

00381
4/2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PRUEBAS DE CRECIMIENTO, DESCRIPCION E
IDENTIFICACION DE CULTIVOS DE HONGOS
ECTOMICORRIZOGENOS E INOCULACION CONTROLADA CON
ESPORAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A :

MARIA GUADALUPE/SANTIAGO MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS DR. TEOFILO HERRERA SUAREZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

entregado a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: María Guadalupe Santiago Martínez

FECHA: Aq. 26, 92

FIRMA: Dr. G. Santiago Martínez

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

NO SE PUEDE
REPRODUCIR SIN
AUTORIZACIÓN

A mis padres y mi hermana con
todo cariño, gracias por el apoyo
y amor que siempre me han dado

A todas las personas que de alguna
manera han contribuido a la realización
de este trabajo y que han confiado en mi

El presente estudio se realizó con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto No. 4690, en el laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, bajo la dirección del Dr. Teófilo Herrera Suárez.

AGRADECIMIENTOS

Hago patente el agradecimiento a todas las personas que de alguna manera hicieron posible la realización y culminación de este trabajo.

A los integrantes del Comité Tutorial, por revisar cada semestre los avances del trabajo de investigación
A los miembros del jurado: Dr. Teófilo Herrera Suárez, Dra. Patricia Lappe, Dr. Emmanuel Rincón, Dr. Arturo Estrada, Dra. Lucía Varela, Dra. Evangelina Pérez-Silva y Dr. Joaquín Cifuentes, por la revisión de la tesis, así como por las sugerencias que hicieron al trabajo final

Un agradecimiento especial al Dr. Teófilo por apoyarme académicamente en todos los tramites que se requirieron para poder terminar de escribir la tesis, así como de la paciencia que ha tenido conmigo

También agradezco a los Doctores Arturo Estrada y Lucía Varela por la inapreciable ayuda, apoyo y sugerencias que me dieron para realizar mi trabajo de investigación, así como por la amistad que siempre me han brindado.

A los miembros del laboratorio de Sistemática Alejandro Kong y Adriana Montoya por su ayuda en la identificación del material estudiado.

A las integrantes del laboratorio de Micorrizas Laura Hernández, Yolanda Nava y Gema Galindo que me han apoyado en el área de micorrizas y por su inapreciable amistad.

A Adolfo Castilla, Manuel Hernández y Juan Carlos Muñoz por todo el apoyo que me han brindado en el trabajo de campo, y en especial por su amistad

A todas las personas que han estado y están en el laboratorio trabajando en el área de micorrizas, Araceli, Argelia, Alfredo, Maribel, Mary, Brenda, Rosy, Aurora, Margarito, Lupita, Flor y Enrique

A las autoridades de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

ÍNDICE

Resumen	1
Summary	3
Introducción	5
Antecedentes	6
Definición de Micorriza	6
Tipos de micorrizas	6
Ectomicorriza	6
Origen y evolución de las ectomicorrizas	7
Generalidades sobre ectomicorrizas	7
Hongos simbiotes	7
Plantas simbiotes	8
Beneficios fisiológicos	8
Captación de nutrimentos	9
Beneficios ecológicos	11
Compatibilidad	12
Especificidad	13
Sucesión	14
Distribución de las ectomicorrizas	15
Problemática forestal en México	16
Reforestación y plantaciones forestales	16
Cultivos <i>in vitro</i>	17
Selección de hongos	18
La micorrización en los viveros	19
Técnicas de micorrización en vivero y tipos de inóculo	20
Competencia de los hongos inoculados con los hongos indígenas	22
La inoculación en otros países	23
El uso de los hongos en programas de inoculación	24
Decadencia de los bosques	24
Estudio de los hongos ectomicorrizógenos en México	24
Justificación	26
Objetivo general	27
Metodología general	27
CAPÍTULO I. Optimización del crecimiento de cepas de hongos ectomicorrizógenos	29
Pruebas de crecimiento en diferentes medios nutritivos	30
Pruebas de crecimiento de once cepas de <i>Suillus</i> en diferentes medios nutritivos	39
Influencia del pH en el crecimiento de cepas de hongos ectomicorrizógenos	49
CAPÍTULO II. Pruebas fisiológicas y bioquímicas	63
Parte 1 Crecimiento en temperaturas extremas	64
Parte 2. Efecto de compuestos fungistáticos sobre el crecimiento de algunas cepas de <i>Amanita</i>	69
Efecto de compuestos fungistáticos sobre el crecimiento de algunas cepas de <i>Suillus</i>	75
Parte 3. Degradación de compuestos de carbono y nitrógeno	80
Parte 4. Actividad de la polifenol oxidasa	90
Parte 5. Reacción del micelio con azul de diazonio	97
Parte 6 Análisis de similitud de las cepas de <i>Amanita</i> y <i>Suillus</i>	101

CAPÍTULO III. Síntesis in vitro y caracterización de ectomicorrizas	108
Parte 1. Síntesis <i>in vitro</i> y caracterización de las micorrizas	109
Parte 2. Ectomycorrhizae of <i>Pinus montezumae</i> with <i>Suillus glandulosipes</i> y <i>Suillus</i> cf. <i>pseudobrevipes</i>	119
Parte 3. Pruebas de crecimiento, caracterización en diferentes medios nutritivos y síntesis <i>in vitro</i> de una cepa de <i>Laccaria bicolor</i>	127
Parte 4. La ectomicorriza de <i>Pinus cembroides</i> y <i>Suillus tomentosus</i>	138
CAPÍTULO IV. Inoculación esporal	145
Inoculación esporal	146
CAPÍTULO V. Discusión general y conclusiones generales	157
Discusión general	158
Conclusiones generales	168
Literatura citada	170

RESUMEN

El presente trabajo fue un estudio integral sobre el comportamiento de algunos hongos ectomicorrizógenos aislados en el estado de Tlaxcala, principalmente de los géneros *Amanita* y *Suillus* con el fin de conocer sus habilidades fisiológicas y bioquímicas y su capacidad de asociación con algunos hospederos.

Se realizaron pruebas de crecimiento en diferentes medios nutritivos a cuatro cepas de *Amanita* spp., una de *Boletus* sp., una de *Laccaria bicolor*, una de *Pisolithus arrhizus*, una de *Scleroderma polyrrhizum*, 11 de *Suillus* spp., y una de *Terfezia olbiensis*. Se midieron velocidad media de crecimiento, diámetro final y peso seco, se les aplicó análisis de varianza y pruebas múltiples de Tukey para comparar las respuestas entre cepas. En dichas pruebas se observó que las cepas que presentaron mayor crecimiento fueron las del género *Suillus* spp., en tanto que las cepas que crecieron menos fueron las del género *Amanita*, los medios en los que crecieron mejor la mayoría de las cepas fueron biotina aneurina ácido fólico agar (BAF), papa dextrosa agar (PDA) y Sabouraud agar (SAB).

Se hicieron pruebas de crecimiento en medios sólidos de BAF con pH de 4 a 8. Para estas pruebas se usaron dos cepas de *Amanita* spp., una de *Laccaria bicolor*, dos de *Pisolithus arrhizus*, una de *Rhizopogon* sp., una de *Scleroderma* sp., siete de *Suillus* spp. y una de *Terfezia olbiensis*. Se midieron la velocidad de crecimiento, el diámetro final y el peso seco, aplicando a estos datos análisis de varianza y pruebas múltiples de Tukey, se observó que los pH de 4 a 6 fueron los que permitieron el mayor crecimiento de la mayoría de las cepas, con excepción de *T. olbiensis* que presentó buen crecimiento en pH 7 y 8.

A quince cepas de *Suillus* spp. y siete de *Amanita* spp. se les realizaron pruebas fisiológicas y bioquímicas, tales como: crecimiento en compuestos fungistáticos, crecimiento en diferentes temperaturas, actividad de las enzimas polifenol oxidasa, reacción de las colonias al reactivo azul de diazonio y degradación enzimática de compuestos de carbono y nitrógeno.

La mayoría de las cepas de *Suillus* presentaron tolerancia al benomil, cloruro de sodio, rosa de bengala, verde de malaquita y crecieron a 25 °C, mientras que fueron sensibles a la cicloheximida y no se desarrollaron a 30 °C; algunas cepas no produjeron lacasa ni tirosinasa, otras las produjeron con la misma intensidad y otras más, produjeron solamente tirosinasa; el micelio tratado con KOH presentó una coloración rojiza cuando se le agregó azul de diazonio; estas cepas no degradaron celulosa, lignina ni almidón y solamente *S. tomentosus* degradó débilmente la pectina y *Suillus* cf. *unicolor* los lípidos. La mayoría de cepas degradaron ligeramente la urea.

En cuanto a las cepas de *Amanita*, se observó que presentaron diferentes respuestas ante los compuestos fungistáticos. No crecieron a 30 °C y solamente una cepa de *A. muscaria* se desarrolló a 7 °C; la mayoría de las cepas crecieron a 25 °C. Todas las cepas fueron tirosinasa dominante; presentaron diferentes respuestas cuando el micelio no se trató con KOH y se le agregó azul de

diazonio, la mayoría de las cepas fueron positivas a las lipasas y ureasas y presentaron diferentes respuestas al degradar gelatina y casaminoácidos

Con los resultados obtenidos en las pruebas anteriores se realizó un análisis de similitud comparando el comportamiento de los dos géneros con los resultados reportados en la literatura. En este análisis se observó que se formaron cuatro grupos: 1) cepas de *Suillus* aisladas de Tlaxcala, 2) cepas de *Suillus* reportadas en el extranjero; 3) cepas de *Amanita* aisladas de Tlaxcala; y 4) cepas de *Amanita* del extranjero.

Se comprobó la capacidad simbiótica de *Suillus* spp. *L. bicolor*, *T. olbiensis* y *Rhizopogon* sp. con plántulas de *Pinus montezumae* y *P. cembroides*, realizándose un total de 9 caracterizaciones de los sistemas micorrízicos obtenidos

Las micorrizas que formó *Rhizopogon* sp fueron parecidas a las que se desarrollaron en *Suillus* (dicotómicas a coraloides), pero las de este último género fueron de una coloración café amarillenta, mientras que las de *Rhizopogon* fueron blanquecinas. Las micorrizas de *L. bicolor* con *P. montezumae* son de simples a dicotómicas. Las micorrizas de *T. olbiensis* con *P. cembroides* no mostraron cambios morfológicos aparentes, solamente formaron un manto muy delgado y laxo, con una red de Hartig muy irregular

Se realizaron dos ensayos de inoculación esporal con *P. montezumae*, en uno se aplicaron esporas de *Amanita caesarea* y *Boletus edulis*, utilizando suelo forestal como sustrato, encontrándose que no se formaron micorrizas con las esporas de estos hongos. En el segundo ensayo se emplearon esporas de *Inocybe dulcamara*, *I. griseovelata* y *Suillus glandulosipes*, utilizando suelo extraído del cerro Tepeticpac, mezclado con suelo forestal en una proporción 3:1; en este ensayo se obtuvieron bajos porcentajes de micorrización con los diferentes inóculos. A cada inóculo esporal que se utilizó, se le efectuaron tinciones con sales de tetrazolio y hematoxilina para conocer sus porcentajes de viabilidad y actividad, encontrándose que las esporas de *Amanita caesarea* y *Boletus edulis* no se tiñeron con el metil tetrazolio (MTT) en el tiempo estipulado en la técnica; mientras que los otros inóculos esporales presentaron porcentajes de tinción desde 24 hasta 33 % en las esporas de *Suillus glandulosipes* y del 81 al 83 % en las de *Inocybe*.

En el presente estudio se encontró que las cepas que toleran más el manejo de laboratorio son las pertenecientes al género *Suillus*, por lo que tienen mayor potencial para su uso en plantaciones de pinos, ya sea en forma de inóculo vegetativo o esporal.

La cepa de *Terfezia olbiensis* también podría tener potencial para utilizarse en lugares perturbados, ya que es una cepa que soporta condiciones alcalinas, es de crecimiento relativamente rápido y es capaz de asociarse con *Pinus cembroides*.

SUMMARY

This research is an integral study on the behavior of specific ectomycorrhizal fungi, mainly of the genera *Suillus* and *Amanita*, isolated in the state of Tlaxcala, Mexico, with the purpose of learning about their physiological and biochemical properties, as well as of their capacity of association with certain hosts.

Growth tests on different nutrient media were performed using four strains of *Amanita* spp., one of *Boletus* sp., one of *Laccaria bicolor*, one of *Pisolithus arrhizus*, one of *Scleroderma* sp., eleven of *Suillus* spp., and one of *Terfezia* sp. Mean growth rate, final diameter and dry weight were measured, to which variance analysis and the test of Tukey were applied in order to compare their responses. Through these tests it was observed that the strains of the genus *Suillus* presented the greatest growth, while those that grew least corresponded to the genus *Amanita*, the media where most strains grew best were biotin-aneurin-folic acid (BAF), potato-dextrose-agar (PDA) and Sabouraud (SAB).

Growth tests were carried out using BAF with pH ranging from 4 to 8, using two strains of *Amanita* spp., one of *Laccaria bicolor*, two of *Pisolithus arrhizus*, one of *Rhizopogon* sp., one of *Scleroderma* sp., seven of *Suillus* spp. and one of *Terfezia*. Mean growth rate, final diameter and dry weight were measured and analyzed applying variance analysis and the test of Tukey. It was observed that for most strains a pH ranging from 4 to 6 allowed the greatest growth, while only *Terfezia olbiensis* grew well at pH values between 7 and 8.

Fifteen strains of *Suillus* spp., and seven of *Amanita* spp., were tested for physiological and biochemical properties, such as: growth on fungistatic compounds, growth at different temperatures, polyphenoloxidase enzymatic activity, colony reaction to diazonium blue B staining, and enzymatic degradation of nitrogen and carbon compounds.

Most of the *Suillus* strains were tolerant to benomyl, sodium chloride, Bengal rose, malachite green, and grew well at 25°C; yet were sensitive to cicloheximide and could not develop at 30°C. Some of the strains produced neither laccase nor tyrosinase, some produced them with the same intensity, while others produced only tyrosinase. Mycelium treated with KOH turned red when diazonium blue B was added to the media. These strains did not degrade cellulose, lignin or starch; only *S. tomentosus* degraded pectin mildly and *Suillus* cf. *unicolor* degraded lipids. Most strains degraded urea slightly.

Regarding the *Amanita* strains, different responses to the fungistatic compounds were observed. They did not grow at 30°C and only one strain of *A. muscaria* developed at 7°C, while most strains grew best at 25°C. All strains were dominant for tyrosinase and presented different responses when mycelia was treated with diazonium blue B in the absence of KOH, most strains were positive for lipases, ureases and responded differently while degrading gelatin and casaminoacids.

With the results obtained on the previous tests, a similarity test was carried out in which the behavior of the two genera was compared to those reported in the literature. The formation of four

groups was observed: 1) *Suillus* strains isolated in Tlaxcala, 2) *Suillus* strains isolated elsewhere, 3) *Amanita* strains isolated in Tlaxcala; and 4) *Amanita* strains isolated elsewhere.

The symbiotic capacity of *Suillus* spp., *Laccaria bicolor*, *Terfezia olbiensis* and *Rhizopogon* sp., with *Pinus montezumae* and *Pinus cembroides* plantlets was proven, and a total of nine characterizations of the obtained mycorrhizal systems were performed.

The mycorrhiza formed by *Rhizopogon* was similar to the one developed by *Suillus* (dicotomic to coralloid), except that the latter presented a brown yellowish color, while those of *Rhizopogon* were whitish. The mycorrhiza formed by *Laccaria bicolor* with *Pinus montezumae* was from simple to dichotomous. The mycorrhiza of *Terfezia olbiensis* with *P. cembroides* showed no apparent morphological changes; they formed a very thin and loose mantle with a highly irregular Harting's net.

Two assays of sporal inoculation were carried out on *Pinus montezumae*. In one of them, spores of *Amanita caesarea* and *Boletus edulis* were applied, using forest soil as a substrate, no mycorrhiza were formed with spores of these fungi. In the second assay, spores from *Inocybe dulcamara*, *I. griseovelata* and *Suillus glandulosipes* were tested, using as a substrate soil extracted from the Cerro Tepeticipac mixed with forest soil, in a proportion of 3:1. In this assay, a low percentage of mycorrhization was obtained with the different inoculums. In order to determine the percentages of viability and activity of each sporal inoculum's, they were stained with tetrazolium salts and hematoxilin, *A. caesarea* and *B. edulis* did not stain with MTT in the time period established by the technique. Sporal inoculums from *Suillus glandulosipes* presented stain percentages ranging from 24 to 33% while *Inocybe* from 81 to 83%.

In the present investigation it was determined that the strains that better tolerated laboratory manipulation belonged to the *Suillus* genus, therefore indicating a greater potential for its use in pine plantations, either as sporal or vegetative inoculums.

Due to the fact that the *Terfezia olbiensis* strain withstands alkaline conditions, has a relatively fast growth rate and is able of associating to *Pinus cembroides* it may have the potential to be used in disturbed areas.

INTRODUCCIÓN

Los vegetales se encuentran distribuidos de muy diversas maneras dando lugar a formaciones vegetales que se unen unas a otras conformando biotopos (Villé, 1988). Uno de éstos es el bosque. Éste se encuentra conformado por diversas interrelaciones que hacen al sistema biodiverso y sustentable (Pérez-Moreno, 1995). Sin embargo, debido a la destrucción acelerada de los bosques es necesario tomar medidas tendientes a conservar, restaurar, proteger y aprovechar racionalmente la riqueza forestal existente (SDS e INE, 1993). Una de las condiciones necesarias para que se establezcan y se desarrollen las plantas de interés forestal es la formación de la micorriza.

Se ha reportado que aproximadamente el 90% de las plantas terrestres forman algún tipo de micorriza y que solamente el 10% de la flora del mundo presentan ectomicorriza (Molina *et al.*, 1992a). En esta asociación, los hongos ayudan al crecimiento de las diferentes especies vegetales como los pinos y bajo condiciones naturales son indispensables (Marx, 1980). Las plantas que presentan abundantes micorrizas son más activas fisiológicamente, por aumentar el área de absorción de nutrimentos y agua comparados con plantas con pocas o sin micorrizas (Marx y Cordell, 1994).

La superficie de la raíz fisiológicamente activa puede incrementarse por la extensión micorrízica, además se ha observado que las hifas micorrízicas que se encuentran en el suelo tienen la capacidad de conectar árboles de la misma o diferentes especies (Werner, 1992), formando las denominadas redes interhifales, a través de las cuales se ha observado la transferencia de nutrimentos minerales de una planta hospedera a otra (Brownlee *et al.* 1983).

Por otra parte, se ha comprobado que las ectomicorrizas impiden la colonización de las raíces por patógenos tales como *Phytophthora* (Marx, 1973; Marx y Krupa, 1978) a la vez que inducen una mayor producción de hormonas que incrementan la actividad fisiológica de las raíces (Ek *et al.*, 1983). Sin embargo, no todas las especies de hongos forman ectomicorrizas ni dan el mismo beneficio a sus hospederos bajo condiciones específicas, ya que algunas son más activas que otras (Marx y Cordell, 1994).

Por lo anteriormente mencionado, es necesario conocer las cualidades de las especies nativas de hongos ectomicorrizógenos que existen en las zonas forestales del país y bajo qué condiciones de crecimiento pueden reproducirse así como su potencialidad en los programas de reforestación, ya que éstas están mejor adaptadas a las condiciones edáficas, vegetacionales y climáticas de nuestro país, por lo que su uso en la producción de inoculantes permitirá aumentar la probabilidad de éxito en el establecimiento de los árboles que sean trasplantados en el campo. Un beneficio adicional al realizar estas prácticas es la obtención de hongos comestibles, ya que muchas de las especies forman carpóforos macroscópicos que son utilizados como alimento por las comunidades rurales.

Una forma de conocer la biología de los hongos es por medio de los cultivos puros de las cepas aisladas de los cuerpos fructíferos (Torres, 1992), con estos se puede conocer la capacidad fisiológica o bioquímica de cada cepa en la forma de degradar los compuestos de carbono y nitrógeno, o su resistencia a crecer en condiciones extremas como las de pH o temperatura. Aún cuando se han realizado numerosas descripciones de los cultivos de muchas especies de Hymenomyces saprófitos, en cuanto a hongos ectomicorrizógenos el número de éstas es muy limitado.

Debido a que muchas especies son similares en la morfología colonial y microscópica del cultivo, es difícil diferenciarlas e identificarlas cuando el aislamiento proviene de una ectomicorriza de campo, por lo que Hutchinson y Malloch (1988) sugieren utilizar caracteres fisiológicos y bioquímicos en adición a los caracteres morfológicos.

ANTECEDENTES

DEFINICIÓN DE MICORRIZA

La micorriza es la asociación mutualista entre el micelio de un hongo y las raíces de una planta, la palabra deriva del griego myke y rhiza y significa hongo-raíz, y está basada en los intercambios recíprocos entre vegetales y hongos a través de las raíces e hifas, implicando una serie de interacciones celulares a diferentes niveles en ambos simbioses (Anderson, 1991). La mayoría de las plantas que viven en la superficie terrestre presentan esta asociación, de la cual se han reconocido diferentes tipos de acuerdo con sus características morfo-anatómicas. Cada tipo de micorriza presenta propiedades particulares (Honrubia *et al.*, 1992).

TIPOS DE MICORRIZAS

Las micorrizas están clasificadas con base en las estructuras especializadas que los hongos producen en la raíz, así como por las plantas y hongos asociados. Harley y Smith (1983) describieron varios tipos micorriza arbuscular, arbutoide, monotrofoide, ericoide, orquideoide, ectendomicorriza y ectomicorriza (Marks, 1991).

Ectomicorriza. Se reconoce fácilmente porque cambia la morfología de la raíz, presentándola engrosada y con pérdida de los pelos radicales, además, se forma una cubierta de hifas conocida como manto que rodea a las raíces secundarias. El micelio penetra intercelularmente en el córtex radical dando lugar a un entramado hifal denominado red de Hartig. Los hongos formadores de ectomicorrizas son principalmente miembros de los ascomicetos y basidiomicetos (Honrubia *et al.*, 1992; Marx y Cordell, 1994).

Una forma de conocer la biología de los hongos es por medio de los cultivos puros de las cepas aisladas de los cuerpos fructíferos (Torres, 1992), con estos se puede conocer la capacidad fisiológica o bioquímica de cada cepa en la forma de degradar los compuestos de carbono y nitrógeno, o su resistencia a crecer en condiciones extremas como las de pH o temperatura. Aún cuando se han realizado numerosas descripciones de los cultivos de muchas especies de Hymenomyces saprófitos, en cuanto a hongos ectomicorrizógenos el número de éstas es muy limitado.

Debido a que muchas especies son similares en la morfología colonial y microscópica del cultivo, es difícil diferenciarlas e identificarlas cuando el aislamiento proviene de una ectomicorriza de campo, por lo que Hutchinson y Malloch (1988) sugieren utilizar caracteres fisiológicos y bioquímicos en adición a los caracteres morfológicos.

ANTECEDENTES

DEFINICIÓN DE MICORRIZA

La micorriza es la asociación mutualista entre el micelio de un hongo y las raíces de una planta, la palabra deriva del griego myke y rhiza y significa hongo-raíz, y está basada en los intercambios recíprocos entre vegetales y hongos a través de las raíces e hifas, implicando una serie de interacciones celulares a diferentes niveles en ambos simbioses (Anderson, 1991). La mayoría de las plantas que viven en la superficie terrestre presentan esta asociación, de la cual se han reconocido diferentes tipos de acuerdo con sus características morfo-anatómicas. Cada tipo de micorriza presenta propiedades particulares (Honrubia *et al.*, 1992).

TIPOS DE MICORRIZAS

Las micorrizas están clasificadas con base en las estructuras especializadas que los hongos producen en la raíz, así como por las plantas y hongos asociados. Harley y Smith (1983) describieron varios tipos micorriza arbuscular, arbutoide, monotrofoide, ericoide, orquideoide, ectendomicorriza y ectomicorriza (Marks, 1991).

Ectomicorriza. Se reconoce fácilmente porque cambia la morfología de la raíz, presentándola engrosada y con pérdida de los pelos radicales, además, se forma una cubierta de hifas conocida como manto que rodea a las raíces secundarias. El micelio penetra intercelularmente en el córtex radical dando lugar a un entramado hifal denominado red de Hartig. Los hongos formadores de ectomicorrizas son principalmente miembros de los ascomicetos y basidiomicetos (Honrubia *et al.*, 1992; Marx y Cordell, 1994).

ORIGEN Y EVOLUCIÓN DE LAS ECTOMICORRIZAS

Pirozinski y Hawksworth (1988) afirmaron que la simbiosis es la asociación más estable e íntima y probablemente sea el resultado de la coevolución planta-hongo, entre las que destacan el parasitismo y el mutualismo, además, mencionaron que los hongos son organismos biológicos ideales para interactuar con otros organismos en simbiosis. Taylor (1990) sugirió que las ectomicorrizas se desarrollaron cuando aparecieron las primeras plantas con flores en el carbonífero.

GENERALIDADES SOBRE ECTOMICORRIZAS

Se ha notado que con la presencia del hongo simbiote el crecimiento de las raíces secundarias se reduce tomando el nombre de raíces cortas, estas son colonizadas para formar la micorriza. La forma típica puede ser simple o ramificada. También se ha observado que la estructura de la ectomicorriza está determinada por la planta hospedera (Werner, 1992).

El hongo crece más rápido que la raíz en la zona de colonización, de tal manera que puede envolver la corteza radical con una capa de hifas llamada manto, éste tiene una superficie relativamente compacta con poco micelio radial, aunque también puede ser más laxo. Se ha observado que las hifas de la capa interior del manto contienen más organelos y citoplasma y están embebidas en una matriz de carbohidratos (Werner, 1992).

El micelio que se encuentra rodeando las células de la raíz es llamado Red de Hartig, ésta puede estar restringida a la capa exterior de las células corticales o puede llegar hasta la endodermis. La penetración de las hifas para la formación de esta estructura es tanto mecánica como por excreción de pectinasas. Estas hifas tienen citoplasma denso y numerosas mitocondrias. Se ha observado que un manto bien desarrollado no es requisito para la formación de la red (Werner, 1992).

La vida media de una raíz micorrizada es de alrededor de 9 a 14 meses y muestra un ciclo de desarrollo anual (Werner, 1992). También se ha visto que en los primeros 10 cm del suelo, las micorrizas son jóvenes y bien desarrolladas; sin embargo, a grandes profundidades éstas son escasas, viejas y sufren por falta de oxígeno (Laiho, 1988).

La fertilidad de los suelos puede influir en la estructura de las ectomicorrizas, ya que se ha encontrado que en los lugares moderadamente fértiles, la micorriza de *Vaccinum* y *Myrtillus* presenta un manto delgado y escaso con una red de Hartig bien desarrollada mientras que en lugares más fértiles y ricos en hierbas, tienen un manto delgado y una red de Hartig delgada (Laiho, 1988).

HONGOS SIMBIOTES

La mayoría de los hongos simbiotes que forman ectomicorriza son ascomicetos o basidiomicetos y sólo algunas especies pertenecen al grupo de los zigomicetos (Werner, 1992).

Las formas más importantes de las micorrizas por su abundancia son las formadas por los basidiomicetos, con los géneros *Boletus*, *Leccinum*, *Suillus*, *Russula*, *Cortinarius*, *Amanita*, *Tricholoma* e *Hygrophorus*, *Laccaria*, *Paxillus*, *Cantharellus*, *Gomphidius* e *Hydnum* (Laiho, 1988).

PLANTAS SIMBIONTES

La asociación ectomicorrízica predomina en árboles y arbustos templados o en bosques tropicales con baja diversidad o monoespecíficos. Se han encontrado alrededor de 140 géneros de plantas distribuidas en las familias Dipterocarpaceae, Pinaceae, Fagáceae, Myrtaceae, Salicaceae y Betulaceae que son hospederos de hongos ectomicorrizógenos (Werner, 1992).

BENEFICIOS

La simbiosis micotrófica modifica la morfología y fisiología de la planta incrementando la asimilación de nutrimentos (Pirozynski y Hawksworth, 1988); además, incrementa la longevidad de las raíces, reduce su tasa de crecimiento, y promueve una alta ramificación de las raíces la cual tiene gran efecto sobre la respiración. Se ha observado que todos los nutrimentos pueden ser transportados por las hifas hasta la raíz, la que se vuelve hasta cinco veces más eficiente, esto es porque las hifas son capaces de infiltrarse en los espacios capilares más pequeños del suelo, desarrollando una área superficial activa más grande que la lograda por los pelos radicales (Werner, 1992)

Las plantas ectomicorrizadas son capaces de absorber y acumular nitrógeno, fósforo, potasio y calcio más rápidamente en el manto y por periodos más largos que las no micorrizadas; a través de la asociación se incrementa la tolerancia de los árboles a la sequía, altas temperaturas del suelo, toxinas (orgánicas e inorgánicas) así como acidez o basicidad del suelo, no obstante, no todas las especies de hongos forman ectomicorrizas ni dan el mismo beneficio bajo condiciones específicas, por lo que algunas son más efectivas que otras (Marx y Cordell, 1994)

La producción de hormonas por los hongos es importante para la interacción simbiótica ya que las auxinas, citoquininas, giberelinas y etileno que producen inhiben la formación de pelos radicales, estimulan la ramificación de la raíz y la reestructuración morfológica de las células exteriores del córtex de la raíz (Werner, 1992); también inducen a las raíces para tener una mayor actividad fisiológica que las raíces no micorrizadas (Ek *et al.*, 1983)

Se ha sugerido que los hongos ectomicorrizógenos secretan ácidos orgánicos que precipitan calcio, fierro o aluminio, además de incrementar la disolución de fosfatos en los suelos. Tal acción puede dar alguna explicación de la tolerancia a suelos alcalinos de algunas especies de árboles cuando están micorrizados (Harley y Smith, 1983).

Los hongos pueden proteger a la planta contra patógenos mediante los siguientes mecanismos: 1) La excreción de sustancias antifúngicas y antibióticas; 2) La estimulación de otros microorganismos que inhiben el crecimiento de los patógenos; 3) La producción de antibióticos por el hospedero, bajo el control de los simbiontes; 4) La reducción de fuentes de carbono y fuentes de energía sobre la superficie de la raíz para que las esporas de los patógenos no puedan germinar; 5) La excreción de sideróforos que deprimen el hierro para el patógeno, 6) La protección estructural de la raíz por el manto. Los hongos pueden utilizar una o más combinaciones de estas estrategias (Werner, 1992).

De los antibióticos extraídos y producidos por los hongos, muy pocos han sido identificados químicamente y no se ha explicado su mecanismo de acción; por otro lado, también se ha visto que las raíces colonizadas tienen ocho veces más terpenos volátiles y sesquiterpenos; por ejemplo, *Leucopaxillus cerealis* produce poliacetileno que tiene propiedades fungistáticas y bacteriostáticas (Werner, 1992).

CAPTACIÓN DE NUTRIMENTOS

Se considera que la función primaria de las hifas micorrizógenas es la absorción de nutrientes del suelo, donde la eficiencia relativa de la micorriza en tomar y translocar agua y nutrientes, es resultado tanto de transporte activo, como pasivo (Miller y Allen, 1992). Tal translocación se da en ambas direcciones, ya que, compuestos de carbono derivados de los hospederos son translocados para el crecimiento de las hifas y cuerpos fructíferos (Harley y Smith, 1983).

El nitrógeno y el fósforo son los dos elementos más importantes en la nutrición fúngica, por lo que es bueno considerar su capacidad ecológica ya que pueden existir en los hábitats naturales en muchas formas químicas como los nitratos, amonio, proteínas en el primer caso y fosfatos orgánicos e inorgánicos en el segundo. Además, se puede esperar que el aprovechamiento de las diversas formas tiene influencias selectivas en la presencia de especies particulares en un hábitat. Aunque también, se argumenta que los elementos menores como el zinc, o el calcio, pueden ser igual o más importantes en determinados nichos ecológicos (Jennings, 1989).

Carbohidratos. En los primeros intentos para cuantificar el movimiento del carbono, se mencionó que los compuestos producidos durante la fotosíntesis son transportados al manto e hifas extramatriciales. Se ha calculado que el 15 % de la producción de las plantas es consumida por los hongos, sin embargo, en ocasiones las mismas especies de micobiontes bajo diferentes condiciones fisiológicas inducen diferentes grados de movimiento del carbono y las mismas especies de plantas experimentan diferencias con varias especies de micobiontes (Miller y Allen, 1992).

Los hongos utilizan carbohidratos simples como sacarosa, maltosa, celobiosa, xilosa y arabinosa. La glucosa la convierten a trehalosa y glicógeno y la fructosa a manitol (Werner, 1992).

Es de particular interés el hecho de que se ha encontrado que algunos hongos ectomicorrizógenos pueden utilizar pectina, pero otros no. La habilidad del hongo para hidrolizar pectina y hemicelulosa, podría explicar la penetración de las hifas a la raíz, no obstante, sólo algunas especies han mostrado capacidad pectinolítica (Harley y Smith, 1983).

Nitrógeno. No hay evidencia de que los hongos puedan fijar nitrógeno atmosférico, por lo que las plantas que incrementan las concentraciones de éste lo toman del suelo (Harley y Smith, 1983). Los hongos ectomicorrizógenos tienen la capacidad de utilizar fuentes de nitrógeno orgánicas, incluyendo proteínas y aminoácidos libres, así como inorgánicas tales como amonio y nitratos. Estos hongos también contribuyen a la nutrición del hospedero al convertir el nitrógeno absorbido en formas que metabolizan los hospederos (Miller y Allen, 1992).

Muchos hongos crecen con compuestos de amonio y algunos pueden utilizar nitratos, pero otros no. Se ha observado que la absorción de amonio modifica el pH del medio incrementando o disminuyendo la tasa del crecimiento de los hongos. Existen cepas que utilizan nitratos solamente después de un período de adaptación (Harley y Smith, 1983; Read *et al.*, 1989).

En el suelo, el nitrato es más móvil que el amonio, lo cual se debe a la demanda de éste por las plantas, por lo que la mayoría de los suelos tienen deficiencia de este compuesto (Harley y Smith, 1983).

Fósforo. En suelos húmicos incluyendo los forestales, muchos de los fosfatos (alrededor del 80% o más) están presentes en forma de fitatos (fosfato inositol) que son insolubles (Harley y Smith, 1983; Werner, 1992). Bouher *et al.* (1990) encontraron que, para que las raíces puedan colonizarse por los hongos ectomicorrizógenos, la cantidad óptima de fósforo va de 2-4 mg por Kg⁻¹ de suelo; sin éste se tiene una baja colonización micorrizica, pero con una dosis mayor de 36 mg las raíces no se colonizan.

La translocación del fósforo ocurre a altas tasas dependiendo del metabolismo del hongo, sugiriéndose que se transporta por el citoplasma acarreado por las vacuolas y se almacena en el manto en forma de gránulos de polifosfatos (Gianinazzi-Pearson y Gianinazzi, 1989). Además, estos gránulos contienen altas concentraciones de calcio, por lo que la acumulación de Ca sigue a la de fosfatos (Werner, 1992).

Azufre. El azufre puede estar presente en el suelo en concentraciones relativamente altas y tener mayor movilidad que el fosfato, por lo que la translocación hifal puede no tener mucha importancia en la entrada de los sulfatos. Sin embargo, el hongo tiene efecto en la absorción de este ión. Se ha

demostrado que la fertilización con fosfatos y la colonización micorrízica incrementan la entrada de ^{35}S del suelo a la planta (Harley y Smith, 1983)

Calcio. Análisis recientes de los gránulos de polifosfatos en las hifas de los hongos mostraron que contienen calcio. Este elemento es requerido en trazas por algunos hongos y parece que los ascomicetos y basidiomicetos pueden requerir cantidades más grandes, pero en menor cantidad que las plantas (Harley y Smith, 1983)

Potasio. No se han observado los requerimientos de potasio por los hongos ectomicorrizógenos (Harley y Smith, 1983)

Metales. Se ha observado que los metales pesados pueden reducir la colonización micorrízica influyendo en el crecimiento de la planta, detectándose también que las ectomicorrizas pueden proteger al hospedero contra el zinc (Stribley, 1987).

BENEFICIOS ECOLÓGICOS

Se ha aceptado ampliamente que las plantas en la mayoría de los ecosistemas son colonizadas por hongos micorrizógenos, sin embargo, se han realizado pocos experimentos para investigar la función del mutualismo a nivel de comunidad, ya que las investigaciones dirigidas a cuestiones nutricionales se han enfocado a plantas individuales (Francis y Read, 1994)

Árboles de la misma o de diferente especie pueden estar comunicados entre sí por las hifas de los hongos lo cual permite la transferencia bidireccional de nutrimentos promoviendo el reestablecimiento forestal después de un disturbio, dado que la conexión puede reducir la competencia y promover la recuperación forestal. La habilidad de los hongos para conectar a las plantas depende de la composición y estructura de la materia orgánica de los suelos (Amaranthus y Perry, 1994).

En un sistema donde varias plantas hospederas están interconectadas, la muerte de una de ellas no es importante ya que el hongo está conectado con otras plantas y el almidón almacenado en las raíces de las plantas muertas es solubilizado y traslocado por las hifas a las otras plantas después de aproximadamente 4 semanas (Miller y Allen, 1992)

Se ha mostrado que las raíces micorrizadas son capaces de vivir varios meses después de haber sido eliminada la parte aérea de la planta, disminuyendo su viabilidad con el paso del tiempo, de tal manera que al introducir plántulas de manera natural o artificial éstas pueden ser colonizadas rápidamente por la red de hifas que existe en el suelo. Sin embargo, si las plántulas no se introducen al siguiente año después del corte, la red de micelio se pierde (Miller y Allen, 1992) Por otro lado,

Amaranthus y Perry (1994) mencionaron que las esporas y fragmentos de hifas pueden permanecer metabólicamente viables por más de dos años

COMPATIBILIDAD

El fenómeno de compatibilidad está ligado a la ultraestructura, bioquímica y niveles genéticos de las interacciones entre hongo y planta, en donde el reconocimiento inicial, las alteraciones en la estructura celular y el establecimiento de interfases funcionales son vitales para balancear las relaciones e intercambios de metabolitos (Molina *et al* , 1992b).

El estudio de las interacciones fisiológicas que tienen lugar durante la formación de endo y ectomicorrizas indica que hay genes que regulan los eventos de la interacción a varios niveles, inicialmente en la rizosfera, después en la superficie de la raíz y finalmente en la raíz (Kropp y Anderson, 1994).

A través de experimentos citoquímicos se han podido detectar y localizar azúcares específicos en la interfase hongo-planta, revelando diferencias en la composición de la pared celular entre los tejidos micorrizados y no micorrizados. La adhesión de los hongos a la raíz es mediada por una matriz mucilaginosa que envuelve a la hifa y a la superficie de la raíz, encontrándose que la secreción de glicoproteínas extracelulares son la clave en las asociaciones compatibles. Una capa de polímeros fibrilares extracelulares está presente en la matriz del micelio de algunos hongos antes de la interacción, los cuales son depositados en los lugares de contacto e intervienen en la especificidad con alta afinidad entre el hospedero y su micobionte (Martin *et al.*, 1994b). En contraste, en las interacciones no compatibles este material no es secretado y se retarda? o no se presenta? el desarrollo de la micorriza (Marks, 1991; Martin *et al.*, 1994 a).

Las hidrofobinas producidas durante la formación de la micorriza pueden ser secretadas por las hifas colonizadoras como se ha sugerido para otras interacciones (Martin *et al.*, 1994 b) También se ha observado la presencia de lectinas en las hifas del hongo, las cuales reconocen los componentes de los pelos radicales del hospedero (Kropp y Anderson, 1994).

Se ha encontrado que las plantas micorrizadas contienen altos niveles de compuestos como los isoflavonoides, gliceolin I, coumestrol y diadzein, sugiriéndose que esos niveles de compuestos fenólicos explican la gran resistencia de las plantas a los patógenos. Estos compuestos también podrían impactar a los microorganismos no patógenos (Hetrick, 1989).

Cuando hay incompatibilidad entre simbiosis, la lignina y los polifenoles se juntan en la interfase. Este tipo de respuesta también se presenta con células corticales viejas o cuando el simbionte fúngico activa la liberación de defensas del hospedero (Marks, 1991).

ESPECIFICIDAD

La especificidad se refiere a la asociación de ciertos hongos con algunos hospederos, donde los primeros son aparentemente específicos para un hospedero. En contraste, otros hongos ectomicorrizógenos se asocian con varias plantas formando ectomicorrizas con numerosos géneros de árboles de diversas familias (Marx y Cordell, 1994). Aunque la presencia de un hongo asociado con un hospedero puede o no correlacionarse con la presencia o ausencia de los cuerpos fructíferos (Kropp y Anderson, 1994). De acuerdo con la diversidad de especies de plantas que forman micorriza con las especies fúngicas se pueden apreciar tres categorías de especificidad: estrecha, intermedia y amplia (Molina *et al.*, 1992a).

Intervalo de hospederos estrecho. Puede ser la asociación de un hongo ectomicorrizógeno con una especie de planta. Se ha observado que numerosos hongos forman micorriza o producen esporomas solamente en asociación con un género de planta. Anteriormente mencionas que la clasificación en estrecho intermedio y amplia es de acuerdo con la diversidad de especies de plantas que forman micorriza. En este caso son los hongos quienes tienen un intervalo de hospederos estrecho ya que se asocian solamente con un género de planta.

La especificidad del hospedero con intervalo estrecho presenta muchas presiones de selección, por ejemplo, *Alnus rubra*, es resistente a ser colonizada por hongos de intervalo amplio de hospederos, ya que se asocia únicamente con hongos fuertemente específicos (Molina, 1979), también se ha observado que es resistente a patógenos de la raíz, probablemente porque produce abundantes fenoles radicales (Trappe *et al.*, 1973).

Intervalo de hospederos intermedio. Cuando los hongos están limitados a una familia de hospederos, por ejemplo: *Suillus* y *Rhizopogon* con pináceas.

Muchos hongos fructifican consistentemente con un hospedero en particular, mientras que otros lo hacen con una amplia variedad de hospederos. Sin embargo, la falta de esporomas no implica inhabilidad para formar micorrizas en el campo (Trappe, 1962; Molina y Trappe 1982).

Intervalo de hospederos amplio. Los hongos en esta categoría pueden formar micorrizas con diversas plantas hospederas. Se ha observado que muchos hongos caen en esta categoría, y que gran cantidad de plantas pueden formar micorriza con numerosas especies de hongos (Molina *et al.*, 1992a, 1992b).

La formación de esporomas en los hongos ectomicorrizógenos con amplia gama de hospederos está regulada por el ambiente ya que estos hongos pueden fructificar en invernadero, vivero, plantaciones,

o bosques con hospederos de todas las edades, siempre que la humedad y la temperatura sean los adecuados (Molina *et al.*, 1992a; 1992b)

En general, los hongos micorrizógenos sólo forman un tipo de micorriza; sin embargo, existen excepciones que podrían incluir algunos ascomicetos y basidiomicetos que pueden formar ecto y ectendomicorriza (Molina *et al.*, 1992a; 1992b).

Muchas plantas también pueden mostrar preferencia a una micorriza en particular. Al examinar algunas angiospermas se reporta que solamente el 65% de las especies forman una clase de micorriza, mientras que el 5% forman más de una clase (Trappe, 1987)

La ectomicorriza prevalece sólo en las familias Pinaceae, Fagaceae y Betulaceae (Molina *et al.*, 1992a; 1992b), aunque se ha observado que algunas plantas ericoides forman esta asociación (Largent *et al.*, 1980). La ecto y ectendomicorriza son encontradas comúnmente en el mismo hospedero y algunos hongos ectomicorrizógenos pueden formar micorriza orquideoide (Warcup, 1988) Por otro lado, familias como Salicaceae o Myrtaceae y géneros como *Alnus*, *Salix*, *Populus* y *Eucalyptus* pueden formar micorriza arbuscular o ectomicorrizas en la misma raíz (Chilvers *et al.*, 1987; Molina *et al.*, 1992b). *Arctostaphylos uva-ursi* y *Arbutus menziesii* (ericales) pueden formar micorriza arbutoide y ectomicorriza en cultivo puro con una gran variedad de hongos y en estudios de campo se ha observado que estas plantas proveen de inóculo a pinos y piceas en suelos talados (Molina *et al.*, 1992a).

Especies de plantas pertenecientes a los géneros *Pinus*, *Picea*, *Abies*, *Quercus*, *Fagus* y *Carpinus* son ectomicorrízicas obligadas, mientras que las especies facultativas pertenecen a los géneros *Acer*, *Alnus*, *Betula*, *Corylus*, *Cupressus*, *Eucalyptus*, *Juniperus*, *Salix* y *Ulmus*, indicándose que alrededor del 12 % de las angiospermas son facultativas (Werner, 1992). En este tipo de asociación los simbiontes vegetales son capaces de formar micorriza, pero también son capaces de completar su ciclo de vida sin formar la asociación o formando otro tipo de micorriza (Molina *et al.*, 1992b), en contraste, la rareza con que los hongos producen esporomas en ausencia de sus hospederos, indica relaciones obligadas. El crecimiento de muchos hongos en medios artificiales y la inhabilidad de otros, indica diferencias fisiológicas entre los hongos obligados (Molina *et al.*, 1992a).

SUCESIÓN

La composición de especies de hongos ectomicorrizógenos cambia considerablemente durante el desarrollo del bosque, algunas especies son características de bosques jóvenes, otras, de bosques viejos (Arnolds, 1991; Deacon y Fleming 1992).

En la sucesión de los bosques se presentan hongos característicos de estadios tempranos y otros típicos de estadios tardíos, no obstante, solamente los hongos de estadios tempranos son capaces de colonizar rápidamente las plántulas en un suelo que contiene otros hongos ectomicorrizógenos nativos (Marx y Cordell, 1994)

Cuando los árboles maduran, los hongos de estadios tempranos no desaparecen totalmente; éstos pueden ser suplantados gradualmente por las especies más dominantes o ser suprimidos en su reproducción porque cambiaron las características de la rizosfera (Dighton *et al.*, 1986) Se ha observado que con la edad del rodal se incrementa el número de especies fúngicas (Last *et al.*, 1984).

Marx y Cordell (1994) mencionaron que la sucesión fúngica se mide con la producción de esporomas y está influenciada por los cambios estacionales, la cantidad y frecuencia de lluvias, así como por el contenido orgánico del suelo, la densidad de raíces y el grado de desarrollo de las ectomicorrizas.

Es posible que los cambios de especies micorrizógenas de un hospedero se deban a la competencia entre los hongos inoculados y los nativos, o a los cambios en la fisiología de la planta, desde plántula hasta árbol maduro. En el campo los hongos de los estadios tardíos son capaces de formar micorrizas solamente después de que los hongos de estadios tempranos han desaparecido de la raíz o han perdido su efectividad (Miller y Allen, 1992).

Por otro lado, Werner (1992) mencionó que también existe una sucesión en cuanto a la distancia que existe entre el tronco del árbol y los hongos ectomicorrizógenos ya que en *Betula pubescens* se observó que a los 25 cm del tronco el 10 % de las raíces fueron colonizadas por especies de *Hebeloma*, incrementándose hasta el 50% a una distancia de 100 cm; algunas especies de *Lactarius* su mayor fructificación se observó a los 50 cm de distancia, mientras que *Leccinum* no fructifica a una distancia de 75-100 cm.

DISTRIBUCIÓN DE LAS ECTOMICORRIZAS

Las micorrizas arbusculares y las ectomicorrizas están distribuidas de acuerdo con el bioma. Los hongos ectomicorrizógenos predominan en climas templados, además, de que generalmente se encuentran en suelos con alto contenido de materia orgánica (Allen *et al.*, 1995).

En 1967, Moser (fide Allen *et al.*, 1995) elaboró un mapa de los patrones de distribución de los bosques con micorriza arbuscular y ectomicorriza en el mundo. Básicamente, los bosques con ectomicorriza incluyen bosques de coníferas boreales y templados, altas elevaciones con encinos, pinos, hayas y bosques de coníferas en los trópicos, subtropicos y zonas montañosas de regiones áridas a semiáridas, el bosque de *Eucalyptus* de la Australia templada y el bosque tropical de Malasia y nordeste de Australia. El bosque del sudeste de Asia actualmente está mezclado con micorriza

arbuscular, hay sitios que son ectomicorrizógenos predominantes y lugares que tienen solamente el 10 % de raíces ectomicorrizadas. El bosque tropical es predominante o exclusivamente arbuscular, aunque puede tener algunos árboles ectomicorrizógenos, tales como leguminosas en África y Dipterocarpaceas en India. También se mostró que en bosques tropicales y caducifolios de América Central hay ectomicorrizas, pero hay mucho más micorrizas arbusculares, como es el caso de los bosques tropicales secos de África. Otros bosques con micorriza arbuscular se encuentran en Nueva Zelanda, y en parches como en los bosques de micorriza arbuscular/ectomicorrizas en climas templados (Allen *et al.*, 1995).

