en estudios como el presente, donde no se observa la formación de esporomas, la identificación a partir de las ectomicorrizas es más compleja ya que en muchos casos no es posible determinar con certeza el taxón correspondiente debido a la falta de información sobre sus características distintivas (Clasen et al., 2018).

Considerando que la morfología de las ectomicorrizas está determinada tanto por la planta hospedera y el simbionte fúngico, como por las condiciones del suelo y los factores ambientales (Clasen et al., 2018), es posible que condiciones específicas del ambiente generen variaciones en la morfología de algunas ectomicorrizas; por ejemplo, afectando la formación del manto fúngico y la estructura de la red de Hartig (Wang et al., 2025b). Sin embargo, la inoculación, formación y desarrollo de las ectomicorrizas bajo condiciones de invernadero pueden reducir la variabilidad en la morfología de las ectomicorrizas y permitir descripciones más precisas.

En este estudio fue fundamental la utilización de un enfoque combinado, utilizando técnicas morfológicas y moleculares para caracterizar las ectomicorrizas e identificar los taxones que colonizaron el sistema radical de *P. montezumae*. Aunque la morfología macro y microscópica del micelio, así como las ectomicorrizas, sugirieron la presencia de ciertos taxones, los análisis moleculares confirmaron la identidad de los hongos ectomicorrízicos presentes en 2 de los tratamientos.

La ectomicorriza formada por *Tylospora* sp. y *P. montezumae*, correspondiente al morfotipo amarillo, forma parte de la familia Atheliaceae, que son hongos formadores de simbiosis ectomicorrízica con varias especies de *Pinus*. En algunos casos, cuando se asocian con *Pinus pseudostrobus*, *P. muricata* y *P. densiflora*, presenta niveles de colonización que varían de bajos a moderados (Huang et al., 2018; Kyaschenko et al., 2017; Rudawska et al., 2011). Mientras que, con otras especies este género es considerado como uno de los taxones dominantes en la colonización de sus raíces en campo; tal es el caso de *Pinus massoniana* (Huang et al., 2018) y *P. montezumae* (Baeza-Guzmán et al., 2017; Reverchon et al., 2012), lo cual puede deberse a que el micelio se extiende abundantemente y se mantiene durante largos periodos (patrón anual), por lo que se le considera una micorriza colonizadora de alto establecimiento, comparado con otros hongos (Garay-Serrano et al., 2018).

En general, el éxito de la familia Atheliaceae en la colonización de raíces de árboles forestales es atribuido a su extenso sistema micelial (Reverchon et al., 2014). En bosques de Inglaterra, diversas especies del género *Tylospora* han sido reportadas como abundantes en el sistema radical del género *Pinus*, alcanzando niveles de colonización de 70%, en condiciones de campo (Palfner et al., 2005). En México solo se ha reportado a *Tylospora* sp. a nivel de género, asociada a *Pinus patula* (Ramírez-Miguel et al., 2021) y *P. montezumae* (Baeza-Guzmán et al., 2017; Reverchon et al., 2012). Es importante mencionar que las características morfológicas de las ectomicorrizas formadas por *Tylospora* reportadas por Ramírez-Miguel

et al. (2021) fueron similares a las encontradas en este estudio. Además, en la base de datos de UNITE existen 58 registros de *Tylospora* sp., por lo que consideramos que este género es abundante en Norteamérica, en asociación estricta con el género *Pinus* (Rosenthal et al., 2017).

Respecto a la ectomicorriza formada por *Aureoboletus* sp. y *P. montezumae*, correspondiente al morfotipo blanco, los resultados de BLAST indicaron que corresponde a *A. auriporus*. Este hongo pertenece la familia Boletaceae y subfamilia Xerocomoideae, el cual se distribuye principalmente en regiones templadas de Asia, Europa y Norteamérica (Tedersoo et al., 2010). *Aureoboletus auriporus* es considerado un complejo de especies (Ayala-Vásquez et al., 2023), ya que está conformado por varias especies crípticas, es decir, organismos genéticamente distintos que presentan una morfología muy similar (Bickford et al., 2007). Por ejemplo, los esporomas de *Aureoboletus gentilis*, *A. viridiflavus* y *A. formosus* suelen ser confundidos entre sí (Zhang et al., 2015).

En adición, la especie *Aureoboletus readii*, que ha sido reportada en México como comestible, también forma parte de este complejo; sin embargo, *A. auriporus* tiene una distribución restringida al este y sureste de EUA, desde Nueva Jersey y Florida hasta Mississippi y Texas (Ayala-Vásquez et al., 2023); aunque existe un reporte inusual de este hongo en un bosque de *Quercus* ubicado en Costa Rica (Dentinger et al., 2010). Dadas las dificultades taxonómicas de este grupo (Zhang et al., 2019), la ausencia de registros confiables de *A. auriporus* en México y la falta de esporomas que permitan una comparación morfológica detallada, la asignación a nivel de especie no fue posible. Aunque el análisis de similitud mediante blast mostró afinidad con secuencias de *A. auriporus*, los valores de identidad (máximo 96.93%) y cobertura (máximo 98%) fueron inferiores a los umbrales comúnmente aceptados para una asignación confiable a nivel de especie (identidad ≥ 98.5 -99%) (Lücking et al., 2020), por lo que se optó por una clasificación conservadora como *Aureoboletus* sp. Actualmente, existen 35 especies de este género, de las cuales, se han registrado 15 en China, 11 en México y 9 en EUA (Ayala-Vásquez et al., 2023). La mayoría de estos estudios se han enfocado en la caracterización morfológica de los esporomas recolectados en campo y/o a su identificación molecular (Tedersoo et al., 2010; Zhang et al., 2015), mientras que la descripción morfológica y anatómica de las ectomicorrizas no ha sido documentada.

Por otro lado, *Aureoboletus* ha sido reportado como formador de ectomicorrizas en plantas de las familias Fagaceae, Betulaceae y Pinaceae (Binder y Hibbett, 2006; Tedersoo et al., 2010). Si bien la simbiosis con *Quercus* es la más común, también se ha registrado su asociación con especies del género *Pinus* (Baeza-Guzmán et al.,

2023; Farid, 2021). No obstante, dichos estudios tampoco han descrito a las ectomicorrizas de *Aureoboletus*. Este estudio constituye el primer reporte de la caracterización morfológica de ectomicorrizas formadas por *Aureoboletus* sp. Además, los resultados obtenidos en esta investigación permiten documentar, por primera vez, la caracterización morfológica y molecular de las ectomicorrizas de *P. montezumae* con *Tylospora* y *Aureoboletus*, sintetizadas a partir de ectomicorrizas nativas, provenientes de rizósferas de plántula de vivero, producida con suelo forestal del ANP de Piedra Canteada, Nanacamilpa, Tlaxcala.

Se seleccionó la región ITS2 como marcador molecular para la identificación de los hongos ectomicorrízicos debido a su adecuada resolución a nivel de género, e incluso especie, en numerosos linajes de hongos (Lücking et al., 2020; Smith et al., 2007). En comparación con ITS1 o con la región ITS completa, ITS2 presenta ciertas ventajas, como una menor variabilidad en longitud, lo que facilita su amplificación y secuenciación (Horton et al., 2002; Smith et al., 2007). Además, ITS2 tiende a mostrar una menor coamplificación de ADN no fúngico, lo cual mejora la especificidad de los análisis (Gardes y Bruns, 1993; Rodríguez-Tovar et al., 2004). Aunque ITS2 resulta útil como marcador universal en hongos (Smith et al., 2007), la identificación taxonómica de ectomicorrizas puede beneficiarse del uso complementario de otros marcadores moleculares específicos. Entre las alternativas más utilizadas se encuentran regiones génicas como LSU (28S), SSU (18S) y genes codificantes de proteínas como RPB1, RPB2 y TEF1- α , los cuales pueden mejorar la resolución filogenética y permitir una delimitación más precisa de especies, para refinar la identificación en linajes complejos en futuras investigaciones que requieran mayor detalle molecular (He et al., 2017).

En esta investigación se presentaron algunas limitaciones en la identificación molecular de la micorriza del morfotipo negro. Esto se encuentra relacionado con dificultades en la amplificación del ADN, debido a la presencia de melanina, que es un pigmento oscuro en la pared celular del hongo, que le confiere tolerancia al estrés (Fernández y Koide, 2013; Netherway y Bahram, 2024) pero que inhibe la PCR (Eckhart et al., 2000; Hu et al., 2015). A pesar de estas limitaciones, *C. geophilum* es considerado un hongo ectomicorrízico de distribución geográfica cosmopolita y muy abundante en suelos y viveros forestales, además de ser una de las ectomicorrizas más estudiadas (Bzdyk et al., 2022). Este taxón no presenta especies estrechamente relacionadas con morfologías ectomicorrízicas similares y posee caracteres diagnósticos distintivos, como son el color negro carbonizado de los morfotipos monopodiales o dicotómicos, abundantes hifas septadas de coloración

café oscuro a negro, abundante micelio extraradical y formación de esclerocios (Almaraz-Llamas et al., 2019; Massicotte et al., 1992; Obase et al., 2017). En este contexto, y considerando el enfoque del presente estudio en ectomicorrizas nativas, la identificación basada en caracteres morfológicos de las raíces colonizadas se considera adecuada y consistente con lo reportado en la literatura (Agerer y Rambold, s.f.; Almaraz-Llamas et al., 2019; Obase et al., 2017; Rodríguez-Gómez-Tagle et al., 2024; Soto-Gil et al., 2022).