PROBLEMÁTICA FORESTAL EN MÉXICO

Uno de los problemas más graves que se vive a nivel mundial es la deforestación. El territorio de México también ve desaparecer la cubierta vegetal gradualmente, constituyendo uno de los casos más graves de deforestación del continente americano, donde el crecimiento de la ganadería extensiva, la extracción inmoderada de madera y otros recursos forestales, así como la práctica de actividades agrícolas sin manejo adecuado, son las principales causas de esta destrucción con la pérdida de casi 40% de los bosques de coníferas y encino (Salas-Portugal, 1996).

Para 1990 la superficie total arbolada nacional se calculó en 49.6 millones de hectáreas, la cual está integrada por bosques de coníferas, latifoliadas y selvas altas, medianas y bajas, por otro lado, el área total de las áreas forestales perturbadas es de 21.6 millones de hectáreas (SARH, 1991-1992)

La FAO (Food and Agricultural Organization) y el programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) situó a México en el tercer lugar de Latinoamérica con una tasa de 500 000 hectáreas de deforestación anual (1981-1985), en tanto que González-Pacheco (1992) la estimó en 400 000 hectáreas por año, tales cifras contrastan con las que arroja la expansión agrícola y, sobretudo, la pecuaria (Toledo, 1988).

REFORESTACIÓN Y PLANTACIONES FORESTALES

Algunas de las medidas que pueden contribuir a la recuperación de la cubierta vegetal del país y hacer un uso sustentable de nuestros recursos bióticos son: la reforestación con especies nativas que permitan la regeneración de suelos y de la vegetación, así como el apoyo a cultivos que favorezcan la conservación de la diversidad biológica y el uso racional de los recursos maderables (Salas-Portugal, 1996).

En México, las áreas que requieren reforestación están severamente erosionadas y el subsuelo expuesto está generalmente compacto, seco, rocoso y es de baja fertilidad. Por el contrario, las prácticas de vivero de uso común favorecen el desarrollo de hongos simbiotes que son capaces de crecer en suelos con alta humedad y fertilidad, pero cuando la planta de este vivero se pasa al campo,

el hongo es incapaz de sobrevivir y crecer en los sitios severamente perturbados, provocando fracasos en las reforestaciones (Valdés, 1986)

La expansión de plantaciones forestales debe llevar consigo el empleo de prácticas que incluyan la inoculación con hongos, ya que se tienen evidencias de estudios de campo que demuestran que éstos mejoran la sobrevivencia de los árboles (Dodd y Thomson, 1994). En numerosos estudios se ha observado la habilidad que tienen algunas especies de hongos para colonizar raíces y para mejorar el crecimiento de árboles en vivero y campo. Estas investigaciones se han basado en coníferas, por su importancia económica en plantaciones forestales, pero también porque han demostrado su dependencia de los hongos simbiotes (Castellano y Molina, 1989; Castellano y Bougher, 1994, Grove y Malajczuk, 1994). Esta simbiosis tiene potencial para su uso en la restauración de suelos, control de la erosión, así como en el incremento en la formación de agregados de partículas de suelos por las hifas extramatriciales e incremento en la diversidad (Dodd y Thomson, 1994).

Desde hace varias décadas, se ha observado que el uso de hongos específicos ha mejorado el rendimiento de plántulas de pino en vivero y campo en varias partes del mundo ya que el desarrollo ectomicorrizógeno es esencial para el establecimiento exitoso de especies de pino en áreas desforestadas (Vozzo y HacsKaylo, 1971; Mikola, 1973). Además, la combinación con hongos simbiotes comestibles sería de gran valor para los países en desarrollo (Valdés, 1986).

El manejo de las ectomicorizas en las plantaciones forestales es más accesible que en otros sistemas de cultivo por la facilidad del cultivo de los hongos, ya que se pueden tener aislamientos a partir de cuerpos fructíferos y prepararse en cultivos puros, alternativamente se pueden utilizar esporas o basidiomas como inóculo, sobretodo en hongos con fructificación profusa (Grove y Malajczuk, 1994).

CULTIVOS *IN VITRO*

El cultivo *in vitro* permite el control riguroso de los factores que intervienen en el desarrollo y crecimiento de las plantas ya que las células poseen un núcleo que es capaz de reproducir las características de su progenitor, sin embargo, el comportamiento de cada organismo es variable en los diferentes medios de cultivo (Augé *et al.*, 1986), por lo que es importante estudiar el comportamiento de cada organismo en diferentes medios nutritivos.

En el caso de los hongos ectomicorrizógenos, el aislamiento y cultivo puro es parte fundamental de cualquier trabajo de investigación sobre ectomicorizas. Estudios sobre la biología y fisiología de las especies fúngicas, la compatibilidad y especificidad con determinados hospederos, la selección de especies o cepas de hongos específicos para la inoculación en vivero, las interacciones con microorganismos, incluidos patógenos, etc., precisan del aislamiento y cultivo de las especies fúngicas con las que se desea trabajar (Torres, 1992).

SELECCIÓN DE HONGOS

Es de gran importancia el estudio de la simbiosis establecida en las raíces de coníferas, especialmente cuando se trata de mejorar el desarrollo de plántulas de vivero en el campo. Por lo que es importante conocer la biota fúngica que se asocia con una especie forestal determinada para poder iniciar la selección de las especies fúngicas más adecuadas y plantear un programa efectivo de inoculación (Torres, 1992).

Cuando se reforestan lugares con plantas que dependen de las micorrizas para desarrollarse adecuadamente y carecen de éstas, el fracaso es inminente, por lo que es necesario dotarlas de los hongos simbiotes adecuados, ya que se persigue incrementar su vigor, el cual se hace evidente en la producción de biomasa vegetal, incremento en altura y grosor de su tallo y en el número de ramificaciones, etc; lo anterior permitirá acelerar los procesos de revegetación en zonas determinadas. En este sentido, numerosos trabajos en Argentina, Australia, Canadá, Francia, España y Estados Unidos, entre otros, han evidenciado la importancia de las inoculaciones controladas con el fin de mejorar la respuesta de las plántulas en campo (Vozzo y HacsKaylo, 1971; Mikola, 1973; Theodorou y Bowen, 1973; Trappe, 1977; Laiho, 1988; Marx *et al.*, 1991; Honrubia *et al.*, 1992), manifestándose sus beneficios después de la plantación en campo (Dixon *et al.* 1981; Ruehle *et al.*, 1981 y Ruehle, 1982; Thomas y Jackson, 1983; Beckjord y McIntosh, 1984; Kropp *et al.*, 1985, Marx y Hatchell, 1986; Valdés, 1986).

El primero y más importante paso en cualquier programa de inoculación de plántulas es la selección de los hongos más aptos, utilizando las diferencias fisiológicas y ecológicas que existen entre ellos. Además de considerar las condiciones extremas del suelo y clima, los antagonistas del suelo incluyendo otros hongos ectomicorrizógenos, la aplicación de pesticidas, el rompimiento físico del micelio por las prácticas culturales del vivero (poda de raíces) y el brusco ajuste fisiológico de la planta que en el vivero tuvo una buena fertilización e irrigación, al cambio hacia el lugar de transplante con baja fertilidad y diversas tensiones ambientales (Dodd y Thomson, 1994; Marx y Cordell, 1994).

El inóculo obtenido a partir de micelio de un hongo ha sido recomendado como el mejor material biológico para inoculación, desafortunadamente, algunos hongos son difíciles de obtener en cultivo puro, otros crecen muy lentamente o nunca se han aislado y crecido en medios de cultivo y otros mueren algunos meses después de su aislamiento. Muchos de estos hongos requieren de factores de crecimiento específicos, como vitaminas (tiamina y biotina) y carbohidratos simples (Marx y Kenney, 1982), así como de otras sustancias aún no determinadas.

La selección de la cepa del hongo que se va a utilizar en inoculaciones de vivero debe ser hecha minuciosamente teniendo en cuenta los siguientes criterios (Molina y Trappe 1984; Álvarez, 1985): **1)** Facilidad de aislamiento; **2)** Capacidad de crecimiento en cultivo puro y resistencia a las

manipulaciones a las que se verá sometida en el proceso de inoculación; **3)** Capacidad de formación de simbiosis con varios hospederos; **4)** Adaptación a las condiciones ecológicas de la localidad donde serán trasplantados, así como adaptación a las condiciones existentes en los viveros; **5)** Producción de rizomorfos (debido a que se cree que incrementan la capacidad del hongo de absorber agua y nutrientes) o producción de esclerocios; **6)** Agresividad y competitividad con otros tipos de hongos existentes en los viveros; **7)** Capacidad de resistencia a hongos patógenos específicos, y **8)** Capacidad de tolerar compuestos tóxicos existentes en el suelo.

LA MICORRIZACIÓN EN LOS VIVEROS

El concepto de formación de micorrizas en los viveros con hongos ecológicamente adaptados a los lugares de trasplante mejora el rendimiento en el campo y fue desarrollado en Hungría por Bokor en 1954; posteriormente los procedimientos fueron refinados en Austria por Theodorou y Bowen en 1973 y en Estados Unidos por Vozzo y Hacskaylo en 1971 (Marx *et al.*, 1991). Estos programas de investigación mostraron que las plántulas con ectomicorrizas específicas exceden el rendimiento en el campo de los que tuvieron pocos hongos en el trasplante (Marx *et al. op. cit.*)

En condiciones de vivero y de campo, la mayoría de las plantas se encuentran micorrizadas en mayor o menor grado por lo que una cuestión primordial es optimizar el estado de micorrización y en consecuencia el estado de salud de las plantas, controlando a los hongos simbiotes de interés, con el objetivo de reintroducirlos a zonas determinadas (Honrubia *et al.*, 1992).

La inoculación en vivero en algunos países es adoptada ampliamente ya que incrementa la eficiencia de las prácticas de vivero así como la higiene por la fumigación o pasteurización que se realiza (Jasper, 1994); aunque aún existen muchos viveristas que temen incorporar hongos a sus cultivos porque los consideran nocivos ya que los relacionan con los que producen el Damping-off (Honrubia *et al.*, 1992).

Se han realizado estudios de efectos de inoculación de árboles jóvenes con más de 500 hongos específicos, donde casi la mitad ha mostrado tener un efecto positivo a la inoculación, aunque, en algunos casos se han detectado efectos negativos (Grove y Malajczuk, 1994).

Con la inoculación en vivero se evitan retrasos en la colonización de las raíces, mejorando la sobrevivencia y crecimiento de la planta en regiones donde el periodo de establecimiento está restringido por la sequía de verano o el frío de invierno, ya que los requerimientos de nutrientes son más grandes en el establecimiento de la plantación (Grove y Malajczuk, 1994).

Los sistemas de vivero están diseñados generalmente para minimizar espacio, costos de labor y materiales, además de proveer plantas con características uniformes y adecuadas para las

plantaciones; así como de manipular factores como tipo de suelo, pH, contenido de humedad, temperatura de enraizamiento, fumigaciones y pasteurizaciones, uso de biocidas y fungicidas (Marx *et al.*, 1982; Cordell *et al.*, 1991). Por ello se sugiere seleccionar aislamientos efectivos en la colonización, que persistan en las raíces, que incrementen el crecimiento de los árboles, que estén adaptados a condiciones extremas y que sean capaces de soportar los cambios que se presentan en las condiciones ambientales desde el paso por el vivero hasta el campo (Dodd y Thomson, 1994; Grove y Malajczuk, 1994).

Cuando el nivel de nutrimentos en los viveros es alto se impide la formación de micorrizas al menos por una temporada y cuando las dosis de fertilización son bajas se forman micorrizas débiles y pobremente ramificadas, mientras que en los suelos minerales su estructura es fuerte (Laiho, 1988). Hay mayor respuesta de crecimiento de la planta cuando se adiciona fósforo solamente en las cantidades necesarias. También se ha visto que altas concentraciones de nitrógeno reducen la colonización, detectándose que el NO_3^- inhibe más la colonización que el NH_4^+ ; aunque las cantidades de cada nutrimento son específicas en cada vivero (Grove y Malajczuk, 1994).

Cuando hay exceso de agua en el suelo, las plantas desarrollan raíces gruesas y carnosas que actúan como esponjas y no permiten la formación de micorrizas, estas plantas carecen totalmente de posibilidades de subsistir en campo. Por otro lado, cuando las plantas se mantienen con escasez de agua también presentan carencia de nutrimentos, manifestándose en la parte aérea y radical (Honrubia *et al.*, 1992).

TÉCNICAS DE MICORRIZACIÓN EN VIVERO Y TIPOS DE INÓCULO

Hay flexibilidad para seleccionar el hongo a inocular, la forma del inóculo, el método de aplicación y las condiciones culturales más adecuadas para la formación de las ectomicorrizas y crecimiento de las plántulas; la elección depende del nivel de sofisticación de los viveros (Grove y Malajczuk, 1994).

Para las ectomicorrizas se distinguen tres tipos de inóculo, de acuerdo con las formas de manipulación de los hongos **a) Inóculo bruto**, sin depurar, que corresponde a los propágulos existentes en el suelo (micelio, rizomorfos, cordones miceliales, esporas, esclerocios, trocitos de raíces micorrizadas, etc.) y del que no se conoce la cantidad y frecuencia-abundancia de las especies o de los mismos propágulos; **b) Inóculo esporal**, constituido por esporas maduras, y **c) Inóculo micelial**, producido en laboratorio y consistente en el micelio aislado y cultivado en medios sintéticos (Honrubia *et al.*, 1992).

Inóculo bruto o forestal. Es el método más simple y ampliamente usado para inocular nuevas áreas, y consiste en extraer suelo forestal y utilizarlo para la producción de planta (Marx y Cordell, 1994). Sin embargo, requiere del movimiento de grandes volúmenes de suelo dando costos de transporte altos y

provocando una gran alteración de la zona de extracción (Honrubia *et al.*, 1992; Torres, 1992; Marx y Cordell 1994).

Los mayores problemas que presenta este sistema de micorrización son de origen biológico ya que se pueden introducir semillas de malas hierbas y patógenos como hongos, bacterias, virus y nemátodos; además, la calidad y cantidad de inóculo micorrizógeno introducido son desconocidas y variables de un año al otro, dependiendo del lugar de procedencia del suelo (Honrubia *et al.*, 1992); asimismo, el suelo no se puede proteger de los recalentamientos y desecación y algunos de los propágulos son sensibles a estos factores (Werner, 1992).

Inóculo micelial. La micorrización con inóculo micelial obtenido de cultivos puros o inoculación vegetativa, es posiblemente el método más seguro, carente de riesgo de introducción de otros organismos no deseables, así como competidores. Es también el más efectivo y con el que se alcanza mayor porcentaje de micorrización en menos tiempo, sin embargo, es el más costoso y de manipulación más sofisticada. Su implantación en los viveros requiere de una adecuación tecnológica de las instalaciones, aunque es interesante observar la productividad (Honrubia *et al.*, 1992).

El punto de partida es la producción del inóculo en el laboratorio, el cual se puede obtener de varias fuentes: por aislamiento y cultivo del micelio extraído directamente de los esporomas, por la germinación de esporas *in vitro*, o por cultivo del micelio a partir de micorrizas (Honrubia *et al.*, 1992)

El micelio se puede producir en mezclas de turba-vermiculita, medio líquido o gotas de alginato. Aunque hay gran interés en el uso de micelio encapsulado en alginato porque tiene las ventajas de alta efectividad por unidad de volumen, se puede almacenar por varios meses, protege el micelio contra las condiciones adversas hasta la colonización de las raíces; sin embargo, existen serias dificultades para encapsular algunas especies de hongos (Grove y Malajczuk, 1994)

Varios investigadores en diversas partes del mundo han desarrollado procedimientos de cultivo puro para la producción de inóculo de una gran variedad de hongos, desafortunadamente, la aplicación en vivero a gran escala siempre involucra solamente unos cuantos miles de plántulas, por la falta de cantidades suficientes de inóculo viable, ya que es relativamente fácil producir un volumen de 30 a 40 litros de inóculo para estudios de investigación, pero es completamente diferente producir material suficiente para comercializar y/o para inoculaciones a gran escala en viveros (Marx y Cordell, 1994)

Inóculo Esporal La inoculación con esporas ha sido ampliamente utilizada, ya que es relativamente fácil de aplicar ya sea mezclándolas con el suelo antes de la plantación, en el riego de las camas o en los contenedores; en pelets de esporas, o baño de las semillas (Grove y Malajczuk, 1994). Además, no requieren de una fase de crecimiento bajo condiciones asépticas (Marx y Cordell, 1994).

Este método puede ser aplicado fácilmente por los viveristas pues no requiere de tecnologías sofisticadas sino el de conocer las especies fúngicas adecuadas (Honrubia *et al.*, 1992). El mayor inconveniente es que algunas especies fúngicas producen pocos esporomas, sus esporas germinan pobremente o presentan baja viabilidad, se desconoce la cantidad de esporas que se requiere y faltan pruebas apropiadas para determinar su viabilidad (Grove y Malajczuk, 1994; Marx y Cordell, 1994).

El inóculo esporal se prepara fácilmente con hongos que producen muchas esporas como *Suillus*, *Rhizopogon*, *Pisolithus*, *Scleroderma*. Algunos de ellos se han probado ofreciendo garantía de su uso durante unos cuantos meses después de su preparación (Honrubia *et al.*, 1992), a pesar de lo expresado por Castellano (1989) quien encontró que las suspensiones de esporas de distintas especies de *Rhizopogon* mantienen su efectividad durante varios años.

Las dosis de aplicación pueden variar según la especie hospedera pero de manera generalizada se utiliza un total de 10^7 esporas por planta. De 5 a 7 carpóforos de las especies de *Suillus*, *Rhizopogon* o *Amanita* dependiendo del estado de maduración, tienen esporas en cantidad suficiente para micorrizar de diez a quince mil pinos en el vivero, aunque conviene comprobar la dosis aplicada y el estado de viabilidad de las esporas para tener la certeza de que las esporas son capaces de germinar en la rizosfera de las plántulas (Honrubia *et al.*, 1992).

Actualmente se encuentran suspensiones esporales comercializadas de varios hongos en algunas empresas forestales privadas, principalmente americanas (Forest Mycorrhizal Application, Oregón) y españolas (Micología Forestal y Aplicada, Barcelona) las cuales tienen a la venta suspensiones esporales de *Suillus*, *Rhizopogon*, *Lactarius*, etc. (Honrubia *et al.*, 1992).

COMPETENCIA DE LOS HONGOS INOCULADOS CON HONGOS INDÍGENAS

El suelo forestal y los suelos no estériles de vivero generalmente contienen hongos micorrizógenos indígenas, y una decisión para introducir inóculos bajo esta circunstancia depende de la efectividad de los hongos nativos cuando se comparan con los hongos inoculados (Dodd y Thomson, 1994). En este caso, se tendrían que utilizar inóculos de hongos que sean competitivos con los nativos (Jasper, 1994), ya que su efectividad depende de la habilidad que tengan para competir (Grove y Malajczuk, 1994).

En una plantación manejada intensivamente es más conveniente que se desarrollen prácticas que den ventajas competitivas a los hongos indígenas, pues se tiene la prioridad de mantener la biodiversidad del ecosistema (Grove y Malajczuk, 1994).

LA INOCULACIÓN EN OTROS PAÍSES

Estados Unidos. Este país ha concentrado sus estudios en *Pisolithus tinctorius*, sus técnicas de inoculación han sido desarrolladas para su uso en sistemas de producción de plántulas y su inóculo está basado en formulaciones comerciales. También se han utilizado siete especies de hongos hipogeos con cuatro especies de coníferas, donde las especies que produjeron numerosas micorrizas fueron *Rhizopogon vinicolor* y *R. colossus* (Marx et al., 1991).

El inóculo de basidiosporas se ha utilizado en escalas experimentales y operacionales, siendo efectivos en varias formas: como pellets o encapsulados en semillas (Marx et al., 1991).

Francia La inoculación en este país tiene dos propósitos: mejorar el crecimiento de los árboles en las reforestaciones y mejorar la producción de hongos comestibles (Le Tacon et al., 1988).

Se han realizado trabajos de inoculación de *Pinus pinaster* con *Suillus granulatus* y *Quercus* spp. con *Tuber melanosporum* o *T. uncinatum* que han sido reproducidos comercialmente para la producción de trufa. Con este sistema, las trufas se obtienen tres o cinco años después del trasplante. Por otro lado, *Laccaria laccata*, *L. bicolor* y *Hebeloma crustuliniforme* forman abundantes micorrizas después de ser inoculados como micelio vegetativo (Marx et al., 1991).

También se ha producido micelio en fermentadores, el cual es encapsulado en alginato de calcio con turba en polvo, determinándose que en esta forma está mejor protegido para sobrevivir más tiempo y es más efectivo que la reproducción en vermiculita (Marx et al., 1991).

Canadá. Las inoculaciones están concentradas en especies de *Pinus*, *Picea* y *Larix*, con cepas de *Laccaria laccata*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Cenococcum geophilum*, *Thelephora terrestris* y *Pisolithus tinctorius*, las cuales son reproducidas en medio líquido (Marx et al., 1991).

Filipinas. De la Cruz y colaboradores y The National Institute of Biotechnology and Applied Microbiology (BIOTECH) elaboran una tableta de arcilla conteniendo basidiosporas de *Pisolithus tinctorius* y una especie de *Sclerotinia*; esta tableta es adicionada a los contenedores con la planta y a los tres meses se pueden observar micorrizas (Marx et al., 1991).

Venezuela. En los viveros de este país se utiliza suelo tratado con inóculo de *Thelephora terrestris* en una plantación de *Pinus caribea* establecida en 1966, este hongo forma micorrizas con plantas de *Pinus caribea*, *P. oocarpa* y *Eucalyptus* spp. (Marx et al., 1991)

Desde 1980 se utilizan basidiosporas de *P. tinctorius* originario de Georgia, Estados Unidos y el nuevo inóculo esporal es recolectado cada año. Este procedimiento da un máximo desarrollo de ectomicorrizas para mejorar la sobrevivencia y crecimiento de las plantas (Marx et al., 1991).

EL USO DE LOS HONGOS EN PROGRAMAS DE INOCULACIÓN EN EL MUNDO

Se ha probado el inóculo vegetativo de once especies en diferentes especies de árboles bajo diferentes condiciones experimentales, estos hongos son: *Amanita muscaria*, *Corticium bicolor*, *Hebeloma cylindrosporum*, *Lactarius rufus*, *Paxillus involutus*, *Rhizopogon roseolus*, *Scleroderma sp.*, *Suillus cothurnatus*, *S. luteus*, *S. variegatus* y *Tricholoma albobrunneum*, dichos hongos están disponibles en Mycorr Tech Inc (Estados Unidos), sin embargo, solamente unas pocas formulaciones vegetativas de estos hongos se han probado para su efectividad bajo condiciones operacionales (Marx *et al.*, 1991)

Además de *P. tinctorius*, el inóculo esporal de otras 18 especies de hongos se han reportado como formadoras de micorrizas con varias especies de árboles bajo condiciones experimentales, estos hongos son: *Hebeloma crustuliniforme*, *Rhizopogon colossus*, *R. luteolus*, *R. nigrescens*, *R. roseolus*, *R. vinicolor*, *Scleroderma auranteum*, *S. dictyosporum*, *S. flavidum*, *S. texense*, *Suillus acidus*, *S. granulatus*, *S. grevillei*, *Tuber aestivum*, *T. brumale*, *T. maculatum*, *T. magnatum* y *T. melanosporum* (Marx *et al.*, 1991).

DECADENCIA DE LOS BOSQUES

Arnolds (1991) mencionó que la decadencia de los bosques se puede deber a la sucesión forestal, la recolección de hongos comestibles, cambios en el manejo del bosque, influencia de la contaminación del aire, acidificación de los suelos y consecuente incremento de la disponibilidad de aluminio, deposición de nitrógeno, incremento en la acumulación de hojarasca, cambios en la capa herbácea y reducción de la vitalidad de los árboles.

Algunas ectomicorrizas parecen ser tolerantes al O₃, mientras que otros son más tolerantes al SO₂. Los cambios en los niveles de los metales pesados pueden afectar directamente a las ectomicorrizas. Se ha observado que altas concentraciones de Cu, Zn o Pb en el suelo hacen que disminuya el número de micorrizas activas, aunque *P. tinctorius* y *Cenococcum geophilum* tienen algunas proteínas que los hace tolerantes a los metales pesados (Werner, 1992).

ESTUDIO DE LOS HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS EN MÉXICO

En nuestro país, los primeros estudios de hongos ectomicorrizógenos consistieron en ensayos donde se inocularon éstos en especies forestales, encontrándose resultados positivos al confrontar varias especies de *Pinus* con algunas cepas exóticas de hongos ectomicorrizógenos (Cuevas-Rangel, 1979; Valdés y Grada-Yautentzi, 1980; Valdés *et al.*, 1983; Estrada-Torres y Valdés, 1986; Valdés, 1986; Quintos y Valdés, 1987; Cigarrero *et al.*, 2002).

Posteriormente, se trabajó con especies de pino, probando especies de hongos ectomicorrizógenos nativos como *Scleroderma texense* y *S. aerolatum* (Orozco-García, 1991), *Cantharellus cibarius*, *Lepista nuda*, *S. verrucosum* y *Pisolithus tinctorius* (Arias y Garza-Ocañas, 1997a y 1997b), *P. tinctorius* (Villa, 1998), *S. glandulosipes* y *Rhizopogon* sp. (Navarro, 2000), *Inocybe griseovelata* y *Suillus tomentosus* (Xochitiotzin, 2000), *S. texense* y un inóculo mixto (Aguilar *et al.*, 2002); *Laccaria* sp. *P. tinctorius* y *Rhizopogon* sp. adicionando ácido fúlvico (Cuevas-Rangel y Zamora-Martínez, 2002); *P. arhizus* y *Cenococcum geophilum* (Orozco *et al.*, 2002). Por otro lado, Bárcenas *et al.* (2000) evaluaron el porcentaje de micorrización de plantas de vivero. Con respecto a otras especies forestales, solamente se cuenta con el estudio de un encino, en el cual se registró que la planta presentó ectomicorriza y micorriza arbuscular (Reyes y Palacios, 1998).

Se han elaborado listados de especies potencialmente micorrizógenas de lugares particulares (Castillo *et al.*, 1979; León y Guzmán, 1980; Quintos *et al.*, 1984; Garza-Ocañas, 1986; Uribe-Arróyave *et al.*, 1997; Pensado y Garza, 1998; Guzmán, 2000; Juárez *et al.*, 2000; Kong-Luz y Estrada-Torres, 2000; Kong-Luz *et al.*, 2000; Parada y Kong-Luz, 2000; Ramírez *et al.*, 2000; Reyes y Aquiahuatl, 2000).

Por otro lado, se han realizado aislamientos de hongos a partir de micorrizas, en los que se observado el antagonismo de estos hongos contra algunos patógenos (Peña-Cabriales y Valdés, 1974). Asimismo, se han obtenido aislamientos a partir de micelio obtenido de cuerpos fructíferos. Estos aislamientos han sido objeto de diferentes estudios: caracterización de los micelios (Ávila, 1988; Cruz-Ulloa, 1990 y 1991; Pérez-Moreno y Ferrera-Cerrato, 1991); optimización del crecimiento de las colonias en diferentes medios nutritivos (Cuaxilo, 1991; Santiago-Martínez y Cuaxilo, 1991; Santiago-Martínez *et al.*, 1995; Aquiahuatl *et al.*, 2000); crecimiento de las colonias en diferentes valores de pH (Vázquez y Santiago-Martínez, 1994), caracterizaciones fisiológicas (Vázquez-Marrufo *et al.*, 1998); fisiología de la glucosa (Galindo-Flores y Estrada-Torres, 1998; Aquiahuatl *et al.*, 1998a); efecto de la utilización de diferentes fuentes de nitrógeno (Aquiahuatl *et al.*, 1998b); obtención y manejo de germoplasma para la síntesis de micorrizas (Tejocote *et al.*, 2000); y métodos de conservación de colonias de hongos (Carranza *et al.*, 1998).

Se han obtenido síntesis *in vitro* y caracterización de las micorrizas producidas con hongos como *Pisolithus tinctorius* (Santiago-Martínez *et al.*, 1993), *Laccaria bicolor* (Santiago-Martínez *et al.*, 1994); *Rhizopogon* sp. (Torres *et al.*, 1997) y *Suillus* spp. (Xicohténcatl *et al.*, 1997)

Asimismo se han realizado estudios de caracterización de micorrizas de campo (Kong-Luz y Santiago-Martínez, 1991; Bárcenas *et al.*, 1996; Garza *et al.*, 1996; Arias y Garza, 1997a; Burrola *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1997).

Por otra parte, se han realizado estudios en plantaciones, en los cuales se describió la morfología de algunas micorrizas y se evaluó su relación con el crecimiento de plantas de pino (López-Olivares y Fierros, 1990; López-Olivares *et al.*, 1990) En lo tocante a aspectos ecológicos del grupo, sólo se cuenta con un estudio realizado con *Tricholoma magnivelaris* (Suárez-Islas y Villareal, 1998) en el que no obstante, se exploró su potencial como comestible y no como ectomicorrizógeno

Los estudios sobre hongos ectomicorrizógenos han aumentado, sin embargo aún falta realizar más estudios en un país tan diverso como es México, tal como lo mencionan Varela y Estrada-Torres (1997).

Zamora *et al* (2002), mencionan que es necesaria una normatividad para el uso de inoculantes de hongos ectomicorrizógenos de origen nacional y de importación, para lo cual se requiere de la participación de los micólogos. Esta acción se debe a que en la producción de plantas de interés forestal, en la mayoría de los viveros de México se utiliza suelo extraído de los bosques como fuente de inóculo para la formación de micorrizas, lo cual conlleva a daños ecológicos; algunos utilizan inóculos del extranjero, lo cual puede alterar diversos aspectos ecológicos por la introducción de especies exóticas.

Es importante mencionar que la mayoría de los trabajos citados aquí son resúmenes de congresos y solamente unos cuantos constituyen artículos publicados en revistas especializadas.

JUSTIFICACIÓN

La destrucción acelerada de los ecosistemas forestales hace necesario realizar estudios de sus diferentes componentes bióticos, como son los árboles y los organismos con los que se asocian, en especial aquellos que les proporcionan beneficios como los hongos mutualistas que favorecen una buena nutrición y crecimiento vegetal

El conocimiento de las especies de hongos ectomicorrizógenos existentes en las zonas forestales del país es aún precario, tanto en el ámbito ecológico como al nivel de laboratorio, ya que se desconocen las condiciones de crecimiento bajo las cuales pueden reproducirse, así como su potencialidad en los programas de reforestación. Por ello, es necesario conocer las cualidades de los hongos nativos del país, que pueden estar bien adaptados a las condiciones ambientales de nuestro país y de esta manera, aumentar la probabilidad de éxito en el establecimiento de las plantaciones forestales.

Por otra parte, se han realizado estudios en plantaciones, en los cuales se describió la morfología de algunas micorrizas y se evaluó su relación con el crecimiento de plantas de pino (López-Olivares y Fierros, 1990; López-Olivares *et al.*, 1990) En lo tocante a aspectos ecológicos del grupo, sólo se cuenta con un estudio realizado con *Tricholoma magnivelaris* (Suárez-Islas y Villareal, 1998) en el que no obstante, se exploró su potencial como comestible y no como ectomicorrizógeno

Los estudios sobre hongos ectomicorrizógenos han aumentado, sin embargo aún falta realizar más estudios en un país tan diverso como es México, tal como lo mencionan Varela y Estrada-Torres (1997).

Zamora *et al* (2002), mencionan que es necesaria una normatividad para el uso de inoculantes de hongos ectomicorrizógenos de origen nacional y de importación, para lo cual se requiere de la participación de los micólogos. Esta acción se debe a que en la producción de plantas de interés forestal, en la mayoría de los viveros de México se utiliza suelo extraído de los bosques como fuente de inóculo para la formación de micorrizas, lo cual conlleva a daños ecológicos; algunos utilizan inóculos del extranjero, lo cual puede alterar diversos aspectos ecológicos por la introducción de especies exóticas.

Es importante mencionar que la mayoría de los trabajos citados aquí son resúmenes de congresos y solamente unos cuantos constituyen artículos publicados en revistas especializadas.

JUSTIFICACIÓN

La destrucción acelerada de los ecosistemas forestales hace necesario realizar estudios de sus diferentes componentes bióticos, como son los árboles y los organismos con los que se asocian, en especial aquellos que les proporcionan beneficios como los hongos mutualistas que favorecen una buena nutrición y crecimiento vegetal

El conocimiento de las especies de hongos ectomicorrizógenos existentes en las zonas forestales del país es aún precario, tanto en el ámbito ecológico como al nivel de laboratorio, ya que se desconocen las condiciones de crecimiento bajo las cuales pueden reproducirse, así como su potencialidad en los programas de reforestación. Por ello, es necesario conocer las cualidades de los hongos nativos del país, que pueden estar bien adaptados a las condiciones ambientales de nuestro país y de esta manera, aumentar la probabilidad de éxito en el establecimiento de las plantaciones forestales.

Los cultivos de hongos tienen características micro y macromorfológicas particulares, sin embargo no han podido utilizarse para determinar la identidad de las cepas obtenidas a partir de micorrizas de campo debido a que carecen de estructuras reproductoras que pueden utilizarse en el proceso de identificación. No obstante, con el afán de diferenciar grupos ecológicos basados en su modo de nutrición en la literatura se ha propuesto una serie de pruebas bioquímicas y fisiológicas que pueden ayudar a diferenciarlos.

Por estas razones, se planeó hacer un estudio integrado que muestre las necesidades nutricionales de algunos hongos ectomicorrizógenos para que tengan buen crecimiento en medios de cultivo específicos, los pH a los cuales crecen mejor, sus cualidades fisiológicas y bioquímicas y su compatibilidad con algunos hospederos. Con estos resultados se espera poder hacer recomendaciones acerca del uso y manejo de algunos hongos en vivero y campo, así como conocer las características fisiológicas y bioquímicas de varias cepas de hongos ectomicorrizógenos mexicanos.

OBJETIVO GENERAL

CONOCER LA BIOLOGÍA DE ALGUNOS HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS, MEDIANTE PRUEBAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

METODOLOGÍA GENERAL

En el trabajo se estudió un total de 31 cepas de hongos ectomicorrizógenos, pertenecientes a los siguientes taxa: *Amanita* spp. (9 cepas), *Boletus* sp. (1), *Laccaria bicolor* (1), *Pisolithus arhizus* (2), *Rhizopogon* sp. (1), *Scleroderma polyrhizum* (1), *Suillus* spp. (15) y *Terfezia olbiensis* (1); aisladas de carpóforos procedentes de diferentes localidades del estado de Tlaxcala, con excepción de una cepa que procede de Oaxaca (Cuadro 1); Las cepas se encuentran depositadas en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Los cultivos de hongos tienen características micro y macromorfológicas particulares, sin embargo no han podido utilizarse para determinar la identidad de las cepas obtenidas a partir de micorrizas de campo debido a que carecen de estructuras reproductoras que pueden utilizarse en el proceso de identificación. No obstante, con el afán de diferenciar grupos ecológicos basados en su modo de nutrición en la literatura se ha propuesto una serie de pruebas bioquímicas y fisiológicas que pueden ayudar a diferenciarlos.

Por estas razones, se planeó hacer un estudio integrado que muestre las necesidades nutricionales de algunos hongos ectomicorrizógenos para que tengan buen crecimiento en medios de cultivo específicos, los pH a los cuales crecen mejor, sus cualidades fisiológicas y bioquímicas y su compatibilidad con algunos hospederos. Con estos resultados se espera poder hacer recomendaciones acerca del uso y manejo de algunos hongos en vivero y campo, así como conocer las características fisiológicas y bioquímicas de varias cepas de hongos ectomicorrizógenos mexicanos.

OBJETIVO GENERAL

CONOCER LA BIOLOGÍA DE ALGUNOS HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS, MEDIANTE PRUEBAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

METODOLOGÍA GENERAL

En el trabajo se estudió un total de 31 cepas de hongos ectomicorrizógenos, pertenecientes a los siguientes taxa: *Amanita* spp. (9 cepas), *Boletus* sp. (1), *Laccaria bicolor* (1), *Pisolithus arthizus* (2), *Rhizopogon* sp. (1), *Scleroderma polyrhizum* (1), *Suillus* spp. (15) y *Terfezia olbiensis* (1); aisladas de carpóforos procedentes de diferentes localidades del estado de Tlaxcala, con excepción de una cepa que procede de Oaxaca (Cuadro 1); Las cepas se encuentran depositadas en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Los cultivos de hongos tienen características micro y macromorfológicas particulares, sin embargo no han podido utilizarse para determinar la identidad de las cepas obtenidas a partir de micorrizas de campo debido a que carecen de estructuras reproductoras que pueden utilizarse en el proceso de identificación. No obstante, con el afán de diferenciar grupos ecológicos basados en su modo de nutrición en la literatura se ha propuesto una serie de pruebas bioquímicas y fisiológicas que pueden ayudar a diferenciarlos.

Por estas razones, se planeó hacer un estudio integrado que muestre las necesidades nutricionales de algunos hongos ectomicorrizógenos para que tengan buen crecimiento en medios de cultivo específicos, los pH a los cuales crecen mejor, sus cualidades fisiológicas y bioquímicas y su compatibilidad con algunos hospederos. Con estos resultados se espera poder hacer recomendaciones acerca del uso y manejo de algunos hongos en vivero y campo, así como conocer las características fisiológicas y bioquímicas de varias cepas de hongos ectomicorrizógenos mexicanos.

OBJETIVO GENERAL

CONOCER LA BIOLOGÍA DE ALGUNOS HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS, MEDIANTE PRUEBAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS.

METODOLOGÍA GENERAL

En el trabajo se estudió un total de 31 cepas de hongos ectomicorrizógenos, pertenecientes a los siguientes taxa: *Amanita* spp. (9 cepas), *Boletus* sp. (1), *Laccaria bicolor* (1), *Pisolithus arhizus* (2), *Rhizopogon* sp. (1), *Scleroderma polyrhizum* (1), *Suillus* spp. (15) y *Terfezia olbiensis* (1); aisladas de carpóforos procedentes de diferentes localidades del estado de Tlaxcala, con excepción de una cepa que procede de Oaxaca (Cuadro 1); Las cepas se encuentran depositadas en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Cuadro 1. Cepas de hongos ectomicorrizógenos estudiados

No. de cepa	Taxa	Material de referencia	Procedencia	Vegetación
TLAX 2	<i>Amanita muscaria</i> (L.) Hook.	GSM 54	3	IV
TLAX 22	<i>A. muscaria</i>	AME 1045	3	IV
TLAX 27	<i>A. muscaria</i>	AKL 2252	3	IV
TLAX 41	<i>A. muscaria</i>	GGF 1851	6	II
TLAX 21	<i>A. pantherina</i> Gonn & Rabenh.	AME 1004	7	VI
TLAX 26	<i>Amanita</i> aff. <i>rubescens</i> (Pers.) Gray	AKL 2251	3	IV
TLAX 46	<i>Amanita</i> aff. <i>rubescens</i>	AME 1541	7	VII
TLAX 4	<i>Amanita</i> sp. Secc. <i>Vaginata</i>	GSM 134	5	II
TLAX 47	<i>Amanita</i> sp.	AME 1419	7	VII
TLAX 8	<i>Boletus</i> sp.	AKL 1757	8	VI
TLAX 30	<i>Laccaria bicolor</i> (Maire) P. D.	VCL 55	3	IV
TLAX 13	<i>Pisolithus arrhizus</i> (Scop.) Rauschert	ENCB	9	VIII
TLAX 37	<i>P. arrhizus</i>	AME 1177	7	VI
TLAX 28	<i>Rhizopogon</i> sp.	AKL 2254	3	IV
TLAX 38	<i>Scleroderma polyrhizum</i> (J. F. Gmel.) Pers.	AME 1263	7	VII
TLAX 31	<i>Suillus cothurnatus</i> var. <i>hiemalis</i> Singer	AME1137	2	I
TLAX 5	<i>S. glandulosipes</i> Thiers A. H. Sm.	AKL 1588	1	III
TLAX 10	<i>S. glandulosipes</i>	GSM 284	1	III
TLAX 25	<i>S. glandulosipes</i>	VCL 54	1	III
TLAX 34	<i>S. glandulosipes</i>	AKL 2267	2	I
TLAX 35	<i>S. glandulosipes</i>	AKL 2296	1	III
TLAX 40	<i>S. lakei</i> (Murril) A. H. Sm. & Thiers	AKL 2740	5	II
TLAX 9	<i>S. tomentosus</i> (Kauffman) Singer	GSM 276	3	IV
TLAX 24	<i>S. tomentosus</i>	AME 1009	3	IV
TLAX 33	<i>Suillus</i> cf. <i>pseudobrevipes</i> A. H. Sm. & Thiers	AKL 2266	2	I
TLAX 36	<i>Suillus</i> cf. <i>pseudobrevipes</i>	AKL 2297	1	III
TLAX 42	<i>Suillus</i> cf. <i>unicolor</i> (Frost) Kuntze	GGF 1852	6	II
TLAX 32	<i>Suillus</i> sp.	AKL 2264	2	I
TLAX 20	<i>Suillus</i> sp.	AKL 1970	4	V
TLAX 44	<i>Suillus</i> sp.	AKL 2650	5	II
TLAX 16	<i>Terfezia olbiensis</i> Tul.	AKL 1594	1	III

LOCALIDADES DE PROCEDENCIA DE LAS CEPAS: 1: Cerro Tepeticpac, Mpio. Totolac; 2: 2 Km al NO de Miltepec, Mpio. España; 3: Parque Nacional La Malinche, Mpio. Huamantla; 4: Cerro El Peñón, N de El Rosario, Mpio. Tlaxco; 5: Villarreal, Mpio. Terrenate; 6: Barranca del río Zahuapan, NE de Tlaxco, Mpio. Tlaxco; 7: 1 Km al este de San Francisco Temezontla, Mpio. Panotla; 8: Cerro Tizatán, Mpio. Totolac; 9: Oaxaca.

VEGETACIÓN ASOCIADA: I: *Pinus-Juniperus-Arbutus-Quercus*; II: *Pseudotsuga-Quercus-Pinus-Abies*; III: *Pinus-Quercus*; IV: *Pinus-Abies*; V: *Abies-Pinus-Quercus*; VI: *Quercus*; VII: *Pinus*; VIII: *Juglans*.

CAPÍTULO I

OPTIMIZACIÓN DEL CRECIMIENTO DE CEPAS DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS

En el caso de los hongos ectomicorrizógenos, el aislamiento y cultivo axénico de las especies fúngicas con las que se desea trabajar es parte fundamental de cualquier trabajo de investigación encaminado a generar conocimientos sobre su biología y fisiología (Torres, 1992).

Debido a que hasta ahora no existen estudios que indiquen cuales son los medios de cultivo y valores de pH más favorables para el crecimiento de las colonias, el propósito de este capítulo es proporcionar información acerca del crecimiento de 19 cepas en diferentes medios y valores de pH.

Los resultados de las pruebas en diferentes medios de cultivo se derivan en dos manuscritos, uno en donde se describe el crecimiento de ocho cepas de hongos de diferentes taxa y otro en el que se reporta el crecimiento de once cepas del género *Suillus*. Este último se envió a la revista Terra para su evaluación y publicación.

Por otra parte, se preparó el artículo que se encuentra en prensa: Vázquez-García, A., G. Santiago-Martínez y A. Estrada-Torres, 2002. Influencia del pH en el crecimiento de cepas de hongos ectomicorrizógenos **Anales del Instituto de Biología, Serie Botánica 73(1):1-15**

PRUEBAS DE CRECIMIENTO EN DIFERENTES MEDIOS NUTRITIVOS

ANTECEDENTES

Existen miles de hongos ectomicorrizógenos que presentan gran diversidad fisiológica, lo que es evidente por la facilidad o dificultad que se tiene para aislarlos, por el crecimiento que presentan en cultivo puro, por su efectividad al ser utilizados como inóculo y por el beneficio que aportan al hospedero (Molina y Trappe, 1984).

Los hongos ectomicorrizógenos tienen gran potencial de uso en los programas de reforestación ya que se asocian de manera obligada con las coníferas (Honrubia *et al.*, 1992). El aislamiento y cultivo puro de los hongos ectomicorrizógenos es parte fundamental de cualquier trabajo de investigación sobre ectomicorrizas (Torres y Honrubia, 1993), dado que los estudios de los cultivos son la vía para conocer las características biológicas y fisiológicas de los hongos (Molina y Palmer, 1982).

Estrada-Torres y Varela (1998) proponen que la diversidad de los hongos mexicanos podría ser una de las más grandes del mundo. Sin embargo, los estudios sobre hongos ectomicorrizógenos mexicanos son aún escasos (Varela y Estrada-Torres, 1997).

Debido a que no existen hasta ahora estudios que nos indiquen cuales son los medios de cultivo más favorables para el crecimiento de estos hongos y dado que es importante para lograr la optimización de la reproducción masiva de las cepas, el objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento de ocho cepas de hongos ectomicorrizógenos mexicanos en siete medios de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas que se estudiaron fueron recolectadas de diferentes municipios del estado de Tlaxcala y pertenecen a diferentes géneros y especies. Se encuentran depositadas en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, las cuales se mantienen en papa dextrosa agar. En el cuadro 1 se enlistan las cepas identificadas con su clave de cepario, el taxón al que pertenecen, el número de Herbario, la procedencia del material de referencia y el tipo de vegetación en el que se encontraron asociadas.

El micelio crecido durante tres semanas en cajas de Petri con papa dextrosa agar (Bioxon Becton Dickinson, México) se cuadrículó con un bisturí estéril, cortando fragmentos de 5 mm por lado, posteriormente se transfirieron a cajas de Petri de 90 mm de diámetro por 10 mm de alto que contenían los medios de cultivo que se utilizan cotidianamente en la manipulación de cepas de hongos ectomicorrizógenos: PDA, Ingestad agar (ING) (Mason, 1980), Melin y Norkrans agar modificado

(MNM) (Molina y Palmer, 1982), Hagem agar (HG) (Molina y Palmer, 1982) y biotina-aneurina-ácido fólico-agar (BAF) (Moser, 1960), así como los medios de cultivo que se utilizan para crecer una gran variedad de hongos, como son extracto de malta agar (EMA) (Bioxon Becton Dickinson, México) y Sabouraud agar (SAB) (Bioxon Becton Dickinson, México), sembrándose 6 repeticiones para cada cepa y medio. Las cepas se incubaron en la oscuridad a 25°C. Los medios de cultivo y las cajas de Petri se esterilizaron de manera convencional.

Cuadro 1. Origen y clasificación de las cepas estudiadas y vegetación asociada

No. de Cepa	Taxa	Material de referencia	Procedencia	Vegetación
TLAX 22	<i>Amanita muscaria</i> (L.: Fr.) Hooker	AME 1045	2	II
TLAX 27	<i>A. muscaria</i>	AKL 2252	2	II
TLAX 21	<i>Amanita pantherina</i> (DC.: Fr.) Kummer	AME 1004	3	III
TLAX 26	<i>Amanita aff. rubescens</i> (Pers.: Fr.) S. F. Gray	AKL 2251	2	II
TLAX 8	<i>Boletus sp.</i>	AKL 1757	4	III
TLAX 37	<i>Pisolithus arrhizus</i> (Scop.) Rauschert	AME 1177	3	III
TLAX 38	<i>Scleroderma polyrhizum</i> Pers.	AME 1263	3	IV
TLAX 16	<i>Terfezia olbiensis</i> Tulasne.	AKL 1594	1	I

LOCALIDADES DE PROCEDENCIA DE LAS CEPAS: 1: Cerro Tepeticpac, Mpio. Totolac ;2: Parque Nacional la Malinche, Mpio. Huamantla; 3: 1 Km al este de San Francisco Temezontla, Mpio Panotla; 4: Cerro Tizatián, Mpio. Totolac. VEGETACIÓN ASOCIADA: I: bosque de *Pinus-Quercus*; II: bosque de *Pinus-Abies*; III: bosque de *Quercus*; IV: bosque de *Pinus*.