Este ascomiceto de la familia Gloniaceae (Spatulifera et al., 2012) tiene un rango muy amplio de hospedadores, de más de 200 especies de árboles, formando ectomicorrizas con más de 40 especies de gimnospermas (como *Abies*, *Picea* y *Pinus*) y angiospermas (varias especies de Fagaceae y Betulaceae) (Douhan et al., 2007). Además, su distribución abarca desde regiones boreales hasta zonas templadas y subtropicales (Obase et al., 2016). En México, ha sido reportado en gran parte del territorio nacional en simbiosis con varias especies forestales, como *Quercus crassifolia* y *Abies religiosa* (Chávez-Aguilar et al., 2020), pero principalmente con pinos: *Pinus greggii*, *P. hartwegii*, *P. maximartinezii*, *P. montezumae* y *P. patula* (Almaraz-Llamas et al., 2019; Rodríguez-Gómez-Tagle et al., 2024; Soto-Gil et al., 2022).

Este hongo se encuentra comúnmente colonizando plantas bajo estrés por sequía, donde mejora las condiciones de absorción de agua y nutrientes (Obase et al., 2011; Zhang et al., 2024). Además, tiene la capacidad de generar resistencia a metales pesados debido a sus paredes melanizadas (Zhang et al., 2024). *Cenococcum geophilum* desempeña un papel crucial en la salud y resiliencia de las plantas hospedadoras (Netherway y Bahram, 2024) y genera oportunidades valiosas para aplicaciones en conservación y restauración ecológica.

El enfoque combinado de técnicas morfológicas y moleculares permitió identificar algunos taxones de ectomicorrizas nativas de suelos forestales que colonizan el sistema radical de *P. montezumae*. El análisis molecular basado en la secuenciación de la región ITS2 del ADN ribosomal fue fundamental para confirmar la identidad de 2 de las ectomicorrizas a nivel de género (*Tylospora* sp. y *Aureoboletus* sp.), superando las limitaciones por la ausencia de esporomas. Ambos géneros representan nuevos registros de hongos ectomicorrízicos en México, asociados de manera natural a suelos del Área Natural Protegida de Piedra Canteada, Tlaxcala, lo que resalta la necesidad de profundizar en su estudio. Asimismo, se demuestra la viabilidad de la técnica de inoculación con rizósfera como una estrategia para seleccionar y propagar germoplasma fúngico local, lo que representa una alternativa accesible para viveros comunitarios. En

conjunto, estos hallazgos destacan el valor ecológico y aplicado de las ectomicorrizas nativas en programas de producción y restauración forestal.

Agradecimientos

A todo el personal del Área Natural Protegida Piedra Canteada, por el buen recibimiento en su bosque y las atenciones prestadas al equipo de trabajo.

Referencias

- Aceves-Rangel, L. D., Méndez-González, J., García-Aranda, M. A. y Nájera-Luna, J. A. (2018). Distribución potencial de 20 especies de pinos en México. *Agrociencias*, 52, 1043–1057.
- Agerer, R., Hartmann, A., Pristich, K., Raidl, S., Schloter, M. y Verma, R. (2012). Plants and their ectomycorrhizosphere: cost and benefit of symbiotic soil organisms. En R. Matyssek, H. Schnyder, W. Obwald, D. Ernst, J. C. Munch y H. Pretzsch (Eds.), *Growth and defence in plants* (pp. 213–242). Heidelberg: Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30645-7_10
- Agerer, R. y Raidl, S. (2004). Distance-related semi-quantitative estimation of the extramatrical ectomycorrhizal mycelia of *Cortinarius obtusus* and *Tylospora asterophora*. *Mycological Progress*, 3, 57–64. <https://doi.org/10.1007/s11557-006-0077-9>
- Agerer, R. y Rambold, G. (s.f.). DEEMY. An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. Recuperado el 03 de septiembre del 2025 de: <http://www.deemy.de/>
- Almaraz-Llamas, A., Pérez-Moreno, J., Torres-Aquino, M., Carcaño-Montiel, M. G. y Hernández Ríos, I. (2019). *Cenococcum geophilum* y su asociación con *Pinus maximartinezii* árbol nativo de México en peligro de extinción. *Scientia Fungorum*, 49, 1–15. <https://doi.org/10.33885/sf.2019.49.1222>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Arteaga-León, C., Pérez-Moreno, J., Espinosa-Victoria, D., Almaraz-Suárez, J. J., Silva-Rojas, H. y Delgado-Alvarado, A. (2018). La inoculación ectomicorrízica con hongos comestibles incrementa el crecimiento vegetal y el contenido nutrimental de *Pinus ayacahuite*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89, 1089–1099. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.4.2235>
- Ayala-Vásquez, O., Martínez-Reyes, M., Pérez-Moreno, J., Martínez-González, C. R., Pinzón, J. P., de la Fuente, J. I. et al. (2023). Five new species of *Aureoboletus* and *Chalciporus* (Boletaceae, Boletales) and their ethnomycological aspects. *Journal of Fungi*, 9, 1041. <https://doi.org/10.3390/jof9101041>