El desarrollo de las cepas se evaluó midiendo el diámetro de las colonias cada tercer día, hasta que se estabilizó el crecimiento registrándose el diámetro final. En el caso de las cepas de *Amanita* se tomaron datos durante 42 días, de *Boletus sp* y *Scleroderma polyrhizum* por 46 días, de *Pisolithus arrhizus* por 48 días y de *Terfezia* por 24 días. Con los valores obtenidos cada tercer día, se obtuvo matemáticamente el valor de la pendiente de la curva para tener un indicador de la velocidad media de crecimiento (Santiago-Martínez, 1992).

Al final de estos periodos, se midió la biomasa del peso seco, modificando la técnica de Chapman et al. (1990), en la cual el micelio se separó calentando la caja hasta el punto de fusión del agar; posteriormente se enjuagó con agua caliente para eliminar el medio nutritivo y se secó a 60°C hasta obtener peso constante.

A los resultados de diámetro final, velocidad de crecimiento y producción de biomasa se les aplicó el análisis de varianza simple, así como pruebas de intervalos múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amanita muscaria

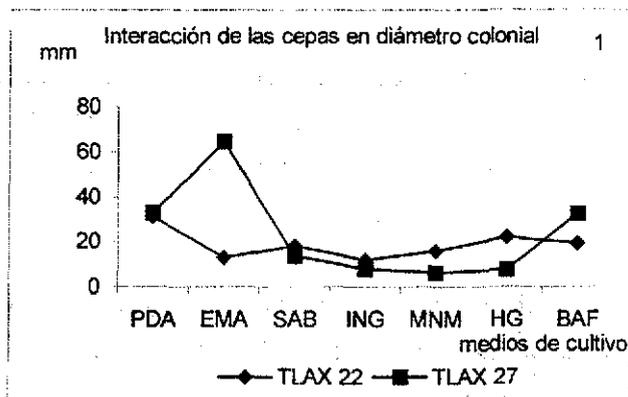
La cepa TLAX 22 de *A. muscaria*, presentó los valores de velocidad media y diámetro final más grandes en el medio de PDA, obteniendo diferencias significativas con los valores registrados en los otros medios, excepto con el medio HG el cual fue similar con los valores de todos los medios ensayados (cuadros 2 y 3). Para la cepa TLAX 27 se puede observar que se formaron tres grupos: 1) el mayor diámetro colonial y velocidad media de crecimiento se obtuvo en EMA, presentando diferencias significativas con los otros tratamientos; 2) se obtuvieron valores intermedios en los medios PDA y BAF; y 3) la cepa presentó crecimiento escaso o no creció en los medios de SAB, ING, MNM y HG (cuadros 2 y 3).

Cuadro 2. Velocidad media de crecimiento (mm/día)

CEPA	TAXA		PDA	EMA	SAB	ING	MNM	HG	BAF
TLAX 22	<i>A. muscaria</i>	\bar{x}	0.64a	0.21b	0.31b	0.27b	0.27b	0.40ab	0.32b
		e	0.1	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TLAX 27	<i>A. muscaria</i>	\bar{x}	0.68b	1.34a	0.22c	0.08c	0.03c	00.0c	0.72b
		e	0.08	0.09	0.04	0.02	0.03	00.0	0.04
TLAX 21	<i>A. pantherina</i>	\bar{x}	1.26ab	0.35d	0.24d	0.99c	1.32a	1.37a	1.02bc
		e	0.04	0.07	0.05	0.04	0.07	0.04	0.08
TLAX 26	<i>A. aff. rubescens</i>	\bar{x}	0.97a	0.68bc	0.22d	0.51c	0.69bc	0.66bc	0.82ab
		e	0.05	0.06	0.07	0.05	0.05	0.06	0.03
TLAX 8	<i>Boletus sp.</i>	\bar{x}	0.61a	0.76a	0.14b	0.58a	0.51a	0.40ab	0.55a
		e	0.08	0.07	0.05	0.08	0.05	0.08	0.09
TLAX 37	<i>P. arrhizus</i>	\bar{x}	1.27a	0.56b	0.46b	0.64b	1.10a	0.65b	1.16a
		e	0.03	0.06	0.04	0.05	0.1	0.04	0.02
TLAX 38	<i>S. polyrhizum</i>	\bar{x}	1.09a	0.57bc	0.07e	0.70b	0.29de	0.43cd	1.30a
		e	0.06	0.06	0.04	0.04	0.07	0.06	0.05
TLAX 16	<i>T. olbiensis</i>	\bar{x}	2.63b	0.24d	0.34d	2.05c	2.48bc	1.97c	3.42a
		e	0.06	0.04	0.06	0.07	0.13	0.09	0.08

\bar{x} Promedio de 6 repeticiones; e error estándar; letras iguales en la misma línea no hay diferencias significativas

En la figura 1 se muestra la interacción significativa que hay entre las dos cepas de *A. muscaria* en cuanto al diámetro final, detectándose que en el PDA las dos cepas respondieron de la misma manera, sin embargo, en el EMA la cepa TLAX 22 presentó un diámetro pequeño mientras que la TLAX 27 presentó su mayor valor; en los medios SAB, ING MNM y HG la cepa TLAX 27 presentó los menores diámetros coloniales, en tanto en BAF esta cepa presentó mayor diámetro que la cepa TLAX 22



Hutchison (1991) reportó para esta especie diámetros coloniales similares a los obtenidos en este ensayo en los medios de BAF y PDA (cuando la colonia tenía 30 días); mientras que en los medios de MN y HG obtuvo diámetros mayores.

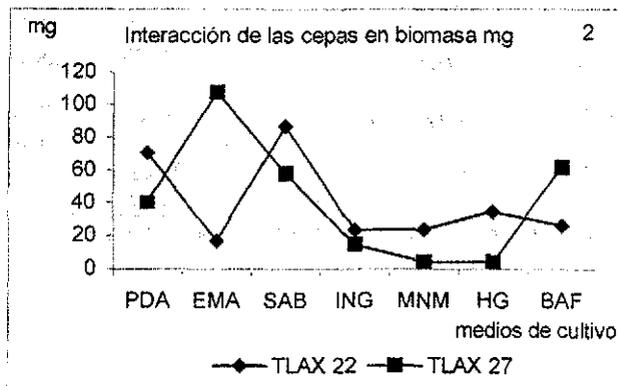
Cuadro 3. Diámetro final de las colonias (mm)

CEPA	TAXA		PDA	EMA	SAB	ING	MNM	HG	BAF
TLAX 22	<i>A. muscaria</i>	\bar{x}	31.2a	13.0b	18.2b	11.8b	15.8b	22.0ab	19.2b
		e	0.61	0.36	0.38	0.2	0.33	0.32	0.36
TLAX 27	<i>A. muscaria</i>	\bar{x}	32.7b	64.5a	13.6c	7.9c	6.3c	7.6c	32.4b
		e	0.48	0.63	0.25	0.14	0.22	0.33	0.29
TLAX 21	<i>A. pantherina</i>	\bar{x}	54.8ab	21.0c	15.0c	45.5b	60.7a	60.3a	47.0b
		e	0.31	0.48	0.29	0.27	0.37	0.27	0.55
TLAX 26	<i>A. aff. rubescens</i>	\bar{x}	43.5a	33.6bc	9.5e	25.3d	34.7bc	31.7cd	39.7ab
		e	0.33	0.40	0.25	0.28	0.32	0.4	0.22
TLAX 8	<i>Boletus sp.</i>	\bar{x}	33.2ab	38.0a	12.2c	30.2ab	28.0ab	20.3bc	30.2ab
		e	0.47	0.44	0.27	0.47	0.32	0.53	0.51
TLAX 37	<i>P. arrhizus</i>	\bar{x}	59.7a	32.3c	30.8c	34.5c	43.5b	34.8c	54.8a
		e	0.24	0.39	0.38	0.28	0.44	0.25	0.14
TLAX 38	<i>S. polyrhizum</i>	\bar{x}	49.5b	32.5cd	8.8f	34.1c	16.0ef	24.3de	58.5a
		e	0.33	0.37	0.25	0.32	0.44	0.4	0.34
TLAX 16	<i>T. olbiensis</i>	\bar{x}	63.3b	10.7d	12.4d	53.2bc	57.7b	45.2c	83.1a
		e	0.35	0.18	0.29	0.46	0.57	0.41	0.36

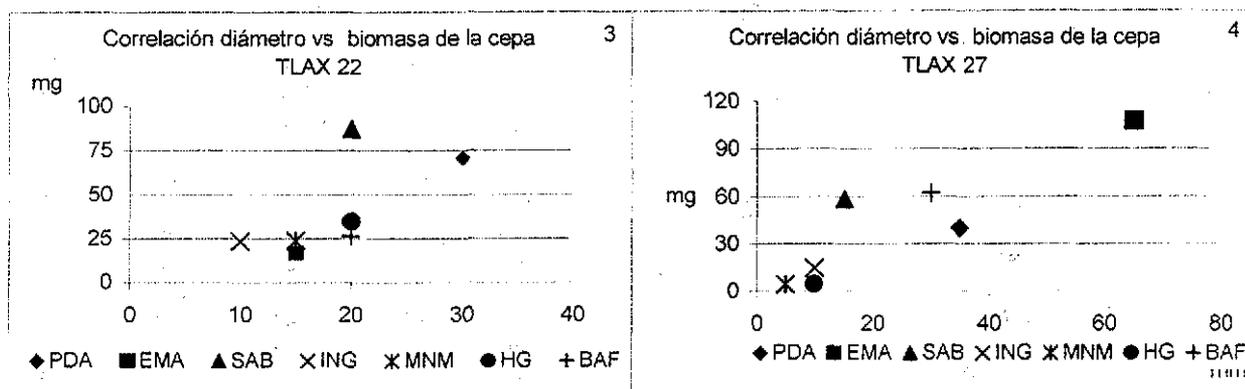
\bar{x} promedio de 6 repeticiones; e error estándar; letras iguales en la misma línea no hay diferencias significativas

En cuanto a la biomasa (cuadro 4), se puede observar que la cepa TLAX 22 alcanzó la mayor producción en el medio SAB, valor que presentó diferencias estadísticas con los otros valores excepto con el obtenido en PDA; los valores más bajos se obtuvieron en los medios MNM, ING y EMA. Para la cepa TLAX 27, la mayor biomasa se observó en el medio EMA, valor que presentó diferencias significativas con los crecimientos en los otros medios de cultivo; los valores más bajos se detectaron en los medios de cultivo MNM y HG.

En la figura 2 se muestra la interacción significativa que existe entre las dos cepas en cuanto a la producción de biomasa, donde se puede observar que la cepa TLAX 27 produjo los valores más grandes en los medios EMA y BAF, mientras que la TLAX 22 los obtuvo en los medios de PDA y SAB. Como se ilustra en la figura 2, las cepas no respondieron de la misma manera en los diferentes medios de cultivo a pesar de haber sido recolectadas en el mismo lugar y de estar asociadas con el mismo hospedero.



En las figuras 3 y 4 se muestra que no existe correlación entre las variables del diámetro colonial y la producción de biomasa, ya que por ejemplo en la cepa TLAX 22, los valores de diámetro final en los medios de SAB, HG y BAF son muy parecidos, sin embargo, se produjo mayor biomasa en el medio SAB. Las diferencias que se presentaron se deben al tipo de colonia que se desarrolló, ya que en el SAB la colonia presentó un micelio compacto, mientras que la colonia en BAF y HG el micelio fue laxo con abundante micelio aéreo.



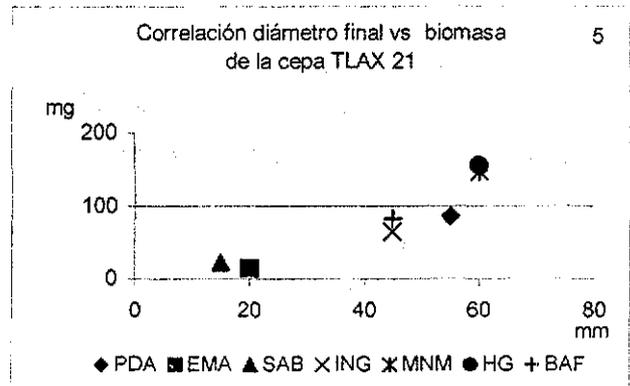
Cuadro 4 Peso seco (mg)

CEPA	TAXA		PDA	EMA	SAB	ING	MNM	HG	BAF
TLAX 22	<i>A. muscaria</i>	\bar{x}	70.8ab	16.8c	87.0a	23.5c	23.9c	34.7bc	26.3c
		e	1.13	0.29	0.96	0.27	0.48	0.49	0.33
TLAX 27	<i>A. muscaria</i>	\bar{x}	40.0bc	107.7a	58.3b	14.8cd	4.4d	4.3d	62.0b
		e	0.62	0.93	0.66	0.14	0.19	0.42	0.48
TLAX 21	<i>A. pantherina</i>	\bar{x}	85.4ab	14.3b	22.8b	64.7ab	146.6a	155.1a	82.3ab
		e	0.99	0.25	0.34	0.5	1.45	1.1	0.8
TLAX 26	<i>A. aff. rubescens</i>	\bar{x}	18.3a	15.6ab	4.0c	12.0ab	10.0bc	12.9ab	13.8ab
		e	0.5	0.36	0.2	0.21	0.17	0.3	0.28
TLAX 8	<i>Boletus sp.</i>	\bar{x}	50.7ab	76.1a	14.0b	43.5ab	24.9b	50.1ab	51.5ab
		e	0.77	0.78	0.35	0.6	0.26	0.81	1.08
TLAX 37	<i>P. arrhizus</i>	\bar{x}	135.7b	29.2d	134.4b	63.1cd	70.9cd	79.0c	178.6a
		e	0.68	0.54	1.22	0.55	0.66	0.33	0.66
TLAX 38	<i>S. polyrhizum</i>	\bar{x}	53.9b	37.5bc	7.4c	62.4b	11.5c	9.1c	119.6a
		e	0.76	0.58	0.28	0.7	0.64	0.33	0.93
TLAX 16	<i>T. olbiensis</i>	\bar{x}	97.0ab	15.8d	18.7d	40.7cd	144.9a	23.8d	74.5bc
		e	0.67	0.32	0.59	0.94	1.11	0.53	0.78

\bar{x} promedio de 6 repeticiones; e error estándar; letras iguales en la misma línea no hay diferencias significativas

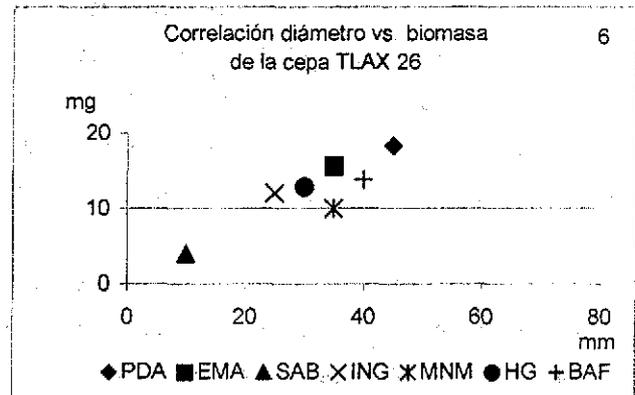
Amanita pantherina

En la cepa de *Amanita pantherina* TLAX 21, se pudieron observar los mayores valores de velocidad de crecimiento, diámetro final y producción de biomasa en los medios HG y MNM, presentando diferencias significativas con los otros valores, excepto con los de PDA; los valores más bajos se observaron en los medios SAB y EMA, que presentaron diferencias significativas con los valores de los otros medios (cuadros 2, 3 y 4). En esta cepa si se observa correlación entre los valores de diámetro colonial y la biomasa (figura 5).



Amanita rubescens

La velocidad media de crecimiento y el diámetro colonial más grande de la cepa de *Amanita rubescens* TLAX 26 se alcanzaron en el medio PDA, que presentó diferencias significativas con los valores obtenidos en los otros medios, excepto los de BAF; el valor más bajo se presentó en SAB el cual tuvo diferencias significativas con los valores de los otros medios. Los valores de biomasa en los medios PDA, EMA, BAF, HG e ING no presentaron diferencias estadísticas, en tanto la cepa produjo menos biomasa en el medio SAB. En la figura 6 se puede observar que existe correlación entre el diámetro final y la producción de biomasa de la cepa TLAX 26 ya que en valores de diámetro colonial pequeños se obtuvo biomasa escasa y en valores de diámetro colonial grandes se produjo mayor biomasa.



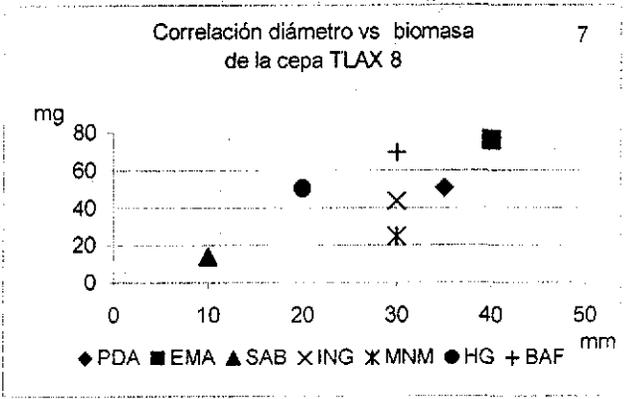
Al comparar nuestros resultados con los de Hutchison (1991), se puede observar que nuestra cepa creció más en los medios de PDA y BAF, mientras que el crecimiento fue menor en los medios MNM y HG.

Boletus sp.

En la cepa de *Boletus sp.* TLAX 8, se pudo observar que la velocidad de crecimiento presentó sus valores más grandes en los medios de EMA, PDA, MNM, HG, BAF y HG los cuales no presentaron diferencias significativas entre si, la velocidad de crecimiento en el medio HG fue similar con el valor más pequeño obtenido en el medio SAB. En el diámetro final y producción de biomasa, la cepa obtuvo el valor más grande en EMA y el más pequeño en SAB. Hutchison (1991) reportó para las cepas de

este género diámetros más grandes que los obtenidos en nuestros ensayos; por otro lado, Torres y Honrubia (1993) reportaron crecimientos de 15 a 20 mm de diámetro en 30 días, valores diferentes a los que reportó el primer autor y parecidos a los nuestros.

En la figura 7 se observa que no hay correlación entre el diámetro final y la producción de biomasa, ya que por ejemplo los medios de ING, MNM y BAF presentaron diámetros similares pero produjeron diferentes cantidades de biomasa.

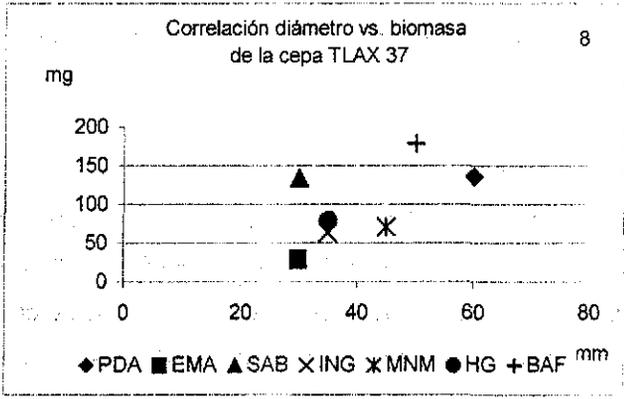


Pisolithus arrhizus

En la cepa de *Pisolithus arrhizus* TLAX 37 la mayor velocidad de crecimiento se alcanzó en PDA, BAF y MNM, los cuales presentaron diferencias estadísticas con los valores obtenidos en los otros tratamientos (HG, ING, EMA y SAB). En el diámetro colonial se observaron tres grupos: las colonias más grandes se obtuvieron en PDA y BAF los cuales presentaron diferencias significativas con los otros tratamientos; el medio MNM presentó crecimiento intermedio, en tanto el menor desarrollo de las colonias se obtuvo en los medios ING, EMA y SAB. En cuanto a la producción de biomasa, el valor más alto se presentó en BAF, el cual presentó diferencias significativas con los valores de los otros tratamientos, en tanto el valor más pequeño se obtuvo en EMA.

Hutchison (1991) trabajó con cepas de esta especie en los medios de cultivo HG y MN y obtuvo crecimientos más grandes que los obtenidos en nuestro ensayo; en los medios de PDA y BAF, la cepa *P. arrhizus* (TLAX 37) presentó mayor diámetro colonial que los obtenidos por Hutchison (1991). Por otro lado, la cepa que trabajaron Torres y Honrubia (1993) alcanzó las mismas medidas que la cepa trabajada por Hutchison (1991) en MN

En la figura 8 se puede observar que no existe correlación entre los valores obtenidos en diámetro final y producción de biomasa de la cepa TLAX 37.

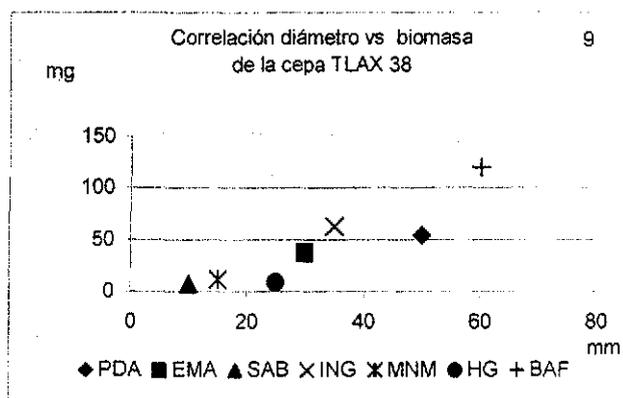


Scleroderma polyrhizum

En la cepa de *Scleroderma polyrhizum* TLAX 38, la mayor velocidad de crecimiento se alcanzó en los medios BAF y PDA, en tanto los valores más pequeños se obtuvieron en SAB, presentándose diferencias significativas entre los dos grupos. En cuanto al diámetro final, el valor más grande se alcanzó en el medio BAF y el más pequeño en el medio SAB, presentándose diferencias significativas entre estos dos resultados. La mayor cantidad de biomasa se registró en el medio BAF, presentando diferencias significativas con los resultados de los otros medios, en tanto el valor más pequeño se obtuvo en los medios MNM, HG y SAB (cuadros 2, 3 y 4).

Hutchison (1991) reportó cepas de este género con valores de diámetro colonial en los medios de MNM y HG más grandes que los obtenidos para la cepa TLAX 38, mientras que las colonias crecidas en los medios PDA y BAF fueron más grandes en nuestro ensayo.

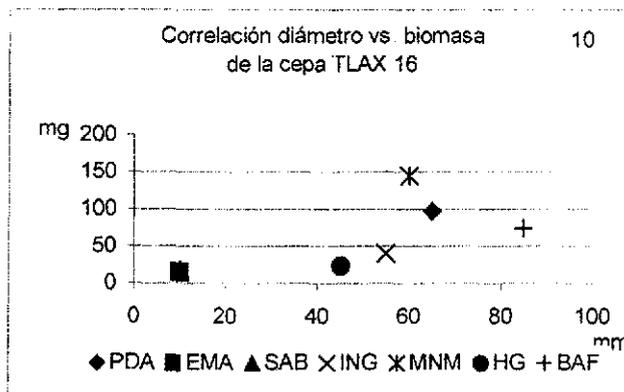
En esta cepa tampoco existe correlación entre los resultados de diámetro final y biomasa, ya que en varios medios se obtuvieron valores de biomasa similares, mientras que los de diámetro fueron diferentes (figura 9).



Terfezia olbiensis

La cepa de *Terfezia olbiensis* TLAX 16 alcanzó su mayor velocidad de crecimiento y diámetro final en el medio BAF, presentando diferencias significativas con los otros valores, los valores más pequeños se registraron en SAB y EMA. La cepa produjo la mayor biomasa en el medio MNM, presentando similitud estadística con el PDA, en tanto los valores más pequeños los alcanzó en los medios HG, SAB y EMA (cuadros 2, 3 y 4).

En la figura 10 se puede observar que no existe correlación entre las biomazas y los diámetros de la cepa TLAX 16. Un ejemplo de esto, es el comportamiento de la cepa en el medio de BAF, en el cual se observaron los valores más grandes de diámetro colonial, sin embargo presentó un valor de producción de



biomasa más bajo que en otros medios, por otro lado, en el MNM se observó gran producción de biomasa, sin embargo la colonia fue muy compacta, dando como resultado un diámetro escaso.

CONCLUSIONES

- Los medios de cultivo en los que crecieron mejor la mayoría de las cepas fueron PDA y BAF
- Al comparar el crecimiento de todas las cepas, se pudo observar que los géneros *Amanita* y *Boletus* presentan los valores de crecimiento más bajos, mientras que *Scleroderma polyrhizum* y *Terfezia olbiensis* los valores más altos.
- Solamente las cepas de *Amanita pantherina* y *Terfezia olbiensis* presentaron buen crecimiento en el medio MNM.
- Únicamente las cepas de *Amanita muscaria* (TLAX 27) y *Boletus* sp. se desarrollaron mejor en el medio EMA.
- Las cepas nativas de Tlaxcala presentaron crecimientos en los medios de cultivo muy diferentes a los de las cepas reportadas en la literatura.
- Las cepas de *Terfezia olbiensis* y *Scleroderma polyrhizum* podrían ser buenos candidatos para reproducirse masivamente en el medio de cultivo BAF, con el fin de realizar inoculaciones de plantas de interés forestal

PRUEBAS DE CRECIMIENTO DE ONCE CEPAS DE *SUILLUS* EN DIFERENTES MEDIOS NUTRITIVOS

Growth Tests of Eleven Strain of *Suillus* in Seven Culture Media

Guadalupe Santiago-Martínez¹, Arturo Estrada-Torres¹, Lucía Varela² y
Teófilo Herrera³

¹Universidad Autónoma de Tlaxcala, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Laboratorio de Micorrizas y Laboratorio de Sistemática, Km 10.5 carretera Texmelucan Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala, CP 90120

²Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Ecología Microbiana, Carpio y Plan de Ayala, 11340, México, D. F.

³Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Departamento de Botánica, Laboratorio de Micología, A. P. 70-233, Coyoacán, México, D. F. 04510.

RESUMEN

Se realizaron pruebas de crecimiento de once cepas de *Suillus* en siete medios de cultivo. Para determinar la dinámica de crecimiento de cada cepa se consideraron las siguientes variables: velocidad media de crecimiento, diámetro final y producción de biomasa. Con respecto a la velocidad media de crecimiento, se observó que las cepas que crecieron más rápido fueron *Suillus tomentosus* TLAX 24 y *Suillus* sp. TLAX 32 y las más lentas *S. glandulosipes* TLAX 34 y *Suillus* cf. *pseudobrevipes* TLAX 36. En el diámetro final, la cepa de *Suillus* sp. TLAX 32 presentó el diámetro más grande y *Suillus* cf. *pseudobrevipes* TLAX 36 el más pequeño. El medio de cultivo que dio mejores condiciones para las variables evaluadas de crecimiento fue el PDA. En cuanto a la producción de biomasa, se encontró que las cepas *S. tomentosus* TLAX 9 y *Suillus* sp. TLAX 32 presentaron los mayores valores de peso seco. Los medios de cultivo en los que las cepas produjeron mayor biomasa fueron SAB, BAF y PDA, en tanto, en los medios HG y MNM se obtuvieron los valores más bajos en las tres variables analizadas.

Palabras clave: hongos ectomicorrizógenos, reforestación, coníferas, viveros.

SUMMARY

Growth tests with eleven strains of *Suillus* and seven culture media were made. Average speed growth, final colony diameter and biomass production were evaluated. Concerning the average speed growth, *Suillus tomentosus* TLAX 24 and *Suillus* sp. TLAX 32 were the strains with fastest growth, while *S. glandulosipes* TLAX 34 and *S. cf. pseudobrevipes* TLAX 36 had the slowest. *Suillus* sp. TLAX 32 had the longer colony diameter, while *S. cf. pseudobrevipes* had the smaller one. The best culture medium for both of these variables was PDA. Concerning the biomass production, *Suillus tomentosus* TLAX 9

and *Suillus* sp. TLAX 32 produced the highest dry masses. The best culture media for biomass production were SAB, BAF and PDA, while HG and MNM were the culture media with the lowest values in the three analyzed variables.

Index words: *Ectomycorrhizal fungi, reforestation, coniferae, nursery.*

INTRODUCCIÓN

Los hongos ectomicorrizógenos son organismos que forman asociaciones mutualistas con diversas plantas en particular las de interés forestal. Estos hongos tienen gran potencial de uso en los programas de reforestación ya que muchas plantas de alto valor económico, como las coníferas, se asocian en forma obligada con ellos (Honrubia *et al.*, 1992). A pesar de que en nuestro país su uso ha sido limitado, la presencia de micorrizas en las raíces, es un criterio para evaluar la calidad de las plantas producidas en los viveros.

Existen miles de hongos formadores de ectomicorriza, los cuales presentan gran diversidad fisiológica, lo que se hace patente por la facilidad o dificultad que se tiene para aislarlos, y por las diferencias que presentan cuando están en cultivo axénico (Molina y Trappe, 1984).

Se ha propuesto que la diversidad de los hongos ectomicorrizógenos mexicanos podría ser una de las más grandes del mundo (Estrada-Torres y Varela, 1998). No obstante, los estudios sobre estos organismos son aún escasos en México (Varela y Estrada-Torres, 1997) y sólo unas cuantas colecciones resguardan germoplasma de los mismos (Estrada-Torres y Varela, 1998).

Entre los hongos ectomicorrizógenos que se desarrollan en México, resaltan aquéllos del género *Suillus* debido a su relativa alta abundancia (Bandala y Montoya, 1993; González-Velázquez y Valenzuela, 1993; Moreno-Fuentes *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1994), a la facilidad con que son aislados (Molina y Palmer, 1982), a su rápido crecimiento *in vitro*, a que comúnmente pueden asociarse con plantas jóvenes (Mason *et al.*, 1990; Bowen, 1994) y a su estrecha relación con coníferas de la familia Pinaceae (Van *et al.*, 1987; Molina *et al.*, 1991; Francis y Read 1994).

No obstante, no existen hasta ahora estudios que nos indiquen cuales son los medios de cultivo más favorables para estos hongos y dado que es importante para lograr la optimización de la reproducción masiva de las cepas, el objetivo del presente estudio fue evaluar el crecimiento de once cepas mexicanas del género *Suillus* en siete medios de cultivo, procedentes de diferentes localidades del estado de Tlaxcala.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Las cepas utilizadas se encuentran depositadas en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT) las cuales se mantienen en papa dextrosa agar. En el cuadro 1 se enlistan las cepas identificadas con su clave del cepario, el taxón al que pertenecen, el número de Herbario, la procedencia del material de referencia y el tipo de vegetación con el que se encontraron asociadas.

Cuadro 1. Listado de las cepas estudiadas

No. de Cepa	Taxa	Material de referencia	Procedencia	Vegetación
TLAX 31	<i>Suillus cothurnatus</i> var. <i>hiemalis</i> Sing.	AME 1137	2	I
TLAX 5	<i>S. glandulosipes</i> Thiers et Smith	AKL 1588	1	II
TLAX 10	<i>S. glandulosipes</i> Thiers et Smith	GSM 284	1	II
TLAX 25	<i>S. glandulosipes</i> Thiers et Smith	VCL 54	1	II
TLAX 34	<i>S. glandulosipes</i> Thiers et Smith	AKL 2267	2	I
TLAX 35	<i>S. glandulosipes</i> Thiers et Smith	AKL 2296	1	II
TLAX 9	<i>S. tomentosus</i> (Kauffm.) Singer, Snell et Dick	GSM 276	3	III
TLAX 24	<i>S. tomentosus</i> (Kauffm.) Singer, Snell et Dick	AME 1009	3	III
TLAX 33	<i>S. cf. pseudobrevipes</i> Smith et Thiers	AKL 2266	2	I
TLAX 36	<i>S. cf. pseudobrevipes</i> Smith et Thiers	AKL 2297	1	II
TLAX 32	<i>Suillus</i> sp.	AKL 2264	2	I

LOCALIDADES DE PROCEDENCIA DE LAS CEPAS: I: Cerro Tepeticpac, Mpio de Totolac ; 2: 2 Km al NO de Miltepec, Mpio. de Españaíta; 3: Parque Nacional la Malinche, Mpio de Huamantla. VEGETACIÓN ASOCIADA: I: *Pinus-Juniperus-Arbutus-Quercus*; II: *Pinus-Quercus*; III: *Pinus-Abies*

Fase experimental. Para la reactivación de las cepas y tener el micelio de la misma edad las colonias se desarrollaron en cajas de petri durante tres semanas con PDA (Bioxon Becton Dickinson, México), posteriormente se cuadrícularon con un bisturí estéril, cortando fragmentos de 4 a 5 mm por lado y transfiriéndolos a cajas de 90 mm de diámetro por 10 mm de alto que contenían los medios de cultivo que se utilizan cotidianamente en la manipulación de cepas de hongos ectomicorrizógenos como son papa dextrosa agar (PDA), Ingestad agar (ING) (Mason, 1980), Melin y Norkrans Modificado agar (MNM) (Molina y Palmer, 1982), Hagem agar (HG) (Molina y Palmer, 1982) y biotina-aneurina-ácido fólico-agar (BAF) (Moser, 1960), así como medios de cultivo que se usan para crecer una gran variedad de hongos, como son extracto de malta agar (EMA) (Bioxon Becton Dickinson, México) y Sabouraud agar (SAB) (Bioxon Becton Dickinson, México). Se sembraron cinco repeticiones por cepa y medio de cultivo. Las placas se incubaron en la oscuridad a 25°C, durante 46 días.

Evaluación de resultados. La velocidad media de crecimiento, la biomasa y el diámetro colonial final fueron evaluados de acuerdo con los procedimientos descritos por Santiago-Martínez *et al.* (1995).

Para verificar si existían diferencias significativas en los resultados de velocidad media, diámetro final y peso seco entre los diferentes medios y entre las cepas, se aplicaron a los datos análisis de varianza bifactorial y pruebas de intervalos múltiples de Tukey con nivel de significancia al 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Velocidad media de crecimiento. Los resultados de velocidad de crecimiento se presentan en la cuadro 2. En general, la cepa que creció más rápido fue la de *Suillus tomentosus* TLAX 24, presentando diferencias estadísticas con respecto al resto de las cepas; seguida por la cepa *Suillus* sp. TLAX 32 que también presentó diferencias significativas con el resto de las cepas. La cepa con crecimiento más lento fue *S. glandulosipes* TLAX 34.

Cuadro 2. Velocidad media de crecimiento de las cepas de *Suillus* (mm/día)

CEPA		PDA	EMA	SAB	ING	MNM	HG	BAF	CEPAS
TLAX 31	̄	1.23	0.60	0.28	0.91	0.63	1.00	1.23	0.84ef
	†	0.02	0.02	0.04	0.01	0.09	0.01	0.02	
TLAX 5	̄	0.39	0.81	1.08	1.15	0.29	0.85	1.04	0.95de
	†	0.08	0.02	0.03	0.08	0.04	0.13	0.03	
TLAX 10	̄	1.43	0.64	1.38	1.16	0.85	0.78	1.34	1.08c
	†	0.04	0.02	0.03	0.01	0.01	0.05	0.02	
TLAX 25	̄	1.42	1.19	1.08	0.95	0.88	0.85	1.18	1.08c
	†	0.02	0.02	0.14	0.03	0.02	0.03	0.08	
TLAX 34	̄	0.66	0.39	0.27	0.68	0.05	0.09	0.50	0.38g
	†	0.04	0.11	0.06	0.07	0.01	0.02	0.07	
TLAX 35	̄	0.81	0.83	1.04	0.88	0.63	0.89	0.96	0.86e
	†	0.04	0.02	0.03	0.05	0.05	0.07	0.03	
TLAX 9	̄	1.34	0.53	1.33	1.37	0.64	0.79	1.18	1.03cd
	†	0.01	0.02	0.04	0.02	0.07	0.01	0.03	
TLAX 24	̄	4.37	0.85	0.92	3.04	0.48	0.84	1.29	1.69a
	†	0.03	0.02	0.10	0.31	0.18	0.14	0.09	
TLAX 33	̄	1.42	1.16	0.97	0.83	0.87	0.92	1.19	1.05cd
	†	0.01	0.01	0.03	0.02	0.02	0.05	0.05	
TLAX 36	̄	1.29	1.35	0.61	0.76	‡	‡	1.11	0.73f
	†	0.02	0.05	0.01	0.12			0.05	
TLAX 32	̄	1.51	1.63	1.50	1.28	1.27	1.06	1.45	1.39b
	†	0.03	0.02	0.03	0.01	1.05	0.08	0.04	
MEDIOS	̄	1.5a	0.91c	0.95c	1.18b	0.60e	0.74d	1.13b	

̄ promedio de cinco repeticiones; † error estándar; letras iguales no hay diferencias significativas P=0.05; ‡ no creció la colonia

Los medios que proporcionaron mejores condiciones para el crecimiento radial de los hongos fueron PDA mismo que presentó diferencias estadísticas con el resto de los medios; seguido por el ING y el

BAF que fueron estadísticamente similares pero diferentes significativamente de las demás; los crecimientos obtenidos en HG y MNM fueron los menores, presentando diferencias significativas entre ellos y con el resto de los medios estudiados.

Las cepas de *S. glandulosipes* tienen una velocidad de crecimiento variable, presentándose crecimientos lentos como en la cepa TLAX 34 con 0.4 mm/día hasta crecimientos que rebasan valores de 1 mm/día en las cepas TLAX 10 y 25.

La cepa de *S. tomentosus* TLAX 24 presentó un periodo de adaptación al medio de dos días, con su mayor velocidad de crecimiento en PDA, ya que cubrió la placa en 22 días; sin embargo, en los otros medios la velocidad de crecimiento fue menor.

También se encontraron diferencias entre las dos cepas de *S. tomentosus* probadas, siendo la TLAX 24 la que tuvo mayor velocidad de crecimiento de todas las cepas aisladas.

Las cepas de *Suillus* cf. *pseudobrevipes* TLAX 33 y 36 presentaron diferencias estadísticas entre sí creciendo más rápido la primera; la cepa TLAX 36 no creció en los medios de MNM y HG.

Las cepas TLAX 31, 9, 24 y 33 tuvieron un periodo de adaptación al medio de menos de 8 días, en tanto las cepas TLAX 10, 25, 35 y 32 presentan periodos de adaptación al medio de aproximadamente 8 días. Las cepas TLAX 5 y 34 necesitan un mayor periodo de adaptación al medio (16 días) para que comience su crecimiento.

Diámetro final. Los resultados del diámetro final se muestran en la cuadro 3. La cepa *Suillus* sp. TLAX 32 fue la que presentó el mayor diámetro colonial final detectándose diferencias significativas con las demás cepas; le siguieron las cepas *S. glandulosipes* TLAX 25 y TLAX 10, *S. tomentosus* TLAX 9 y *Suillus* cf. *pseudobrevipes* TLAX 33, que presentaron valores estadísticamente similares entre ellas; las cepas *Suillus* cf. *pseudobrevipes* TLAX 36 y *S. glandulosipes* TLAX 34 fueron en las que se presentaron los diámetros finales menores, con diferencias significativas respecto a las demás cepas y entre ellas.

En cuanto a los medios de cultivo, el PDA fue en el que se obtuvieron los valores mayores de diámetro final, con diferencias estadísticas respecto a las colonias crecidas en otros medios de cultivo. En los medios HG y MNM se registraron los diámetros finales menores, presentando diferencias significativas con los otros medios y entre ellos.

Cuadro 3. Diámetro final de las cepas de *Suillus* (mm)

CEPA		PDA	EMA	SAB	ING	MNM	HG	BAF	CEPAS
TLAX 31	̄	62.2	34.2	20.7	44.5	35.8	50.7	61.5	44.2cd
	†	0.95	1.08	2.17	0.43	3.58	0.21	0.76	
TLAX 5	̄	62.0	34.0	50.3	58.0	20.8	41.2	48.8	45.0c
	†	2.46	1.26	1.33	2.41	1.81	4.25	0.98	
TLAX 10	̄	61.7	27.7	63.8	53.8	42.2	38.5	61.7	49.9b
	†	1.38	0.71	1.22	0.31	0.54	1.61	1.41	
TLAX 25	̄	67.0	52.3	48.0	47.2	41.9	41.2	55.3	50.4b
	†	0.36	2.10	6.58	1.22	0.80	0.92	3.92	
TLAX 34	̄	37.5	30.5	20.5	35.2	6.25	11.5	32.7	24.9d
	†	1.12	4.59	3.35	2.68	0.11	1.56	2.64	
TLAX 35	̄	40.2	41.2	50.8	39.5	33.3	43.0	45.8	42.0cd
	†	1.78	1.54	1.01	1.94	2.11	2.26	0.91	
TLAX 9	̄	63.2	27.2	62.3	62.5	34.3	41.7	57.0	49.7b
	†	0.83	0.95	1.67	1.18	3.17	0.61	1.34	
TLAX 24	̄	90.0	24.7	26.5	67.3	18.0	25.5	34.0	40.9d
	†	0	0.99	2.20	5.78	4.03	2.65	2.05	
TLAX 33	̄	64.7	51.8	42.1	44.25	43.11	44.2	56.6	49.5b
	†	0.49	0.95	0.84	0.76	0.51	1.59	2.62	
TLAX 36	̄	60.2	58.0	34.5	40.7	‡	‡	52.2	36.5e
	†	1.19	2.07	3.58	4.51			1.78	
TLAX 32	̄	69.7	70.2	68.5	62.2	58.2	49.2	66.33	63.4a
	†	1.74	1.17	1.12	1.11	1.54	2.69	1.43	
MEDIOS	̄	61.6a	41.06d	44.3c	50.46b	30.81f	35.61e	51.99	

b

̄ promedio de cinco repeticiones; † error estándar; letras iguales no hay diferencias significativas $P=0.05$; ‡ no creció la colonia

Producción de biomasa. Los resultados sobre biomasa final producida se incluyen en la cuadro 4 y figura 1. Las cepas de *Suillus tomentosus* TLAX 9 y *Suillus* sp. TLAX 32 produjeron las mayores biomásas, siendo estadísticamente similares entre ellas pero con diferencias significativas respecto a las demás cepas. En la cepa *S. glandulosipes* TLAX 34 se obtuvo la menor producción de biomasa, mostrando diferencias significativas con el resto de las cepas.

En cuanto a los medios de cultivo, se presentaron diferencias significativas entre las biomásas producidas en todos los medios, excepto en HG y MNM donde se produjeron las menores biomásas; la mayor producción de biomasa se presentó en el medio de SAB, seguido de BAF, PDA, ING y por último EMA.

El diámetro final de la colonia es una variable utilizada para evaluar el efecto de diferentes medios sobre el desarrollo de los hongos (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 1988; Cuaxilo, 1991; Mata y Guzmán, 1989; Salmones *et al.*, 1990). Sin embargo, el uso de esta variable como indicador del crecimiento podría conducir a una selección inadecuada del medio de cultivo más favorable para el desarrollo de una

cepa en particular ya que dos cepas con el mismo diámetro colonial no siempre presentan el mismo vigor.

Cuadro 4. Producción de biomasa de las cepas de *Suillus* (mg)

CEPA		PDA	EMA	SAB	ING	MNM	HG	BAF	CEPAS
TLAX 31	̄	130.8	26.0	70.0	36.6	42.6	89.1	187.3	83.2cd
	†	9.13	0.60	10.1	4.01	11.71	2.4	8.86	
TLAX 5	̄	176.7	41.5	195.6	116.0	14.4	21.2	175.7	105.9b
	†	16.81	3.33	11.67	6.93	3.48	3.42	9.45	
TLAX 10	̄	140.2	21.0	234.3	86.3	52.2	20.7	175.9	104.4b
	†	8.61	3.00	17.31	4.79	1.19	2.22	9.59	
TLAX 25	̄	145.2	82.0	205.6	70.3	51.7	61.9	134.7	107.3b
	†	15.53	8.77	54.74	4.27	3.54	1.79	15.3	
TLAX 34	̄	55.3	32.3	42.8	58.1	2.9	9.4	49.0	35.7e
	†	4.99	6.62	12.1	5.17	0	0.89	7.99	
TLAX 35	̄	60.4	79.7	241.4	74.8	33.4	60.9	121.8	96.1bc
	†	6.64	8.32	14.04	9.06	5.92	5.72	7.63	
TLAX 9	̄	153.1	15.2	329.8	111.0	57.7	27.8	251.6	135.2a
	†	13.83	2.85	14.48	11.86	9.00	0.50	6.01	
TLAX 24	̄	164.0	22.1	134.5	68.3	31.8	37.6	70.7	75.6d
	†	15.96	1.39	11.95	6.90	9.59	4.53	5.64	
TLAX 33	̄	160.8	82.0	151.7	60.7	61.6	63.8	148.9	104.2b
	†	6.09	8.32	12.61	3.73	5.38	8.25	8.79	
TLAX 36	̄	106.1	84.4	210.2	74.23	‡	‡	146.7	88.8bcd
	†	4.68	9.93	28.03	16.11			15.80	
TLAX 32	̄	154.6	92.0	280.3	154.1	52.2	20.7	175.9	132.8a
	†	17.99	12.76	13.11	6.88	1.18	2.22	9.59	
MEDIOS	̄	137.6c	52.6e	190.6a	82.8d	36.4f	37.5f	148.9b	

̄ promedio de cinco repeticiones; † error estándar; letras iguales no hay diferencias significativas P=0.05; ‡ no creció la colonia

La producción de biomasa es otra variable que se ha utilizado para la evaluación del crecimiento de las colonias (Oort, 1981), debido a que esta variable podría ser mejor indicador del crecimiento de las cepas, ya que entre mayor cantidad de micelio producido, se podrá contar con mayor cantidad de inóculo.

Santiago-Martínez *et al.* (1995) reportaron que no siempre existe correlación entre el crecimiento radial de las colonias de *Pisolithus tinctorius* y las biomásas producidas. Al graficar estas variables para el caso de las cepas de *Suillus* probadas en este estudio, se observó que en algunos casos sí existe una relación directa entre el radio colonial final y la biomasa; es decir, a mayor radio colonial mayor cantidad de biomasa producida; tal como sucede con la cepa TLAX 10 de *S. glandulosipes* (figura. 2). No obstante, éste no es siempre el caso, ya que en algunas cepas se observó que se producía gran cantidad de biomasa en algunos medios, aunque el radio colonial fuera pequeño, o viceversa (figuras 3, 4 y 5).

Además, en las figuras 6 y 7 podemos observar que no todas las cepas responden de la misma manera en los diferentes medios de cultivo; un ejemplo de esto podría ser la cepa de *S. tomentosus* TLAX 24 que en los medios de PDA e ING presentó velocidades de crecimiento más grandes que las otras cepas.

CONCLUSIONES

En general, las cepas de *Suillus* presentan crecimientos aceptables en algunos medios de cultivo como SAB, PDA y BAF y se pueden considerar como adecuadas para continuar con la producción masiva de inóculo micelial y utilizarse en ensayos de vivero o campo, ya que además su aislamiento a partir de basidiomas es fácil de realizar.

Las cepas *S. tomentosus* TLAX 9 y *Suillus* sp. TLAX 32, al producir mayor biomasa en menos tiempo son la que tienen mayor capacidad para reproducirlas masivamente en laboratorio y con estas colonias realizar ensayos de inoculación en vivero.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACyT, por el financiamiento del proyecto SELECCIÓN DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS PARA LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES EN EL ESTADO DE TLAXCALA, el cual fue apoyado por medio del convenio número 4690-N9406.