- Baeza-Guzman, Y., Camargo-Ricalde, S. L., Trejo Aguilar, D. y Montano, N. M. (2023). Fungal and bacterial communities in a forest relict of *Pinus pseudostrobus* var. *coatepecensis*. *iForest Biogeosciences and Forestry*, 16, 299–306. <https://doi.org/10.3832/for4284-016>
- Baeza-Guzmán, Y., Medel-Ortiz, R. y Garibay-Orijel, R. (2017). Caracterización morfológica y genética de los hongos ectomicorrízicos asociados a bosques de *Pinus hartwegii* en el Parque Nacional Cofre de Perote, Veracruz. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2017.01.027>
- Barragán-Soriano, J. L., Pérez-Moreno, J., Almaraz-Suárez, J. J., Carcaño-Montiel, M. G. y Medrano-Ortiz, K. I. (2018). Inoculation with an edible ectomycorrhizal fungus and bacteria increases growth and improves the physiological quality of *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Chapingo serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 24, 3–16. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2017.01.010>
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K. et al. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Binder, M. y Hibbett, D. S. (2006). Molecular systematics and biological diversification of Boletales. *Mycologia*, 98, 971–983. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832626>
- Bzdyk, R. M., Sikora, K., Studnicki, M. y Aleksandrowicz-Trzcińska, M. (2022). Communities of mycorrhizal fungi among seedlings of scots pine (*Pinus sylvestris* L.) growing on a clearcut in microsites generated by different site-preparation methods. *Forests*, 13, 353. <https://doi.org/10.3390/f13020353>
- Cairney, J. W. G. y Burke, R. M. (1994). Fungal enzymes degrading plant cell walls: their possible significance in the ectomycorrhizal symbiosis. *Mycological Research*, 98, 1345–1356. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81062-9](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81062-9)
- Chávez-Aguilar, G., Burrola-Aguilar, C., González-Morales, A. y Pérez-Suárez, M. (2020). Almacén de carbono orgánico del suelo y abundancia ectomicorrízica bajo dos especies de coníferas en el Nevado de Toluca, México. *Agro Productividad*, 13, 75–82. <https://doi.org/10.32854/agrop.vi0.1621>
- Clasen, B. E., Silveira, A. D. O., Baldoni, D. B., Montagner, D. F., Jacques, R. J. S. y Antonioli, Z. I. (2018). Characterization of Ectomycorrhizal species through molecular biology tools and morphotyping. *Scientia Agricola*, 75, 246–254. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0419>
- Dentinger, B. T. M., Ammirati, J. F., Both, E. E., Desjardin, D. E., Halling, R. E., Henkel, T. W. et al. (2010). Molecular phylogenetics of porcini mushrooms (Boletus section Boletus). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57, 1276–1292. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.10.004>
- Douhan, G. W., Huryn, K. L. y Douhan, L. I. (2007). Significant diversity and potential problems associated with inferring population structure within the *Cenococcum geophilum* species complex. *Mycologia*, 99, 812–819. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832513>
- Eckhart, L., Bach, J., Ban, J. y Tschachler, E. (2000). Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271, 726–730. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2716>
- Farid, A., Bessette, A. E., Bessette, A. R., Bolin, J. A., Kudzma, L. V., Franck, A. R. et al. (2021). Investigations in the boletes (Boletaceae) of southeastern USA: four novel species and three novel combinations. *Mycosphere*, 12, 1038–1076. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/12/1/12>
- Fernández, C. W. y Koide, R. T. (2013). The function of melanin in the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* under water stress. *Fungal Ecology*, 6, 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2013.08.004>
- Flores, R. (2020). Luciérnagas iluminan la conservación de un bosque en México. Mongabay. Recuperado el 03 de septiembre del 2025 de <https://es.mongabay.com/2020/08/luciernagas-iluminan-la-conservacion-de-un-bosque-en-mexico/>
- Flores-García, A., Pineda-Ojeda, T. y Flores-Ayala, E. (2019). Potencial de reforestación de seis especies de pino para la restauración de zonas degradadas. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10, 171–179. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i55.604>
- Garay-Serrano, E., Ortega-Larrocea, M. P., Reverchon, F. y Suárez-Quijada, I. (2018). Persistence of ecto- and ectendomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* in experimental microcosms. *Symbiosis*, 74, 67–78. <https://doi.org/10.1007/s13199-017-0496-1>
- Gardes, M. y Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2, 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Garibay-Orijel, R., Morales-Marañón, E., Domínguez-Gutiérrez, M. y Flores-García, A. (2013). Caracterización morfológica y genética de las ectomicorrizas formadas entre *Pinus montezumae* y los hongos presentes en los bancos de esporas en la Faja Volcánica Transmexicana. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 153–169. <https://doi.org/10.7550/rmb.29839>
- González-Ocampo, H. A., Cortés-Calva, P., Íñiguez-Dávalos, L. I. y Ortega-Rubio, A. (2014). Las áreas naturales protegidas de México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 60, 7–15.
- Goodman, D. M., Trofymow, J. A. y Thomson, A. J. (2000). Developing an online database of descriptions of ectomycorrhizae. *Journal of Ecosystems and Management*, 1, 1–8. <https://doi.org/10.22230/jem.2001v1n1a211>
- Guerra-De la Cruz, V., Carrillo-Anzures, F. y Acosta-Mireles, M. (2008). El aprovechamiento de los recursos forestales maderables. En V. Guerra-de la Cruz y C. Mallén-Rivera (Comp.), *Tlaxcala, sus recursos forestales: conservación, aprovechamiento y bases para su manejo sustentable. Libro Técnico Núm. 4* (pp. 30–43). Ciudad de México: INIFAP-Cenid-Comef.