LITERATURA CITADA

- Acosta-Urdapilleta, L., G. Bustos-Zagal y D. Portugal, 1988. Aislamiento y Caracterización de Cepas de *Pleurotus ostreatus* y su Cultivo en Residuos Agroindustriales en el Estado de Morelos. Rev. Mex. Mic. 4:13-20.
- Bowen, G.D., 1994. The Ecology of Ectomycorrhiza Formation and Functioning. Plant Soil 159:61-67.
- Bandala, V.M. y L. Montoya, 1993. Nuevos Registros de Hongos del Estado de Veracruz, V. Nuevos Aphylophorales y Agaricales. Rev. Mex. Mic. 9:85-118.
- Cuaxilo, L.V., 1991. Desarrollo de Tres Cepas del Hongo Ectomicorrízico *Laccaria bicolor* (Maire) Orton de los Bosques de la Malintzi Sobre Medios de Cultivo a Base de Espirulina. Tesis Profesional, Dpto. De Ingeniería y Tecnología. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.
- Estrada-Torres, A. y L. Varela, 1998. Hacia el Estudio de la Diversidad y la Conservación de Germoplasma de Hongos Micorrizógenos de México. In: Zulueta, R. R., M. A. Escalona y D. Trejo (eds.). Avances de la Investigación Micorrízica en México. Universidad Veracruzana. Jalapa. 1-7.
- Francis, R. y D. Read, 1994. The Contributions of Mycorrhizal Fungi to the Determination of Plant Community Structure. Plant Soil 159:11-25.
- González-Velázquez A. y R. Valenzuela, 1993. Boletáceos y Gonfidíáceos del Estado de México I. Discusiones Sobre su Distribución en Diferentes Tipos de Vegetación, Asociaciones Ectomicorrizógenas, Fenología y Comestibilidad. Rev. Mex. Mic. 9:35-46.
- Honrubia, M., P. Torres, G. Díaz y A. Cano, 1992. Manual para Micorrizar Plantas en Viveros Forestales. ICONA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. LUDECME VIII. Monografías 54.
- Mason, P.A., 1980. Aseptic Synthesis of Sheathing (Ecto-) Mycorrhizas. In: Ingram, D.S. y J. P. Helgeson (eds.) Tissue Culture Methods for Plant Pathologist. Blackwell Scientific Publications, London, 173-178.
- Mason, P.A., F.T. Last, J. Wilson, J.W. Deacon, L.V. Fleming y F.M. Fox, 1990. Fruiting and Successions of Ectomycorrhizal Fungi. In: Pegg, G. F. y P. G. Ayres (eds.) Fungal Infection of Plants. Nueva York, 253-268.
- Mata, G. y G. Guzmán, 1989. Caracterización de Cepas Mexicanas del Hongo Comestible *Lentinus borianus* y Determinación de su Patrón de Sexualidad. Rev. Mex. Mic. 5:81-95.

- Molina R. y J.G. Palmer, 1982. Isolation, Maintenance and Pure Culture Manipulation of Ectomycorrhizal Fungi. In: Schenk N. C. (Ed.) Methods and Principles of Mycorrhizal Research. American Phytopathological Society, St. Paul. 115-125.
- Molina, R. y J.M. Trappe, 1984. Mycorrhizae Management in Bareroot Nurseries. In: Duryea M. L. y T. D. Landis (eds.). Forest Nursery Manual: Production of Bareroot Seedlings. Martinuss Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. La Haya, 211-223.
- Molina, R., Massicotte y J.M. Trappe, 1991. Specificity Phenomena in Mycorrhizal Symbioses: Community-Ecological Consequences and Practical Implications. In: Allen, M. F. (Ed.). Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant-Fungal Process. Chapman and Hall, New York, 357-423.
- Moreno-Fuentes, A., E. Aguirre-Acosta, M. Villegas y J. Cifuentes, 1994. Estudio Fungístico de los Macromicetos en el Municipio de Bocoyna, Chihuahua, México. Rev. Mex. Mic. 10:63-76.
- Moser, M., 1960. Die Gattung Phlegmacium. DIE PILZE MITTELEUPORA'S 4. J. Bad Heilbrunn.
- Oort, A.J.P., 1981. Nutritional Requirements of *Lactarius* Species, and Cultural Characters in Relation to Taxonomy. North-Holland, Nueva York.
- Rodríguez, O., M. Garza y L. Guzman-Dávalos, 1994. Inventario Preliminar de los Hongos del Volcán de Tequila, Estado de Jalisco, México. Rev. Mex. Mic. 10:103-111.
- Salmones, D., V. Álvarez, G. Mata y G. Guzmán, 1990. Estudio de una Cepa Mexicana de *Laetiporus sulphureus* (Polyporaceae) Bajo Diferentes Condiciones de Cultivo en el Laboratorio. Rev. Mex. Mic. 6:253-257.
- Santiago-Martínez, G., L. Varela, A. Estrada-Torres y V. Cuaxilo, 1995. Efecto de Seis Medios de Cultivo Sobre el Crecimiento de Tres Cepas de *Pisolithus tinctorius*. Rev. Mex. Mic. 11:57-68.
- Van, H., T. Cotter y O.K. Miller, JR., 1987. Ectomycorrhizal Associates of the Bolete Genus *Suillus* in Nepal. In: Sylvia, D. M., L. L. Hung y J. H. Graham (eds.). Mycorrhizae in the Next Decade. Proceeding of the 7th North American Conference on Mycorrhizae. Gainsville, 90.
- Varela, L. y A. Estrada-Torres, 1997. Diversity and Potential Use of Mycorrhizae for Sustainable Development in Mexico. In: Palm M. E. and I. H. Chapela (eds.) Mycology in Sustainable Development: Expanding Concepts, Vanishing Borders. Parkway, North Carolina, 160-182.

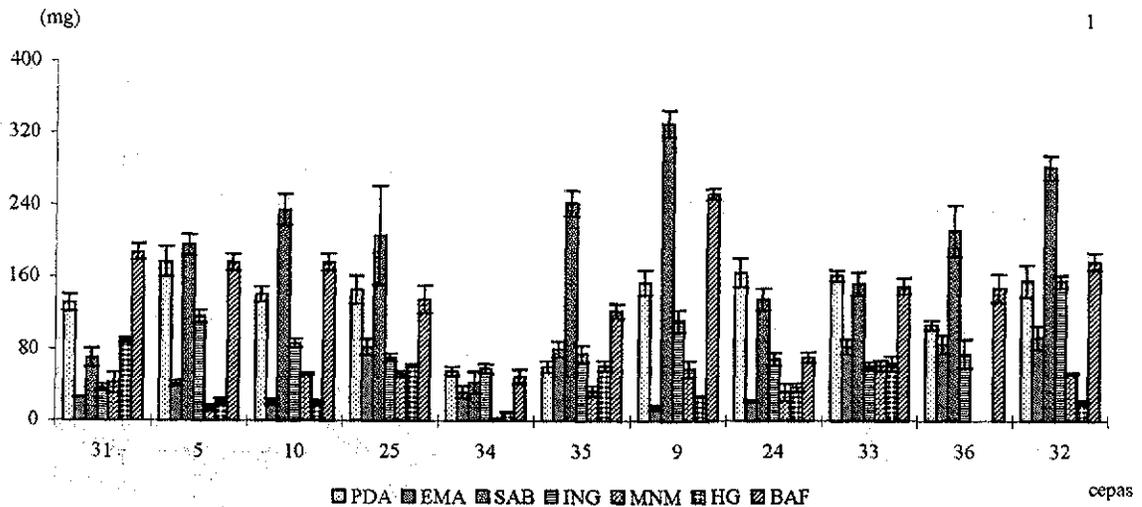


Fig. 1: Biomasa (mg) producida por las cepas de *Suillus* en los diferentes medios nutritivos.

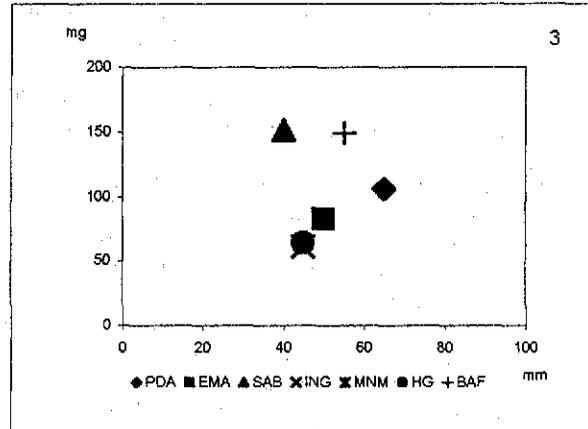
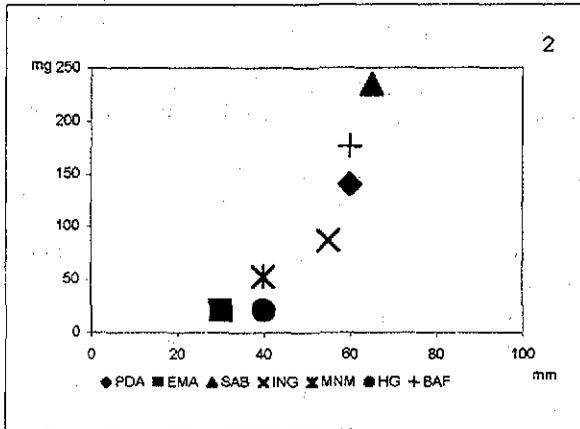


Fig. 2: Correlación entre la biomasa y diámetro colonial, cepa *S. glandulosipes* TLAX 10.

Fig. 3: Correlación entre la biomasa y diámetro colonial, cepa *Suillus cf. pseudobrevipes* TLAX 33.

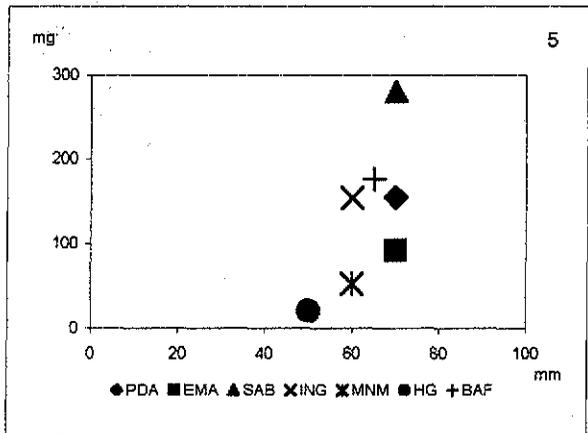
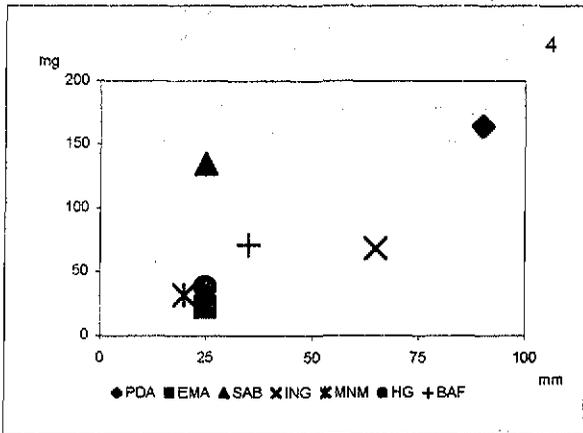


Fig. 4: Correlación entre la biomasa y diámetro colonial, cepa *Suillus tomentosus* TLAX 24.

Fig. 5: Correlación entre la biomasa y diámetro colonial, cepa *Suillus sp.* TLAX 32.

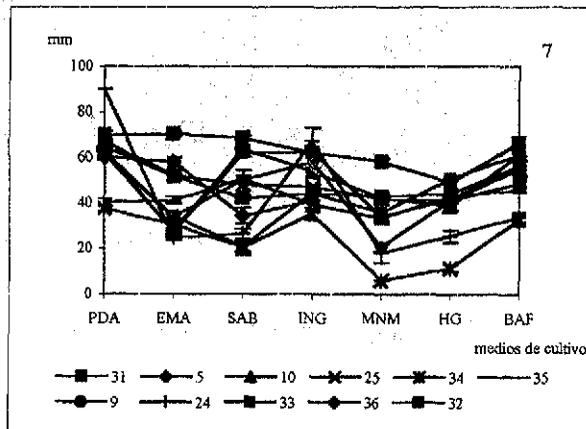
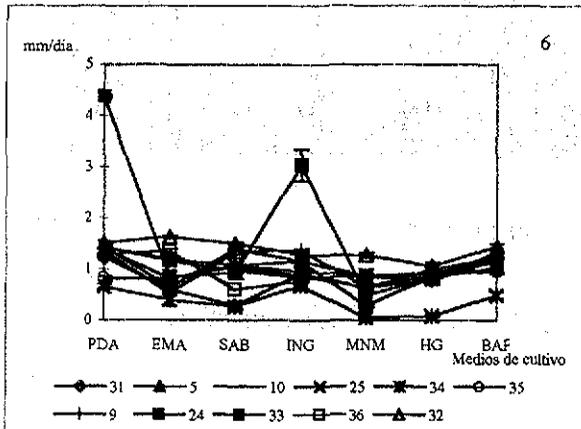


Fig. 6: Interacción entre los medios de cultivo y las once cepas de *Suillus* con respecto a la velocidad media de crecimiento.

Fig. 7: Interacción entre los medios de cultivo y las once cepas de *Suillus* con respecto al diámetro final.

INFLUENCIA DEL PH EN EL CRECIMIENTO DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS

ALFREDO VÁZQUEZ-GARCÍA*
GUADALUPE SANTIAGO-MARTÍNEZ*
ARTURO ESTRADA-TORRES*

Resumen. Se estudió el efecto del pH sobre el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos, las cuales se encuentran depositadas en el cepario del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT) y pertenecen a los siguientes taxa: *Amanita muscaria*, *Laccaria bicolor*, *Pisolithus arrhizus*, *Rhizopogon* sp., *Scleroderma polyrhizum*, *Suillus glandulosipes*, *S. tomentosus*, *Suillus* sp. y *Terfezia olbiensis*. Para la evaluación del desarrollo de las cepas en los diferentes valores de pH se midieron las variables: velocidad media de crecimiento, diámetro final de la colonia y peso seco.

Las cepas de *Amanita muscaria* presentaron un crecimiento lento sin diferencias significativas en los pH de 4 a 7; la cepa TLAX 22 creció mejor que la 27. *Laccaria bicolor* presentó su mayor crecimiento en los pH de 6 y 7. Las cepas de *Pisolithus arrhizus* tuvieron su mayor crecimiento en los pH de 4 a 6, siendo la cepa TLAX 13 la de crecimiento más rápido. *Rhizopogon* sp. obtuvo mayor crecimiento en los pH de 5.0 y 6.0. *Scleroderma polyrhizum* obtuvo su mayor crecimiento en pH 6.0. Las cepas de *Suillus* crecieron mejor en los pH de 4 a 6. *Terfezia olbiensis* fue la única cepa que se desarrolló mejor en pH 8.0; además, fue la de crecimiento más rápido, por lo que el experimento se finalizó a los 18 días.

Palabras clave: hongos ectomicorrizógenos, pH, *Amanita*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Suillus*, *Scleroderma*, *Terfezia*.

Abstract. The effect of pH on growth rate was studied in fifteen strains of ectomycorrhizal fungi. The strains are deposited in the culture collection of the Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas (CICB), Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT), and belong to: *Amanita muscaria*, *Laccaria bicolor*, *Pisolithus arrhizus*, *Rhizopogon* sp., *Scleroderma polyrhizum*, *Suillus glandulosipes*, *S. tomentosus*, *Suillus* sp. and *Terfezia olbiensis*. The tested pH values were 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0. The variables studied were average growth rate, final diameter and dry weight of the fungal colonies.

Amanita muscaria strains had slow growth, without statistical significant differences at 4 to 7 pH values, being the strain TLAX 22 which grew better than strain TLAX 27. *Laccaria bicolor* had its larger growth at pH of 6 and 7. *Pisolithus arrhizus* strains had their best growth at pH of 4 to 6, being the

*Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Km 10.5 autopista Texmelucan-Tlaxcala, San Felipe Ixtacuixtla, CP 90120, Tlaxcala.

strain TLAX 13 which grew faster. *Rhizopogon* sp. had its larger growth at pH of 5 and 6. *Scleroderma polyrhizum* grew better at pH of 6. *Suillus* strains grew better at pH of 4 to 6. In contrast, strain of *Terfezia olbiensis* was the only one that grew better at pH of 8.0, and its growth was so faster that the experiment was concluded at 18 days.

Key words: ectomycorrhizal fungi, pH, *Amanita*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Suillus*, *Scleroderma*, *Terfezia*

Introducción

El pH del suelo es muy importante porque influye en la población microbiana, así como en la disponibilidad de nitrógeno, fósforo, calcio y magnesio, entre otros (Bockheim, 1991), considerándose que la mayoría de los nutrientes están disponibles para las plantas a los pH de 6.5 a 7.5 (Tamhane *et al.*, 1986).

Sin embargo, la intervención del hombre induce cambios importantes en el pH edáfico; así, en los suelos en los que se han extraído minerales con su posterior acumulación en la superficie, el pH se modifica notablemente (Malajczuk *et al.*, 1994), en tanto muchos suelos de Europa y Norteamérica se han acidificado por la precipitación de soluciones sulfúricas y ácidos nítricos, o el depósito de bióxido de azufre, óxidos de nitrógeno o partículas que contienen sulfato o nitrato de amonio (Fredman, 1989; Willenborg *et al.*, 1990). Estos cambios ocasionan graves daños en los procesos edáficos.

La ectomicorriza es la asociación mutualista entre las raíces de plantas como las coníferas y el micelio de algunos hongos del suelo; en esta asociación, el hongo rodea las raíces secundarias de las plantas formando una red de hifas entrelazadas llamado manto; intercelularmente, el hongo rodea a las células corticales formándose la red de Hartig (Smith y Read, 1997). En esta asociación se favorece la captación de agua y nutrientes del suelo, se provee a la planta de resistencia a condiciones ambientales extremas como sequía, pH y temperatura, y se proporciona protección contra patógenos (Honrubia *et al.*, 1992)

La susceptibilidad de las plántulas a ser micorrizadas depende de factores ambientales y químicos como disponibilidad de nutrientes, temperatura y pH, donde la tolerancia de los hongos a estos factores puede influir en la colonización y establecimiento de las micorrizas. Estas características podrían ser utilizadas como uno de los criterios de selección de hongos, para que puedan ser útiles en los programas de reforestación, sobre todo en lugares con condiciones adversas (Hormilla *et al.*, 1994).

Cada tipo de hongo puede tener diferentes reacciones en cada valor de pH, pero la información concerniente al pH óptimo necesario para el establecimiento de una simbiosis entre un hongo específico y las raíces de su hospedero es todavía limitada (Hung y Trappe, 1983). El pH del medio de cultivo afecta el crecimiento de los hongos ectomicorrizógenos (Zak, 1973) y aunque se han reportado datos experimentales que indican un buen crecimiento a pH desde 3.2 hasta 6.5, el óptimo oscila entre 4.5 y 5.5 para la mayoría de los aislamientos probados. También existen algunas especies con buen crecimiento a un pH de 6.8 y 8.3 (Hung y Trappe, 1983). No obstante, los experimentos *in vitro* que miden el efecto del pH sobre el crecimiento fúngico deben ser interpretados con precaución, ya que los resultados pueden ser afectados por la duración del ensayo, la

fuelle de nitrógeno o la adición de sales de hierro antes o después de la esterilización del medio (Hung y Trappe, 1983).

En México, el pH de los suelos está sujeto a cambios dramáticos (Castro-Servín, 1995); por un lado, los problemas de la contaminación por gases y lluvia ácida han afectado a las zonas boscosas aledañas a las grandes ciudades durante los últimos años (Arnolds, 1991), en tanto que, por otro lado, los problemas de desertificación por degradación ecológica (Llerena-Villalpando y Sánchez-Bernal, 1992) afectan cerca del 54 % de la superficie total de la República Mexicana la cual está en peligro de convertirse en zonas tepetatosas (Werner, 1992). Por lo anterior, es necesario emprender nuevas formas de protección y conservación, así como detectar qué hongos ectomicorrizógenos son capaces de tolerar los cambios en el suelo y lograr que la asociación se desarrolle para el mejor establecimiento de las plantas utilizadas con fines de rehabilitación. Es por esto, que el propósito de este trabajo fue determinar la influencia que tiene el pH sobre el desarrollo de cepas de hongos ectomicorrizógenos bajo condiciones de cultivo axénico, así como observar su tolerancia a la acidez y/o alcalinidad, para proporcionar las bases que permitan su empleo en vivero y/o campo.

Materiales y métodos

Obtención de las cepas. Las cepas estudiadas se encuentran depositadas en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Dichas cepas se obtuvieron a partir de cuerpos fructíferos procedentes de diferentes localidades del estado de Tlaxcala y pertenecen a siete géneros. Asimismo, se incluyó una cepa proveniente del estado de Oaxaca (Cuadro 1). Los materiales de referencia se encuentran depositados en el herbario TLXM de la misma institución.

Crecimiento activo. Para el crecimiento activo, las cepas seleccionadas se sembraron en medio papa-dextrosa-agar (PDA) (Bioxon Becton Dickinson de México) y se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante cuatro semanas.

Ajuste del pH. El pH del medio biotina-aneurina-ácido fólico agar (BAF) (Moser, 1960) se ajustó a los pH de 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0, agregando HCl o KOH 1N, según fuera necesario.

Cultivo en diferentes pH. La colonia en crecimiento activo se cuadrículó con un bisturí estéril, cortando fragmentos de 5 mm por lado y transfiriendo un cuadro a cada caja de Petri con el medio de cultivo BAF previamente ajustado a los diferentes valores de pH. Se sembraron cuatro repeticiones para cada una de las pruebas y se incubaron a 25°C en la oscuridad durante 30 días. El diámetro de la colonia se midió cada tercer día para poder estimar la velocidad de crecimiento.

Modificación del pH. En cada tratamiento se midió el pH inicial y final del medio de cultivo con un potenciómetro modelo PHI 34 marca Beckman provisto con un electrodo para sólidos.

Variables consideradas:

Velocidad media de crecimiento. Con los datos de los diámetros coloniales obtenidos cada tercer día, se realizó un análisis de regresión lineal para obtener el valor de la pendiente de cada tratamiento. A estas pendientes se les consideró como la velocidad media de crecimiento de la colonia considerando los criterios de Santiago-Martínez (1992).

Cuadro 1. Listado de especies estudiadas

No de Cepa	Taxon	Material de referencia	Procedencia	Vegetación
TLAX 22	<i>Amanita muscaria</i> (L.) Hook.	AME 1045	1	I
TLAX 27	<i>A. muscaria</i>	AKL 2252	1	I
TLAX 30	<i>Laccaria bicolor</i> (Maire) P. D. Orton	CLV 55	1	I
TLAX 13	<i>Pisolithus arrhizus</i> (Scop.) Rauschert	ENCB 5	2	II
TLAX 37	<i>P. arrhizus</i>	AME 1177	3	III
TLAX 28	<i>Rhizopogon</i> sp.	AKL 2254	1	I
TLAX 38	<i>Scleroderma polyrhizum</i> (J. F. Gmel.) Pers.	AME 1263	3	IV
TLAX 10	<i>Suillus glandulosipes</i> Thiers & A. H. Sm.	SMG 284	4	V
TLAX 5	<i>S. glandulosipes</i>	AKL 1588	4	V
TLAX 35	<i>S. glandulosipes</i>	AKL 2296	4	V
TLAX 9	<i>S. tomentosus</i> (Kauffman) Singer	SMG 276	1	I
TLAX 24	<i>S. tomentosus</i>	AME 1009	1	I
TLAX 20	<i>Suillus</i> sp.	AKL 1970	5	VII
TLAX 32	<i>Suillus</i> sp.	AKL 2264	6	VIII
TLAX 16	<i>Terfezia olbiensis</i> Tul	AKL 1594	4	IV

LOCALIDADES: (1) Cañada Grande, Ladera Este, Volcán la Malintzi, Mpio. Huamantla, Tlax (2) Oaxaca. (3) 1 Km al N de Sn Francisco Temezontla, Mpio. de Panotla, Tlax (4) Cerro Tepeticpac, Mpio. de Totolac, Tlax (5) El Peñón, N del Rosario, Mpio. de Tlaxco, Tlax (6) 2 Km al NW de Miltepec, Mpio. de Españita, Tlax. **VEGETACIÓN:** (I) bosque de *Pinus-Abies*; (II) *Juglans*; (III) bosque de *Quercus*; (IV) bosque de *Pinus leiophylla* y *Arbutus*; (V) área reforestada con *Pinus*; (VI) matorral secundario y bosque residual de *Quercus*; (VII) bosque de *Abies*, *Pinus* y *Quercus*; (VIII) bosque de *Quercus-Arbutus-Juniperus*

Diámetro final. Es el dato de la última medición del diámetro colonial.

Producción de biomasa. Al terminar el periodo de incubación, se determinó la producción de biomasa a través del peso seco de la colonia con la técnica modificada de Chapman *et al.* (1990), la cual consistió en eliminar el agar poniendo la colonia en agua hirviendo, posteriormente ésta se enjuagó con agua caliente y se colocó en un horno a 80°C, hasta obtener peso constante.

Análisis estadístico. A los datos obtenidos de velocidad media de crecimiento, diámetro final y producción de biomasa de cada cepa en los diferentes pH se les aplicó análisis de varianza simple o bifactorial, según el caso, para comparar el crecimiento en los diferentes pH entre cepas del mismo género, así como la prueba múltiple de Tukey con nivel de significancia de $P=0.05$ para establecer los tratamientos en los que hubo diferencias estadísticas. Para esto se utilizó el programa estadístico SAS, Institute Inc. (1985).

Resultados y discusión

Con base en los resultados de los análisis estadísticos, podemos determinar que el crecimiento de las cepas fue afectado por el pH, observándose que el valor óptimo para la mayoría de los aislamientos varía entre 4.0 y 6.0 y sólo la cepa de *Terfezia obliensis* TLAX 16 tiene su crecimiento óptimo en pH de 8.0. Esto puede deberse a las condiciones en que crece este hongo en el campo, ya que se encontró en un lugar donde predominan los suelos calcáreos, con valores de pH básicos.

El crecimiento de las cepas de *Amanita muscaria* fue lento, comenzando a formar hifas a los cuatro días aproximadamente. La cepa TLAX 22 presentó crecimiento únicamente en los pH de 4 a 7 y la cepa TLAX 27 creció en todos los tratamientos aunque los valores más altos de las variables estudiadas los presentó en los mismos valores de pH en los que se desarrolló la otra cepa de esta especie. Los análisis de varianza bifactoriales nos indicaron que no hay diferencias significativas de los crecimientos en los pH de 4.0 a 7.0; pero al comparar el crecimiento entre cepas, la TLAX 22 tiene mayor crecimiento con diferencias significativas, aunque es importante señalar que no se desarrolló en los valores de pH extremos; únicamente se observó interacción entre cepas y pH del medio en la producción de biomasa. Torres y Honrubia (1991) reportan resultados parecidos, ya que en ambos estudios no hay diferencias significativas entre los tratamientos para cada cepa (Cuadros 2, 3 y 4).

En cuanto al crecimiento de las cepas de *Pisolithus arrhizus*, se observó que la cepa procedente de Oaxaca (TLAX 13) tiene mayor crecimiento que la TLAX 37 presentando diferencias estadísticas entre ellas; en los pH de 4.0, 5.0 y 6.0, se encontraron los valores más altos en las tres variables para las dos cepas, presentando diferencias estadísticas con los valores de los pH de 7.0 y 8.0 (Cuadros 2, 3 y 4). La cepa TLAX 37 es más sensible a los pH básicos, ya que no creció en pH 8.0. La interacción entre cepas y medios no fue significativa.

Hung y Trappe (1983) observaron que algunas cepas de *Pisolithus arrhizus* pueden crecer en condiciones alcalinas, pero las cepas mexicanas estudiadas desarrollan sólo algunas hifas sobre el cuadro del inóculo cuando se pasan a medios de cultivo con pH de 7.0 y 8.0.

Las cepas del género *Suillus* presentaron gran variabilidad en cuanto a su patrón de crecimiento. Así, *S. glandulosipes* TLAX 10 se desarrolló bien en los pH de 3.0 a 6.0, obteniendo sus mayores velocidad de crecimiento y diámetro final en el pH de 3.0 y su mayor producción de biomasa en el de 5.0. La cepa de *S. glandulosipes* TLAX 5 mostró su mayor velocidad de crecimiento y diámetro final en el pH de 7.0 y su mayor producción de biomasa en el pH de 5.0; finalmente, la cepa TLAX 35 presentó su mayor desarrollo en el pH de 6.0, siendo la única cepa de *Suillus* que creció en el pH de 8.0 (Cuadros 2, 3 y 4).

La cepa de *Suillus tomentosus* TLAX 9 presentó su mayor diámetro final y producción de biomasa en el pH de 4.0 y la mayor velocidad media de crecimiento en el de 6.0; mientras tanto la cepa TLAX 24 de la misma especie creció bien en los pH de 3.0 a 7.0, determinándose como pH óptimo el de 5.0 para producción de biomasa y el de 7.0 para la velocidad de crecimiento y el diámetro final (Cuadros 2, 3 y 4).

La cepa de *Suillus* sp. TLAX 20 tuvo su mayor desarrollo en el pH de 6.0, en tanto la cepa de *Suillus* sp. TLAX 32 presentó su máximo crecimiento en los pH de 4.0 y 6.0 en la velocidad de crecimiento y diámetro final, y su mayor producción de biomasa en el de 6.0 (Cuadros 2, 3 y 4).

Cuadro 2. Velocidad media de crecimiento (mm/día)

CEPA		3	4	5	6	7	8	̄ CEPAS	
1	TLAX 22	̄ e	no creció	0.35 0.16	0.41 0.16	0.38 0.16	0.28 0.22	no creció	0.36a
	TLAX 27	̄ e	0.10 0.0	0.20 0.16	0.24 0.0	0.24 0.16	0.15 0.0	0.12 0.0	0.18b
	̄ pH		0.10b	0.27a	0.33a	0.31a	0.22a	0.12ab	
2	TLAX 13	̄ e	1.78 0.16	1.50 0.5	2.43 0.22	2.03 0.22	1.06 0.4	0.10 0.05	1.48a
	TLAX 37	̄ e	0.62 0.3	0.94 0.22	0.94 0.3	1.17 0.3	0.005 0.03	no creció	0.74b
	pH		1.20ab	1.22ab	1.68a	1.60a	0.53b	0.10c	
3	TLAX 10	̄ e	1.48 0.16	1.31 0.16	1.27 0.22	1.26 0.16	0.44 0.11	no creció	1.15a
	TLAX 5	̄ e	0.73 0.16	1.0 0.16	1.17 0.09	1.12 0.16	1.36 0.16	no creció	1.07a
	TLAX 35	̄ e	1.24 0.16	0.84 0.22	0.95 0.22	1.27 0.11	1.08 0.16	0.08 0.08	0.91b
	TLAX 9	̄ e	no creció	0.99 0.16	0.75 0.11	1.06 0.16	0.49 0.22	no creció	0.82b
	TLAX 24	̄ e	0.84 0.16	0.87 0.22	0.92 0.22	0.91 0.3	0.94 0.11	no creció	0.90b
	TLAX 20	̄ e	0.48 0.22	1.03 0.07	1.29 0.16	1.40 0.16	0.27 0.16	no creció	0.89b
	TLAX 32	̄ e	no creció	1.44 0.16	1.17 0.09	1.41 0.16	0.61 0.16	no creció	1.16a
	̄ pH		0.95b	1.07b	1.07b	1.21a	0.74c	0.08d	
4	TLAX 30	̄ e	no creció	1.77ab 0.0	2.43a 0.16	2.67a 0.16	2.66a 0.16	1.1b 0.4	
5	TLAX 28	̄ e	0.43c 0.16	0.88ab 0.16	1.19a 0.16	1.28a 0.16	0.46bc 0.3	0.06c 0.16	
6	TLAX 38	̄ e	no creció	0.28b 0.07	0.91a 0.16	1.13a 0.16	0.27b 0.09	0.07b 0.16	
7	TLAX 16	̄ e	no creció	no creció	2.59b 0.4	3.95ab 0.3	3.24ab 0.3	4.6a 0.4	

1) *Amanita muscaria*; 2) *Pisolithus arrhizus*; 3) *Suillus* spp.; 4) *Laccaria bicolor*; 5) *Rizopogon* sp.; 6) *Scleroderma polyrhizum*; 7) *Terfezia olbiensis*. ̄ Promedio de 4 repeticiones; e error estándar; letras iguales no hay diferencias significativas P=0.05.

Cuadro 3. Diámetro final (mm)

CEPA		3	4	5	6	7	8	\bar{x} CEPAS	
1	TLAX 22	\bar{x}	no creció	13.6	16.1	15.2	12.7	no creció	14.4a
		e		0.9	0.8	1.2	1.1	creció	
	TLAX 27	\bar{x}	7.1	10.9	12.2	11.9	9.1	7.1	
	e	0.4	0.8	0.6	0.8	0.5	0.4		
\bar{x} pH		7.1b	12.2ab	14.2a	13.5a	10.9ab	7.1b		
2	TLAX 13	\bar{x}	52.7	58.5	69.5	59.2	37.5	7.0	47.4a
		e	0.7	1.0	1.3	1.2	1.9	0.9	
	TLAX 37	\bar{x}	22.5	32.5	33.4	38.2	5.4	no creció	
	e	1.6	1.2	1.3	1.3	0.6	creció		
\bar{x} pH		37.6b	45.5ab	51.4a	48.7ab	21.4c	5.9c		
3	TLAX 10	\bar{x}	44.6	42.9	40.6	40.2	19.4	no creció	37.5a
		e	0.9	0.7	1.1	0.9	0.6	creció	
	TLAX 5	\bar{x}	25.0	32.1	35.4	32.0	40.1	no creció	
	e	0.7	0.8	0.7	1.0	1.0	creció		
TLAX 35	\bar{x}	40.1	26.6	30.1	39.6	32.6	7.1	29.4bc	
	e	1.0	1.3	1.3	0.5	1.0	0.6		
TLAX 9	\bar{x}	no creció	36.0	25.9	34.2	19.7	no creció		29bc
	e		0.7	0.6	0.8	1.2	creció		
TLAX 24	\bar{x}	26.1	27.7	27.9	27.7	28.0	no creció	27.5c	
	e	0.9	1.4	1.3	1.5	0.8	creció		
TLAX 20	\bar{x}	18.7	33.6	38.7	41.5	13.7	no creció		29.3bc
	e	1.0	0.6	0.7	0.7	0.9	creció		
TLAX 32	\bar{x}	no creció	44.4	37.7	44.9	23.1	no creció	37.5ab	
	e		0.6	0.5	0.6	0.8	creció		
\bar{x} pH		30.9ab	34.8a	33.8a	37.2a	25.2b	7.1c		
4	TLAX 30	\bar{x}	no creció	52.1ab	70.1a	78.0a	79.0a	35.7b	
		e		0.5	1.0	1.1	1.1	2.3	
5	TLAX 28	\bar{x}	17.5cd	30.5ab	35.7a	40.9a	18.6bc	6.2d	
		e	0.5	0.8	0.9	0.9	1.4	1.0	
6	TLAX 38	\bar{x}	no creció	14.2c	32.0b	38.2a	12.5cd	8.5d	
		e		0.2	0.8	0.8	0.5	0.5	
7	TLAX 16	\bar{x}	no creció	no creció	48.6b	70.2ab	60.5ab	80.0a	
		e			1.7	1.1	1.3	1.5	

1) *Amanita muscaria*; 2) *Pisolithus arrhizus*; 3) *Suillus* spp.; 4) *Laccaria bicolor*; 5) *Rizopogon* sp.; 6) *Scleroderma polyrhizum*; 7) *Terfezia olbiensis*. \bar{x} Promedio de 4 repeticiones; e error estándar; letras iguales no hay diferencias significativas P=0.05.

Cuadro 4. Producción de biomasa (mg)

CEPA		3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	× CEPAS	
1	TLAX 22	× no e creció	24.8 1.3	29.5 1.6	22.3 2.4	16.9 1.2	no creció	23.4a	
	TLAX 27	× 13.2 e 0.7	28.7 1.3	40.4 1.4	30.2 2.2	13.4 1.3	5.3 0.2		21.9a
	× pH	13.2a	26.7a	34.9a	26.2a	15.1a	5.3a		
2	TLAX 13	× 127.1 e 2.4	160.9 3.0	292.9 4.1	202.7 4.0	57.6 2.8	5.8 1.1	141.2a	
	TLAX 37	× 43.1 e 1.3	98.7 3.2	67.8 2.0	80.0 1.6	1.4 0.3	no creció		58.2b
	× pH	85.1bc	129.8ab	180.3a	141.3ab	29.5c	5.8c		
3	TLAX 10	× 118.7 e 3.1	131.1 1.4	162.3 3.3	119.8 2.7	30.8 1.4	no creció	112.5a	
	TLAX 5	× 63.2 e 1.3	78.7 2.2	80.9 2.1	60.9 1.9	80.4 2.9	no creció		72.0b
	TLAX 35	× 77.1 e 2.1	75.1 3.4	75.4 2.3	137.6 1.7	64.4 2.6	4.2 0.8	73.1b	
	TLAX 9	× no e creció	106.4 2.0	71.9 2.1	95.8 2.4	23.8 1.9	no creció		74.5b
	TLAX 24	× 53.6 e 1.2	60.9 3.0	67.0 3.3	61.2 3.3	45.1 1.8	no creció	57.5b	
	TLAX 20	× 41.2 e 2.0	66.3 1.3	70.8 1.9	89.2 2.2	9.6 0.6	no creció		55.4b
	TLAX 32	× no e creció	93.7 1.4	71.6 1.0	120.7 1.5	19.7 0.8	no creció	76.b	
	× pH	70.8a	87.5a	85.7a	97.9a	39.8b	4.2b		
4	TLAX 30	× no e creció	34.6a 1.7	27.2a 1.4	54.6a 1.7	44.3a 1.9	16.1a 1.9		
5	TLAX 28	× 36.7bcd e 0.7	83.3ab 1.5	76.3bc 2.8	133.6a 1.8	25.3cd 1.6	3.7d 1.0		
6	TLAX 38	× no e creció	13.0bc 0.4	21.2ab 0.6	29.0a 1.4	5.6c 0.7	0.5c 0.2		
7	TLAX 16	× no e creció	no creció	28.9c 1.4	118.3b 2.5	136.8b 2.5	244.8a 1.4		

1) *Amanita muscaria*; 2) *Pisolithus arrhizus*; 3) *Suillus* spp.; 4) *Laccaria bicolor*; 5) *Rhizopogon* sp.; 6) *Scleroderma polyrhizum*; 7) *Terfezia olbiensis*. × Promedio de 4 repeticiones; e error estándar; letras iguales no hay diferencias significativas P=0.05.

Las cepas de *Suillus* comenzaron su crecimiento a partir del cuarto día; sin embargo las cepas TLAX 5 y TLAX 20 presentaron un crecimiento lento que se aceleró hasta los 12 días.

El análisis bifactorial nos indicó que las cepas que presentaron mejor crecimiento en las tres variables fueron *Suillus glandulosipes* TLAX 10 y TLAX 5, y *Suillus* sp. TLAX 32; los valores de pH en los que crecieron estas cepas van de 3.0 a 6.0 (Cuadros 2, 3 y 4). El análisis también indicó que la interacción entre las cepas y los pH del medio fue significativa, es decir, las cepas respondieron de forma diferente a los distintos valores de pH.

La cepa de *Laccaria bicolor* TLAX 30 fue sensible a pH muy ácidos (3.0) no creciendo en dicha condición. También se pudo observar que las colonias obtuvieron sus mayores velocidades de crecimiento y diámetro final en los pH de 6.0 y 7.0 (Cuadros 2 y 3), aunque su mayor producción de biomasa se encontró en el pH de 6.0 (Cuadro 4). Jongbloed y Borst-Pauwels (1990) reportaron que esta especie alcanza su mayor diámetro colonial en pH de 6.0, sin embargo, también señalaron que la mayor producción de biomasa se obtiene en pH de 4.8. El crecimiento de la colonia en pH de 8.0 fue escaso con un micelio postrado en el medio.

La cepa de *Rhizopogon* sp. TLAX 28 creció bien en pH de 6.0, con los valores más altos en las tres variables (Cuadros 2, 3 y 4). También presentó tolerancia para crecer en pH muy ácidos (3.0) o básicos (8.0), concordando con lo reportado por Jha *et al.* (1990) para un aislamiento de *R. luteolus*. Dennis (1985) reportó que algunas cepas de *R. rubescens* y *R. vulgaris* presentan crecimiento óptimo en pH 6.0; por otro lado, Torres y Honrubia (1991) y Hung y Trappe (1983) estudiaron algunas cepas de *Rhizopogon* registrando su mayor crecimiento en otros valores de pH a los reportados en este estudio para la cepa TLAX 28. La cepa comenzó su crecimiento entre los 8 y 10 días de haberse resembrado.

La cepa de *Scleroderma polyrhizum* TLAX 38 alcanzó su mayor desarrollo en los pH de 5.0 y 6.0 en las tres variables (Cuadros 2, 3 y 4). Dennis (1985) reportó una cepa de *Scleroderma bovista* con crecimiento óptimo en el mismo valor de pH. Esta cepa tiene un periodo de acondicionamiento al medio de cultivo de 12 días.

La cepa de *Terfezia olbiensis* TLAX 16 fue la única que presentó su mayor velocidad de crecimiento, diámetro final y biomasa (Cuadro 2, 3 y 4) en el pH de 8.0, por lo que se consideró como su pH óptimo, siendo sensible a los pH muy ácidos (3.0 y 4.0) y tolerante al pH de 5.0. Dado el desarrollo acelerado que presentó en el pH de 8.0, el experimento se concluyó antes del tiempo señalado en la metodología, ya que cubrió las cajas de petri a los 18 días. Se han realizado pocos estudios referentes a este taxón y hasta el momento se tiene información de que este género se asocia con plantas arbustivas como *Helianthemum* y *Cistus* entre otras, encontrándose frecuentemente en suelos con pH alcalinos (Leduc *et al.*, 1986).

El pH del medio de cultivo puede modificar el patrón de ramificación de las hifas; un ejemplo muy evidente se presentó en la cepa de *Laccaria bicolor* TLAX 30 que en el pH de 8.0 presentó un micelio escaso y laxo, en tanto en el pH de 6.0 la colonia fue más compacta con micelio aéreo abundante; *Terfezia olbiensis* TLAX 16 presentó una colonia laxa y postrada en el medio con pH 5.0, pero la colonia fue más densa y con micelio aéreo abundante en el pH 8.0.

La mayoría de las cepas provienen de suelos forestales, donde el pH varía desde 5.0 hasta 6.5; otras cepas provienen de una zona de lomeríos de origen calcáreo donde el valor del pH del suelo es de 8 a 8.5. Las cepas se desarrollaron bien en los valores de pH probados en el laboratorio que se acercan a los pH de los suelos de los lugares de donde fueron recolectadas, por ejemplo, la cepa de *Laccaria bicolor*, que proviene de un suelo forestal con pH de 6.5, presentó un pH óptimo entre 6.0 y 7.0 en las pruebas de laboratorio (Cuadro 2, 3 y 4).

Las cepas de *S. glandulosipes* presentaron un comportamiento acidófilo a pesar de que provienen de un lugar con suelo calcáreo; estas cepas proceden de una plantación de pinos o de los manchones residuales de bosque que aún quedan en el sitio en que fueron recolectadas y normalmente se encuentran en lugares completamente cubiertos con hojarasca, lo que posiblemente disminuya el pH del área en la que están creciendo. Por otro lado, la cepa TLAX 35 presentó un crecimiento escaso en el pH de 8.0 en comparación con las otras cepas de *Suillus* que no crecieron en dicho valor de pH (Cuadro 3).

La única cepa que presentó su pH óptimo en valores alcalinos fue la de *Terfezia olbiensis*, ya que obtuvo su mayor desarrollo en pH de 8.0, teniendo el suelo de su lugar de procedencia las mismas condiciones de alcalinidad (Cuadros 2, 3 y 4).

Por otro lado, se ha observado que el pH de un medio de cultivo puede cambiar durante el crecimiento de los hongos y estos cambios pueden afectar la composición del medio. Además, se menciona que el efecto en el cambio del pH de una solución puede ser el resultado de la actividad metabólica de los hongos (Lilly y Barnett, 1951).

En la Cuadro 5 se muestra como los pH iniciales son modificados por la acción de cada una de las cepas probadas. Así, las cepas de *Amanita muscaria* TLAX 22 y 27 incrementaron los valores en menos de media unidad en los pH de 3.0 y 4.0; en el pH de 6.0, el valor disminuyó hasta una unidad. Hung y Trappe (1983) reportaron una cepa de *Amanita muscaria* que disminuyó el pH de 6.0 hasta 3.4.

La cepa de *Laccaria bicolor* TLAX 30 aumentó ligeramente los valores de pH iniciales 3.0, 4.0 y 5.0; en tanto disminuyó los de 6.0, 7.0 y 8.0.

El patrón de variación del pH de las cepas de *Pisolithus arrhizus* es diferente entre ambas. La cepa TLAX 13 disminuyó a 3.3 y 4.1 los pH de 5.0 y 6.0 respectivamente; mientras que la cepa TLAX 37 decrementó el pH desde 6.0 hasta 4.6. Hung y Trappe (1983) reportaron cambios de 2.25 hasta 2.55 unidades para una cepa de *Pisolithus arrhizus* en esos mismos valores de pH.

Con *Rhizopogon* sp. TLAX 28, el pH de 6.0 bajó hasta 4.7, en tanto para los demás valores de pH la variación es de menos de media unidad.

Scleroderma polyrhizum TLAX 38 incrementó ligeramente los pH de 3.0 a 3.2 y de 4.0 a 4.1, no sobrepasando 0.5 de unidad; los pH de 6.0, 7.0 y 8.0 llegaron a 5.4, 6.6 y 7.5 respectivamente.

Las cepas del género *Suillus* spp. respondieron de las siguientes formas: en el pH de 3.0, la cepa TLAX 10 disminuyó el pH hasta 2.8; y las cepas TLAX 5, 35, 24 y 20 lo incrementaron en menos de media unidad; en el pH de 4.0, el valor disminuyó con todas las cepas probadas; en el pH inicial de 5.0, disminuyó desde 0.5 hasta 1.0 unidad; en el pH de 6.0 la disminución va desde 1.0 hasta 1.5 unidades; en el pH de 7.0, las cepas TLAX 10, 9, 20 y 32 disminuyeron el valor en menos de una unidad, en tanto las cepas TLAX 10 y 5 lo hicieron en más de una unidad, y solamente la cepa TLAX 24 lo disminuyó hasta 4.5. En los pH de 8.0, todas las cepas bajan ligeramente el pH (Cuadro 5).

Terfezia olbiensis TLAX 16 incrementó en menos de media unidad los pH del 3.0 a 5.0; en los demás valores, el cambio también fue menor de 0.5 de unidad y sólo en el pH de 8.0 lo bajó hasta 7.0, siendo en ese pH donde la cepa obtuvo su mayor crecimiento.

Podemos decir que las cepas fueron capaces de modificar el pH del medio de cultivo y se puede notar que, por lo general, las mayores modificaciones coinciden con los tratamientos en donde se obtuvieron los mayores valores en las diferentes variables estudiadas. Las modificaciones de los valores del pH del medio posiblemente tengan que ver con una estrategia de estos hongos para regular el ambiente en el que se desarrollan, tendiendo a modificar el pH hacia sus valores óptimos de crecimiento.

Las cepas estudiadas presentaron una gran variación intraespecífica, ya que cepas de la misma especie obtuvieron diferencias en la producción de metabolitos que confirieron distintas coloraciones al micelio y medio de cultivo en los diferentes valores de pH, tal como se notó con las cepas de *Amanita muscaria*, *Pisolithus arrhizus*, *Suillus glandulosipes* y *S. tomentosus*.

Conclusiones

La mayoría de las cepas modifican el pH inicial del medio, es decir, en los pH alcalinos y neutro se presenta una disminución a pH ligeramente ácidos, en tanto que en pH más bajos (3.0 y 4.0) se tiende a incrementar su valor.

La modificación del pH medio de cultivo sugiere que la mayoría de las cepas tienden a regular la acidez o alcalinidad del medio.

Con estos resultados se tienen candidatos de hongos que toleran diversos valores de pH, lo que permitirá utilizar cepas específicas de acuerdo con las condiciones de pH del suelo del lugar que se desee reforestar, así como de las condiciones disponibles en el vivero en el que se producirá la planta.

De acuerdo con el desarrollo de los hongos ectomicorrizógenos probados podríamos destinar cepas como la de *Pisolithus arrhizus* TLAX 13 o la de *Suillus glandulosipes* TLAX 10 para la introducción de plántulas ectomicorrizadas en suelos sometidos a fuerte acidificación por efecto de la contaminación; o cepas como *Suillus glandulosipes* TLAX 5 y 35; *S. tomentosus* TLAX 24 y *Terfezia olbiensis* TLAX 16 en la recuperación y/o establecimiento de árboles en suelos de origen calcáreo.

Agradecimientos

Este trabajo forma parte del proyecto SELECCIÓN DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS PARA LA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES EN EL ESTADO DE TLAXCALA, financiado por CONACyT, convenio número 4690-N9406.

Literatura citada

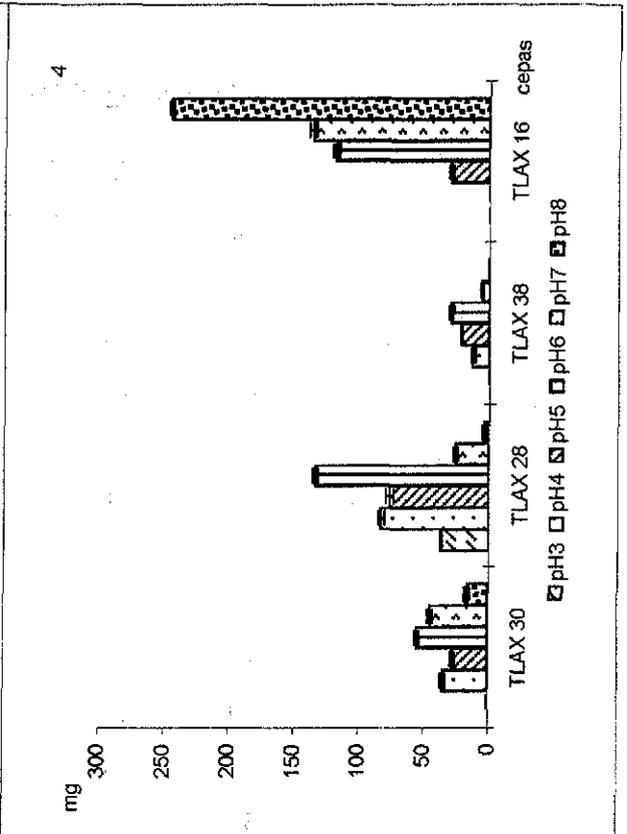
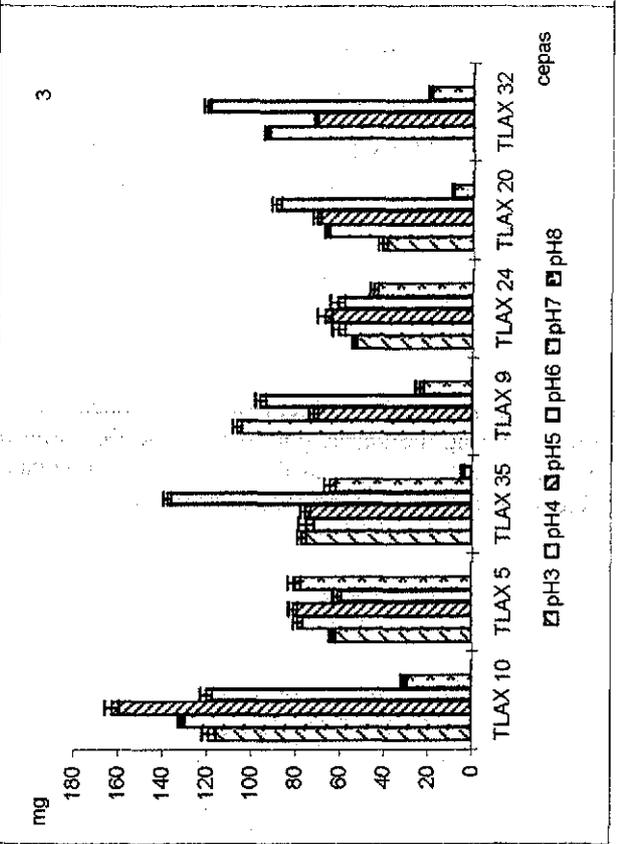
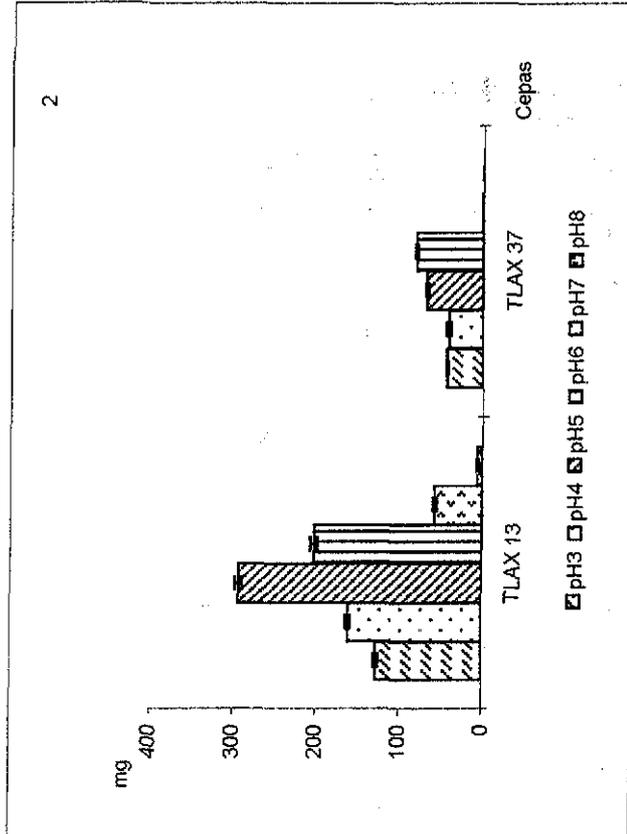
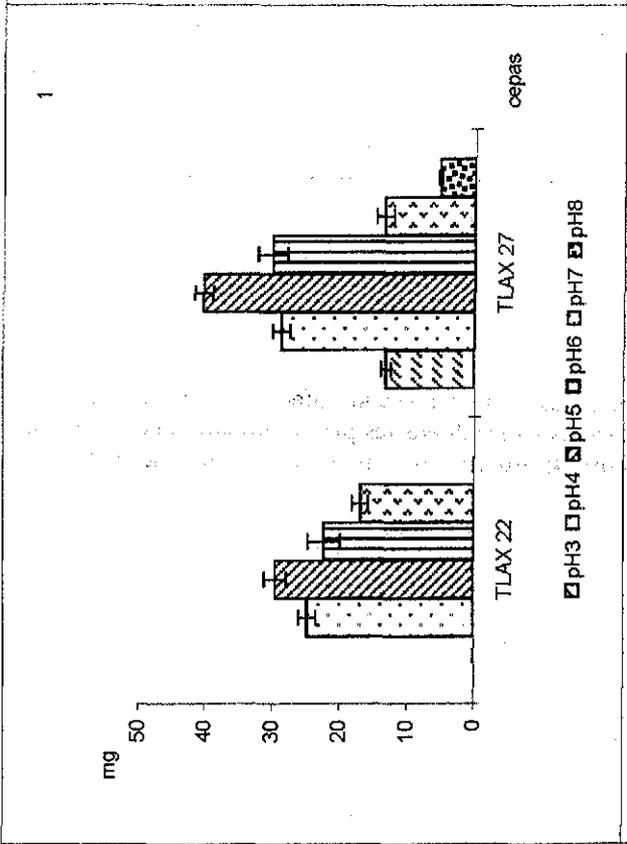
- ARNOLDS, E., 1991. Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe. *Agriculture Ecosystems and Environment* 35:209-244.
- BOCKHEIM, J. G., 1991. Suelos forestales. In: R. A. Young (Ed.). *Introducción a las Ciencias Forestales*. Limusa. México, D. F.
- CASTRO-SERVÍN, J. M., GONZÁLEZ-KLADIANO V. Y T. HERNÁNDEZ-TEJEDA, 1995. Metales pesados en los suelos del Desierto de los Leones, Distrito Federal. *Revista Ciencia Forestal en México* 20:101-112.
- CHAPMAN, W. K., S. M. BERCH Y T. M. BALLARD, 1990. *In vitro* growth of ectomycorrhizal fungi on dilute agar. *Mycologia* 82:526-527

- DENNIS, J. J., 1985. *Effect of pH and temperature on in vitro growth of ectomycorrhizal fungi*. Report BC-X-273. Canadian Forestry Service. Pacific Forestry Centre. Vancouver.
- FREEDMAN, B., 1989. *Environmental ecology: The Impacts of Pollution and other Stresses on Ecosystem Structure and Function*. Academic Press, Inc, San Diego.
- HORMILLA S., M. K. DUÑABEITIA, J. M. BECERRIL, P. CABRERIZO Y J. I. PEÑA, 1994. Growth of several ectomycorrhizal fungi in response to different pure culture conditions. In: *Current of Fourth European Symposium on Mycorrhizas*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada.
- HONRUBIA, M. P. TORRES, G. DÍAZ Y A. CANO, 1992. *Manual para Micorrizar Plantas en Viveros Forestales*. Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. LUDECME VIII. Monografías 54. Murcia.
- HUNG, L. L. Y J. M. TRAPPE, 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. *Mycologia* 75:234-241.
- JHA, B. N., SHARMA Y R. R. MISHRA, 1990. Effect of the growth of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. In: B. L. Jalali, y H. Chand (eds.) *Current Trends in Mycorrhizal Research, Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza, Held at Haryana Agricultural University, Hisar, India*. 66-67.
- JONGBLOED R. H. Y G. W. F. H. BORST-PAUWELS, 1990. Effects of ammonium and pH on growth of some ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Acta Botanica Neerlandica* 39:349-358.
- LEDUC, J. P., J. DEXHEIMER Y G. CHEVALIER, 1986. Etude ultrastructurale comparée des associations de *Terfezia leptoderma* avec *Helianthemum salicifolium*, *Cistus albidus* et *C. salviaefolius*. *Mycorrhizae: Physiology and genetics*. 1st. ESM, Dijon, 1-5 July. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris. 291-295.
- LLERENA-VILLALPANDO F. A. Y B. SÁNCHEZ-BERNAL, 1992. Recuperación de Tepetates en la Vertiente Oriental del Valle de México. *Terra 10, No Especial*:302-308.
- LILLY, V. G. Y H. L. BARNETT, 1951. *Physiology of the fungi*. Mc Graw-Hill Co., New York.
- MALAJCZUNK, N., P. REDDELL Y M. BRUNDRETT, 1994. Role of ectomycorrhizal fungi in minesite reclamation. In: F. L. Pflieger, y R. G. Linderman (ed.) *Mycorrhizal and plant health*. APS Press. St. Paul.
- MOSER, M., 1960. Die Gattung Phlegmacium (Schleimköpfe) in *Die Pilze Mitteleuropas* 4:1-440. Julius Klinkhardt, Bad Heilbrunn.
- SANTIAGO-MARTÍNEZ, M. G., 1992. *Pruebas de Crecimiento, síntesis in vitro y caracterización de 10 cepas de hongos ectomicorrizógenos*. Tesis Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- SAS Institute Inc, 1985. *SAS® Introductory Guide for Personal Computers*, Version 6 Edition, Cary, NC:SAS Institute Inc. USA.
- SMITH, S. E. Y D. J. READ, 1997. *Mycorrhizal Symbiosis. Structure and Development of Ectomycorrhizal Roots*. Academic Press, New York, 161-290.
- TAMHANE, R. V., D. P. MOTIRAMANI, Y. P. BALI Y R. L. DONAHUE, 1986. *Suelos: su química y fertilidad en zonas tropicales*, 4a edición, Diana, S. A. México, D. F.
- TORRES, P. Y M. HONRUBIA, 1991. Dinámica de crecimiento y caracterización de algunos hongos ectomicorrízicos en cultivo. *Cryptogamie Mycologie* 12:183-192.
- WERNER, G., 1992. Suelos Volcánicos Endurecidos (Tepetates) en el Estado de Tlaxcala: Distribución, Rehabilitación, Manejo y Conservación. *Terra 10, No. Especial*:318-331.
- WILLENBORG, A., D. SCHMITZ Y J. LELLEY, 1990. Effects of environmental stress factors on ectomycorrhizal fungi *In vitro*. *Canadian Journal of Botanic* 68:1741-1746.
- ZAK, B., 1973. Classification of ectomycorrhizae. In: G. C. Marks y T. T. Kozlowski (eds.) *Ectomycorrhizae Their ecology and physiology*. Academic Press, New York.

Cuadro 5. Modificación del valor de pH de las cepas

Cepa	pH inicial					
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
TLAX 22	3.6	4.4	5.0	5.1	6.3	7.9
TLAX 27	3.4	4.3	4.6	5.1	6.3	8.0
TLAX 30	3.4	4.3	5.2	5.6	6.9	7.6
TLAX 13	3.0	3.3	3.3	4.1	6.4	7.6
TLAX 37	3.0	3.6	4.3	4.6	6.5	8.0
TLAX 28	3.3	4.0	4.6	4.7	6.5	7.7
TLAX 38	3.2	4.1	5.1	5.4	6.6	7.5
TLAX 10	2.8	3.9	4.5	5.2	6.3	7.8
TLAX 5	3.1	3.8	4.3	4.7	5.4	7.9
TLAX 35	3.1	3.9	4.3	4.5	5.4	7.3
TLAX 9	---	3.6	3.9	4.5	6.3	7.8
TLAX 24	3.2	3.9	4.1	4.6	4.5	7.9
TLAX 20	3.2	3.9	4.5	4.7	6.6	7.7
TLAX 32	---	3.6	4.1	4.5	6.3	7.7
TLAX 16	3.1	3.9	5.4	5.9	6.7	7.0

Figs. 1-4. 1: Producción de biomasa (mg) producida por las cepas de *Amanita* en los diferentes pH; 2: Producción de biomasa (mg) producida por las cepas de *Pisolithus arrhizus* en los diferentes pH; 3: Producción de biomasa (mg) producida por las cepas de *Suillus* en los diferentes pH; 4: Producción de biomasa (mg) producida por las diferentes cepas probadas en los diferentes pH.



CAPÍTULO II

PRUEBAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS

Los cultivos axénicos de hongos ectomicorrizógenos son difíciles de identificar, debido a que producen pocas estructuras micromorfológicas y éstas suelen ser tan escasas que no permiten diferenciarlos (Zak y Bryan, 1963; Zak y Marx, 1964). Ante tal problemática, se ha propuesto que para la identificación de aislamientos desconocidos es necesario usar caracteres macromorfológicos como textura y color de la colonia, además de hacer uso de herramientas fisiológicas y bioquímicas (Hutchison, 1991).

Bajo esta premisa, en este capítulo se muestran los resultados obtenidos al realizar diferentes pruebas de crecimiento con hongos ectomicorrizógenos.

Debido a que las pruebas realizadas requieren de metodologías diferentes, este capítulo se dividió en partes:

Parte 1. Manuscrito Crecimiento en diferentes temperaturas.

Parte 2. Manuscrito en forma de artículo: Efecto de compuestos fungistáticos sobre el crecimiento de algunas cepas de *Amanita*. Enviado a la Revista Mexicana de Micología para su revisión y publicación.

Artículo publicado: **Santiago-Martínez, G.**, A Estrada-Torres, L Varela y A. Kong-Luz, 1997. Efecto de compuestos fungistáticos sobre algunas cepas de *Suillus*. **Rev. Mex. Mic.** 13:28-32.

Parte 3. Manuscrito: Degradación de compuestos de carbono y nitrógeno

Parte 4. Manuscrito: Actividad de la polifenol oxidasa

Parte 5. Manuscrito: Reacción del micelio con azul de diazonio.

Parte 6. Manuscrito: Análisis de similitud de las cepas de *Amanita* y *Suillus*, con base a los resultados obtenidos en las pruebas fisiológicas y bioquímicas obtenidas.

PARTE 1

CRECIMIENTO EN TEMPERATURAS EXTREMAS

ANTECEDENTES

Las plantas ectomicorrízicas y sus hongos asociados han tenido éxito para colonizar diversos hábitats en una amplia área geográfica (Meyer, 1973). Sin embargo, para que un hongo ectomicorrizógeno pueda colonizar exitosamente las raíces de un árbol influyen factores edáficos y ambientales, tales como el tipo de suelo, la disponibilidad de los nutrimentos, la humedad, el pH y la temperatura, así como la influencia de los microorganismos que se encuentran cercanos (Hutchison, 1990 d).

En ocasiones se correlaciona la asociación específica de los hongos con la tolerancia a las temperaturas de 30 °C, con la incidencia de los hongos en pinos y encinos que poseen características de un sistema radical profundo y que se encuentran en lugares xerófilos con suelos arenosos (Hutchison, 1990 d).

Se han desarrollado trabajos con el afán de seleccionar los hongos idóneos para la inoculación de plántulas destinadas a hábitats particulares, en los cuales puedan existir temperaturas extremas en el suelo (Trappe, 1977).

Por otro lado, se tienen bien establecidas las técnicas de estudio en la identificación de levaduras y ciertos grupos de hongos, donde se utiliza un número limitado de temperaturas como un carácter taxonómico útil que define los valores máximo, mínimo y óptimo de crecimiento para cada especie; sin embargo, en hongos ectomicorrizógenos se han realizado pocos estudios que definan estos caracteres y sólo el trabajo de Hutchison (1990 d) ha tenido como objetivo estudiar el efecto de la temperatura.

Hutchison (1990 d) mencionó que la sensibilidad o tolerancia de los hongos ectomicorrizógenos a las temperaturas extremas puede ser empleada como una herramienta taxonómica para marcar las diferencias de los aislamientos y que en combinación con las características fisiológicas y bioquímicas, permite definir la identidad genérica o específica de cepas de identidad desconocida.

Por lo anterior, se planteó en este estudio realizar ensayos de crecimiento de algunas cepas a las temperaturas de 7 °, 18 °, 25 ° y 30 °C, para posteriormente determinar si la temperatura tiene potencial taxonómico que nos pueda ayudar a diferenciar cepas de los géneros *Amanita* y *Suillus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este ensayo se utilizaron cepas de los géneros *Amanita* y *Suillus*, las cuales se encuentran listadas en los cuadros 1 y 2, respectivamente

Para las pruebas de crecimiento en diferentes temperaturas, se cuadrícularon las colonias de cada cepa en fragmentos de 5 X 5 mm, los cuales se transfirieron a cajas de 90 mm de diámetro por 10 de alto que contenían el medio de MNM (Marx, 1969) Se sembraron 20 cajas con cada una de las cepas, se separaron en cuatro grupos los cuales se sometieron a las temperaturas de 7 °, 18 °, 25 ° y 30 °C. A las cinco semanas se midió el diámetro final de las colonias, restándoles el diámetro inicial.

Siguiendo el criterio de Hutchison (1990 d) la temperatura de 18 °C se tomó como la temperatura testigo y a partir de ésta, se establecieron tres respuestas de crecimiento de acuerdo con las siguientes categorías i) tolerante, cuando el crecimiento es mayor del 50% con respecto al testigo, ii) semitolerante, cuando el crecimiento es del 20 al 50% con respecto al testigo; y iii) sensible, cuando el crecimiento es menor del 20% con respecto al testigo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Hutchison (1990 d) trabajó con las temperaturas de 7 °C y 30 °C como temperaturas extremas y menciona que la temperatura de 18 °C es la temperatura ideal para las especies de hongos que él trabajó, por lo que la toma como temperatura testigo; sin embargo, se ha observado que las cepas del estado de Tlaxcala que se han trabajado presentan buen crecimiento a los 25 °C, por lo que se adicionó este valor de temperatura en el experimento y se comparó con los datos obtenidos en 18 °C.

Al comparar los resultados obtenidos en este ensayo con lo reportado por Hutchison (1990 d), se observó que las cepas de Tlaxcala no responden de la misma manera que las trabajadas por él, quizá porque las condiciones de los lugares de donde fueron aisladas son diferentes tanto en latitud como en altitud; así como la presencia de nevadas que en el extranjero llegan a ser de varios meses, mientras que en el centro del nuestro país prácticamente no existen.

La respuesta de las cepas de *Amanita* se registra en el cuadro 1, en el que se puede observar que todas las cepas son sensibles a altas temperaturas (30 °C) ya que no mostraron crecimiento. Hutchison (1990 d) reportó a las cepas de este género con respuestas variables, desde tolerantes (*A. brunescens*, *A. citrina* y *A. flavoconia*), hasta sensibles (*A. muscaria* y *A. rubescens*). Mientras que Yang *et al.* (1999) reportó algunas cepas con respuesta tolerante.

CUADRO 1. Respuesta de crecimiento de las cepas de *Amanita* a temperaturas extremas

CEPA	TAXA	7 °C	25 °C	30 °C
TLAX 2	<i>Amanita muscaria</i>	S	T+	S
TLAX 22	<i>A. muscaria</i>	S	T+	S
TLAX 27	<i>A. muscaria</i>	S	ST	S
TLAX 41	<i>A. muscaria</i>	T+	T	S
TLAX 46	<i>Amanita aff. rubescens</i>	S	T+	S
TLAX 4	<i>Amanita</i> sp. secc. <i>vaginata</i>	S	T	S
TLAX 47	<i>Amanita</i> sp.	S	T+	S

S=sensible; T= tolerante; T+ creció más que el testigo; ST= semitolerante

A la temperatura de 7 °C, las cepas fueron sensibles ya que su crecimiento fue menor del 20 %, excepto la cepa (TLAX 41) de *Amanita muscaria* cuya colonia creció más que en la temperatura testigo (18 °C) Hutchison (1990 d) y Yang *et al.* (1999) reportaron a las cepas de *Amanita* como sensibles a esta temperatura.

La mayoría de las cepas fueron tolerantes a 25 °C, incluso dos cepas de *Amanita muscaria* (TLAX 2 y 22), una de *Amanita aff. rubescens* (TLAX 46) y una de *Amanita* sp. (TLAX 47) crecieron más que en 18 °C. Estas respuestas sugieren que la temperatura óptima para estas cepas de *Amanita* es diferente de los 18 °C posiblemente porque las condiciones de nuestros bosques son más cálidas.

Denis (1985) encontró que *A. rubescens* presenta crecimiento a los 35 °C, en tanto Yang *et al.* (1999) reportaron que la especie no sobrevive a -10 °C y es sensible a 7 y 30 °C.

En el cuadro 2 se muestra la respuesta de las cepas de *Suillus*, encontrando que todas las cepas fueron sensibles a la temperatura de 30 °C. Hutchison (1990 d) reportó a *Suillus tomentosus* con respuesta tolerante, mientras que cepas de otras especies tuvieron respuesta variable; en tanto, Dennis (1985) reportó que las tasas de respiración de este género se inhiben con las altas temperaturas.

Las cepas de *Suillus glandulosipes* fueron sensibles a temperaturas de 7 °C, excepto la TLAX 10 que fue semitolerante, la cepa de *S. lakei* (TLAX 40) fue tolerante a esta temperatura, en tanto las dos cepas de *S. tomentosus* (TLAX 9 y 24) fueron sensibles, una cepa de *Suillus cf. pseudobrevipes* (TLAX 33) fue tolerante, mientras la otra fue semitolerante (TLAX 36). La cepa de *Suillus cf. unicolor* (TLAX 42) y dos cepas de *Suillus* sp. (TLAX 32 y 44) fueron sensibles, en tanto la cepa TLAX 20 creció más que en la temperatura testigo, considerándose entonces como tolerante (Cuadro 2).

CUADRO 2. Respuesta de crecimiento de las cepas de *Suillus* a temperaturas extremas

CEPA	TAXA	7 °C	25 °C	30 °C
TLAX 31	<i>Suillus coturnatus</i> var. <i>hiemalis</i>	S	T+	S
TLAX 5	<i>S. glandulosipes</i>	S	T	S
TLAX 10	<i>S. glandulosipes</i>	ST	T+	S
TLAX 25	<i>S. glandulosipes</i>	S	T	S
TLAX 34	<i>S. glandulosipes</i>	S	T+	S
TLAX 35	<i>S. glandulosipes</i>	S	T+	S
TLAX 40	<i>S. lakei</i>	T	T	S
TLAX 9	<i>S. tomentosus</i>	S	T	S
TLAX 24	<i>S. tomentosus</i>	S	T+	S
TLAX 33	<i>S. cf. pseudobrevipes</i>	T	T+	S
TLAX 36	<i>S. cf. pseudobrevipes</i>	ST	T+	S
TLAX 42	<i>S. cf. unicolor</i>	S	T	S
TLAX 32	<i>Suillus</i> sp.	S	T+	S
TLAX 20	<i>Suillus</i> sp.	T+	T+	S
TLAX 44	<i>Suillus</i> sp.	S	T+	S

S=sensible; T= tolerante; T+ creció más que el testigo; ST= semitolerante

Moser en 1958 encontró que los aislamientos de *Suillus plorans* obtenidos en altitudes elevadas están mejor adaptados a las temperaturas frías; Cline *et al* (1987) probaron que *Suillus granulatus* muestra mayor crecimiento micelial en temperaturas bajas.

Todas las cepas fueron tolerantes a los 25 °C, e incluso la mayoría crecieron más que en la temperatura testigo (Cuadro 2)

En la literatura se ha reportado que puede haber gran variedad de respuestas al incubar diferentes cepas de una misma especie, que fueron aisladas de lugares geográficos próximos, así, Samson y Fortin (1986) encontraron que *S. grevillei* es una especie de amplia distribución pero su origen geográfico no se correlaciona con el crecimiento en las temperaturas probadas, argumentando que la altitud es un factor más importante que la latitud o el intervalo de latitudes muestreadas y sugiriendo que esto se debe a una gran variabilidad genética.

Moser (1958) encontró que *Suillus variegatus* puede sobrevivir en periodos de heladas hasta -2 °C y que puede tener crecimiento micelial desde 0 °C hasta 5 °C; también observó que los ecotipos

provenientes de sitios elevados pueden sobrevivir las heladas durante dos meses, mientras que los hongos de los valles morían a los cinco días, concluyendo finalmente que la variabilidad intraespecífica es muy alta en los hongos ectomicorrizógenos (Marx y Kenney, 1982).

Theodorou y Bowen (1971) examinaron tres aislamientos de *Suillus granulatus* que cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 20 y 25 °C; posteriormente, Cline *et al* (1987) encontraron tres aislamientos de la misma especie que crecieron a 32 °C, mientras que otras ocho cepas presentaron crecimiento óptimo en un intervalo de 16 a 32 °C, concluyendo que la variabilidad del crecimiento micelial en cultivo puro entre aislamientos de la misma especie en respuesta a la temperatura sugiere que el genotipo fúngico puede estar influyendo significativamente en las respuestas del crecimiento.

Theodorou y Bowen (1971) indicaron que las respuestas fúngicas a las temperaturas observadas en cultivo puro pueden tener valor limitado en la predicción del comportamiento de los hongos en la rizosfera. A pesar de esto, Graham y Linderman (1981) han mostrado que la infectividad parece estar correlacionada con la tasa de crecimiento de los aislamientos en cultivo puro (Samson y Fortin, 1986)

La determinación de la temperatura óptima de cada una de las cepas es muy importante para la reproducción masiva de las cepas para posteriormente realizar inoculaciones en vivero, debido a que en algunos estudios en Europa indican que las respuestas a la temperatura pueden limitar su distribución, actividad y persistencia en la formación de micorrizas ectotróficas con especies de árboles particulares (HacsKaylo *et al* , 1965).

Cline *et al* (1987) citaron que es importante determinar los requerimientos de temperatura, porque esto permite: 1) que el crecimiento del inóculo sea efectivo, 2) que la micorriza alcance un buen desarrollo después de la inoculación en el vivero, y 3) que tenga buena sobrevivencia y crecimiento en el trasplante.

CONCLUSIONES

- Con base en los resultados obtenidos podemos concluir que las cepas de *Amanita* y *Suillus* aisladas del estado de Tlaxcala son muy sensibles a 30 °C
- No obstante, las cepas responden más a las condiciones del lugar de donde fueron aisladas, que a características taxonómicas de la especie, ya que cepas de la misma especie pueden presentar respuestas diferentes a las temperaturas ensayadas.

PARTE 2

EFFECTO DE COMPUESTOS FUNGISTÁTICOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE ALGUNAS CEPAS DE *Amanita*

Guadalupe Santiago-Martínez¹
Arturo Estrada-Torres¹
Lucía Varela²
Teófilo Herrera³

ABSTRACT

Seven strains of *Amanita* were grown on potato-dextrose-agar added with one of the following fungitoxic compounds: benomyl 10 µg/ml, cicloheximide 2 µg/ml, rose bengal 10 µg/ml, malachite green 2 µg/ml, and sodium chloride 10 mg/ml. Each fungitoxic compound was tested by triplicate. After five weeks, colonial growths were measured, compared without fungitoxic, and classified as tolerant when the growth was higher than 50%, semitolerant with a growth between 20 and 50%, and sensitive with a growth lesser than 20%. All tested strains were tolerant to semitolerant to NaCl, three strains of *A. muscaria* and one of *A. aff. rubescens* were sensitive to benomyl, but the other three strains were tolerant; the four strains of *A. muscaria* and the one of *Amanita* sp. section *Vaginatae* were tolerant to the rose bengal, while *Amanita aff. rubescens* and *Amanita* sp. were semitolerant. Responses in the growth of the strains in the media with malachite green and cicloheximide were variable.

Key words ectomycorrhizal fungi, benomyl, cicloheximide, rose bengal, malachite green, sodium chloride.

RESUMEN

Se sembraron siete cepas de *Amanita* en el medio de papa dextrosa agar con los siguientes compuestos tóxicos: benomil 10 µg/ml, cicloheximida 2 µg/ml, rosa de bengala 10 µg/ml, verde de malaquita 2 µg/ml y cloruro de sodio 10 mg/ml, con seis repeticiones por tratamiento. A las cinco semanas, se midió el diámetro de las colonias en cada compuesto tóxico y se compararon con el crecimiento de la cepa sin compuestos tóxicos (testigo) tomando en cuenta los criterios: tolerantes cuando el crecimiento es mayor del 50% con respecto al testigo, semitolerante con crecimiento del 20 al 50%, y sensible menos del 20% con respecto al testigo.

¹ Laboratorio de Micología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km 10.5 Carr. Texmelucan-Tlaxcala, 90120, Ixtacuixtla, Tlaxcala.

² Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Carpio y Plan de Ayala, México, D. F.

³ Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM. A. P. 70-233, Coyoacán, México, D. F. 04510

Las cepas fueron de tolerantes a semitolerantes al NaCl, tres cepas de *A. muscaria* y una de *A. aff. rubescens* presentaron sensibilidad al benomil, las otras tres cepas tolerantes; en cuanto al verde de malaquita presentaron variabilidad de respuestas; las cuatro cepas de *A. muscaria* fueron tolerantes al rosa de bengala, *A. aff. rubescens* y *Amanita* sp. semitolerantes y la cepa de *Amanita* sp. sección *vaginata* tolerante; con la cicloheximida también presentaron variabilidad en las respuestas.

Palabras clave hongos ectomicorrizógenos, benomil, cicloheximida, rosa de bengala, verde de malaquita, cloruro de sodio.

INTRODUCCIÓN

El efecto de los compuestos fungistáticos sobre algunos hongos ha sido evaluado para conocer sus usos potenciales en la micología médica y para el control de patógenos de plantas (Hall, 1979). La toxicidad selectiva de muchos compuestos se ha usado no sólo para la preparación de medios selectivos, sino también por su potencial para la diferenciación de taxa (Hutchison, 1990).

Tradicionalmente se han enfatizado las características coloniales microscópicas y macroscópicas, no obstante, éstas no se han podido utilizar para determinar la identidad de las cepas de los simbiontes fúngicos aislados de ectomicorrizas de campo. Sin embargo, Taylor (1974) y Hutchison y Malloch (1988) sugirieron que es necesario usar integralmente las características fisiológicas, bioquímicas y morfológicas que puedan diferenciar taxa.

Hutchison (1990) propuso que la acción de compuestos fungistáticos como el benomil, los colorantes rosa de bengala y verde de malaquita, la cicloheximida y el cloruro de sodio podrían apoyar la delimitación de grupos taxonómicos. La respuesta de las cepas a diferentes compuestos puede ser útil en la identificación de géneros, grupos de especies o incluso para separar cepas aisladas a partir de ectomicorrizas de campo.

La necesidad de identificar los cultivos de cepas aisladas de las ectomicorrizas de campo, tomando en cuenta que las características macro y micromorfológicas no son suficientes para la delimitación taxonómica de los organismos involucrados, ha enfatizado la necesidad de tomar en cuenta características fisiológicas y bioquímicas de las cepas en cuestión. Estos estudios podrían tomar en cuenta la toxicidad selectiva de algunos compuestos, sin embargo, es necesario validar la reproducibilidad de los resultados usando un gran número de cepas de diferentes especies, con diferentes procedencias.

En el cepario de hongos ectomicorrizógenos del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala se cuenta con aislamientos del género *Amanita*. Dado que es

uno de los grupos más grandes dentro de los basidiomicetos, con más de 400 especies descritas para el mundo, se considera un grupo cosmopolita de interés para el ser humano porque contiene especies tanto comestibles como venenosas. Además, la mayor parte de las especies de *Amanita* forman ectomicorrizas. Se ha asumido que muchas especies están restringidas a hábitats particulares, no obstante muchas parecen tener amplia distribución y estar asociadas a numerosos hospederos (Yang et al., 1999).

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto de los cinco compuestos fungistáticos propuestos por Hutchison (1990) sobre el desarrollo micelial de siete cepas de *Amanita*, con el fin de validar su potencial como herramienta auxiliar en la identificación de taxa de hongos ectomicorrizógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el medio de papa dextrosa agar (PDA, Bbl, Becton Dickinson y Co, Coceysville, MD) como medio basal, el cual después de esterilizado se dejó enfriar parcialmente y antes de solidificar se le adicionaron alícuotas de soluciones de cada compuesto tóxico con la ayuda de jeringas estériles, para obtener los medios con las concentraciones finales propuestos por Hutchison (1990): benomil 10 µg/ml; cicloheximida 2 µg/ml, rosa de bengala 10 µg/ml; verde de malaquita 2 µg/ml; el cloruro de sodio fue adicionado directamente en el agar antes de ser esterilizado para dar una concentración final de 10 mg/ml. Los medios así preparados se agitaron con el compuesto, vaciando 30 ml de medio a cajas de petri de 90 mm de diámetro (Hutchison, 1990).

Para el ensayo se utilizaron siete cepas de *Amanita* cuyas procedencias e identificaciones se muestran en el cuadro 1. Las cepas ensayadas se encuentran depositadas en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del CICB y los materiales de referencia en el herbario TLMX de la misma Institución.

Para la inoculación de cada ensayo, se cortaron con un bisturí trozos de 5 mm por lado en los márgenes de colonias en crecimiento activo, los cuales fueron colocados en el centro de cada caja de Petri. Para cada compuesto, el ensayo se hizo por triplicado montando en forma simultánea el testigo sin fungistático. Cada caja fue sellada con papel egapac e incubado boca abajo en la oscuridad a 18 C por cinco semanas. Posteriormente se determinó el diámetro medio (diámetro final menos el diámetro del inóculo) de cada colonia en los diferentes compuestos. Los porcentajes de crecimiento para cada aislamiento fueron calculados según los criterios de Hutchison (1990), con una relación entre el crecimiento en los medios con fungistáticos y los testigos. Para cada compuesto tóxico probado, los aislamientos fueron clasificados de acuerdo con su respuesta de crecimiento en tres categorías. (1)

tolerante, cuando el crecimiento es mayor del 50% comparado con el testigo; (2) semitolerante cuando el crecimiento es del 20-50% del testigo; (3) sensible, cuando el crecimiento es menor del 20% del testigo.

No cepa	Taxa	Mat. de referencia	Procedencia	Vegetación
TLAX 2	<i>Amanita muscaria</i> (L.:Fr.) Hooker	GSM 54	1	I
TLAX 22	<i>Amanita muscaria</i> (L.:Fr.) Hooker	AME 1045	1	I
TLAX 27	<i>Amanita muscaria</i> (L.:Fr.) Hooker	AKL 2252	1	I
TLAX 41	<i>Amanita muscaria</i> (L.:Fr.) Hooker	GGF 1851	2	II
TLAX 46	<i>Amanita aff. rubescens</i> (Pers. Fr.) S F Gray	AME 1541	3	III
TLAX 4	<i>Amanita</i> sp. Secc. <i>Vaginatae</i>	GSM 134	4	II
TLAX 47	<i>Amanita</i> sp	AME 1419	3	II

Cuadro 1. Listado de cepas estudiadas 1. Parque Nacional La Malinche, Mpio. de Huamantla, 2. Barranca del Río Zaguapan. NE de Tlaxco, Mpio de Tlaxco; 3 1 Km al este de San Francisco Temezontla, Mpio de Panotla; 4 Villareal, Mpio de Terrenate I: *Pinus-Abies*; II: *Pseudotsuga-Quercus-Pinus-Abies*; III: *Pinus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas de *Amanita muscaria* TLAX 22 y 27 presentaron tolerancia al cloruro de sodio, en tanto las TLAX 2 y 41 fueron semitolerantes (cuadro 2), Hutchison (1991) señaló que esta especie presenta respuestas variables, Yang *et al.* (1999) la señalan como tolerante, en cuanto al benomil, tres cepas fueron sensibles (TLAX 2, 22 y 27) y una tolerante (TLAX 41) Hutchison (1990, 1991) reportó que las cepas de *A. muscaria* son sensibles al benomil; con el verde de malaquita, las cepas TLAX 2, 22 y 27 fueron sensibles y solamente la cepa TLAX 41 fue semitolerante, concordando que las tres primeras cepas son de la Malintzi y la cuarta de Tlaxco, lo que posiblemente explica las diferencias en sensibilidad, Hutchison (1990) reportó que esta especie es sensible a este colorante; con respecto al rosa de bengala, las cepas estudiadas presentaron tolerancia al compuesto, sin embargo, Hutchison (1990, 1991) reportó que las cepas que él estudió presentaban mayor sensibilidad, en tanto, Yang *et al.* (1999) reportaron que esta especie es tolerante; con respecto al compuesto cicloheximida, las cepas TLAX 2 y 22 fueron tolerantes al compuesto, la TLAX 27 semitolerante y la TLAX 41 sensible. Hutchison (1990) reportó la especie como sensible.

La cepa de *Amanita aff. rubescens* solamente fue tolerante al cloruro de sodio; sensible al benomil y semitolerante al verde de malaquita, rosa de bengala y cicloheximida; los datos concuerdan con los de la literatura ya que marcan sensibilidad al benomil, semitolerancia a la cicloheximida y tolerancia al

NaCl (Hutchison 1990). Yang et al. (1999) señalaron que las especies del complejo *rubescens* son tolerantes a la cicloheximida, rosa de bengala, verde de malaquita y NaCl

Cepa	Cloruro de sodio	Benomil	Verde de malaquita	Rosa de bengala	Cicloheximida
TLAX 2	ST	S	S	T	T
TLAX 22	T	S	S	T	T
TLAX 27	T	S	S	T	ST
TLAX 41	ST	T	ST	T	S
TLAX 46	T	S	ST	ST	ST
TLAX 4	T	T	T	T	ST
TLAX 47	T	T	ST	ST	S

Cuadro 2. Respuesta de las cepas a los diferentes compuestos tóxicos. T=tolerante, > de 50% con respecto al testigo; ST=semitolerante, del 20 al 50%; S=sensible < del 20% con respecto al testigo. El testigo se consideró como el 100% y corresponde al crecimiento de la cepa sin compuestos fungistáticos.

La cepa TLAX 4 la cual pertenece a la sección *Vaginatae* fue tolerante a los compuestos NaCl, benomil, verde de malaquita rosa de bengala y semitolerante a la cicloheximida.

La cepa TLAX 47 (*Amanita* sp.) fue tolerante al cloruro de sodio y benomil, semitolerante al rosa de bengala y verde de malaquita, y sensible al compuesto de cicloheximida.

Las cepas que son tolerantes al benomil y/o cloruro de sodio son susceptibles a utilizarse en ensayos de inoculación en vivero, ya que por un lado, en el vivero se utiliza comúnmente el benomil para controlar hongos patógenos que pueden atacar a las plantas; y por otro algunas veces las plantas se destinan a lugares con suelos que tienen problemas de salinidad y si van micorrizadas con hongos que toleran ciertas concentraciones de sales tienen mayor probabilidad de sobrevivir en estos sitios

CONCLUSIONES

Se requiere hacer más estudios donde se involucre un número mayor de cepas de diferentes lugares para poder estandarizar las respuestas que tiene cada especie.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por el financiamiento del proyecto SELECCIÓN DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS PARA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES EN EL ESTADO DE TLAXCALA, mediante el convenio número 4690-N9406.

LITERATURA CITADA

- Hall, R., 1979. Fungitoxicants and Fungal Taxonomy. **Bot. Rev.** **45**:1-14
- Hutchison, L. J., 1990. Studies on Systematics of Ectomicorrhizal Fungi in Axenic Culture. IV. The Effect of Some Selected Fungitoxic Compounds upon Linear Growth. **Can. J. Bot.** **68**:2172-2178.
- Hutchison, L. J., 1991. Description and Identification of Cultures of Ectomicorrhizal Fungi Found in North America. **Mycotaxon** **42**:387-504
- Hutchison, L. J. y D. W. Malloch, 1988. A Verification Protocol for Cultural Isolates of Ectomycorrhizal Basidiomycetes. In: Lalonde M y Y. Piché (eds) **Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry**. Université Laval, Sainte-Foy, Québec 121-124.
- Taylor, 1974. Biochemical Tests for Identification of Micelial Cultures of Basidiomycetes. **Ann. Appl. Biol.** **78**:113-123.
- Yang, Z. L., M. Weiß, I. Kottke, F. Oberwinkler, U. Nehls, M. Gutternerg y R. Hampp, 1999. Amanita. In Cairney J. W. G. y S. M. Chambers (Eds) **Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile**. Springer, New York, 201-230.

EFFECTO DE COMPUESTOS FUNGISTÁTICOS SOBRE ALGUNAS CEPAS DE *SUILLUS*

GUADALUPE SANTIAGO-MARTÍNEZ¹

ARTURO ESTRADA-TORRES¹

LUCÍA VARELA²

ALEJANDRO KONG-LUZ¹

¹ Laboratorio de Micología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala Km 10.5 Carr. Texmelucan-Tlaxcala, 90120, Ixtacuixtla, Tlaxcala.

² Laboratorio de Ecología Microbiana, Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN Carpio y Plan de Ayala, México, D. F.

ABSTRACT

EFFECT OF FUNGISTATIC COMPOUNDS ON SOME STRAINS OF *SUILLUS*. Rev. Mex. Mic. 13: 28-32 (1997). Fifteen strains of *Suillus* were grown on potato-dextrose-agar added with one of the following fungitoxic compounds: benomyl 10 mg/ml; cicloheximide 2 mg/ml; rose bengal 10 mg/ml; malachite green 2 mg/ml; and sodium chloride 10 mg/ml. Each fungitoxic compound was tested by triplicate. After five weeks, colonial growths were measured, compared with the control without fungitoxic, and classified as tolerant when the growth was higher than 50%, semitolerant with a growth between 20 and 50%, and sensitive with a growth lesser than 20%. All the isolates were tolerant to sodiumchloride; fourteen were tolerant and just one was semitolerant to benomyl; response to malachite green was from semitolerant to tolerant; in bengal rose, the response was variable; in cicloheximide, twelve strains were sensitive, two tolerant, and one semitolerant.

Key words: ectomycorrhizal fungi, benomyl, cicloheximide, rose bengal, malachite green, sodium chloride.

RESUMEN

Se sembraron quince cepas de *Suillus* en medio de papa dextrosa agar con los siguientes compuestos tóxicos: benomil 10 mg/ml; cicloheximida 2 mg/ml; rosa de bengala 10 mg/ml; verde de malaquita 2 mg/ml; cloruro de sodio 10 mg/ml, con tres repeticiones por tratamiento. A las cinco semanas, se midió el diámetro de la colonia en cada compuesto tóxico y se comparó con el crecimiento de la cepa en el mismo medio de cultivo sin tóxicos (testigo) tomando en cuenta los siguientes criterios: tolerantes cuando el crecimiento es mayor al 50%; semitolerante con crecimiento del 20 al 50%; y sensible menos del 20% con respecto al testigo. Se observó que todas las cepas fueron tolerantes al cloruro de sodio; 14 cepas fueron tolerantes al benomil y sólo una fue semitolerante; la respuesta al verde de malaquita fue de semitolerante a tolerante; en el rosa de bengala, la respuesta fue muy variable; en la cicloheximida 12 de las cepas fueron sensibles, dos tolerantes y una semitolerante.

Palabras clave: hongos ectomicorrizógenos, benomil, cicloheximida, rosa de bengala, verde de malaquita, cloruro de sodio.

Introducción

La acción de compuestos fungistáticos (compuestos químicos que inhiben o detienen de desarrollo de los hongos) ha sido propuesta como un carácter taxonómico adicional, auxiliar en la delimitación de grupos fúngicos, sobretudo en aquellos hongos de importancia médica y fitopatológica (Hall, 1979). En el

caso de los hongos ectomicorrizógenos, Hutchison (1990) ha propuesto que la acción de compuestos fungistáticos como el benomil, los colorantes rosa de bengala y verde de malaquita, el antibiótico cicloheximida y el cloruro de sodio podrían ser un valioso apoyo en la delimitación de grupos taxonómicos. Este

hecho podría ser un importante auxiliar en la identificación de géneros, grupos de especies e/o incluso especies de aislamientos realizados a partir de la ectomicorriza, en donde se carece de la estructura reproductora usualmente utilizada durante el proceso de identificación. No obstante, antes de poder utilizar rutinariamente estos caracteres fisiológicos en la identificación de hongos ectomicorrizógenos, es necesario validar su reproducibilidad usando un gran número de cepas de diferentes especies, procedencias geográficas y ecológicas.

En el cepario del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (CICB) se cuenta con numerosos aislamientos de algunas especies de *Suillus*, un género fúngico frecuentemente asociado a coníferas y con un gran potencial para ser utilizado en programas de producción de plantas para fines de reforestación. El presente trabajo tuvo como objetivo analizar el efecto sobre el desarrollo micelial de los cinco compuestos fungistáticos propuestos por Hutchison (1990) y determinar su potencial como herramienta auxiliar en la identificación de taxa de hongos ectomicorrizógenos.

Materiales y métodos

Se utilizó el medio de papa dextrosa agar (PDA, BBI, Becton Dickinson y Co., Coceysville, MD) como medio basal, el cual después de esterilizado se dejó enfriar parcialmente y antes de la gelificación se le adicionaron alícuotas de soluciones de cada compuesto tóxico con ayuda de jeringas estériles, para obtener medios con las concentraciones finales propuestos por Hutchison (1990): benomil 10 mg/ml; cicloheximida 2 mg/ml; rosa de bengala 10 mg/ml; verde de malaquita 2 mg/ml; el cloruro de sodio fue adicionado directamente en el agar antes de ser esterilizado para dar una concentración final de 10 mg/ml. Los medios así preparados se agitaron con el compuesto, vaciando 30 ml de medio a cajas de Petri de 90 mm (Hutchison, 1990).

Para el ensayo se utilizaron 15 cepas de *Suillus*, cuyas procedencias e identificaciones se muestran en la Tabla 1. Las cepas ensayadas se encuentran depositadas en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del CICB y los materiales de referencia en el herbario TLMX de la misma institución.

Para la inoculación de cada ensayo, se cortaron con un bisturí trozos de 5 mm por lado en los márgenes de colonias recientes, los cuales fueron colocados

en el centro de cada caja Petri. Para cada compuesto, el ensayo se hizo por triplicado montando en forma simultánea el control sin fungistático. Cada caja fue sellada con papel egapac e incubado boca abajo en la oscuridad a 18°C por cinco semanas. Posteriormente, se determinó el diámetro medio (diámetro final menos el diámetro del inóculo) de cada colonia en los diferentes compuestos. Los porcentajes de crecimiento para cada aislamiento fueron calculados según los criterios de Hutchison (1990), con una relación entre los crecimientos en los medios con fungistáticos y los controles. Para cada compuesto tóxico probado los aislamientos fueron clasificados de acuerdo con su respuesta de crecimiento en tres categorías: (1) tolerante, cuando el crecimiento es mayor del 50% comparado con el control; (2) semitolerante, cuando el crecimiento lineal es de 20-50% del control; (3) sensible, cuando el crecimiento es menor del 20% del control.

Resultados y discusiones

De acuerdo con Hutchison (1991), el género *Suillus* se caracteriza por ser tolerante al benomil, al verde de malaquita y al mismo tiempo sensible a la cicloheximida, lo que en general coincide con los resultados encontrados en el presente trabajo. En cuanto a la respuesta al rosa de bengala, dicho autor reporta una respuesta variable, desde sensible hasta tolerante, pero la mayoría de las cepas y especies presentan tolerancia a este compuesto (Hutchison, 1990;1991). Hecho que también coincide con nuestros resultados (Tabla 2). En el caso del cloruro de sodio, Hutchison (1990;1991) encontró una respuesta de semitolerante a tolerante, aunque la mayoría de las cepas y especies estudiadas correspondieron a la última categoría. En el presente trabajo, todas las cepas estudiadas mostraron tolerancia a la concentración de cloruro de sodio ensayada (Tabla 2).