- Guerra-De la Cruz, V., Islas-Gutiérrez, F., Flores-Ayala, E., Acosta-Mireles, M., Buendía-Rodríguez, E., Carrillo-Anzures, F. et al. (2019). Modelos locales altura-diámetro para *Pinus montezumae* Lamb. y *Pinus teocote* Schiede ex Schltdl. en Nanacamilpa, Tlaxcala. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10, 133–156. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v10i51.407>
- Guevara-Rojas, M. (2019). *Inoculación con dosis de tierra micorrizada y Suillus luteus comercial en la producción de plántones de Pinus radiata D. Don, en Paquecc (2510 m snm), Huanta – Ayacucho (Tesis-Ingeniería)*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional De San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú.
- Gutiérrez-Arancibia, G. G. (2019). *Tipos y niveles de inóculos de micorrizas en la producción de dos especies de pinos en tubetes, Vivero Forestal Huamanga 2761 msnm, Ayacucho (Tesis-Ingeniería)*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional De San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú.
- Guzmán, G. (2009). La diversidad de hongos en México. *Ciencias*, 39, 52–57.
- He, X. L., Li, Q., Peng, W. H., Zhou, J., Cao, X. L., Wang, D. et al. (2017). Intra- and inter-isolate variation of ribosomal and protein-coding genes in *Pleurotus*: implications for molecular identification and phylogeny on fungal groups. *Bmc Microbiology*, 17, 139. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1046-y>
- Herrera, M., Yu, F. Q., Ramos-Rendón, D., Martínez-Reyes, M., Hernández-Santiago, F., Chater, C. C. et al. (2022). Morphoanatomical and phylogenetic characterization of the ectomycorrhiza between *Laccaria squarrosa* with *Pinus pseudostrobus* and its relevance for reforestation programs. *Botanical Sciences*, 100, 397–411. <https://doi.org/10.17129/botsci.2830>
- Herrera-Hernández, R., López-Upton, J., Muñoz-Gutiérrez, L. y Ramírez-Herrera, C. (2024). Potencial de producción de semilla de *Pinus montezumae* Lambert en el centro de México. *Ciencia Florestal*, 34, e71911. <https://doi.org/10.5902/1980509871911>
- Horton, T. R. (2002). Molecular approaches to ectomycorrhizal diversity studies: variation in ITS at a local scale. *Plant and Soil*, 244, 29–39. <https://doi.org/10.1023/A:1020268020563>
- Horton, T. R. y Bruns, T. D. (2001). The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*, 10, 1855–1871. <https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01333.x>
- Hu, Q., Liu, Y., Yi, S. y Huang, D. (2015). A comparison of four methods for PCR inhibitor removal. *Forensic Science International: Genetics*, 16, 94–97. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.12.001>
- Huang, J., Han, Q. y Li, J. (2018). Soil propagule bank of ectomycorrhizal fungi associated with Masson pine (*Pinus massoniana*) grown in a manganese mine wasteland. *Plos One*, 13, e0198628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198628>
- INEGI. (2021a). *Aspectos geográficos Tlaxcala*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. Recuperado el 25 de agosto del 2025 de https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/areasgeograficas/resumen/resumen_29.pdf
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). (2021b). *Diccionario de datos de climas*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. Recuperado el 25 de agosto del 2025 de https://www.inegi.org.mx/contenidos/productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/702825199258.pdf
- Janowski, D. y Leski, T. (2023). Methods for identifying and measuring the diversity of ectomycorrhizal fungi. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 96, 639–652. <https://doi.org/10.1093/forestry/cpad017>
- Karlsen-Ayala, E., Smith, M. E., Askey, B. C. y Gazis, R. (2022). Native ectomycorrhizal fungi from the endangered pine rocklands are superior symbionts to commercial inoculum for slash pine seedlings. *Mycorrhiza*, 32, 465–480. <https://doi.org/10.1007/s00572-022-01092-3>
- Kyaschenko, J., Clemmensen, K. E., Hagenbo, A., Karlton, E. y Lindahl, B. D. (2017). Shift in fungal communities and associated enzyme activities along an age gradient of managed *Pinus sylvestris* stands. *International Society for Microbial Ecology Journal*, 11, 863–874. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.184>
- Lücking, R., Aime, M. C., Robbertse, B., Miller, A. N., Ariyawansa, H. A., Aoki, T. et al. (2020). Unambiguous identification of fungi: Where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding?. *Ima Fungus*, 11, 14. <https://doi.org/10.1186/s43008-020-00033-z>
- Manzanilla-Quinones, U., Delgado-Valerio, P., Hernández-Ramos, J., Molina-Sánchez, A., García-Magaña J. J. y Rocha-Granados, M. C. (2019). Similitud del nicho ecológico de *Pinus montezumae* y *P. pseudostrobus* (Pinaceae) en México: implicaciones para la selección de áreas productoras de semillas y de conservación. *Acta Botanica Mexicana*, 126, e1398. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1398>
- Martínez-González, C. R., Ramírez-Mendoza, R., Jiménez-Ramírez, J., Gallegos-Vázquez, C. y Luna-Vega, I. (2017). Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (Cactaceae). *Plant Methods*, 13, 82. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0234-y>
- Massicotte, H. B., Trappe, J. M., Peterson, R. L. y Melville, L. H. (1992) Studies on *Cenococcum geophilum*. II. Sclerotium morphology, germination, and formation in pure culture and growth pouches. *Canadian Journal of Botany*, 70, 125–132. <https://doi.org/10.1139/b92-017>
- Netherway, T. y Bahram, M. (2024). Melanized root-associated fungi: key players in plant–soil systems. *Trends in Microbiology*, 12, 1190–1199. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.06.006>
- Obase, K., Douhan, G. W., Matsuda, Y. y Smith, M. E. (2016). Revisiting phylogenetic diversity and cryptic species of *Cenococcum geophilum* sensu lato. *Mycorrhiza*, 26, 529–540. <https://doi.org/10.1007/s00572-016-0690-7>