En cuanto a las cepas estudiadas, la de *Suillus cothurnatus* var *hiemalis* y una de las no identificadas presentaron el mayor grado de sensibilidad a los fungistáticos, siendo ambas sensibles al rosa de bengala y a la cicloheximida, y la primera semitolerante al benomil, en tanto la segunda semitolerante al verde de malaquita. La cepa más tolerante correspondió a la TLAX 24 de *Suillus tomentosus*, no presentándose diferencias con respecto al testigo en ninguno de los compuestos probados (Tabla 2). La respuesta más frecuentemente encontrada entre las cepas estudiadas

Nº de cepa	Taxa	Material de referencia	Procedencia	Vegetación
TLAX 31	<i>Suillus cothurnatus</i> var. <i>hiemalis</i> Sing.	AME 1137	2	I
TLAX 5	<i>S. glandulosipes</i> Thiers et Smith	AKL 1588	1	III
TLAX 10	<i>S. glandulosipes</i> Thiers et Smith	GSM 284	1	III
TLAX 25	<i>S. glandulosipes</i> Thiers et Smith	VCL 54	1	III
TLAX 34	<i>S. glandulosipes</i> Thiers et Smith	AKL 2267	2	I
TLAX 35	<i>S. glandulosipes</i> Thiers et Smith	AKL 2296	1	III
TLAX 40	<i>S. lakei</i> (Murr.) Smith et Thiers	AKL 2740	5	II
TLAX 9	<i>S. tomentosus</i> (Kauffm.) Singer, Snell et Dick	GSM 276	3	IV
TLAX 24	<i>S. tomentosus</i> (Kauffm.) Singer, Snell et Dick	AME 1009	3	IV
TLAX 33	<i>S. cf. pseudobrevipes</i> Smith et Thiers	AKL 2266	2	I
TLAX 36	<i>S. cf. pseudobrevipes</i> Smith et Thiers	AKL 2297	1	III
TLAX 42	<i>S. cf. unicolor</i> (Frost) Kuntze	GGF 1852	6	II
TLAX 32	<i>Suillus</i> sp.	AKL 2264	2	I
TLAX 20	<i>Suillus</i> sp.	AKL 1970	4	V
TLAX 44	<i>Suillus</i> sp.	AKL 2650	5	II

Tabla 1. Listado de cepas estudiadas. 1: Cerro Tepeticpac, Mpio de Totolac; 2: 2 Km al NO de Miltepec, Mpio de Españita; 3: Parque Nacional la Malinche, Mpio de Huamantla; 4: Cerro El Peñón, N de El Rosario, Mpio. de Tlaxco; 5: Villarreal, Mpio de Terrenate; 6: Barranca del río Zaguapan, NE de Tlaxco, Mpio de Tlaxco. I: *Pinus-Juniperus-Arbutus-Quercus*; II: *Pseudotsuga-Quercus-Pinus-Abies*; III: *Pinus-Quercus*; IV: *Pinus-Abies*; V: *Abies-Pinus-Quercus*.

fue la tolerancia a cloruro de sodio, benomil, verde de malaquita, rosa de bengala y sensibilidad a cicloheximida (Tabla 2). Esta respuesta se presentó en tres cepas de *Suillus glandulosipes*, una de *S. lakei*, una de *Suillus cf. pseudobrevipes* y una cepa no identificada. Hutchison (1990) registró esta misma respuesta para *S. luteus* (L.:Fr.) S. F. Gray, *S. sinuspaulinus* (Pomerleau et Smith) Dick et Snell, *S. subluteus* (Pk.) Snell, *S. umbonatus* Dick et Snell y algunos aislamientos de *S. granulatus* (L.:Fr.) Kuntze, *S. grevillei* (Kl.: Fr.) Sing. y *S. ochraceoroseus* (Snell) Sing., por lo que al parecer no existe ninguna correlación entre esta respuesta y la ubicación taxonómica de las especies, ya que éstas pertenecen a ambos subgéneros (*Boletinus* y *Suillus*) reconocidos por Thiers (1975) y dentro de éstos a dos y tres

secciones, respectivamente, *Boletinus* y *Viscidi* en el primero, y *Suillus*, *Annulati* y *Megasporini* en el segundo. A pesar de lo anterior, parece haber constancia en al menos algunas respuestas dentro de la misma especie. Así, por ejemplo *Suillus tomentosus* parece ser consistentemente tolerante a benomil, cloruro de sodio y verde de malaquita (Hutchison, 1990; 1991; Tabla 2), aunque sus respuestas son variables a la cicloheximida y al rosa de bengala. Cabe señalar que aún dentro de los aislamientos de la misma especie procedentes de la misma localidad, o incluso de la misma población, las respuestas a los fungistáticos no son constantes. Así, para los dos aislamientos de *S. tomentosus*, ambos procedentes de un bosque de *Pinus-Abies* en el Volcán la Malintzi, se encontraron las mismas respuestas para cloruro de

Cepa	Cloruro de sodio	Benomil	Verde de malaquita	Rosa de Bengala	Cicloheximida
TLAX 31	T	ST	T	S	S
TLAX 5	T	T	T	T	S
TLAX 10	T	T	T	ST	S
TLAX 25	T	T	T	T	S
TLAX 34	T	T	T	T	S
TLAX 35	T	T	T	ST	S
TLAX 40	T	T	T	T	S
TLAX 9	T	T	T	T	ST
TLAX 24	T	T	T	T	T
TLAX 33	T	T	T	T	S
TLAX 36	T	T	ST	T	T
TLAX 42	T	T	ST	T	S
TLAX 32	T	T	ST	S	S
TLAX 20	T	T	T	S	S
TLAX 44	T	T	T	T	S

Tabla 2. Respuesta de las Cepas a los Diferentes Compuestos Tóxicos T=Tolerante > de 50% con respecto al testigo; ST=Semitolerante del 20 al 50 %; S=Sensible del 20 % con respecto al testigo. El Testigo se consideró como el 100% y corresponde al crecimiento de la cepa sin compuestos fungistáticos.

sodio, benomil, verde de malaquita y rosa de bengala, pero no para la cicloheximida, siendo un aislamiento tolerante pero el otro semitolerante. Así mismo, se encontró que los cuatro aislamientos de *Suillus glandulosipes*, pertenecientes a la misma población del cerro Tepeticpac, eran tolerantes al cloruro de sodio, benomil y verde de malaquita, y sensibles a la cicloheximida, pero su respuesta al rosa de bengala fue variable, yendo de semitolerantes a tolerantes.

La tolerancia al cloruro de sodio presentadas por todas las cepas estudiadas podría indicarnos que la mayoría de los aislamientos de *Suillus* son potencialmente útiles para la introducción de plantas en sitios con problemas de salinidad. Asimismo, la tolerancia al benomil podría ser una característica valiosa para manejar estas cepas en viveros con problemas de "damping off", en donde este fungistático podría ser

aplicado sin afectar significativamente la micorrización de las plantas.

Conclusiones

Como ya se había señalado previamente, el género *Suillus* parece estar bien delimitado en cuanto a sus respuestas de tolerancia al benomil, cloruro de sodio y cicloheximida, siendo generalmente tolerante a los dos primeros compuestos y sensible al último.

Aún cuando existen respuestas constantes de las diferentes especies a algunos fungistáticos, estas respuestas parecen no estar correlacionadas con los diferentes rangos infragenéricos (subgéneros, secciones o subsecciones) delimitados por Thiers (1975).

Las pruebas de tolerancia a compuestos fungistáticos pueden ser auxiliares en la determinación taxo-

nómica de aislamientos de hongos ectomicorrizógenos, pero su valor podría ser limitado si no se utilizan conjuntamente con otras pruebas (morfológicas, degradación de compuestos orgánicos, etc.).

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT por el financiamiento del proyecto SELECCIÓN DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS PARA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES EN EL ESTADO DE TLAXCALA, mediante el convenio número 4690-N9406.

Literatura citada

- Hall, R., 1979. Fungitoxicants and fungal taxonomy. *Bol. Rev.* 45: 1-14.
- Hutchison, L.J., 1990. Studies on systematics of ectomycorrhizal fungi in axenic culture. IV. The effect of some selected fungitoxic compounds upon linear growth. *Can. J. Bot.* 68: 2172-2178.
- Hutchison, L.J., 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* 42: 387-504.
- Thiers H.D., 1975. The genus *Suillus* in the United States. In: Bigelow, H. E. y H. D. Thiers (ed.) Studies on higher fungi. A collection of papers dedicated to Dr. A. H. Smith the occasion of his seventieth birthday, 1975. *Bethesda Nova Hedwigia* 51: 247-278.

Recibido: 19 de noviembre, 1997. Aceptado: 10 de febrero, 1998.
Solicitud de sobretiros: Ma. Guadalupe Santiago Martínez.

PARTE 3

DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS DE CARBONO Y NITRÓGENO

ANTECEDENTES

Los hongos tienen una forma de nutrición característica y altamente exitosa, requieren como fuentes de energía y de carbono para su nutrición de compuestos orgánicos preformados. Las moléculas más simples como monosacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos, los obtienen a través de la membrana celular y las moléculas más complejas que incluyen muchos disacáridos, deben degradarse a monómeros en el exterior de la célula por medio de enzimas extracelulares. Los alimentos se digieren externamente por enzimas hidrolíticas que secretan a su alrededor, las cuales rompen los sustratos en sub-unidades más pequeñas (Garraway y Evans, 1991).

Los hongos, como todos los organismos vivientes toman el material que está alrededor de sus membranas, lo transportan por sitios metabólicos activos y lo transforman en energía para el mantenimiento y procesos biosintéticos (Garraway y Evans, 1991).

Entre las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno que usan los hongos se encuentran la lignina, celulosa, pectina, almidón, lípidos, gelatina, urea y aminoácidos, los cuales se describen brevemente a continuación:

Celulosa: es un polisacárido complejo que constituye el polímero orgánico más abundante sobre el planeta, puede ser descompuesta en sub-unidades de β glucosa por hidrólisis (Garraway y Evans, 1991)

Lignina: es el segundo polímero orgánico más abundante sobre la tierra y el mayor componente de las plantas perennes. Es estructuralmente complejo y con alto peso molecular; su estructura química lo hace resistente al ataque de los microorganismos. Hay evidencias que sugieren que las enzimas fenol-oxidasa extracelulares producidas por algunos hongos tales como la lacasa y peroxidasa, la degradan produciendo productos de bajo peso molecular (Garraway y Evans, 1991)

Almidón: es la mezcla de cuando menos 2 polisacáridos llamados amilosa y amilopectina. Es una polimerización de alrededor de 300 moléculas de α -glucosa en una cadena simple (Garraway y Evans, 1991).

Lípidos: pueden servir como fuente de carbono. Muchas especies de hongos secretan al medio lipasas que hidrolizan los lípidos en sub-unidades (Garraway y Evans, 1991).

Sustancias pécticas: se encuentran en las paredes celulares de los vegetales formando una capa delgada llamada laminilla media, que es la responsable de mantener unidas a las células y no se considera parte de la pared de ninguna de ellas. Está compuesta en gran proporción de pectina que es blanda y de consistencia gelatinosa (Garraway y Evans, 1991)

Otros compuestos orgánicos que son fuentes potenciales de carbono son las que también contienen nitrógeno. El nitrógeno orgánico más comúnmente encontrado son las proteínas y sus aminoácidos. Muchas especies de hongos secretan proteasas al medio liberando los aminoácidos que pueden ser utilizados como nutrimentos. Dependiendo de las especies, los aminoácidos pueden servir como una fuente de carbón o como fuente de nitrógeno, o ambos (Garraway y Evans, 1991).

Urea: es producida por la degradación de compuestos como purinas, pirimidinas y arginina. La urea puede utilizarse por los hongos como fuente de nitrógeno cuando se adiciona en el medio (Garraway y Evans, 1991).

Aminoácidos: muchos hongos utilizan estos compuestos como fuente de nitrógeno. Pueden utilizarlos durante el crecimiento o esporulación. Por ejemplo el triptofano, leucina y metionina se utilizan para la esporulación, la serina, γ -aminobutirato y glutamato son excelentes fuentes de N para ambos procesos, en tanto la ornitina y la arginina son buenas fuentes sólo para el crecimiento (Garraway y Evans, 1991).

Las diferentes cepas de la misma especie de hongo pueden variar en su habilidad para utilizar ciertas clases de compuestos de carbono o el uso del mismo compuesto en diferentes rutas metabólicas. Cuando se presenta una mezcla de diferentes fuentes de carbono, hay un uso preferencial de algunas formas, más que de otras (Hutchison, 1990 a)

Las investigaciones sobre la actividad enzimática de varios hongos han tenido interés por el afán de diferenciar grupos ecológicos basados en su modo de nutrición. El metabolismo de carbohidratos se ha utilizado como carácter taxonómico en la identificación y clasificación de bacterias, levaduras y ciertos grupos de hongos filamentosos importantes médicamente. Nobles (1958) y Stalpers (1978) enfatizaron la importancia de ciertos caracteres bioquímicos tales como la actividad de la lacasa y la tirosinasa. Taylor (1974), y más recientemente Hutchison y Malloch (1988), Klán *et al.* (1989) y Hutchison (1990 b), sugirieron que la utilización de las características bioquímicas y fisiológicas en adición con las características morfológicas pueden ser útiles en la investigación de las relaciones taxonómicas entre los Hymenomycetes (Hutchison, 1990 a).

Por esta razón, se planteó comprobar si las cepas de *Amanita* y *Suillus* no degradan lignina, ni celulosa y determinar si son capaces de degradar compuestos que contienen pectina, lípidos, gelatina, almidón, casaminoácidos y urea para utilizarlos como fuente de carbono y nitrógeno y corroborar que dichas respuestas pueden ser útiles como características taxonómicas en cada especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas que se utilizaron para estas pruebas pertenecen a los géneros *Amanita* y *Suillus*, las cuales se encuentran listadas en los cuadros 1 y 2

En esta parte, se utilizó la metodología descrita por Hutchison (1990 a) donde el medio basal utilizado para el seguimiento de las pruebas fisiológicas fue el MN modificado por Marx (1969), como se describe a continuación: 1.0 g de glucosa, 2.0 g de extracto de malta; 1.0 g de extracto de levadura; 0.5 g de KH_2PO_4 , 0.25 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 0.15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g de CaCl_2 , 0.025 g de NaCl , 0.012 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 15 g de agar, 1,000 ml de agua destilada.

Degradación de la celulosa. Se adicionaron 15 ml de medio MNM a frascos de 25 ml, el cual fue esterilizado y solidificado. Por separado se preparó una solución al 2% (w/v) de celulosa azure (Calbichem-Behring Corp., La Jolla, C A.; No. de Cat. 219481) en MNM; 1.5 ml de esta suspensión fue adicionada asépticamente a cada frasco formando una capa, para esto se utilizó una pipeta estéril con la punta rota para facilitar su distribución. La degradación de la celulosa se detectó cuando el color azul de la celulosa se difundió en la capa inferior. Esta prueba es una modificación de la técnica desarrollada por Smith (1977)

Degradación de la lignina. Para esta prueba se utilizó el MNM eliminando el fosfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) y adicionando 0.2 g/l de poly R-478 (Sigma Chemical Co., St. Louis; Cat. No. P. 1900). Después de la inoculación, si la ligninasa se produce, se forma una zona evidente de color púrpura alrededor y debajo de la colonia. Esta prueba es una modificación de la técnica de Glenn y Gold (1983).

Degradación de la pectina. Al medio basal de MNM se le adicionaron 5.0 g/l de pectina-citrus (Eastman Kodak Co., Rochester, NY). Para disolver la pectina, el medio necesitó calentarse y mezclarse completamente antes de esterilizarse. Cinco semanas después de la inoculación (o antes si el hongo es de crecimiento rápido) las cajas de Petri se inundaron por varias horas con una solución acuosa al 1% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Sigma Chemical Co., St. Louis). Posteriormente, el líquido se removió y si la pectinasa se produjo se pudo observar una zona clara alrededor de la colonia.

Degradación de los lípidos. Al medio basal de MNM se le agregó 0.1 g de CaCl_2/l . Por otro lado, se esterilizó por separado el Tween 20 (polixietileno sorbitan monolaureato, J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N. J.) a manera de que quedarán 10 ml por litro de medio. Una vez estériles las soluciones, se mezclaron moviendo suavemente antes de verter a las cajas de Petri. En el caso de que el hongo produzca lipasas se forman cristales macroscópicos visibles alrededor y abajo de las colonias, que representan las sales de calcio del ácido graso (ácido láurico) liberado por la lipólisis.

Degradación de la gelatina. Para la elaboración de este medio se utilizó el medio basal de MNM conteniendo 120 g/l de gelatina en lugar de agar. Para esto, la gelatina se disolvió en 900 ml de agua esterilizándose por separado de los demás ingredientes, los cuales se disolvieron y esterilizaron en 100 ml de agua. Después de esterilizar la mezcla de sales se adicionó a la gelatina tibia antes de vaciar a las cajas de Petri. En el caso de que el hongo haya producido proteasas se observaría la licuefacción de la gelatina alrededor o abajo de la colonia.

Degradación del almidón. Al medio basal de MNM se le agregaron 2.0 g/l de almidón soluble (BDH Chemicals Canada Ltd, Toronto). Después de cinco semanas de incubación, las cajas de Petri se inundaron con una solución de yodo (5.0 g KI y 1.5 g de yodo en 100 ml de agua). Después de varios minutos el líquido se eliminó. Si el hongo produjo amilasa se observaría una zona destañada del color púrpura que tomó el medio al adicionar la solución de yodo.

Degradación de casaminoácidos. Al medio basal de MNM sin $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ se le mezclaron 5.0 g/l de casaminoácidos (Difco Laboratories, Detroit, MI). Se le adicionaron 2 ml/l púrpura de bromo cresol (BDH Chemicals, Canadá, Ltd, Toronto) (el cual fue preparado con 1.6 g por cada 100 ml de etanol al 95 %). El medio es de color gris rojizo a un pH inicial de 6.5. Si los casaminoácidos liberan amonio, el medio se basifica virando a color púrpura (pH >6.8). Si el medio cambia a amarillento o claro, es cuando ocurre la acidificación (pH <5.2) como resultado de la secreción de los ácidos fúngicos. Esta prueba es una modificación de la técnica usada por Summerbell *et al.* (1988).

Degradación de urea. Al medio basal de MNM sin fosfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ se le agregaron 5.0 g de glucosa por litro, también se le adicionó rojo fenol (J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ) a una tasa de 12 mg/l. El medio se elaboró con 900 ml con agua y se esterilizó por separado. Por otro lado, 20 g de urea (BDH Chemicals Canadá Ltd, Toronto) se disolvieron en 100 ml de agua y esta solución se esterilizó por filtración con un filtro milipore de 0.45 μm . Posteriormente, los 100 ml de urea se adicionaron a los 900 ml de agar estéril hasta aforar a un litro. También se adicionaron de 2 a 3 gotas de HCl concentrado y se mezcló para ajustar el pH a 6.8. El medio se vació a las cajas de Petri. Después de la inoculación, si el hongo produjo ureasa el medio amarillo cambió a color rojo (pH >8.2).

Todas las pruebas se realizaron por triplicado inoculando las cajas de Petri y los frascos con cuadros de 4 mm de diámetro, e incubando a 18 C en la oscuridad por 5 semanas. Las pruebas para la degradación de la celulosa, lignina y casaminoácidos se incubaron por 12 semanas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lignina, celulosa y almidón. En los cuadros 1 y 2 se muestra que ninguna cepa de *Amanita* y *Suillus* fue capaz de degradar celulosa, lignina, ni almidón.

CUADRO 1. Degradación de compuestos de carbono y nitrógeno por cepas de *Amanita*

CEPA	TAXA	Cel	Lig	Pec.	Lip	Gel	Alm	Casa	Urea
TLAX 2	<i>A. muscaria</i>	-	-	-	-	+++	-	+++	+
TLAX 22	<i>A. muscaria</i>	-	-	-	+++	++	-	+	+
TLAX 27	<i>A. muscaria</i>	-	-	-	+++	+++	-	++	+
TLAX 41	<i>A. muscaria</i>	-	-	-	+++	+++	-	+	+
TLAX 46	<i>A. aff. rubescens</i>	-	-	-	-	++	-	A	+
TLAX 4	<i>A. sp. Secc. vaginata</i>	-	-	-	+++	+++	-	-	+
TLAX 47	<i>A. sp.</i>	-	-	-	-	+++	-	-	++

Cel:celulosa; lig:lignina; pec:pectina; lip:lipidos; gel:gelatina; alm:almidón; casa:casaminoácidos; (-) negativo; (+) débilmente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) fuertemente positivo; A=acidificó el medio

Las cepas de *Amanita* y *Suillus* probadas no degradaron celulosa y lignina al igual que todos los hongos ectomicorrizógenos probados por Hutchison (1990). Este autor aclaró que en hongos ectomicorrizógenos obligados, la alta actividad de celulasa y/o pectinasa podría disminuir o ser perjudicial para la asociación, en este caso el hongo podría actuar como patógeno provocando una respuesta de defensa. Por el otro lado, la baja actividad celulolítica puede ser preferible para el hospedero pues limita la penetración, promoviendo el establecimiento de la micorriza.

Sin embargo, se han reportado estudios en los que algunos hongos ectomicorrizógenos son capaces de metabolizar fuentes de carbono complejas como la celulosa y la lignina; un ejemplo de esto, es el trabajo de Norkrans (1950. *vide* Hutchison, 1990 a), quién encontró que *Tricholoma vaccinum* fue capaz de descomponer celulosa adicionando glucosa como una fuente de carbono promotora.

Además, se encontró utilizando una técnica de radiorespirómetro, que los componentes de la lignocelulosa fueron descompuestos por hongos como *Cenococcum geophilum*, *Amanita muscaria*, *Tricholoma aurantium*, *Rhizopogon luteolus* y *R. roseolus* (Trojanowski *et al.*, 1984). Por otro lado, se ha demostrado baja actividad celulolítica en *Boletus variegatus* y *Amanita citrina* (Taber y Taber 1987; Donnelly, 1991). Asimismo, Chambers *et al.* (1999) realizaron ensayos directos para determinar la actividad lignina peroxidasa en gran número de hongos ectomicorrizógenos bajo condiciones

limitadas de Fe. Dichos estudios revelaron que no hay evidencias que demuestren la producción de lignina peroxidasa.

Cuadro 2. Degradación de compuestos de carbono y nitrógeno por cepas de *Suillus*

CEPA	TAXA	Cel.	Lig.	Pec.	Lip.	Gel.	Alm	Casa.	Urea
TLAX 31	<i>S. cothurnatus</i> var. <i>hiemalis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
TLAX 5	<i>S. glandulosipes</i>	-	-	-	-	+	-	+	-
TLAX 10	<i>S. glandulosipes</i>	-	-	-	-	+	-	++	+
TLAX 25	<i>S. glandulosipes</i>	-	-	-	-	+	-	++	+
TLAX 34	<i>S. glandulosipes</i>	-	-	-	-	-	-	++	-
TLAX 35	<i>S. glandulosipes</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
TLAX 40	<i>S. lakei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
TLAX 9	<i>S. tomentosus</i>	-	-	+	-	++	-	+	-
TLAX 24	<i>S. tomentosus</i>	-	-	-	-	++	-	+	-
TLAX 33	<i>S. cf. pseudobrevipes</i>	-	-	-	-	-	-	LA	+
TLAX 36	<i>S. cf. pseudobrevipes</i>	-	-	-	-	-	-	++	-
TLAX 42	<i>S. cf. unicolor</i>	-	-	-	++	++	-	+	-
TLAX 32	<i>S. sp.</i>	-	-	-	-	+	-	+	+
TLAX 20	<i>S. sp.</i>	-	-	-	-	++	-	++	+
TLAX 44	<i>S. sp.</i>	-	-	-	-	+	-	++	-

Cel:celulosa; lig:lignina; pec:pectina; lip:lipidos; gel:gelatina; alm:almidón; casa:casaminoácidos; (-) negativo; (+) débilmente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) fuertemente positivo; LA=ligeramente ácido.

Por otra parte, Haselwandter *et al.* (1990) compararon la degradación de la lignina por hongos formadores de micorriza ericoide y ectomicorriza, sugiriendo que son capaces de degradar lignina en el siguiente orden: hongos ericoides > hongos ectomicorizógenos facultativos > hongos ectomicorizógenos obligados (Cao y Crawford, 1993).

Donnelly (1991) indicó que los requerimientos de nitrógeno juegan un papel importante en la regulación de la degradación de lignina y celulosa por *Pisolithus tinctorius*, observando un incremento en la tasa de degradación de lignina y celulosa cuando se disminuyó la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo.

En el caso del almidón, todas las cepas que se probaron en este ensayo son incapaces de producir amilasas, coincidiendo parcialmente con los resultados de Hutchison (1990 a) quién reportó que las cepas de *A. muscaria* presentan respuesta negativa; sin embargo, también encontró varias cepas de otras especies de *Amanita* con respuestas fuertemente positivas, entre ellas una de *A. rubescens* que en nuestro caso también presentó respuesta negativa. En cuanto a las cepas de *Suillus*, también

presentaron respuesta negativa a la producción de amilasas, tal como lo había reportado previamente el mismo autor.

Pectina. Ninguna cepa de *Amanita* fue capaz de degradar pectina (cuadro 1).

Únicamente la cepa de *Suillus tomentosus* (TLAX 9) fue capaz de degradar pectina en bajas proporciones, ya que dio una reacción débilmente positiva (cuadro 2). Hutchison (1990 a) reportó que solamente una especie de *Cortinarius brunneus* utiliza este compuesto

Cairney y Burke (1994) mencionaron que se ha observado que la pared de las células corticales de las raíces de las coníferas son ricas en material péctico y estas células promueven la penetración fúngica, también hay sugerencias (pero no con evidencias directas) de que el hongo puede incrementar el contenido de celulosa y pectina en la pared de la planta para mejorar su flexibilidad

La habilidad para degradar pectina se ha reportado como característica general de los hongos ericoides, con gran importancia durante la colonización de la raíz, como un pre-requisito para el establecimiento de la simbiosis endomicorrízica (Perotto *et al.*, 1997).

Lípidos. De las cuatro cepas de *Amanita muscaria* estudiadas, tres son capaces de degradar lípidos, excepto la TLAX 2 (cuadro 1).

Las cepas de *Amanita aff. rubescens* (TLAX46) y *Amanita sp.* (TLAX 47) no crecieron en este medio a pesar que se repitió tres veces el ensayo. Hutchison (1990 a) reporta a las especies de *Amanita* con respuesta negativa en esta prueba.

Por otro lado, las cepas de *Suillus* mostraron varias respuestas: las cepas de *Suillus cothurnatus var. hiemalis* (TLAX 31), *Suillus tomentosus* (TLAX 9 y 24), *Suillus cf. pseudobrevipes* (TLAX 33 y 36) y *Suillus sp.* (TLAX 20) presentaron buen crecimiento, sin producir cristales de sales de calcio, otras cepas presentaron crecimiento escaso o no crecieron, en este caso encontramos las cepas de *Suillus glandulosipes* (TLAX 5, 10, 25, 34 y 35), *S. lakei* (TLAX 40) y dos cepas de *Suillus sp.* (TLAX 32 y 44); únicamente la cepa de *Suillus cf. unicolor* (TLAX 42) presentó una respuesta moderadamente positiva. Hutchison (1990 a) reportó resultados muy diversos en las especies de *Suillus*

Fries *et al.* (1985) encontraron que el material exudado de las raíces como los carbohidratos, aminoácidos y ácidos orgánicos de bajo peso molecular son de gran importancia para la vida y las actividades de los microorganismos del suelo, aunque los estudios con lípidos son pocos, se ha

encontrado que algunos hongos como *Boletus* y *Laccaria amethystina* reaccionan con los aceites vegetales incrementando su tasa de crecimiento.

Gelatina. Todas las cepas de *Amanita* fueron de moderada a fuertemente positivas en la producción de proteasas (cuadro 1). Hutchison (1990 a) reportó que *A. muscaria* presentaba respuestas variadas, desde negativas hasta ligeramente positivas, en tanto el resto de las especies eran moderadamente positivas.

En cuanto a las cepas de *Suillus* (cuadro 2), encontramos que algunas presentan respuesta de ligera a moderadamente positiva y solamente las cepas de *S. cothurnatus* var. *hiemalis* (TLAX 31), una de *S. glandulosipes* (TLAX 34), *S. lakei* y las dos cepas de *Suillus* cf. *pseudobrevipes* (TLAX 33 y 36) no degradaron la gelatina. Hutchison (1990 a) reportó que todas las cepas de *Suillus* que trabajó fueron negativas.

Casaminoácidos. En el cuadro 1 se puede observar que las cepas de *A. muscaria* (TLAX 2, 22, 27 y 41) degradaron casaminoácidos, con una respuesta desde débil hasta fuertemente positiva. Las cepas TLAX 4 (*Amanita* sp. secc. *vaginata*) y 47 (*Amanita* sp.) dieron resultados negativos. Hutchison (1990 a) reportó que la mayoría de cepas de *Amanita* presentaban respuesta negativa o que acidifican ligeramente el medio. En este estudio, únicamente la cepa de *A. aff. rubescens* (TLAX 46) acidificó el medio de cultivo.

En el cuadro 2 se muestra que las cepas de *Suillus glandulosipes* (TLAX 35) y *S. lakei* (TLAX 40) no degradaron casaminoácidos; las cepas *Suillus cothurnatus* var. *hiemalis* (TLAX 31), *Suillus glandulosipes* (TLAX 5), *Suillus tomentosus* (TLAX 9 y 24), *Suillus* cf. *unicolor* (TLAX 42) y *Suillus* sp. (TLAX 32) degradaron débilmente los casaminoácidos; mientras que las cepas de *Suillus glandulosipes* (TLAX 10, 25 y 34), *Suillus* cf. *pseudobrevipes* (TLAX 36) y *Suillus* sp. (TLAX 20 y 44) degradaron moderadamente este compuesto; únicamente la cepa de *Suillus* cf. *pseudobrevipes* (TLAX 33) acidificó débilmente el medio de cultivo. Hutchison (1990 a) reportó que todas las cepas de *Suillus* que estudió fueron negativas y únicamente una cepa de *S. umbonatus* acidificó el medio de cultivo.

Keller (1996) encontró un alto grado de variabilidad en cepas de *Suillus* cuando los aislamientos se obtuvieron en diferentes estados sucesionales del bosque, encontrando variaciones considerables intraespecíficas en la habilidad para usar proteínas como fuente de nitrógeno, sin una correlación obvia con el tipo de rodal. Mencionó que las diferencias en la capacidad proteolítica pueden ser requisito para la explotación selectiva de fuentes de nitrógeno orgánico por cepas de una especie dada.

También se ha observado que algunas cepas de hongos en cultivo puro presentan crecimiento pobre al utilizar proteínas como fuente de nitrógeno, por lo que las diferencias en la actividad proteolítica pueden ser importantes para determinar la distribución de los hongos ectomicorrizógenos en espacio y tiempo y pueden explicar los tipos de sucesión observada durante el crecimiento del bosque, aunque no excluye la posibilidad de que hongos de estado temprano aislados de suelos con alto contenido orgánico presenten actividad proteolítica (Finlay y Frostegård, 1990).

Por otro lado, Berredjem *et al.* (1998) encontraron que aminoácidos tales como el glutamato, la alanina y el aspartato son excelentes fuentes de nitrógeno para *Laccaria bicolor* pero solamente en la presencia de cantidades esenciales de glucosa, indicando que estos aminoácidos son pobres en carbono.

Urea. Todas las cepas de *Amanita* crecieron sobre el inóculo y produjeron débilmente ureasa, excepto la TLAX 47 que fue moderadamente positiva; sin embargo, las cepas reportadas por Hutchison (1990 a) no produjeron ureasa.

En la prueba de degradación de urea, para las cepas de *Suillus* se pudo observar: las cepas de *Suillus cothurnatus* var. *hiemalis* (TLAX 31), *Suillus glandulosipes* (TLAX 5, 34 y 35), *S. lakei* (TLAX 40) y *Suillus* cf. *unicolor* (TLAX 42) no crecieron en presencia de la urea, en tanto las cepas de *Suillus glandulosipes* (TLAX 10 y 25) presentaron crecimiento de la colonia con una degradación débil; la cepa de *Suillus tomentosus* TLAX 9 no creció; en tanto la TLAX 24 creció pero con respuesta negativa; la cepa TLAX 33 de *Suillus* cf. *pseudobrevipes* no creció, mientras que la TLAX 36 presentó una degradación débil; las cepas de *Suillus* sp. (TLAX 32 y 20) presentaron una degradación débil, mientras que la TLAX 44 no produjo ureasas.

Las pruebas realizadas detectan la actividad enzimática y proporcionan solamente una aproximación de la capacidad de cada hongo. Cuando se producen cantidades muy pequeñas de estas enzimas, estas pruebas no pueden detectarlas, por lo que no pueden indicar el potencial de cada hongo *in vivo* (Hutchison, 1990 a).

CONCLUSIONES

- Las respuestas negativas, en las pruebas de degradación de lignina y celulosa ayuda a comprobar que los hongos estudiados son ectomicorrizógenos, debido a que este tipo de hongos siempre van a ser incapaces de degradar estos compuestos.
- La respuesta positiva en la degradación de lípidos fue consistente para las cepas de *Amanita*, por lo que esta prueba podría tener carácter taxonómico en el género.

- La prueba de degradación de almidón; fue negativa para las cepas de *Suillus* estudiadas, mientras que para las cepas de *Amanita*, las cepas mexicanas presentaron respuesta negativa y las de Norteamérica algunas fueron positivas y otras negativas.
- La degradación de gelatina por las cepas de *Amanita* fue en su mayoría respuestas positivas, por lo que se podría utilizar, para diferenciar cepas de este género. Por otro lado, las cepas mexicanas de *Suillus* spp., produjeron proteasas, sin embargo las cepas de Norteamérica no, por lo que para este género, no funciona, la prueba de producción de proteasas como carácter taxonómico.
- En la degradación de aminoácidos, se obtuvieron diferentes respuestas para los dos géneros estudiados, por lo que esta prueba, no funciona como carácter taxonómico
- La producción de ureasas positiva, fue constante en las cepas de *Amanita* de México, sin embargo, esta prueba fue negativa en las cepas de Norteamérica. Mientras que las cepas de *Suillus* presentaron diferentes respuestas, por lo que para estos géneros, la prueba no funciona como herramienta taxonómica.
- De manera general las pruebas que pueden tener carácter taxonómico en estos géneros, son la degradación de lípidos y gelatina.

PARTE 4

ACTIVIDAD DE LA POLIFENOL-OXIDASA

ANTECEDENTES

Paralelamente a los estudios ecológicos sobre la descomposición microbiana de la madera y del humus, se han realizado estudios de degradación de los sustratos fenólicos con las enzimas lacasa y tirosinasa, las cuales varían dependiendo de la especie fúngica y de su estado de madurez, encontrándose que estas variaciones tienen importancia morfogenética asociada con la pigmentación y fructificación de los hongos (Marr, 1979; Penttilä y Saloheimo, 1999).

Los mecanismos por los cuales los hongos degradan lignina son sólo parcialmente conocidos. Las evidencias sugieren que las enzimas extracelulares producidas por los hongos oxidan los anillos aromáticos y los lados alifáticos de las cadenas produciendo productos de bajo peso molecular que pueden ser asimilados más fácilmente. De acuerdo con el aceptor de electrones usado, las enzimas ligninolíticas oxidativas se pueden dividir en peroxidases, las cuales utilizan H_2O_2 para su actividad, y lacasas que oxidan compuestos fenólicos con una amplia especificidad de sustratos, donde la molécula de O_2 es reducida a agua (Penttilä y Saloheimo, 1999).

Se ha observado que la melanogénesis es un proceso común en muchos hongos cuando se maltratan, los cuales forman complejos rojizos que cambian a coloraciones desde color café hasta negro; el compuesto responsable de este proceso se ha identificado como tirosinasa (Marr, 1984).

En estudios realizados por Bavendawn (1928 *fide* Marr *et al.* 1986) y Nobles (1958 *fide* Marr *et al.*, 1986) sobre el crecimiento de hongos en extracto de malta con ácido gálico o tanínico, se observó que algunos hongos producen una zona oscura sobre el agar si son capaces de producir polifenol-oxidasas. Se dedujo que la producción de estas enzimas tienen potencial taxonómico, ya que puede separar a los hongos de la pudrición blanca que producen la enzima, de los de la pudrición café que no la producen (Hutchison, 1990 b).

En estudios posteriores, se ha visto que las lacasas y tirosinasas oxidan aminas aromáticas y fenoles, además de que algunos investigadores han notado que estas dos enzimas existen en formas múltiples, cada isoenzima (forma) utiliza un sustrato característico. Algunos investigadores han descrito varias formas moleculares de estos compuestos (Marr, 1979).

Marr (1979 y 1984) realizó pruebas con diferentes reactivos en cuerpos fructíferos de Agaricales encontrando que la L-tirosina, *p*-cresol y fenol detectan tirosinasa; por otro lado, la siringaldazina y el α -naftol identifican lacasa; también encontró que el pirogalol, guayacol y guayaco no son sustratos

específicos de estas enzimas. Llegó a la conclusión de que el α -naftol es un detector ideal para las lacasas totales, sin embargo, algunas variedades de estas enzimas no son detectadas con este compuesto. Por otro lado, el *p*-cresol es un sustrato específico para la tirosinasa (Marr, 1979).

En cuanto a hongos ectomicorrizógenos, Giltrap (1982) encontró que 57 de 75 aislamientos producen poca o ninguna polifenol oxidasa, sin embargo, 7 de 8 especies de *Lactarius* producen estas enzimas tan vigorosamente como las especies sobrobias, por lo que deduce que posiblemente se trate de organismos facultativos. El mismo autor menciona que las diferencias de las reacciones en distintos aislamientos de la misma especie pueden indicar diferencias fisiológicas intraespecíficas. Más tarde, Grams *et al.* (1998) encontraron que algunos hongos ectomicorrizógenos son capaces de mineralizar material complejo derivado de plantas y lignina.

Marr *et al.* (1986) trabajaron con 359 hongos, representados por 222 especies de basidiomicetos encontrando que los resultados fueron constantes entre los especímenes maduros e inmaduros de la misma recolección, argumentando que la variabilidad entre las réplicas fue insignificante, por lo que no se disminuye el potencial taxonómico de las pruebas. Dichos autores demostraron que los hongos pueden categorizarse en cuatro grupos fisiológicos los cuales reflejan afinidades taxonómicas.

Hutchison (1990 b) estudió 169 aislamientos de hongos ectomicorrizógenos, encontrando que pueden ser colocados en grupos que reflejan su afinidad taxonómica, basados en la presencia, ausencia o dominancia de las enzimas lacasa o tirosinasa.

De acuerdo con lo reportado, es importante conocer las respuestas de las cepas mexicanas de hongos ectomicorrizógenos, por lo que se planteó realizar las pruebas de detección de la polifenol-oxidasa con cepas de *Amanita* y *Suillus* para determinar si hay consistencia con las respuestas reportadas en la literatura para cepas de estos géneros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este ensayo se basó en la metodología propuesta por Hutchison (1990 b), en la cual se prepararon los medios de papa dextrosa agar (PDA, Bioxon Becton Dickinson de México), Melin y Norkrans Modificado (MNM), Hagem (HG) (Molina y Palmer, 1982) y biotina-aneurina-ácido fólico-agar (BAF) (Moser, 1960).

Con un bisturí se cortaron trozos de 4 mm de diámetro del margen de colonias en crecimiento activo, los cuales se colocaron en el centro de cada caja de Petri de 90 mm conteniendo 30 ml de los medios de cultivo. Se inocularon cuatro cajas por cada medio preparado y por cada aislamiento, posteriormente se sellaron con egapac y se incubaron en la oscuridad a 18 °C durante 5 semanas.

Por otro lado, se prepararon soluciones 0.1 M de α -naftol y p-cresol (Matheson, Coleman & Bell Manufacturing Chemist, Norwood, Ohio) en alcohol al 95 %. Estas dos sustancias se utilizaron como indicadores de lacasa y tirosinasa, respectivamente (Hutchison, 1990 b). Estas soluciones se guardaron en frascos goteros oscuros bien cerrados, los cuales se almacenaron hasta el momento de ser utilizados. Dado que estas soluciones son tóxicas, fue necesario el uso de guantes de plástico para su aplicación.

Después de cinco semanas de incubación, las cajas se destaparon y se pusieron de una a dos gotas de cada solución sobre la superficie del margen de cada colonia; la solución de α -naftol se aplicó en un extremo de la colonia y el p-cresol en la posición opuesta; después, las cajas fueron selladas nuevamente con egapac.

Se hicieron lecturas una hora después de la aplicación de los reactivos. La presencia de lacasa provocó un cambio de color del α -naftol a azul o púrpura; mientras que con el p-cresol se observó un cambio de color a naranja rojizo o café indicando la presencia de tirosinasa. Las reacciones se registraron de acuerdo con la intensidad de colores: (-) si no se observó cambio de color; (+) si la coloración fue muy débil; (++) si la coloración fue débil; (+++) si la coloración fue moderada, (++++) si ocurre una coloración fuerte; y (+++++) si ocurre una coloración intensa (Hutchison, 1990 b).

Basados en la propuesta de Marr *et al.* (1986), las respuestas de los hongos se agruparon en cuatro categorías fisiológicas:

Grupo I. (grupo negativo) donde no se detecta lacasa ni tirosinasa.

Grupo II. (grupo de tirosinasa dominante) donde la reacción de la tirosinasa es más fuerte (3 veces más grande, o más), con relación a la lacasa que es débil.

Grupo III. (grupo de lacasa dominante) cuando la reacción de la lacasa es más fuerte (3 veces más grande o más), que la reacción de la tirosinasa.

Grupo IV. (grupo equivalente) cuando las reacciones de la lacasa y tirosinasa son iguales, o cuando la dominancia no excede 3:1.

Se puede determinar fácilmente la dominancia de una enzima sobre la otra, por la observación directa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clasificación de las cepas de *Amanita* ante el α -naftol y p -cresol (Cuadro 1).

Con excepción la la cepa TLAX 41, las cepas de *Amanita muscaria* presentaron una reacción muy débil en α -naftol y moderada en p -cresol después de haber aplicado los reactivos de prueba, clasificándose en el grupo II

En *Amanita aff. rubescens* (TLAX 46) se pudo observar una respuesta negativa al α -naftol y una respuesta intensa con el p -cresol, clasificándose en el grupo II.

La cepa de *Amanita* sección *vaginata* (TLAX 4) mostró una respuesta equivalente con el α -naftol y el p -cresol, clasificándose en el grupo IV

La cepa de *Amanita* sp TLAX 47 presentó una reacción muy débil con el α -naftol y moderada con el p -cresol, clasificándose en el grupo II.

Cuadro 1. Clasificación de la actividad enzimática las cepas de *Amanita*

Cepa	Lacasa α -NAFTOL				Tirosinasa p -CRESOL				Grupo
	BAF	PDA	MNM	HG	BAF	PDA	MNM	HG	
TLAX 2 <i>A. muscaria</i>	-	-	-	-	+	-	++	+++	II
TLAX 22 <i>A. muscaria</i>	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	II
TLAX 27 <i>A. muscaria</i>	+	-	+	-	+	++	+	++	II
TLAX 41 <i>A. muscaria</i>	++++	++++	++++	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	IV
TLAX 46 <i>A. aff. rubescens</i>	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	II
TLAX 4 <i>A. sp. secc. vaginata</i>	+++	+++	+++	+++	+++++	+++++	+++++	+++++	IV
TLAX 47 <i>A. sp.</i>	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	II

(-) no se observó cambio de color; (+) coloración muy débil; (++) coloración débil; (+++) coloración moderada; (++++) coloración fuerte; (+++++) coloración intensa. I. grupo negativo; II. grupo de tirosinasa dominante. III. grupo de lacasa dominante IV. grupo equivalente

En nuestros resultados pudimos observar respuestas consistentes de las diferentes especies, como sucede con las cepas de *Amanita* las cuales presentaron una respuesta tirosinasa dominante (grupo II) después de una hora; estos resultados concuerdan con los obtenidos por Marr (1986) y Hutchison (1990 b) para las mismas especies. Solamente la cepa de *Amanita muscaria* (TLAX 41) presentó una respuesta equivalente (grupo IV).

Clasificación de las cepas de *Suillus* ante el α -naftol y p -cresol (Cuadro 2).

El género *Suillus* presentó diferentes respuestas después de haber puesto los reactivos: las cepas de *S. cothurnatus* var. *hiemalis* (TLAX 31), todas las cepas de *Suillus glandulosipes*, una cepa de *S. tomentosus* (TLAX 9), *Suillus* cf. *pseudobrevipes* (TLAX 33) y una cepa de *Suillus* sp. (TLAX 32) respondieron ante los reactivos de forma equivalente, considerándose en el grupo IV.

Cuadro 2. Clasificación de la actividad enzimática las cepas de *Suillus*.

Cepa	Lacasa1-NAFTOL				tirosinasaP-CRESOL				Grupo
	BAF	PDA	MNM	HG	BAF	PDA	MNM	HG	
TLAX 31 <i>S. cothurnatus</i>	+	++	+	-	++	++	++	+	IV
TLAX 5 <i>S. glandulosipes</i>	++	-	+++	+	++	++	++	+	IV
TLAX 10 <i>S. glandulosipes</i>	-	+++	-	-	+	++	-	+	IV
TLAX 25 <i>S. glandulosipes</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	IV
TLAX 34 <i>S. glandulosipes</i>	++	++	+	++	+	++	+	+	IV
TLAX 35 <i>S. glandulosipes</i>	++	-	+++	+	++	++	++	+	IV
TLAX 40 <i>S. lakei</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	I
TLAX 9 <i>S. tomentosus</i>	+++	++++	+++	+++	+	++	+	+	IV
TLAX 24 <i>S. tomentosus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	I
TLAX 33 <i>S. cf. pseudobrevipes</i>	++	+++	++	++	++	+++	++	++	IV
TLAX 36 <i>S. cf. pseudobrevipes</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	I
TLAX 42 <i>S. cf. unicolor</i>	-	+	+	-	++	++	++	++	II
TLAX 32 <i>S. sp.</i>	++	++	+	++	++	++	++	++	IV
TLAX 20 <i>S. sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	I
TLAX 44 <i>S. sp.</i>	-	-	-	-	+	+++	-	+	II

(-) no se observó cambio de color; (+) coloración muy débil; (++) coloración débil; (+++) coloración moderada; (++++) coloración fuerte; (+++++) coloración intensa. I. grupo negativo; II. grupo de tirosinasa dominante. III. grupo de lacasa dominante. IV. grupo equivalente. T=tiempo después de aplicar los reactivos

Las cepas de *Suillus tomentosus* (TLAX 24), *Suillus* cf. *pseudobrevipes* (TLAX 36) y *Suillus* sp. (TLAX 20) presentaron una reacción negativa (grupo I) después de una hora.

Suillus cf. *unicolor* (TLAX 42) y *Suillus* sp. (TLAX 20) dieron una respuesta tirosinasa dominante (grupo II).

La cepa de *Suillus lakei* (TLAX 40) presentó una respuesta negativa (grupo I).

Hutchison (1990 b) mencionó que cuando se dejan las colonias con el reactivo más tiempo del indicado puede dar una reacción positiva falsa por auto-oxidación.

Todas las cepas de *Suillus glandulosipes* respondieron de manera consistente; sin embargo, también se encontró variación en algunas cepas pertenecientes a una misma especie como *S. tomentosus* o *Suillus* cf. *pseudobrevipes* que presentaron respuestas diferentes.

Hutchison (1990 b) observó variación en las respuestas de los géneros *Cortinarius* y *Hebeloma*, donde sus especies mostraron reacciones diferentes, pudiendo ser ubicadas en subgéneros particulares. Este autor sugirió que falta por examinar gran número de especies que podrían explicar las respuestas diferentes.

Hutchison (1990 b) observó que varias especies de *Suillus* presentaron una reacción negativa tanto en los basidiomas como en los cultivos. Por otro lado, Thiers (1984) y Bruns *et al.* (1989) reportaron que el género *Suillus* puede presentar reacción negativa con las dos enzimas o agruparse como tirosinasa dominante dependiendo de la especie.

Hutchison (*op. cit.*) mencionó que la respuesta en la actividad polifenol-oxidasa entre los cultivos y basidiomas es similar para las mismas especies. En algunos casos, las diferencias se pueden deber a que se restringen las observaciones a ciertos tipos de medios de cultivo en los cuales se pueden encubrir los resultados, debido a que los productos naturales que se incorporan al medio tales como el extracto de malta que tiene una alta influencia sobre la formación de lacasa en los cultivos jóvenes, respuestas que no se observa en los medios sintéticos.