- Obase, K., Douhan, G. W., Matsuda, Y. y Smith, M. E. (2017). Progress and challenges in understanding the biology, diversity, and biogeography of *Cenococcum geophilum*. En L. Tedersoo (Ed.), *Biogeography of mycorrhizal symbiosis, Vol 230* (pp. 299–317). Cham: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56363-3_14
- Obase K., Lee, J. K., Lee, S. Y. y Chun, K. W. (2011). Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in *Pinus thunbergii* coastal forests in the eastern region of Korea. *Mycoscience*, 52, 383–391. <https://doi.org/10.1007/S10267-011-0123-6>
- Palfner, G., Casanova-Katny, M. A. y Read, D. J. (2005). The mycorrhizal community in a forest chronosequence of Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.] in Northern England. *Mycorrhiza*, 15, 571–579. <https://doi.org/10.1007/s00572-005-0364-3>
- Pérez-Alavez, Y., Rodríguez-Ortiz, G., Santiago-García, W., Martín, M. P., Enríquez-del Valle, J. R. y Aguilar-Pinacho, I. J. (2025). Efectos de aclareos secuenciales en rodal de *Pinus pseudostrobus* Lindl. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 12, e4006.
- Pérez-Moreno, J., Fuentes-García, O., Martínez-Reyes, M., Martínez-González, C. R., Lagunes-Reyes, M., Díaz-Aguilar, I. et al. (2025). The genus *Xerocomellus* (Boletales, Boletaceae) in Mexico: a new species, a new record, and notes on its biocultural importance. *Phytotaxa*, 689, 1–14. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.689.1.1>
- Pérez-Moreno, J. y Martínez-Reyes, M. (2014). Edible ectomycorrhizal mushrooms: biofactories for sustainable development. En R. Guevara-Gonzalez, I. Torres-Pacheco (Eds.), *Biosystems engineering: biofactories for food production in the Century XXI* (pp. 151–233). Cham: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03880-3_6
- Pérez-Moreno, J., Martínez-Reyes, M., Hernández-Santiago, F. y Ortiz-Lopez, I. (2020). Climate change, biotechnology, and mexican neotropical edible ectomycorrhizal mushrooms. En J. Pérez-Moreno, A. Guerin-Laguet, R. Flores-Arzú, F. Q. Yu (Eds.), *Mushrooms, humans and nature in a changing world* (pp. 61–99). Cham: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-37378-8_3
- Pérez-Moreno, J. y 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. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00569.x>
- Ramírez-Miguel, A. A., Hernández-Díaz, A. F., Valenzuela-Encinas, C., Garibay-Orijel, R. y Truong, C. (2021). Hongos ectomicorrízicos asociados a plantas jóvenes de *Pinus patula* y *Quercus crassifolia* en plantaciones del sistema matarrasa de la Sierra Juárez de Oaxaca, México. *Scientia Fungorum*, 51, e1289. <https://doi.org/10.33885/sf.2021.51.1289>
- Rentería-Chávez, M. C., Pérez-Moreno, J., Cetina-Alcalá, V. M., Ferrera-Cerrato, R. y Xoconostle-Cázares, B. (2017). Transferencia de nutrientes y crecimiento de *Pinus greggii* Engelm. inoculado con hongos comestibles ectomicorrízicos en dos sustratos. *Revista Argentina de Microbiología*, 49, 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.06.004>
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M. P., Bonilla-Rosso, G. y Pérez-Moreno, J. (2012). Structure and species composition of ectomycorrhizal fungal communities colonizing seedlings and adult trees of *Pinus montezumae* in Mexican neotropical forests. *Fems Microbiology Ecology*, 80, 479–487. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01314.x>
- Reverchon, F., Ortega-Larrocea, M. P. y Pérez-Moreno, J. (2014). Structure and diversity of ectomycorrhizal resistant propagules in *Pinus montezumae* neotropical forests and implications for seedling establishment. *Mycoscience*, 56, 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2014.06.005>
- Robles-Villanueva, F. A., Rodríguez-Trejo, D. A. y Villanueva-Morales, A. (2017). Calidad de planta y supervivencia en reforestación de *Pinus montezumae* Lamb. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 8, 55–76. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v8i42.19>
- Rodríguez-Gómez Tagle, G., Vargas-Hernández, J. J., López-Upton, J. y Pérez-Moreno, J. (2024). Diversidad de morfotipos de hongos ectomicorrízicos y adaptación al hospedero en poblaciones contrastantes de *Pinus greggii* var. australis (Pinaceae). *Acta Botanica Mexicana*, 24, e2151. <https://doi.org/10.21829/abm131.2024.2151>
- Rodríguez-Gutiérrez, I., Garibay-Orijel, R., Santiago-Morales, B. y Lindig-Cisneros, R. (2020). Comparación entre las abundancias de esporomas y ectomicorrizas del género *Laccaria* en Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91, e913340. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3340>
- Rodríguez-Tovar, A., Xoconostle-Cázares, B. y Valdés, M. (2004). Ecología molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 27, 267–278. <https://doi.org/10.35196/rfm.2004.3.267>
- Rosenthal, L. M., Larsson, K. H., Branco, S., Chung, J. A., Glassman, S. I., Liao, H. L. et al. (2017). Survey of corticioid fungi in North American pinaceous forests reveals hyperdiversity, underpopulated sequence databases, and species that are potentially ectomycorrhizal. *Mycologia*, 109, 115–127. <https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1281677>
- Rudawska, M., Leski, T. y Stasińska, M. (2011). Species and functional diversity of ectomycorrhizal fungal communities on Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) trees on three different sites. *Annals of Forest Science*, 68, 5–15. <https://doi.org/10.1007/s13595-010-0002-x>
- Sakakibara, S. M., Jones, M. D., Gillespie, M., Hagerman, S. M., Forrest, M. E., Simard, S. W. et al. (2002). A comparison of ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis. *Mycological Research*, 106, 868–878. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006263>
- Semarnat (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). (2009). *Restauración de ecosistemas forestales: guía básica para comunicadores*. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-Comisión Nacional Forestal.
- Simard, S. W., Jones, M. D. y Durall, D. M. (2003). Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. En