Hutchison (1990 b) mencionó que la función de las lacasas en los hongos ectomicorrizógenos no es clara, pero se ha asociado con la dominancia de los compuestos fenólicos antifúngicos producidos como barreras de defensa por las raíces de los árboles. También se ha encontrado que las lacasas pueden ayudar a los hongos ectomicorrizógenos en la destoxificación de los compuestos fenólicos encontrados en la capa de humus de los suelos forestales. Otra posible ruta de acción de las lacasas en hongos ectomicorrizógenos es su relación con la pigmentación de los cuerpos fructíferos como las quinonas, las cuales son el resultado de la ruptura de los compuestos fenólicos.

Hutchison (*op. cit.*) mencionó que a pesar de todo, la presencia y detección de lacasa y tirosinasa en hongos ectomicorrizógenos por pruebas químicas es un carácter taxonómico consistente en los cultivos puros trabajados por él. Al analizar nuestros resultados encontramos respuestas consistentes como en los casos del género *Amanita* y *Suillus glandulosipes*; aunque por otro lado, en *S. tomentosus* se observaron dos tipos de respuestas que lo clasifican dentro del grupo II y IV; el mismo

autor, reportó que la mayoría de cepas de esta especie pertenecían al grupo I y solamente hubo dos con respuestas diferentes que fueron ubicadas en los grupos II y IV. Por lo anterior, es conveniente realizar más pruebas de este tipo que nos ayuden a apoyar esta propuesta o que nos de argumentos para desecharla.

Es importante que cuando se hacen las pruebas para detectar las enzimas que se producen, los reactivos se apliquen en los márgenes de las colonias, debido a que las hifas jóvenes son las productoras más activas de lacasa (Shán I, 1966; Harkin *et al.*, 1974).

CONCLUSIONES

- Las cepas de *Amanita* presentan respuesta tirosinasa dominante, sin embargo, no siempre hay consistencia en las respuestas, pues dos cepas (TLAX 41 y 4) presentaron una respuesta equivalente.
- Por otro lado, se pudo observar que las cepas del género *Suillus*, tanto en la literatura como en nuestros ensayos presentan tres respuestas diferentes: negativa, tirosinasa dominante o equivalente.
- A nivel de especie, se pudo observar que las cepas de *S. tomentosus* y *Suillus cf. pseudobrevipes* presentaron respuestas intraespecíficas diferentes (negativa y equivalente).
- Por otro lado, ni en la literatura ni en nuestros ensayos se ha encontrado respuesta lacasa dominante.

PARTE 5

REACCIÓN DEL MICELIO CON AZUL DE DIAZONIO

ANTECEDENTES

Los cultivos puros de hongos ectomicorrizógenos son difíciles de identificar, en parte porque producen pocas estructuras micromorfológicas o no producen las necesarias para su diferenciación (Zak y Bryan, 1963; Zak y Marx, 1964) Hutchinson, (1991) mencionó que para la identificación de aislamientos desconocidos se necesita usar caracteres macromorfológicos como la textura y el color de la colonia pero, también se puede hacer uso de herramientas genéticas, bioquímicas o fisiológicas.

Una de las pruebas bioquímicas desarrolladas para los hongos es la tinción de las paredes celulares con tetrazotizado-o-dianizidina, comúnmente referida como azul de diazonio o azul rápido B (Hopsu-Havu *et al.*, 1967 *fide* Hutchinson y Summerbell, 1990; Tevaganond, 1981 *fide* Hutchinson y Summerbell, 1990). Estas tinciones han servido para diferenciar las levaduras de los ascomicetos de las de los basidiomicetos.

El azul de diazonio B es un compuesto que no se ha utilizado ampliamente con los hongos filamentosos, debido a que su micelio aéreo generalmente repele las soluciones acuosas del colorante a causa de sus constituyentes hidrofóbicos. Summerbell (1985) superó este obstáculo haciendo crecer a los hongos filamentosos sumergidos en cultivo líquido. Se estableció que el azul de diazonio B puede ayudar a la separación de ascomicetos y basidiomicetos, dado que el micelio soporta la hidrólisis alcalina con una solución de hidróxido de potasio. Summerbell (1985) registró que el micelio no expuesto a este tratamiento mostró una reacción amarilla, como ocurrió con el micelio de dos especies de basidiomicetos ectomicorrizógenos (Hutchinson y Summerbell, 1990).

Hutchinson y Summerbell (1990) encontraron que el micelio de los basidiomicetos da una reacción desde roja hasta violeta cuando es tratado con KOH fresco; en contraste, los ascomicetos presentan diferentes respuestas, las cuales pueden ser desde negativas, hasta coloraciones rojas y oscurecimiento del micelio

Es por esto, que en el presente ensayo se planteó determinar si los micelios de *Amanita* y *Suillus* tratados con KOH y sin tratamiento presentan las mismas reacciones reportadas por Hutchinson y Summerbell (1990) ante el colorante azul de diazonio y de esta manera utilizar estos resultados como herramienta taxonómica para la identificación de aislamientos de hongos ectomicorrizógenos.

MATERIALES Y MÉTODOS

La realización de este ensayo se basó en la metodología propuesta por Hutchinson y Summerbell (1990). Para esto, se preparó medio de MNM sin agar (Marx, 1969) adicionando 100 ml de este medio a matraces Erlenmeyer de 250 ml, los cuales se taparon con tapones de algodón y se esterilizaron por 15 minutos a 120 lb de presión. Una vez que se enfrió el medio de cultivo, se inocularon tres cuadros de 4 mm de diámetro de cada colonia a probar. Por cada matraz, se extrajeron tres muestras de micelio a las cuales se les realizó la prueba. Los frascos se colocaron en una agitadora mecánica a 100 rpm durante cinco semanas y se incubaron a 20 C.

Después del periodo de incubación, las colonias se extrajeron y lavaron completamente con agua destilada. Una parte del micelio se colocó en frascos con KOH 1N y se incubaron a 5 C por 12 horas, posteriormente el micelio se enjuagó y se trató de la misma manera que el micelio no tratado.

El azul de diazonio B (o-dianisidine, tetrazotized. Sigma Chemical Co.) se disolvió en una tasa de 1 mg/ml en una solución acuosa de clorhidrato de trizma 0.1 M (Sigma Chemical Co.) (pH 7.0) y se enfrió a 5 C.

Para el manejo de los reactivos fue necesario utilizar guantes de plástico como una precaución ya que el reactivo utilizado es tóxico. Los dos micelios (tratados con y sin KOH) se colocaron en cajas de Petri de vidrio y se les agregaron varias gotas del azul de diazonio B (recién preparado) sobre las superficies, revisando las reacciones de las colonias a los tres minutos.

El micelio expuesto a una hidrólisis alcalina con una solución de hidróxido de potasio por 12 horas y posteriormente teñido con el colorante puede ayudar a separar ascomicetos de basidiomicetos. Por otro lado, el micelio no tratado con el KOH puede dar 5 respuestas diferentes: 1) respuesta negativa; 2) tinción de rojo a violeta; 3) tinción amarilla; 4) interior rojo y exterior amarillo; 5) interior amarillo y exterior rojo (Hutchinson y Summerbell, 1990).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se puede observar que las colonias de *Amanita* tratadas con KOH y con la adición del colorante presentaron una coloración rojiza, resultados que concuerdan con los obtenidos por Hutchinson y Summerbell (1990) para los basidiomicetos.

En cuanto al micelio que no se trató con KOH, se pudo observar que la cepa de *Amanita muscaria* TLAX 2 dió una respuesta negativa, en tanto en la cepa TLAX 22 se observó un ligero color rosado y las cepas TLAX 27 y 41 presentaron una coloración ligeramente amarilla; las cepas de *Amanita aff. rubescens* TLAX 46, *Amanita* sp sección *vaginata* TLAX 4 y *Amanita* sp. TLAX 47 dieron una

reacción negativa. Al comparar con los resultados reportados por Hutchinson y Summerbell (1990) se puede detectar que no hay una correlación entre las cepas de *A. muscaria* trabajadas y reportadas, ya que presentaron mucha variación en las respuestas

Cuadro 1. Reacción del micelio de las cepas de *Amanita* ante el azul de diazonio

Cepa	Taxa	Micelio tratado con KOH	Micelio sin tratamiento con KOH
TLAX 2	<i>Amanita muscaria</i>	++	-
TLAX 22	<i>A. muscaria</i>	++	r+
TLAX 27	<i>A. muscaria</i>	++	a+
TLAX 41	<i>A. muscaria</i>	++	a+
TLAX 46	<i>Amanita aff. rubescens</i>	++	-
TLAX 4	<i>Amanita</i> sp. secc. <i>vaginata</i>	++	-
TLAX 47	<i>Amanita</i> sp.	++	-

- negativo; + ligeramente positivo; ++ moderadamente positivo; a+ ligeramente amarillo; r+ ligeramente rosado

En las colonias de *Suillus* tratadas con KOH se presentaron coloraciones desde rosadas hasta rojizas, característica que comprueba que se trata de basidiomicetos (cuadro 2).

Por otro lado, en las colonias que no se trataron con KOH se observaron las siguientes respuestas. Las cepas de *Suillus glandulosipes* (TLAX 5, 10, 25 y 35) presentaron respuesta negativa, pero en la TLAX 34 se observaron coloraciones rojizas con el margen amarillo. Las cepas de *Suillus cothurnatus* var *hiemalis* (TLAX 31), *S. tomentosus* (TLAX 9 y 24), *Suillus* cf. *pseudobrevipes* (TLAX 33 y 36) y *Suillus* cf. *unicolor* (TLAX 42) presentaron respuestas negativas. En la cepa de *S. lakei* (TLAX 40) se observó una coloración de la colonia ligeramente amarilla; en las cepas de *Suillus* sp. se observaron respuestas diferentes: la TLAX 32 se tiñó ligeramente de amarillo, la TLAX 20 de color rojizo con el margen amarillo y la TLAX 44 mostró una respuesta negativa al colorante. Al comparar nuestros resultados con los de la literatura se puede observar que las cepas mostraron respuestas diferentes, ya que las reportaron desde negativa, micelio ligeramente amarillo, hasta fuertemente amarillo; y desde moderadamente positivo (rojo), hasta micelio oscurecido por la pigmentación.

CONCLUSIONES

- Con los resultados obtenidos en nuestro ensayo se puede concluir que el hecho de realizar las pruebas tratando el micelio con KOH nos puede ayudar a separar cepas provenientes de basidiomicetos de posibles contaminaciones.

- En cuanto al micelio que no es tratado con KOH, se pudo observar mucha variación en las respuestas, por lo que es conveniente que se realicen más ensayos probando mayor número de cepas de diferentes taxa.

Cuadro 2. Reacción del micelio de las cepas de *Suillus* al reactivo de azul de diazonio

Cepa	Taxa	Micelio tratado con KOH	Micelio sin tratamiento con KOH
TLAX 31	<i>Suillus cothurnatus</i> var. <i>hiemalis</i>	+	-
TLAX 5	<i>S. glandulosipes</i>	+	-
TLAX 10	<i>S. glandulosipes</i>	+	-
TLAX 25	<i>S. glandulosipes</i>	++	-
TLAX 34	<i>S. glandulosipes</i>	++	ar
TLAX 35	<i>S. glandulosipes</i>	++	-
TLAX 40	<i>S. lakei</i>	++	a+
TLAX 9	<i>S. tomentosus</i>	++	-
TLAX 24	<i>S. tomentosus</i>	++	-
TLAX 33	<i>Suillus</i> cf. <i>pseudobrevipes</i>	++	-
TLAX 36	<i>Suillus</i> cf. <i>pseudobrevipes</i>	++	-
TLAX 42	<i>Suillus</i> cf. <i>unicolor</i>	+	-
TLAX 32	<i>Suillus</i> sp.	++	a+
TLAX 20	<i>Suillus</i> sp.	++	ar
TLAX 44	<i>Suillus</i> sp.	+	-

- negativo; + ligeramente positivo; ++ moderadamente positivo; a+ ligeramente amarillo; r+ ligeramente rosado; ar amarillo en el exterior y rojizo en el interior

PARTE 6

ANÁLISIS DE SIMILITUD DE LAS CEPAS DE *Amanita* Y *Suillus*

El uso de métodos multivariados es de suma importancia para lograr la separación y medida de la variación en el conjunto de cepas utilizadas. Por el tipo de datos que se obtuvieron en las respuestas de las cepas, se requiere hacer un análisis de conglomerados, que es una técnica analítica que forma grupos de individuos, basados en sus similitudes (Hair, 1999; Dallas, 2000).

El análisis de conglomerados agrupa a los individuos, de tal manera que los individuos que se encuentran en un mismo conglomerado son más parecidos entre sí que los de otros conglomerados. Este tipo de análisis es muy útil cuando se desea comprobar hipótesis previamente establecidas (Hair, 1999).

Asimismo, como parte de este tipo de análisis la taxonomía numérica trata de descubrir estructuras y patrones dentro de un conjunto de datos, realizando arreglos fenéticos de las unidades taxonómicas (OTU), donde las técnicas utilizadas están diseñadas para generar hipótesis más que para probarlas, considerándose un mecanismo de exploración y no tanto de confirmación (Kohlmann, 1994).

Dada la importancia que tiene el análisis multivariado para la organización de datos, nos propusimos realizar un análisis de similitud con las cepas de *Amanita* y *Suillus* (OTU's), tomando los resultados de las siguientes pruebas fisiológicas como los caracteres: crecimiento en diferentes temperaturas, degradación de diferentes compuestos orgánicos y nitrógeno, actividad polifenol oxidasa y compuestos fungistáticos, asimismo, se incluyeron los resultados de las cepas pertenecientes a estos mismos géneros reportados por Hutchison (1990a, 1990b, 1990c, 1990d y 1991), con el fin de definir si existen agrupamientos taxonómicamente consistentes entre las cepas mexicanas y las previamente estudiadas por dicho autor, lo que sería un indicador del valor taxonómico de las pruebas fisiológicas utilizadas.

METODOLOGÍA

De acuerdo con Crisci y López (1983) y Kohlmann (1994), se seleccionaron las cepas de *Amanita* y *Suillus*, tanto de las cepas probadas en este trabajo como de las reportadas en la literatura.

Los caracteres que se utilizaron fueron los siguientes: degradación de pectina, degradación de almidón, lípidos, urea y gelatina; producción de polifenol oxidasa después de una hora de haber puesto los reactivos; tolerancia a las temperaturas de 7 y 30 °C; tolerancia de las cepas a los compuestos de benomil, rosa de bengala, verde de malaquita, cicloheximida y cloruro de sodio. Los caracteres seleccionados fueron de tipo cualitativo y multiestado; a los cuales, se les asignó un

número diferente según la respuesta para poder diferenciarlos (anexo 1) y se eliminaron las pruebas en donde se presentó una respuesta constante para todas las cepas, como es el caso de la degradación de lignina y de celulosa.

Una vez que los caracteres se codificaron bajo la forma de matriz básica de datos, se procedió a estimar el grado de similitud entre las OTU's con la ayuda del programa NTESYS versión 2.10c (2000); utilizando el índice de Rogers y Tanimoto (Crisci y López, 1983).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aunque se observó una gran variabilidad de las cepas con relación a sus respuestas en las pruebas fisiológicas, con excepción de *Amanita citrina* 111 y *A. flavoconia* 109, todas las cepas incluidas en el análisis de conglomerados se agruparon en dos bloques, los cuales prácticamente corresponden con los géneros estudiados (Fig 1).

Las respuestas de *Amanita* fueron más variables que las de *Suillus*, lo que las agrupa en tres conjuntos diferentes. El primero, formado por *A. citrina* 111 y *A. flavoconia* 109, es en el que se presentan las respuestas más disímiles de todas las cepas analizadas, ya que a diferencia de las otras cepas de *Amanita*, son tolerantes a la cicloheximida y son de las pocas cepas capaces de degradar almidón. El segundo bloque incluye a todas las cepas de *Amanita* procedentes de Tlaxcala y a todas las de *Amanita muscaria* estudiadas por Hutchison (1990a). El tercer grupo se integra con *A. brunescens* 5942 y *A. rubescens* 6143, y es más similar con el conjunto de cepas de *Suillus* que con cualquiera de los otros grupos formados por cepas de *Amanita*. Este último grupo se caracteriza por su capacidad de degradar almidón y su semitolerancia a la ciclohexamida.

En la agrupación que incluye a las cepas de Tlaxcala, se puede observar que éstas se separan de las de *A. muscaria* estudiadas por Hutchison (1999a), formado por dos conjuntos bien definidos. Aunque 4 de las 7 cepas aisladas de diversos ambientes del estado de Tlaxcala corresponden también con *A. muscaria*, es claro que son fisiológicamente diferentes de las estudiadas por Hutchison (1990a) ya que las primeras degradan la gelatina y la urea, en tanto las segundas no.

Con respecto a las cepas de *A. rubescens*, tampoco se encontró similitud en sus respuestas en las pruebas fisiológicas, pues mientras la cepa de Tlaxcala se agrupó con el resto de las cepas aisladas en el estado, la estudiada por Hutchison (1990 a) se incluyó en un conglomerado con una cepa de *A. brunescens*.

Las respuestas de las cepas de *Suillus* fueron más homogéneas y el género, en general, se puede considerar como incapaz de degradar la pectina, los lípidos y el almidón, y tolerante al benomil, al

verde de malaquita y al cloruro de sodio. Las cepas de *Suillus* que presentaron las diferencias más notables con el resto, correspondieron con *S. cf. pseudobrevipes* 36, *S. tomentosus* 9, *S. cf. unicolor* 42, todas ellas procedentes de Tlaxcala. En el conglomerado formado por el resto de las cepas de *Suillus*, se separan dos agrupamientos, uno de ellos que contiene la mayoría de las cepas tlaxcaltecas, y el otro que incluye a todas las cepas estudiadas por Hutchison (1990a) más *S. cothurnatus* 31 y *S. lakei* 40 de Tlaxcala. Esta última es la cepa mexicana que mayor semejanza guarda con las del extranjero. Las diferencias más notables entre las cepas aisladas en México y las procedentes de Estados Unidos y Canadá son su capacidad de degradar la gelatina y los casaminoácidos, y su tolerancia a temperaturas de 30 °C.

Las únicas cepas que presentaron 100 % de similitud corresponden con tres de *S. tomentosus* (5291, 5550 y 6060), por un lado, y *S. luteus* 6058, *S. neoalbidipes* 6158 y *S. tomentosus* 5795, por otro. Entre las cepas mexicanas, las que presentaron los mayores índices de similitud entre sí, corresponden con tres cepas de *S. glandulosipes* (5, 25 y 34) y una cepa sin determinar (*Suillus* sp. 44), aunque las otras dos cepas de *S. glandulosipes* consideradas en el estudio son más similares con este agrupamiento que con cualquier otro, mostrándose cierta consistencia taxonómica.

Aparte de los grupos ya señalados antes, otros grupos coherentes desde el punto de vista taxonómico son los formados por *S. granulatus* (6203 y 6204), *S. umbonatus* (5242, 5309, 5461 y 5549) y *Suillus tomentosus* (9 y 24). No obstante, al igual que sucede con las cepas de *Amanita*, no todas las cepas determinadas como la misma especie quedan incluidas en los mismos grupos, tal como sucede con las cepas de *S. brevipes*, *S. tomentosus* y *S. pseudobrevipes*, hecho que se constata no sólo entre las cepas aisladas de México y del extranjero (como *S. tomentosus*), sino también entre cepas procedentes de la misma región geográfica (como *S. tomentosus* y *S. brevipes*, para Canadá, y *S. cf. pseudobrevipes* para México).

Las diferencias fisiológicas encontradas entre las cepas mexicanas de *A. muscaria*, *A. rubescens* y *S. tomentosus* con sus contrapartes canadienses podrían estar indicando diferencias en las estrategias de adaptación a los climas, suelos y hospederos encontrados en cada una de sus regiones de origen. También podrían indicar que estas cepas pertenecen a complejos de especies difíciles de separar desde el punto de vista morfológico, pero suficientemente diferenciadas en los niveles genético, fisiológico y de adaptación ecológica, tal como sucede en otros hongos micorrizógenos (Schüßler *et al.*, 2001) macromicetos saprótrofos (Kullnig *et al.*, 2000; Grünig *et al.*, 2001; Hughes *et al.*, 2001; Lumsch *et al.*, 2001), patógenos (Benyon *et al.*, 2000; Dodd *et al.*, 2000; Gottlieb *et al.*, 2000; Hantula *et al.*, 2000; Hsiang y Wu, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000; Pei y Ruiz, 2000; Posada *et al.*, 2000; Purwantara *et al.*, 2000; Smith y Sivasithamparam, 2000; Stummer *et al.*, 2000; Banniza y Rutherford, 2001; Cámara *et al.*, 2001; Harvey *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Krauss *et al.*, 2001; Pfunder *et al.*,

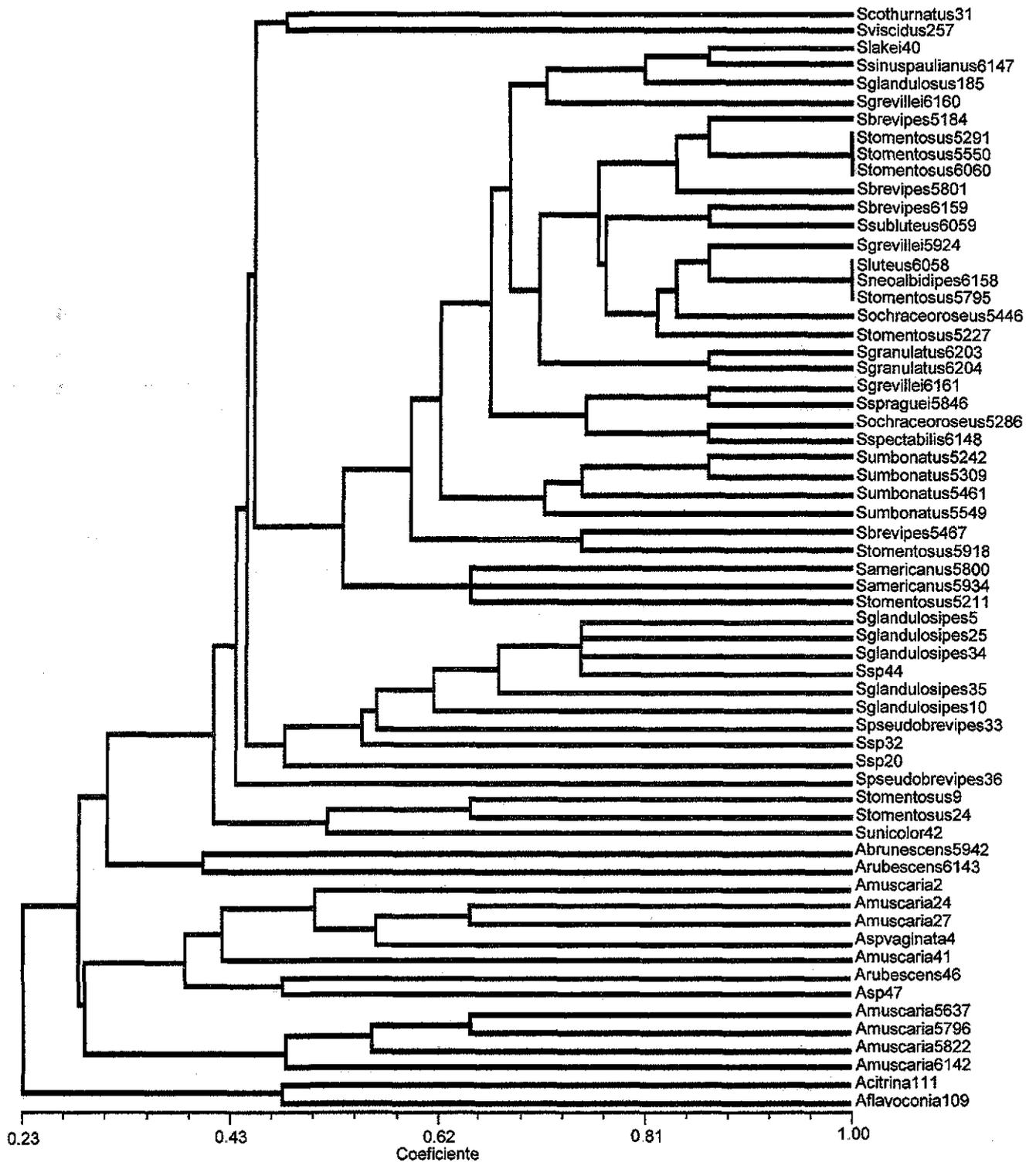
2001; Posada *et al.*, 2001; Swedjemark y Stenlid, 2001) o ectomicorrizógenos (Gomes *et al.*, 2000; Glen *et al.*, 2001).

A pesar de la alta variabilidad de las respuestas fisiológicas que presentaron las cepas estudiadas y de la aparente inconsistencia de los resultados entre cepas asignadas a la misma especie, parece que al menos algunas pruebas son taxonómicamente consistentes para la definición de géneros. Las inconsistencias en los resultados entre cepas de la misma especie podrían dar la pauta para estudios más detallados encaminados a definir si estas diferencias corresponden sólo con adaptaciones a los ambientes en los que se desarrollan o representan evidencias del aislamiento genético de las poblaciones involucradas.

CONCLUSIONES

- Las cepas de *Amanita muscaria* solamente presentaron consistencia en los caracteres de producción de lacasa dominante, degradación de pectina negativa y almidón.
- Las cepas de *Suillus tomentosus* solamente presentaron consistencia en las respuestas negativas a la degradación de lípidos, urea y almidón.
- Las cepas de *Suillus glandulosipes* presentaron consistencia en las respuestas equivalentes en la producción de lacasa y tirosinasa, degradación negativa de pectina, lípidos y almidón, sensibilidad a 30 °C y ciclohexamida; tolerancia a benomil, verde de malaquita y cloruro de sodio.
- Es recomendable estudiar mayor número de cepas de una misma especie, para aclarar las inconsistencias de las respuestas.

Fenograma del análisis de similitud de las especies de *Amanita* y *Suillus*



Cuadro 1. respuestas de las cepas utilizadas para realizar el análisis de similitud

Cepas consideradas	Pol	Pec	Lip	Gel	Cas	Urea	7°	30°	Ben	Cic	Ros	Ver	Clo	Alm
<i>S. cotumathus</i> var. <i>hiemalis</i> *	2	0	0	0	1	0	1	1	2	1	1	3	3	0
<i>S. glandulosipes</i> 5*	4	0	0	1	1	0	1	1	3	1	3	3	3	0
<i>S. glandulosipes</i> 10*	4	0	0	1	2	1	2	1	3	1	2	3	3	0
<i>S. glandulosipes</i> 25*	4	0	0	1	2	1	1	1	3	1	3	3	3	0
<i>S. glandulosipes</i> 34*	4	0	0	0	2	0	1	1	3	1	3	3	3	0
<i>S. glandulosipes</i> 35*	4	0	0	1	0	0	1	1	3	1	2	3	3	0
<i>S. lakei</i> 40*	1	0	0	0	0	0	3	1	3	1	3	3	3	0
<i>S. tomentosus</i> 9*	3	1	0	2	1	0	1	1	3	2	3	3	3	0
<i>S. tomentosus</i> 24*	1	0	0	2	1	0	1	1	3	3	3	3	3	0
<i>S. cf. pseudobrevipes</i> 33*	4	0	0	0	3	1	3	1	3	1	3	3	3	0
<i>S. cf. pseudobrevipes</i> 36*	1	0	0	0	2	0	2	1	3	3	3	2	3	0
<i>S. cf. unicolor</i> 42*	2	0	2	2	1	0	1	1	3	1	3	2	3	0
<i>S. sp.</i> 32*	4	0	0	1	1	1	1	1	3	1	1	2	3	0
<i>S. sp.</i> 20*	1	0	0	2	2	1	4	1	3	1	1	3	3	0
<i>S. sp.</i> 44*	2	0	0	1	2	0	1	1	3	1	3	3	3	0
<i>S. americanus</i> 5800	1	0	0	0	0	0	2	2	3	1	3	1	2	0
<i>S. americanus</i> 5934	1	0	0	0	0	0	1	2	3	1	2	2	2	0
<i>S. brevipes</i> 5184	1	0	0	0	0	0	1	3	3	1	1	3	2	0
<i>S. brevipes</i> 5467	2	0	0	0	0	3	1	3	3	3	3	3	3	0
<i>S. brevipes</i> 5801	1	0	0	0	0	0	1	3	3	1	1	1	3	0
<i>S. brevipes</i> 6159	1	0	0	0	0	3	1	3	3	1	1	3	3	0
<i>S. glandulosus</i> 185	1	0	0	0	0	0	1	1	3	1	2	3	3	0
<i>S. granulatus</i> 6203	4	0	0	0	0	0	1	3	3	1	3	3	3	0
<i>S. granulatus</i> 6204	4	0	0	0	0	0	1	3	3	1	3	1	3	0
<i>S. grevillei</i> 5924	1	0	0	0	0	0	1	2	3	1	3	3	3	0
<i>S. grevillei</i> 6160	1	0	0	0	0	0	1	1	3	2	1	3	3	0
<i>S. grevillei</i> 6161	1	0	0	0	0	2	1	2	3	2	3	3	3	0
<i>S. luteus</i> 6058	1	0	0	0	0	0	1	3	3	1	3	3	3	0
<i>S. neoalbidipes</i> 6158	1	0	0	0	0	0	1	3	3	1	3	3	3	0
<i>S. ochraceoroseus</i> 5286	1	0	0	0	0	0	2	3	3	2	3	3	3	0
<i>S. ochraceoroseus</i> 5446	1	0	0	0	0	2	1	3	3	1	3	3	3	0
<i>S. sunuspaulianus</i> 6147	1	0	0	0	0	0	1	1	3	1	3	3	3	0
<i>S. spectabilis</i> 6148	1	0	0	0	0	0	1	3	3	2	3	3	3	0
<i>S. spraguei</i> 5846	1	0	0	0	0	0	1	2	3	2	3	3	3	0
<i>S. subluteus</i> 6059	1	0	0	0	0	3	1	3	3	1	3	3	3	0
<i>S. tomentosus</i> 5211	1	0	0	0	0	0	2	2	3	1	2	3	3	0
<i>S. tomentosus</i> 5227	1	0	0	0	0	0	1	3	3	3	3	3	3	0
<i>S. tomentosus</i> 5291	1	0	0	0	0	0	1	3	3	1	1	3	3	0
<i>S. tomentosus</i> 5550	1	0	0	0	0	0	1	3	3	1	1	3	3	0
<i>S. tomentosus</i> 5795	1	0	0	0	0	0	1	3	3	1	3	3	3	0
<i>S. tomentosus</i> 5918	2	0	0	0	0	0	1	3	3	3	1	3	3	0
<i>S. tomentosus</i> 6060	1	0	0	0	0	0	1	3	3	1	1	3	3	0
<i>S. umbonatus</i> 5242	2	0	0	0	4	0	1	1	3	1	3	3	3	0
<i>S. umbonatus</i> 5309	2	0	0	0	4	0	1	3	3	1	3	3	3	0
<i>S. umbonatus</i> 5461	1	0	0	0	4	0	1	2	3	1	3	3	3	0
<i>S. umbonatus</i> 5549	1	0	0	0	4	0	1	3	3	1	3	3	2	0
<i>S. vicidus</i> 257	2	0	0	0	0	3	1	1	3	1	1	1	2	0
<i>A. muscaria</i> 2*	2	0	0	3	3	1	1	1	1	3	3	1	2	0
<i>A. muscaria</i> 24*	2	0	3	2	1	1	1	1	1	3	3	1	3	0
<i>A. muscaria</i> 27*	2	0	3	3	2	1	1	1	1	2	3	1	3	0
<i>A. muscaria</i> 41*	2	0	3	3	1	1	4	1	3	1	3	2	2	0
<i>A. rubescens</i> 46*	2	0	0	2	4	1	1	1	1	2	2	2	3	0
<i>A. sp. Secc., vaginata</i> 4*	2	0	3	3	0	1	1	1	3	2	3	3	3	0
<i>A. sp.</i> 47*	2	0	0	3	0	2	1	1	3	1	2	2	3	0
<i>A. brunescens</i> 5942	2	0	1	3	4	0	1	3	3	2	3	3	1	3
<i>A. citrina</i> 111	2	0	2	2	5	0	1	3	2	3	3	1	3	3
<i>A. flavoconia</i> 109	1	0	2	2	5	0	1	3	1	3	3	3	2	2
<i>A. muscaria</i> 5637	2	0	2	0	4	0	1	1	2	1	2	1	2	0
<i>A. muscaria</i> 5796	2	0	2	0	4	0	1	2	1	1	2	1	3	0
<i>A. muscaria</i> 5822	2	0	3	0	0	0	1	1	1	1	2	1	1	0
<i>A. muscaria</i> 6142	2	0	2	1	5	0	1	2	1	1	1	1	1	0
<i>A. rubescens</i> 6143	2	0	0	0	0	0	1	1	1	2	3	3	2	3

* Cepas de Tlaxcala.

Caracteres utilizados:

Po: polifenol oxidasa a una hora de haber puesto el reactivo. 1:grupo negativo; 2:tirosinasa dominante; 3: lacasa dominante; 4:grupo equivalente. **Pec:** pectina. 0: negativo; 1:débilmente positiva. **Lip:** lípidos. 0:negativo; 1:débilmente positivo; 2:moderadamente positivo; 3: fuertemente positivo. **Gel:** gelatina. 0: negativo; 1: débilmente positivo; 2: moderadamente positivo; 3:fuertemente positivo. **Cas:** casaminoácidos. 0:negativo; 1: débilmente positivo; 2:moderadamente positivo; 3:fuertemente positivo; 4:acidificó el medio; 5: acidificó fuertemente el medio. **Ure:** urea. 0: negativo; 1: débilmente positivo; 2:moderadamente positivo; 3:fuertemente positivo. **7°C** 1: sensible; 2: semitolerante; 3: tolerante; 4: creció más que el control. **30°C** 1: sensible; 2: semitolerante; 3: tolerante; 4: creció más que el control. **Ben:** benomil. 1: sensible; 2: semitolerante; 3: tolerante. **Cic:** ciclohexamida. 1: sensible; 2: semitolerante; 3: tolerante. **Ros:** rosa de bengala. 1: sensible; 2: semitolerante; 3: tolerante. **Ver:** verde de malaquita. 1: sensible; 2: semitolerante; 3: tolerante. **Clo:** cloruro de sodio. 1: sensible; 2: semitolerante; 3: tolerante. **Alm:** almidón. 0: negativo; 2:moderadamente positivo; 3:fuertemente positivo.

CAPÍTULO III

SÍNTESIS *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN DE ECTOMICORRIZAS

Con el fin de seleccionar hongos que puedan usarse para preparar inoculantes en programas de reforestación es importante conocer la afinidad y compatibilidad de éstos con la planta de interés. También es de gran relevancia caracterizar morfológica y anatómicamente las micorrizas obtenidas, ya que de esta manera se podrán tener herramientas que ayuden a reconocer las micorrizas en vivero y/o campo. Así, este capítulo consta de cuatro partes, donde se describen un total de nueve combinaciones.

Parte 1. Manuscrito: Síntesis *in vitro* y caracterización de micorrizas. Aquí se reportan las características morfológicas y anatómicas de cinco micorrizas obtenidas en laboratorio.

Parte 2. Manuscrito: Ectomycorrhizae of *Pinus montezumae* with *Suillus glandulosipes* and *Suillus* cf. *pseudobrevipes*. Enviado a la revista *Mycorrhiza* para su revisión y publicación.

Parte 3. Manuscrito: Pruebas de crecimiento, caracterización en diferentes medios de cultivo y síntesis *in vitro* de una cepa de *Laccaria bicolor*. Enviado a la revista *Agrociencia* para su revisión y publicación.

Parte 4. Artículo publicado: Xicohténcatl-Ahuatzin A., G. Santiago-Martínez y A. Estrada-Torres, 1998. La ectomicorriza de *Pinus cembroides* y *Suillus tomentosus*. In: Zulueta, R., M. A. Escalona y D. Trejo (eds.) **Avances de la Investigación Micorrízica en México**. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 260-265.

PARTE 1

SÍNTESIS *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MICORRIZAS

ANTECEDENTES

Melin en 1921-1922 fue el primer investigador en diseñar dispositivos para la obtención *in vitro* de micorrizas, los cuales consistían de frascos que contenían arena como sustrato. Estos eran mantenidos bajo condiciones estériles. Para obtener la micorriza era necesario esperar varios meses, en los cuales se tenía que mantener la humedad del sistema. Posteriormente, se utilizó una mica expandida llamada vermiculita la cual tiene mayor capacidad de retención de agua y mejora la aireación de las raíces (Hacskeylo, 1953).

A partir de esto, numerosas técnicas y variaciones de la síntesis *in vitro* se han probado; no obstante, algunas de ellas requieren de procesos de manipulación muy elaborados y tienen que llevarse a cabo bajo condiciones exigentes de cultivo (Richter y Bruhn, 1986).

En la actualidad, los métodos asépticos más convenientes incluyen el uso de tubos de ensayo grandes con agar o con vermiculita (Molina, 1979; Yang y Wilcox, 1984; Stein y Fortin, 1990); matraces desde 500 hasta 2000 ml (Mason, 1975; Duddridge y Read, 1984); cajas de Petri (Chilvers *et al.*, 1986, Duddridge 1986); bolsas de crecimiento (Fortin y Piché, 1979; Piché y Fortin, 1982); y frascos con perlita y medio nutritivo (Trappe, 1967).

Para lograr la síntesis es necesario tener en cuenta el período de independencia micorrízica en el cual la planta puede vivir y crecer sin necesidad de asociarse simbióticamente. Este intervalo de tiempo varía según la especie, pues existen plantas como *Quercus coccifera* que son capaces de seguir utilizando los nutrimentos de la semilla hasta finales del segundo año de vida (Oria de Rueda, 1991). Este carácter es muy importante en las pruebas de síntesis *in vitro* de las micorrizas, ya que si este período es muy prolongado el hongo puede morir si es inoculado antes de que la planta sea receptiva a su colonización (Santiago-Martínez, 1992).

En condiciones naturales, antes de que se establezca la asociación, el hongo tiene que sobrevivir a las características físicas y la constitución química del suelo, donde influyen factores como el movimiento del agua, oxígeno, dióxido de carbono y varios productos metabólicos (Marks, 1991).

Con el fin de seleccionar hongos que puedan servir como inóculo en programas de reforestación, es importante conocer la afinidad y compatibilidad con la planta de interés. También es importante observar el comportamiento de los hongos al confrontarlos con varias especies forestales, para poder describir su morfología y anatomía y poder tener herramientas que nos ayuden a diferenciarlas en el vivero y el campo.

Además, es indispensable adaptar las técnicas descritas en la literatura a los recursos de cada Institución y buscar los mecanismos para que las plantas desarrollen raíces secundarias en períodos más cortos.

Por lo anterior, se consideró importante realizar ensayos de síntesis *in vitro* utilizando un contenedor de plástico y comprobar la capacidad de formación de la micorriza de algunos hongos ectomicorrizógenos con *Pinus cembroides* y *P. montezumae*, así como caracterizar las micorrizas obtenidas.

METODOLOGÍA

Materiales biológicos. Para las pruebas se utilizaron cuatro cepas de hongos (tabla 1), las cuales se encuentran depositadas en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

No. del cepario	Especie
TLAX 28	<i>Rhizopogon</i> sp.
TLAX 5	<i>Suillus glandulosipes</i>
TLAX 24	<i>S. tomentosus</i>
TLAX 16	<i>Terfezia olbiensis</i>

Las semillas de *Pinus cembroides* Zucc. y *P. montezumae* Lamb. fueron proporcionadas por el Biocentro de Reproducción de la Flora, perteneciente a la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP) hoy Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) ubicado en San Andrés Ahuashuatepec, Apizaco, Tlaxcala.

Tratamiento de las semillas. Para la obtención de plántulas de pino, las testas de las semillas se desinfectaron superficialmente con peróxido de hidrógeno al 30 % durante 15 a 30 minutos dependiendo del tamaño de la semilla y de la dureza de la testa; después se enjuagaron varias veces con agua destilada estéril (Trappe 1967; Mason, 1975; Piché y Fortin, 1982; Miller *et al.*, 1986). Posteriormente, se sembraron en una mezcla estéril de arena vermiculita 1:1.

Micelio en crecimiento activo. De las colonias de los hongos creciendo en medio de papa dextrosa agar, se extrajeron de cinco a ocho cuadros de 5 mm por lado, se sembraron en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 100 ml de medio líquido biotina ácido fólico (BAF) adicionando únicamente 15 g de dextrosa por litro, los matraces se mantuvieron en agitación mecánica a 150 rpm y 25 °C, de dos a tres semanas (Marx y Bryan, 1975; Miller *et al.*, 1986).

Confrontación de los simbiontes. Para la obtención de micorrizas, se utilizaron contenedores de plástico de 18 X 5 cm los cuales se lavaron y desinfectaron con alcohol, en su base se depositó

algodón y se les agregó suelo forestal procedente de la Cañada Grande del Volcán la Malintzi, Tlaxcala, dicho suelo fue pasteurizado dos veces durante una hora por dos días consecutivos.

Las plántulas se transfirieron a los contenedores y se colocaron en el invernadero, regándose dos veces por semana con agua corriente. El sistema radical se revisó semanalmente hasta encontrar las primeras raíces secundarias, en este momento, al micelio en crecimiento activo se le eliminó el medio nutritivo y se enjuagó con agua destilada estéril. Posteriormente, con la ayuda una pipeta de 10 ml, se agregó el micelio sobre las raíces secundarias.

El sistema radical se revisó periódicamente hasta la observación de las primeras micorrizas, las cuales se dejaron por dos meses más para tener mayor cantidad. Las plántulas fueron sacadas de los dispositivos para proceder a la caracterización de la ectomicorriza.

Caracterización Para la caracterización de las micorrizas obtenidas *in vitro* se siguieron los criterios de Agerer (1987-1991), Agerer (1991) e Ingleby *et al.* (1990), tomando en cuenta la morfología y anatomía de la micorriza. Los colores fueron descritos tomando como referencia la tabla de colores de Methuen (Kornerup y Wanscher, 1978). Para tomar las dimensiones del sistema micorrizico se utilizó un vernier.

Posteriormente se fijaron las raíces en formol-ácido acético-alcohol (FAA). Para la observación de la anatomía de las micorrizas se realizaron cortes hechos a mano utilizando papel parafilm previamente doblado; los cortes obtenidos se colocaron sobre un porta objetos y se les agregó una gota de alcohol polivinílico-ácido láctico-glicerol cubriéndose con un cubreobjetos. Para describir las características del manto y red de Hartig, los cortes se observaron en un microscopio Nikon con sistema de iluminación de contraste diferencial de Nomarski (Peterson, 1991).

RESULTADOS

Las semillas germinaron después de 15 a 20 días en la mezcla de arena vermiculita. Al depositar las plantas en los contenedores con el suelo forestal desinfectado, éstas se dejaron por dos semanas para que se habituaran al sistema. *Pinus montezumae* formó sus raíces secundarias después de dos meses, mientras que en *P. cembroides* lo hizo a los cuatro meses. Este dispositivo es eficiente, debido a que no tiene problemas de contaminación y el sistema se puede estar revisando periódicamente sin destruir el sistema radical (fig. 12).

Este método fue apropiado para la obtención de un buen número de micorrizas, sin embargo, en algunos de estos ensayos se presentó un aumento de la temperatura del invernadero por lo que el suelo se calentó en exceso, secando rápidamente los sistemas micorrizados, dañándolos

irreversiblemente, los cuales tomaron una coloración negruzca. Por esta razón, no fue posible caracterizar algunas de las micorrizas obtenidas, de las cuales sólo se observaron las primeras etapas.

Se obtuvieron las micorrizas de las siguientes combinaciones: *Pinus cembroides* con *Suillus glandulosipes* TLAX 5 y *Terfezia obiensis* TLAX 16 y *P. montezumae* con *Rhizopogon* sp. TLAX 28, *Suillus glandulosipes* TLAX 5 y *S. tomentosus* TLAX 24.

Antes de la formación de las micorrizas se observaron manchas de micelio blanquecino sobre las raíces, las cuales formaron posteriormente el manto, las primeras micorrizas se observaron después de dos ó tres meses; con el tiempo algunas hifas se fusionaron y formaron abundantes rizomorfos de diferentes diámetros.

En el caso de las cepas de *Suillus* y *Rhizopogon*, primero se observaron sistemas simples, después dicotómicos y al cabo de un mes coraloides. Al realizar los primeros cortes de las micorrizas, se observaron células taniníferas aún cuando el hongo no penetraba a las raíces. Después de 30 días se observaron pocas células taniníferas y la formación de la red de Hartig.

Caracterización de las micorrizas

***Pinus montezumae* y *Rhizopogon* sp. TLAX 28**

El sistema radical presentó una ramificación que va desde simple (0.3-) 0.8 - 1.6 mm, dicotómica (1.0-) 1.1 - 1.6 (-2.6) mm, hasta coraloide (fig 1), 2.1 - 3.6 mm; las puntas no ramificadas de (0.4-) 0.7 - 1.1 (-1.3) mm de largo y (0.4-) 0.5 - 0.6 (-0.7) mm de diámetro; diámetro de los ejes de (0.4-) 0.6 - 0.7 (-0.9) mm; de color blanco (1A1) cuando jóvenes, blanco amarillento (4A2) cuando maduras y pardo castaño (7E5) cuando viejas; presentan brillo metálico, las puntas no ramificadas son rectas, redondeadas a ligeramente moniliformes en el caso de las ramificaciones simples. En seco, se observó en el manto una superficie espinosa cubierta por células emergentes rígidas y conspicuas llamadas espínulas, con abundantes rizomorfos conectados con el manto en forma de un pequeño abanico, de color blanco (1A1) a amarillo café (5F6), vilosos.

El manto estaba constituido por un tejido plectenquimatoso; de 31.6 - 65.6 μm de grosor, con tres capas, la más externa midió 9.8 - 19.5 μm , con escasas hifas emanantes cortas, de 3.1 - 5.5 μm de diámetro, septadas, de color blanco amarillento (3A2), seguidas por hifas entrelazadas laxas; la capa media midió 9.8 - 19.5 μm , formada por hifas que corren paralelamente sobre la raíz; la capa interna midió de (7.4-) 9.7 - 19.5 (-29.3) μm , formada por hifas redondas mezcladas con hifas paralelas septadas (fig. 2). Células taniníferas de 9.2 - 33.6 X 9.2 - 16.0 μm , de circulares a elípticas, de color amarillo café (5C7); células corticales de 11.8 - 47.4 X 8.6 - 47.4 μm elongadas hacia el cilindro

vascular (fig. 3); la red de Hartig penetró las dos primeras hileras de células corticales las cuales estaban separadas por una sola hilera de células hifales isodiamétricas de 3.1 - 5.5 μm de diámetro.

Rizomorfos de 12.1 - 78.4 μm de diámetro, formado por hifas dispuestas paralelamente, diferenciadas, en la zona central se observaron hifas de mayor diámetro de 2.3 - 3.9 μm de diámetro; hifas delgadas en la periferia de 0.8 - 1.6 μm , con abundantes hifas emanantes de 1.6 - 9.4 μm de diámetro, con abundantes pústulas, presentes a lo largo del sistema

***Pinus cembroides* y *Suillus glandulosipes* TLAX 5**

El sistema radical presentó una ramificación que va desde simple, dicotómica hasta coraloide (fig. 4), de (1.3-) 1.7 - 3.7 (-6.0) mm, las puntas no ramificadas de (0.5-) 0.6 - 1.1 (-1.6) mm de largo y (0.4-) 0.5 - 0.7 (-0.9) mm de diámetro, (0.4-) 0.6 - 0.9 (-1.8) mm de diámetro en los ejes; de color blanco brillante a blanco (1A1) cuando jóvenes, amarillo oro (5B7) cuando maduras y color café oscuro (6F7) cuando viejas, con brillo metálico, las puntas ramificadas se observaron de rectas a torcidas; en seco, el manto se observó con una superficie algodonosa laxa, con abundantes hifas emanantes. Las ectomicorrizas presentaron abundantes rizomorfos con márgenes vilosos que se conectan con el manto en forma de un abanico pequeño, de color blanco (1A1) hasta naranja-café (5C4).