- M. G. A. van der Heijden y I. R. Sanders (Eds.), *Mycorrhizal ecology*, Vol. 157 (pp. 33–74). Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-38364-2_2
- Smith, M. E., Douhan, G. W. y Rizzo, D. M. (2007). Intra-specific and intra-sporocarp ITS variation of ectomycorrhizal fungi as assessed by rDNA sequencing of sporocarps and pooled ectomycorrhizal roots from a *Quercus woodland*. *Mycorrhiza*, 18, 15–22. <https://doi.org/10.1007/s00572-007-0148-z>
- Smith, S. E. y Read, D. J. (2008). *Mycorrhizal symbiosis*. Nueva York: Academic Press.
- Soto-Gil, A. L., Velázquez-Martínez, A., Pérez-Moreno, J., Fierros-González, A. M. y Martínez-Reyes, M. (2022). Morfotipos ectomicorrícicos en retención estructural variable de *Pinus patula* Schltdl et Cham. *Madera y Bosques*, 28, e2822388. <https://doi.org/10.21829/myb.2022.2822388>
- Spatafora, J. W., Owensby, C. A., Douhan, G. W., Boehm, E. W. A. y Schoch, C. L. (2012). Phylogenetic placement of the ectomycorrhizal genus *Cenococcum* in Gloniaceae (Dothideomycetes). *Mycologia*, 104, 758–765. <https://doi.org/10.3852/11-233>
- Taylor, A. F. S. y Alexander, I. J. (1991). Ectomycorrhizal synthesis with *Tylospora fibrillosa*, a member of the Corticiaceae. *Mycological Research*, 95, 381–384. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)81256-2](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81256-2)
- Tedersoo, L., May, T. W. y Smith, M. E. (2010) Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20, 217–263. <https://doi.org/10.1007/s00572-009-0274-x>
- Tedersoo, L. y Smith, M. E. (2013). Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews*, 27, 83–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbr.2013.09.001>
- Velasco-Bautista, E., Zamora-Martínez, M. C., Nieto de Pascual-Pola, C., Martínez-Valdez, J. I. y Montoya, A. (2010). Modelos predictivos de la producción de hongos silvestres comestibles en bosques de coníferas, Tlaxcala, México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 1, 95–104. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v1i1.657>
- Viveros-Viveros, H., Sáenz-Romero, C., López-Upton, J. y Vargas-Hernández, J. J. (2007). Growth and frost damage variation among *Pinus pseudostrobus*, *P. montezumae* and *P. hartwegii* tested in Michoacán, México. *Forest Ecology and Management*, 253, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.07.005>
- Wang, H., Kohler, A. y Martin, F. M. (2025a). Biology, genetics, and ecology of the cosmopolitan ectomycorrhizal ascomycete *Cenococcum geophilum*. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1502977. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1502977>
- Wang, Y., Zhang, W., Cao, Q., Yang, R., Qin, Y. y Zhang, G. (2025b). Description, identification, and growth of ectomycorrhizae in tuber sinense-mycorrhized *Castanea mollissima* seedlings. *Agriculture*, 15, 868. <https://doi.org/10.3390/agriculture15080868>
- Wenny, D. L. y Dumroese, R. K. (1987). Germination of conifer seeds surface-sterilized with bleach. *Tree Planters' Notes*, 38, 18–21.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. y Taylor, J. W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White (Eds.). *Protocols and applications. A laboratory manual* (pp. 315–322). Nueva York: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zhang, M., Li, T. H., Wang, C. Q., Song, B. y Xu, J. (2015). *Aureoboletus formosus*, a new bolete species from Hunan Province of China. *Mycological Progress*, 14, 118. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1142-z>
- Zhang, M., Li, T. H., Wang, C. Q., Zeng, N. K. y Deng, W. Q. (2019). Phylogenetic overview of *Aureoboletus* (Boletaceae, Boletales), with descriptions of six new species from China. *Myckeys*, 61, 111–145. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.61.47520>
- Zhang, X., Zhang, J., He, J., Li, M., Matsushita, N., Geng, Q. et al. (2024). Physiological and transcriptome responses of *Pinus massoniana* seedlings inoculated by various ecotypes of the ectomycorrhizal fungus *Cenococcum geophilum* during the early stage of drought stress. *Journal of Fungi*, 10, 71. <https://doi.org/10.3390/jof10010071>
- Zhang, P., Zhang, Y., Pang, W., Alonazi, M. A., Alwathnani, H., Rensing, C. et al. (2024). *Cenococcum geophilum* impedes cadmium toxicity in *Pinus massoniana* by modulating nitrogen metabolism. *Science of the Total Environment*, 946, 174296. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.174296>