La micorriza presentó un manto de 19.6 a 125.4 μm de grosor, formado por un tejido plectenquimático (fig. 5), constituido por tres capas, la externa midió de 19.6 - 39.2 μm de grosor formado por hifas emanantes hialinas de 2.4 - 3.9 μm de diámetro, septadas, la capa media midió de 27.4 - 31.4 μm de grosor, formada por hifas entrelazadas de 1.6 - 3.1 μm de diámetro, la capa interna midió 0.8 - 4.7 μm de grosor y está formada por hifas de 15.7 - 39.2 μm de diámetro que corren paralelas sobre la raíz. Células taniníferas de 10.2 - 43.1 X 8.6 - 25.1 μm , de circulares a elongadas, de color naranja grisáceo (5B6); células corticales de 16.5 - 62.7 X 15.7 - 32.9 μm circulares; la red de Hartig penetró las dos primeras capas de células corticales, separándolas con una hilera de células hifales circulares, de 0.8 - 5.5 μm de diámetro.

Rizomorfos de 15.7 - 54.9 μm de diámetro, indiferenciados, formados por hifas de 0.8 - 2.3 μm de diámetro, paralelas, compactas, con abundantes hifas emanantes de 2.3 - 3.9 μm de diámetro (fig. 6).

***Pinus montezumae* y *Suillus glandulosipes* TLAX 5**

El sistema radical presentó una ramificación que va desde simple (fig. 7), dicotómica hasta coraloide, de (0.9-) 1.0 - 2.9 (-3.8) mm; las puntas no ramificadas de (0.4-) 0.7 - 1.9 mm de largo y 0.3 - 1.6 mm de diámetro; el diámetro de los ejes midió 0.4 - 1.9 mm. La micorriza presentó un color blanco (1A1) cuando joven, naranja claro (5A4) cuando madura y color café oscuro (7F4) cuando vieja, con brillo

metálico, las puntas no ramificadas se observaron de rectas a redondeadas; en seco, el manto se observó con una superficie lanosa, con abundantes hifas emergentes. Las ectomicorrizas presentaron abundantes rizomorfos con márgenes vilosos que se conectan con el manto en forma de pequeños abanicos en varios puntos de la ectomicorriza; de color blanco (1A1).

La micorriza presentó un manto de 24.3 a 78.4 μm de grosor, formado por un tejido plectenquimático, constituido por tres capas, la externa midió de 19.8 - 29.7 μm de grosor formado por hifas emanantes hialinas de 2.3 - 3.9 μm de diámetro, septadas; la capa media midió de 9.8 - 19.8 μm de grosor, formada por hifas entrelazadas de 1.9 - 3.1 μm de diámetro; la capa interna midió 7.9 -28.7 μm de grosor formada por un tejido más compacto, con hifas de 1.9 -3.1 μm de diámetro. Células taniníferas no bien definidas, sólo se ve una línea de color naranja oscuro (5A8) embebida en el manto, las células corticales presentaron formas isodiamétricas, poligonales, hasta elongadas, de 19.6 - 43.1 X 13.3 - 35.3 μm ; la red de Hartig penetró de dos a tres capas de células corticales y las separó con una hilera de células hifales de circulares a rectangulares de 0.8 - 5.5 μm de diámetro (fig. 8).

Rizomorfos indiferenciados de 7.8 - 36.8 μm de diámetro, formado por hifas de 1.6 - 3.1 μm de diámetro, paralelas, muy juntas; con abundantes hifas emanantes de 1.6 - 3.9 μm de diámetro, de hialinas a color blanco amarillento (4A2), con abundantes pústulas a lo largo del rizomorfo (fig. 9).

***Pinus montezumae* y *Suillus tomentosus* (TLAX 24)**

El sistema radical presentó una ramificación que va desde simple, dicotómica hasta coraloide, de (0.1-) 0.9 - 1.0 (-1.5) mm de largo; las puntas no ramificadas miden de (0.1-) 0.6 -0.9 (1.5) mm de largo, con un diámetro de (0.1-) 0.2 - 0.3 (-0.4) mm; y los ejes de (0.3-) 0.4 - 0.5 (-0.6) mm de diámetro; de color blanco (1A1) cuando jóvenes, naranja-café (6C8) cuando maduras y color café oscuro (7F4) cuando viejas, presentaron brillo metálico. Las puntas no ramificadas se observaron rectas y redondeadas; en seco, el manto se observó con una superficie algodonosa, densa, con abundantes hifas emanantes. Con rizomorfos conectados en un punto por varias partes de la ectomicorriza, de color blanco (1A1), viloso.

La ectomicorriza presentó un manto no diferenciado de 31 a 55 μm de grosor, con abundantes hifas emanantes septadas, de 0.7 a 3.9 μm de diámetro, hialinas; células taniníferas de 11.7 - 19.6 X 31.3 - 47.3 μm , de circulares a elípticas, de color amarillo oscuro (4C8); células corticales de 19.6-23.5 X 35-55 μm , de redondas a elípticas; la red de Hartig penetró de una a dos capas de células corticales y presenta una o dos células hifales circulares de 2.3-9.8 μm entre las células de la raíz.

Presentó rizomorfos de 9.4 a 39 μm de diámetro, formado por hifas paralelas ligeramente diferenciadas, las hifas más delgadas son de 0.7 a 1.5 μm de diámetro, con algunas hifas centrales de mayor diámetro (1.5-2.3 μm), con abundantes hifas emanantes de 3.1-4.7 μm de diámetro con abundantes pústulas a lo largo de la superficie, de color blanco (1A1).

Pinus cembroides* y *Terfezia olbiensis

Las raíces colonizadas no mostraron cambios morfológicos aparentes.

Se observó un manto hialino, delgado, discontinuo de 27.4 - 42.3 μm de grosor (figs. 10 y 11), sin hifas emanantes; células tanínferas bien definidas de 7.9- 33.7 X 15.6 - 50.9 μm de circulares, elípticas a elongadas, de color amarillo dorado (5B7) a naranja grisáceo (5B5) cuando el hongo llega a penetrar (fig. 11); células corticales de 15.6 - 32.5 X 29.0 - 43.9 μm de elípticas irregulares a elongadas; la red de Hartig cubrió con 3 a 4 capas de células hifales, de circulares, elípticas a elongadas de 0.7 X 2.3 μm de diámetro.

DISCUSIÓN

Los contenedores de plástico ofrecieron buenas condiciones para el desarrollo de las micorrizas, ya que en ellos se obtuvo mayor cantidad de raíces micorrizadas en menos tiempo; sin embargo, es muy importante mantener el invernadero con una temperatura fresca, ya que al aumentar la temperatura, muchas de las micorrizas que ya se habían desarrollado se perdieron y ya no se pudo describir la micorriza.

Duddridge *et al.* (1988) mencionaron que cuando aumenta la cantidad de carbohidratos externos se estimula el crecimiento del hongo, pero también se provoca un disturbio en el balance de la simbiosis, por lo que es importante disminuir la cantidad de azúcar que se utiliza en el medio de cultivo para obtener el crecimiento activo de las cepas, con el fin de que se habitúen a crecer en bajas concentraciones de carbohidratos.

En los contenedores de plástico no fue necesario adicionar azúcares, pues, se eliminó el medio en el que crecieron las colonias y se enjuagó el micelio con agua destilada estéril para retirar el exceso de carbohidratos.

En este capítulo se constató la capacidad de *Pinus cembroides* para asociarse con *Suillus glandulosipes* y *Terfezia olbiensis*. También se comprobó la asociación de *P. montezumae* con cepas de *Rhizopogon sp.*, *Suillus glandulosipes* y *S. tomentosus*.

Micorrizas de *Suillus glandulosipes* con *Pinus cembroides* y *P. montezumae*

Se pudieron observar diferencias en las micorrizas, dependiendo de la especie de planta utilizada. En *P. cembroides*, las dimensiones son más grandes que las micorrizas de *P. montezumae*. Las puntas de *P. cembroides* son de rectas a torcidas, mientras que las de *P. montezumae* son de rectas a redondeadas. El grosor del manto es mayor en *P. cembroides*. La capa de células taniníferas en *P. montezumae* no está bien definida.

Micorrizas de *S. glandulosipes* y *S. tomentosus* con *P. montezumae*

En estas micorrizas también se pueden observar diferencias, dependiendo de la cepa de hongo utilizada. Las dimensiones de las micorrizas formadas por *S. glandulosipes* son más grandes que las de *S. tomentosus*. Los rizomorfos de *S. glandulosipes* son en forma de abanico, mientras que los formados con *S. tomentosus* se conectan en un punto, por varias partes de la micorriza. Microscópicamente, las micorrizas de *S. glandulosipes* presentaron un manto formado por tres capas, mientras que las micorrizas formadas con *S. tomentosus* presentaron un manto indiferenciado. Además, con *S. glandulosipes* la red de Hartig penetró de 2 a 3 capas de células corticales, mientras que en *S. tomentosus* la red penetró de una a dos capas de células corticales.

Micorriza de *Rhizopogon* sp. con *P. montezumae*

La morfología de simple a dicotómica o coraloide de las micorrizas de *Rhizopogon* sp., ya había sido reportada en las confrontaciones de *Rhizopogon luteolus* con *Pinus halepensis* (Torres *et al.*, 1991) y *P. patula* (Mohan *et al.*, 1993b), y *R. arctostaphylis*, *R. ellenae*, *R. smithii*, *R. subcaerulescens*, *R. truncatus* y *R. vulgaris* con *P. ponderosa* (Massicotte *et al.*, 1994).

Las coloraciones de las micorrizas de *Rhizopogon* en estado joven son en su mayoría de color blanco, pero al madurar cambian sus tonalidades según la especie de hongo simbiote (Torres *et al.*, 1991; Massicotte *et al.*, 1994). El color blanquecino de estas micorrizas jóvenes es similar al de las formadas por otros hongos como es el caso de *Scleroderma areolatum* (Godbout y Fortin, 1985), *Amanita muscaria* (Ingleby *et al.*, 1990; Mohan *et al.*, 1993a) y *Thelephora* sp. (Colpaert, 1999).

El grosor de los rizomorfos reportados en otras combinaciones de *Pinus* y *Rhizopogon* va desde 50 hasta 500 μm (Massicotte *et al.*, 1994); sin embargo, los obtenidos en este estudio son más delgados (12 μm).

La presencia de manto plectenquimático compuesto por tres capas ya había sido reportado en la asociación de *Rhizopogon* y *Pinus patula* (Massicotte *et al.*, 1994; Mohan *et al.*, 1993b); sin embargo, también hay reportes de *P. sylvestris* con *R. luteolus* en donde se presentan dos capas (Uhl, 1988).

Micorriza de *Terfezia olbiensis* con *P. cembroides*

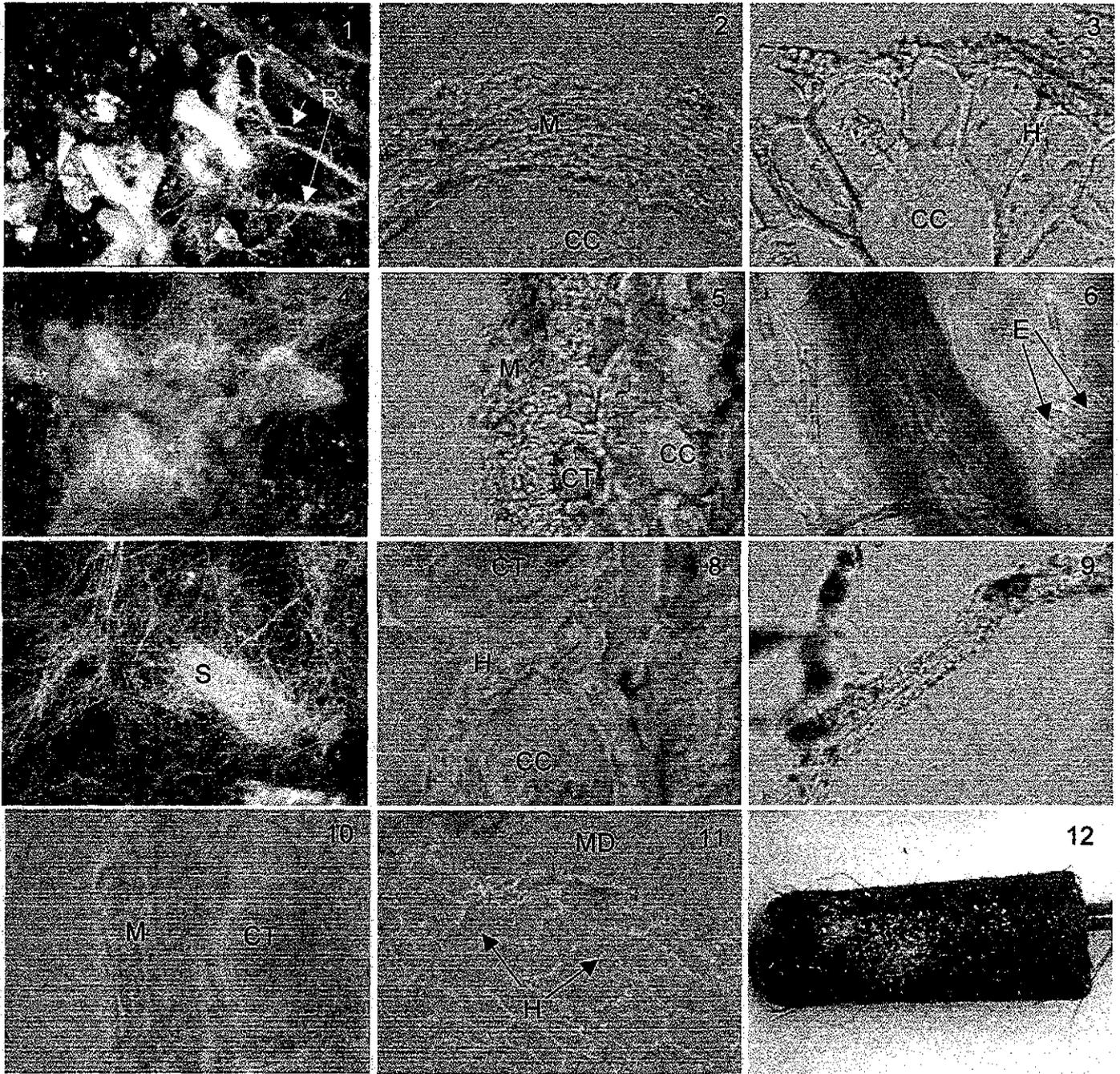
En las micorrizas que se obtuvieron de *Pinus cembroides* con *Terfezia olbiensis* no se observó ningún cambio en la morfología de la raíz; sin embargo, en el estudio anatómico se pudo observar un manto muy delgado, hialino y discontinuo; células taníferas bien definidas; y una red de Hartig penetrando de 3 a 4 capas de células corticales separadas por una o dos hileras de células hifales.

Se ha reportado que los hongos del género *Terfezia* forman endo y ectendomicorriza con diferentes especies de cistáceas (Leduc *et al.*, 1986); en particular, especies del género *Helianthemum* (Áwamed, 1981; Dexheimer *et al.*, 1985; Leduc *et al.*, 1986; Morte y Honrubia, 1995). También se han encontrado asociados con arbustos (Bratek *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1995). En el caso de formar ectendomicorriza, ésta no presenta manto y dependiendo del contenido de fósforo en el suelo presenta red de Hartig; también se ha encontrado que la penetración intracelular es inducida por la escasez de fósforo (Bratek *et al.*, 1996). En el caso de formar manto, éste es discontinuo con hifas laxas alrededor de la raíz y formando enrollamientos que ocupan el lumen de las células enteras, el resto de las estructuras son similares a los de la ectendomicorriza (Morte y Honrubia, 1995).

También se ha observado que *Terfezia claveri* responde a las condiciones xerofíticas. En cultivo puro se desarrolla mejor en MNM y tolera valores de pH de 8.0 (Morte y Honrubia, 1995).

CONCLUSIONES

- La técnica de contenedores de plástico es una buena opción para la obtención de gran número de micorrizas, las cuales nos sirven para realizar caracterización y conocer su morfología y anatomía.
- La cepa de *Suillus glandulosipes* TLAX 5, fue capaz de asociarse con las dos especies de pino utilizadas en esta investigación, por lo que se debe considerar como buen candidato para continuar con los estudios de inoculación en vivero.
- La cepa de *Terfezia olbiensis* procede de un ambiente seco. Dado que se pudo asociar con *P. cembroides*, podría ser considerado un buen candidato para inoculaciones masivas para producir planta destinada a lugares áridos o subáridos; sin embargo, se requiere realizar más estudios de vivero y campo para observar su comportamiento.



Figs. 1-3. Micorriza de *Pinus montezumae* con *Rhizopogon* sp. (TLAX 28). 1: micorrizas dicotómicas a coraloides con abundantes rizomorfos (R), 1x. 2: corte transversal con manto (M) y células corticales (CC) 20x. 3: corte transversal con células corticales elongadas hacia el cilindro vascular. Figs 4-6. Micorriza de *P. cembroides* y *Suillus glandulosipes* (TLAX 5). 4: micorriza coraloides. 5: corte transversal con manto (M), células taniníferas (CT), células corticales (CC) y red de Hartig (H), 40x. 6: rizomorfo con abundantes hifas emanantes (E), 40x. Figs. 7-9. 7: micorriza simple (S) 1x. 8: corte transversal con células taniníferas (CT), células corticales y red de Hartig (H) 100x. 9: Rizomorfo 20x. Figs. 10-11. Micorriza de *P. cembroides* y *Terfezia olbiensis*. 10: corte transversal con manto (M) y células taniníferas (CT) 100x. 11: corte transversal con un manto discontinuo (MD) y red de Hartig (H), 40x. Fig 12. Bloque de suelo con micorrizas obtenidas *in vitro* (MIC).

PARTE 2

Ectomycorrhizae of *Pinus montezumae* with *Suillus glandulosipes* and *Suillus cf. pseudobrevipes*

Araceli Xicohténcatl¹, Guadalupe Santiago-Martínez¹, Arturo Estrada-Torres¹

Abstract The capacity of *Suillus glandulosipes* and *Suillus cf. pseudobrevipes* for forming ectomycorrhizae with *Pinus montezumae* was tested. Seedlings of this conifer were inoculated with cultures of the fungi in active growth. A high colonization was observed two months after inoculation, with abundant ectomycorrhizae and extramatrical mycelium in both fungal species. The mycorrhizae of both strains are similar in their morphological and anatomical features: simple, dichotomous or coralloid; whitish when young, to dark orange in the mature stages, and grayish brown when old, with straight and rounded tips. The sheath was cottony and dense, emanant hyphae; the rhizomorphs were white and had many pustules.

Key words ectomycorrhizae, *Pinus montezumae*, *Suillus glandulosipes*, *Suillus cf. pseudobrevipes*.

Introduction

Pinus montezumae Lamb. is an abundant and widely distributed species in the State of Tlaxcala, México; on occasions, it can be found growing in pure stands or in association with three other species. It is frequently used in reforestation programs (Acosta, 1992).

On the other hand, the genus *Suillus* is widely distributed in México (Bandala and Montoya, 1993; González-Velázquez and Valenzuela, 1993; Moreno-Fuentes *et al.*, 1994; Rodríguez *et al.*, 1994); because these fungi are found in young forests, they are considered pioneers in the succession of ectomycorrhizal species in coniferous forests (Mason *et al.*, 1990; Bowen, 1994); they also show a very close relationship to members of the Pinaceae (Van *et al.*, 1987; Molina *et al.*, 1991; Francis and Read, 1994); they are easy to isolate, growing well in laboratory conditions (Molina and Palmer, 1982), and are tolerant to high concentrations of NaCl and fungicides such as benomil (Santiago-Martínez *et al.*, 1997).

Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Km 10.5 carr. Texmelucan-Tlaxcala, Ixtacuixtla, Tlaxcala. CP 90120. México. Tel/Fax 01 248 1 54 82, e-mail: arturomixo@hotmail.com

Little is known about the fungi that associate with *Pinus montezumae* and the role they may have on the tree's survival. Until now, some work has been done on the *in vitro* synthesis using various containers, confronting the plant with *Pisolithus tinctorius* (Santiago-Martínez *et al.*, 1993a) and *Laccaria bicolor* (Santiago-Martínez *et al.*, 1993b).

The objective of this research was to determine the capacity of two species of fungi of the genus *Suillus* to form ectomycorrhizae with *Pinus montezumae* in plastic containers.

Materials and methods

Seed germination. Seeds were disinfected with hydrogen peroxide at 30% for 15 minutes (Torres, 1992). Afterwards, they were rinsed with sterile distilled water and sown in a sterile mixture of sand and vermiculite. The radical system was checked periodically until secondary roots were observed, then the seedlings were transferred to the containers used for the synthesis of mycorrhizae.

Seed nursery preparation. Forest soil from the Cañada Grande of La Malintzi volcano, Tlaxcala, was used as substrate; the soil was pasteurized twice for one hour on two consecutive days. Hard plastic containers, 18x5 cm, were rinsed and disinfected with alcohol, and used as the synthesis vessels; a cotton plug was placed at the bottom of the containers, and these were later filled with the disinfected soil. Once the seedlings were transferred, they were taken to a greenhouse where they were watered twice a week with tap water.

Preparation of the fungal inoculant. For these tests, strains of *Suillus glandulosipes* Thiers et Smith (TLAX 25) and *S. pseudobrevipes* Smith and Thiers (TLAX 36) were used, both originally from the Cerro de Tepeticpac, Totolac County, Tlaxcala. These strains can be found deposited at the ectomycorrhizal fungi ceparium at the Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas, of the Universidad Autónoma de Tlaxcala, with the respective exsicatta *Cuaxilo Limón V. 54* and *Kong Luz A. 2297*, deposited at the TLXM Herbarium of the same research center.

Strains were subcultured on potato-dextrose-agar (Bioxon Becton Dickinson of México); colonies were subsequently cut into small fragments of 5x5 mm which were later transferred to 250 ml flasks containing 100 ml of liquid biotin-aneurin-folic acid media (Moser, 1960) with 15 g of glucose. Flasks were kept under mechanical agitation at 150 rpm and 25° C for two weeks.

Plant inoculation. Once the mycelial inoculant showed active growth, the nutritive media was eliminated and the mycelium was rinsed with sterile distilled water. Afterwards, the radical system was inoculated with the mycelium. The radical system was checked periodically until the formation of the first ectomycorrhizae was observed, that is, two months after the inoculation.

Ectomycorrhizal characterization. The morphological and anatomical features of the obtained ectomycorrhizae were described according to the criteria established by Agerer (1987-1991), Agerer (1991) and Ingleby *et al.* (1990). Colors were described using the Methuen table of colors as a reference (Kornerup and Wansher, 1978), using its alpha-numerical notation in the descriptions.

Mycorrhizal roots were later fixed in formaldehyde-acetic acid-alcohol (FAA). For the microscopic description, cross and longitudinal sections were hand made, which were observed under a Nikon Optiphot microscope with Nomarski differential -contrast.

Results

Pinus montezumae-*Suillus glandulosipes* ectomycorrhizae

Morphological characteristics. The mycorrhizal system presents a ramification which ranges from simple to dichotomous to coralloid, measuring (0.1-) 0.9-1.9 (-2.0) mm: non-branched tips from (0.4-) 0.8-1.0 (-1.8) mm, with a diameter of (0.1-) 0.4-0.7 (-1.1) mm; non-branched tips were straight and rounded; whitish (1A1) when young, dark orange (5A8) when mature and grayish brown (7f4) when old. Mycorrhiza presented a metallic shine at all stages.

When dry, the mantle is seen as a dense and cottony sheath, with abundant emergent thin hyphae. The ectomycorrhiza presents abundant rhizomorphs connected at one point by various parts of the ectomycorrhiza, of whitish color (1A1), with pustules.

Anatomical characteristics. In cross sections, the ectomycorrhizae presents a sheath from 34.3 μm up to 78.4 μm wide, composed of abundant hyaline emergent and septate hyphae, 1.9-3.9 μm in diameter; tanniferous cells of 19.6-47 x 19.6-31.3 μm , circular to elliptical, dark yellow in color (4C8); cortical cells of 11.7-50.9 x 11.7-39.2 μm , rounded to elliptical; the Hartig net covers one or two cortical cells layers and separates them with one or two circular hyphal cells of 3.9-7.8 μm in diameter.

Longitudinal sections show that the sheath is composed of three layers, the external layer measures 11.7-31.3 μm , has abundant emergent hyphae, 1.9-3.9 μm in diameter, septate and interwoven, with abundant pustules; followed by loosely interwoven hyphae that form a plectenquimatose layer. The middle layer measures 15.6-23.5 μm , is plectenquimatic, formed by parallel hyphae, 1.9-3.1 μm in diameter. The innermost layer is 11.4-23.5 μm thick, a dense plectenquimatic layer with hyphae arranged in a net, 1.9-3.1 μm in diameter.

Rhizomorphs 7.8-39 μm in diameter, formed by slightly differentiated parallel hyphae; thin external hyphae, 1.5-3.9 μm in diameter, with some central hyphae of a greater diameter ranging 2.3-3.1 μm , with abundant emerging hyphae 1.5-3.9 μm in diameter, hyaline and with many pustules all along the system.

Pinus montezumae-Suillus pseudobrevipes ectomycorrhizae

Morphological characteristics. The mycorrhizal system presented branching which varied from simple, dichotomous to coralloid that measured (1.1-) 1.3-1.4 (-1.6) mm; unbranched tips of (0.4-) 1.1-1.6 (-1.7) mm and with a (0.2-) 0.3 (-0.4) mm diameter, the axis measured (0.2-) 0.3-0.4 (-5.0) mm; unbranched tips were straight and rounded; white (1A1) when young, dark orange (5A8) when mature and grayish brown (7F4) when old; with a metallic shine.

When dry, the mantle can be seen as a dense cottony surface, with abundant emerging hyphae. The ectomycorrhizae have abundant rhizomorphs connected at one point by various parts of the ectomycorrhizae; white (1A1) in color and vilose.

Anatomical characteristics. In cross section, the thickness of the sheath varies from 24.5 to 98 μm , with abundant septate, hyaline emerging hyphae, 1.5-3.1 μm in diameter; taniferous cells circular to elliptical, 34.3-49 x 14.7-29.4 μm ; dark yellow (4C8); cortical cells round to elliptical, 29.4-49 x 24.5-49 μm ; Hartig net covers one or two layers of cortical cells and separates them with one to three circular hyphal cells of 3.1-6.2 μm diameter.

Longitudinal sections showed that the sheath is composed by three layers; the external layer is 15.6-39.2 μm thick, with abundant emerging hyphae 2.3-3.9 μm in diameter, septate and interwoven with many pustules, followed by loosely interwoven hyphae which form a plectenquimatose layer; the middle layer, 7.8-31.2 μm thick, is made up of a plectenquimatose

layer formed by parallel hyphae 1.1-3.9 μm in diameter; the internal layer is 7.8-23.5 μm thick, a dense plectenquimatic mantle is observed, with 0.7-3.1 μm thick hyphae in a net-like arrangement.

Rhizomorphs 4.9-90 μm in diameter, formed by highly differentiated parallel hyphae, with a zone of thick and septated central hyphae of 2.3-5.4 μm diameter, as well as thin hyphae near the surface, 1.5-2.3 μm , with abundant emerging hyphae all along the system, 0.9-3.9 μm in diameter, hyaline and with many pustules.

Discussion

The ability of *Suillus glandulosipes* and *Suillus* cf. *pseudobrevipes* to form ectomycorrhizae with *Pinus montezumae* was tested in this research. Both strains formed abundant mycorrhizae.

The comparison of the anatomical and morphological characteristics of both species indicated similarities with respect to the type of branching, color, type of mantle, color of the rhizomorphs and presence of abundant pustules.

The main difference observed was related to the size of the mycorrhizal system, those formed with *S. glandulosipes* were slightly larger than those formed by the *Suillus* cf. *pseudobrevipes* strain.

Differences were also found in relation to the rhizomorph anatomy; the central hyphae in *Suillus* cf. *pseudobrevipes* were highly differentiated, while those of *S. glandulosipes* presented only slight differentiation.

When comparing the structure of these mycorrhizae with those reported in other combinations of *Pinus* + *Suillus*, we observe that the simple to coralloid branching type had already been described for the mycorrhizae of *Pinus resinosa* and *Suillus americanus*, *S. brevipes*, *S. luteus* and *S. neoalbidipes*; in *P. strobus* with *Suillus americanus*, *S. brevipes*, *S. granulatus*, *S. pictus* and *S. punctipes* (Palm and Stewart, 1984); in *P. montezumae* with *Suillus granulatus* (Santiago-Martínez, 1992); in *P. patula* with *Suillus brevipes* (Mohan *et al.*, 1993), and in *P. cembroides* with *Suillus tomentosus* (Xicoténcatl *et al.*, 1998).

The color represents a very important feature for the differentiation of the mycorrhizal systems formed by different fungi; in the case of those described for combinations of *Pinus* +

Suillus, it varies considerably from white to pale yellow, reddish, grayish brown or pinkish brown (Palm and Stewart, 1984; Torres, 1992; Santiago-Martínez, 1992; Mohan *et al.*, 1993). Only the mycorrhizae produced by *P. resinosa* and *P. strobus* with *S. brevipes* (Palm and Stewart, 1984), *P. halpensis* with *S. collinitus* and *S. luteus* (Torres, 1992), and *P. montezumae* with *S. tomentosus* and *S. granulatus* (Santiago-Martínez, 1992) have a similar coloring to those described in this work.

Another highly variable feature of the ectomycorrhizae formed by *Pinus* with *Suillus* is the sheath thickness, which varies from 10-50 μm (Torres, 1992; Mohan *et al.*, 1993) to almost 200 μm (Santiago-Martínez, 1992). Most of the mycorrhizae formed by *Pinus* and *Suillus* present a mantle with three layers, which agrees with what was found in this study. As in most species of *Suillus*, no fibulae in the hyphae were observed and the fungal sheath penetrated only one or two layers of the cortical cells.

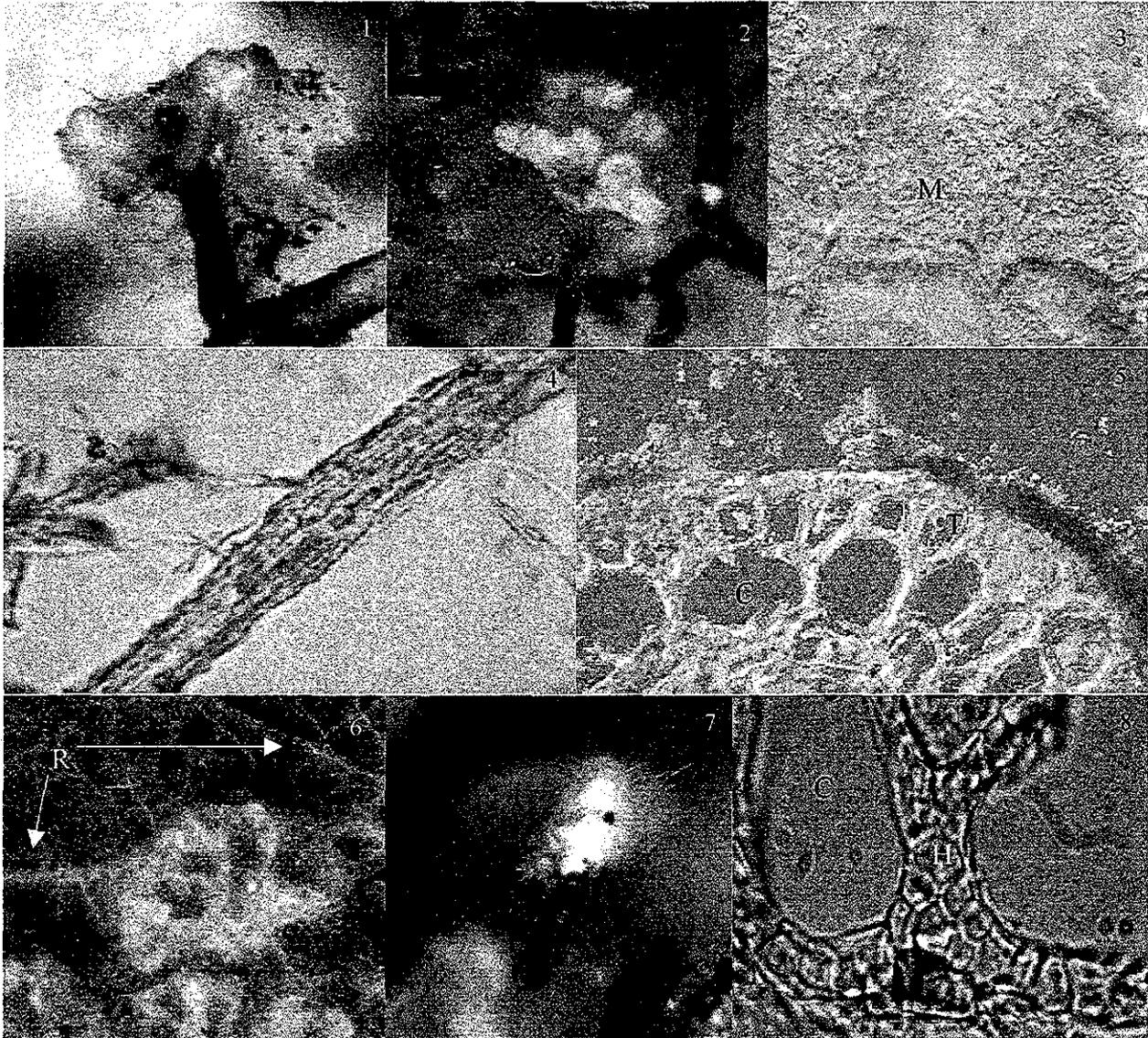
The species tested grew well in the laboratory and presented a high percentage of mycorrhization in the seed containers, for which they could be considered good candidates for nursery and field trials.

Acknowledgements This work was supported by CONACyT research grant No. 4690-N9406, "Selección de hongos ectomicorrizógenos para la producción de inoculantes en el estado de Tlaxcala". We thank Mr. David W Mitchell for language assistance.

References

- Acosta PR (1992) Algunas Coníferas del Estado de Tlaxcala, Jardín Botánico de Tizatlán. Gobierno del Estado de Tlaxcala, Tlaxcala
- Agerer R (1987-1991) Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Munich Einhorn-Verlag.
- Agerer R (1991). Caracterización of Ectomycorrhizae. In: Norris JR, Read, Varma DJ (eds) Methods in Microbiology, Vol. 23 Techniques for the Study of Mycorrhiza. Academic Press, London, pp 25-73
- Bowen GD (1994) The Ecology of Ectomycorrhiza Formation and Functioning. Plant Soil 159:61-67
- Bandala VM, Montoya L (1993) Nuevos Registros de Hongos del Estado de Veracruz, V. Nuevos Aphyllophorales y Agaricales. Rev Mex Mic 9:85-118
- Ingleby K, Mason PA, Last FT, Fleming LV (1990) Identificación of Ectomycorrhizas. ITE Research publication No. 5 Institute of Terrestrial Ecology, Londres
- Francis R, Read D (1994) The Contributions of Mycorrhizal Fungi to the Determination of Plant Community Structure. Plant Soil 159:11-25
- González-Velázquez A, Valenzuela R (1993) Boletáceos y Gonfidáceos del Estado de México I. Discusiones Sobre su Distribución en Diferentes Tipos de Vegetación, Asociaciones Ectomicorrizógenas, Fenología y Comestibilidad. Rev Mex Mic 9:35-46
- Körnerup A, Wascher JH (1978) Methuen Handlook of Colour. London, Eyre Methuen

- Mason PA, Last FT, Wilson J, Deacon JW, Fleming LV, Fox FM (1990) Fruiting and Successions of Ectomycorrhizal Fungi. In: Pegg GF, Y Ayres (eds) Fungal Infection of Plants. New York, pp 253-268
- Mohan V, Natarajan K, Ingleby K (1993) Anatomical Studies on Ectomycorrhizas. II. The Ectomycorrhizas Produced by *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata* and *Suillus brevipes* on *Pinus patula*. *Mycologia* 3: 43-49
- Molina R, Palmer JG (1982) Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Schenk NC (ed) Methods and principles of mycorrhizal research. American Phytopathological Society, St. Paul, pp 115-125
- Molina R, Massicotte H, Trappe JM (1991). Specificity Phenomena in Mycorrhizal Symbioses: Community-Ecological Consequences and Practical Implications. In: Allen MF (ed) Mycorrhizal Functioning: An Integrative Plant-Fungal Process. Chapman and Hall, New York, pp 357-423
- Moreno-Fuentes A, Aguirre-Acosta E, Villegas M, Cifuentes J (1994) Estudio Fungístico de los Macromicetos en el Municipio de Bocoyna, Chihuahua, México. *Rev Mex Mic* 10:63-76
- Moser M (1960) Die Gattung Phlegmacium. *Die Pilze Mitteleuropas* 4.J. Bad, Heilbrunn
- Palm ME, Stewart EL (1984) *In vitro* Synthesis of Mycorrhizas Between Presumed Specific and nonspecific *Pinus* + *Suillus* Combinations. *Mycologia* 76:579-600
- Rodríguez O, Garza M, Guzmán-Dávalos L (1994) Inventario Preliminar de los Hongos del Volcán de Tequila, Estado de Jalisco, México. *Rev Mex Mic* 10:103-111
- Santiago-Martínez G (1992) Pruebas de Crecimiento, Síntesis *in vitro* y Caracterización de 10 Cepas de Hongos Ectomicorizógenos. Tesis de Posgrado. Facultad de Ciencias, UNAM. México, DF
- Santiago-Martínez G, Varela L, Estrada-Torres A (1993 a) Síntesis *in vitro* de la micorriza de *Pisolithus tinctorius* y *Pinus montezumae*. *Rev Mex Mic* 9:77-83
- Santiago-Martínez G, Estrada-Torres A, Varela L (1993b) Síntesis *in vitro* de la micorriza entre *Pinus montezumae* y *Laccaria bicolor*. Resúmenes del 5º Congreso Nacional de Micología, Sociedad Mexicana de Micología y Universidad de Guanajuato, Guanajuato, pp 36
- Santiago-Martínez G, Estrada-Torres A, Varela L, Kong-Luz A (1997) Efecto de compuestos fungistáticos sobre algunas cepas de *Suillus*. *Rev Mex Mic* 13:28-32
- Torres P, (1992) Estudio de las Ectomicorizas de Pino Carrasco (*Pinus halepensis* Miller). Tesis de Doctorado. Facultad de Biología, Universidad de Murcia, España
- Van H, Cotter T, Miller Jr OK (1987) Ectomycorrhizal Associates of the Boletus Genus *Suillus* in Nepal. In: Sylvia DM, Hung LL, Graham JH (eds) Mycorrhizae in the Next Decade. Proceeding of the 7th North American Conference on Mycorrhizae. Gainsville, 90
- Xicohtencatl A, Santiago-Martínez G, Estrada-Torres A (1998). La ectomicorriza de *Pinus cembroides* y *Suillus tomentosus*. In: Zulueta RR, Escalona MA, Trejo D (eds) Avances de la Investigación micorrízica en México. Universidad Veracruzana, Veracruz, pp 259-266



Figs. 1-5: Mycorrhiza of *Pinus montezumae* with *Suillus glandulosipes* (TLAX 25). 1: dichotomous mycorrhiza with abundant emerging hyphae 1.4x; 2: coralloid mycorrhizae with abundant emerging hyphae 1.4x; 3: loose plectenquimatic mantle with abundant emerging hyphae (M), 40x; 4: rhizomorphs with slightly differentiated parallel hyphae, 20x; 5: layer of tanniferous cells (T), cortical cells (C) 20x; Figs. 6-8: Mycorrhiza of *P. montezumae* with *Suillus* cf. *pseudobrevipes* (TLAX 36). 6: dry coralloid mycorrhiza with abundant rhizomorphs (R) 1x; 7: simple mycorrhiza 1.4x; 8: cross section of a mycorrhiza with round cortical cells (C) surrounded by hyphae (H) 20x.

PARTE 3
CRECIMIENTO EN DIFERENTES MEDIOS NUTRITIVOS
Y SÍNTESIS IN VITRO DE UNA CEPA DE *Laccaria bicolor*

GROWTH ON DIFFERENT NUTRITIVE MEDIA AND IN VITRO
OF ONE STRAIN OF *Laccaria bicolor*

Guadalupe Santiago-Martínez², Arturo Estrada-Torres², Lucía Varela³ y Teófilo Herrera⁴

RESUMEN

En el presente trabajo se presentan los resultados del crecimiento de una cepa de *Laccaria bicolor* en siete medios de cultivo, obteniéndose la mayor velocidad de crecimiento y el mayor diámetro colonial en extracto de malta agar y biotina-aneurina-ácido fólico agar (BAF) y la mayor producción de biomasa en los medios de biotina-aneurina-ácido fólico agar y Sabouraud agar. La síntesis *in vitro* se realizó en una botella de un litro, con vermiculita, turba y medio de cultivo líquido de BAF; después de 15 meses se extrajo el sistema radical para su caracterización. Se observó una micorriza de simple a dicotómica, con una coloración café clara, un manto delgado y plectenquimatoso y una red de Hartig que penetró de dos a tres capas de células corticales.

PALABRAS CLAVE: Pruebas de crecimiento, *Pinus montezumae*

ABSTRACT

Growth of one strain of *Laccaria bicolor* in seven culture media was tested. The fastest growth velocity and colony diameter were obtained in EMA, BAF and SAB media. The synthesis *in vitro* of the mycorrhizae of this fungus with *Pinus montezumae* was induced in a one litter flask containing a mix of vermiculite, peat-moss and BAF broth medium. The root system was extracted for characterization after 15 months. The mycorrhizae had a simple to dicotomous morphology, with a pale brown color, a thin and plectenquimatic sheath, and a Hartig net surrounding two or three layers of the cortical cells. **KEY WORDS:** Growth test, *Pinus montezumae*

¹ Este trabajo forma parte del proyecto SELECCIÓN DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS PARA PRODUCCIÓN DE INOCULANTES EN EL ESTADO DE TLAXCALA, financiado por CONACyT, convenio número 4690-N9406.

² Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, UAT., Km 10.5 Autopista. Texmelucan-Tlaxcala, Ixtacuixtlá, C.P. 90122, Tlaxcala. (gsantia@cci.uatx.mx)

³ Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Carpio y Plan de Ayala, México, D. F.

⁴ Laboratorio de Micología, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM. A. P. 70-233, Coyoacán, México, D. F. 04510

INTRODUCCIÓN

Laccaria bicolor es un hongo que se distribuye en Europa y Norteamérica (Mueller, 1992); se asocia frecuentemente con las pináceas, encontrándose en lugares perturbados y en rodales jóvenes (Danielson, 1984; Kropp y Mueller, 1999). Su carácter pionero y la facilidad para manipularlo en cultivo puro, así como su capacidad para formar micorrizas hacen posible estudiar su biología (Kropp y Fortin, 1988; Godbout y Fortin, 1992; Baar et al., 1994; Kropp y Mueller, 1999). Se han obtenido buenos resultados en ensayos de inoculación de plantas con este hongo, logrando obtener fructificación a los 6 meses de la inoculación con la adición de bajas concentraciones de nitrógeno al sustrato (Godbout y Fortin, 1992), ya que incrementa el crecimiento y la sobrevivencia de las plantas durante el trasplante además de ser competitivo con *Thelephora terrestris* en el vivero y con los hongos indígenas después del trasplante (Kropp y Mueller, 1999). Por su alto potencial en programas de reforestación, es necesario evaluar el crecimiento de las cepas mexicanas en diferentes medios de cultivo y determinar su afinidad con las especies de pino usadas comúnmente en los programas de reforestación. Es también importante caracterizar la morfología de su micorriza para poder reconocerla fácilmente en campo. Para esto, se plantearon los siguientes objetivos: evaluar el crecimiento de una cepa mexicana de *Laccaria bicolor* en siete medios de cultivo, así como obtener y caracterizar la micorriza que forma con *Pinus montezumae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del material biológico. Esta cepa se obtuvo en el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) a partir de cuerpos fructíferos procedentes de un bosque de *Pinus-Abies*, del volcán la Malintzi. Parte de los especímenes recolectados, se caracterizaron de acuerdo con los criterios de Cifuentes et al. (1986), se herborizaron con el número de respaldo de Herbario Cuaxilo-Limón 55 y se depositaron en el Herbario TLXM del centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. La cepa obtenida se encuentra depositada en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del mismo centro con la clave TLAX 30.

Pruebas de crecimiento y caracterización. Para la realización de las pruebas de crecimiento en diferentes medios nutritivos, el micelio crecido durante tres semanas en cajas de petri con PDA (Bioxon Becton Dickinson de México) se cuadrículó con un bisturí estéril, cortando fragmentos de 5 mm

por lado; éstos se transfirieron a cajas de petri de 90 mm de diámetro que contenían los medios de cultivo papa dextrosa agar (PDA), extracto de malta agar (EMA), Sabouraud (SAB) (Bioxon Becton Dickinson de México), Ingestad (ING) (Mason, 1980), Melin y Norkrans modificado (MNM), Hagem (HG) (Molina y Palmer, 1982) y biotina-aneurina-ácido fólico-agar (BAF) (Moser, 1960), con seis repeticiones por tratamiento.

Para caracterizar el hongo en los diferentes medios de cultivo se tomó en cuenta el color y la textura de la colonia, así como, el color que se presentó en la parte inferior de la colonia en cada uno de los medios (fig. 2).

Las variables evaluadas fueron la velocidad media de crecimiento, el diámetro colonial final a los 40 días y la producción de biomasa, para lo cual se siguieron los procedimientos descritos por Santiago-Martínez et al., (1992). Para verificar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó un análisis de varianza y una prueba múltiple de Tukey con nivel de significancia al 5 %.

Síntesis in vitro. Para la obtención de la micorriza se modificaron los métodos propuestos por Trappe (1967) y Mason (1980), utilizando frascos de vidrio de un litro, a los cuales se le adicionaron 300 ml de vermiculita, 30 ml de turba y 200 ml de medio nutritivo líquido de BAF (biotina-aneurina-ácido fólico) conteniendo únicamente 10 ml de dextrosa (fig. 3); estos dispositivos se esterilizaron durante una hora a 120 °C. Una vez fríos, el sustrato se inoculó con el hongo crecido en medio BAF líquido y se sembró una plántula de *Pinus montezumae*, la cual se dejó crecer durante 15 meses (fig. 4). Las micorrizas obtenidas se caracterizaron y se fijaron en FAA (formol-ácido acético-alcohol). Para la caracterización de la micorriza obtenida, se siguieron los criterios de Agerer (1987) definiendo los colores con base en la tabla de colores de Methuen, de la cual se utilizó su notación alfa-numérica (Kornerup y Wanscher, 1978).

RESULTADOS

Caracterización de la cepa en los diferentes medios de cultivo (figura 2)

PDA. Al principio, la colonia presentó crecimiento postrado en el agar con una coloración de blanquecina a lila (2A2) y con una textura butirácea. Posteriormente se observó un micelio postrado con textura afelpada y reverso blanquecino. Finalmente, el micelio continuó con crecimiento postrado en el medio pero la coloración cambió a blanco amarillento (3A2),

con una textura aterciopelada laxa, un crecimiento ligeramente irregular, en ocasiones con manchas de color lila (16B4) y reverso de la colonia blanco amarillento (3A2).

EMA. Al inicio se observó un crecimiento postrado en el agar, una coloración lila (16B3) en el centro, con el margen blanquecino, una textura butirácea y reverso gris púrpura (14B2) en el centro y blanquecino en el margen; se formaron algunos cordones aéreos sobre el inóculo. Al terminar el ensayo, la colonia presentó crecimiento regular y postrado en el agar con una coloración violeta grisácea (17C3) en el centro, con micelio algodonoso sobre el inóculo y blanco amarillento (1A2) en el margen, textura aterciopelada laxa y el reverso de la colonia naranja grisáceo (5B5) en el centro, luego lila opaco (15C3) y hacia el margen blanco amarillento (3A2).

SAB. Al inicio del crecimiento, la colonia presentó crecimiento postrado en el agar, con una coloración lila oscura (17C7) con el margen blanquecino, una textura aterciopelada y micelio aéreo sobre el inóculo; en el reverso de la colonia se formaron anillos concéntricos no bien definidos. Al final de la prueba se observaron anillos concéntricos no bien definidos que tomaron las coloraciones gris púrpura (14B2) en el centro, después violeta grisácea (18D4), violeta pálida (18A3), violeta grisácea (18B3) y con el margen violeta grisáceo (17E5) y gris violáceo (17B2) con algunos puntos blancos dispersos; la colonia tenía textura aterciopelada densa con micelio poco rizado y elevado en el centro y margen con micelio postrado en el agar; en el reverso se observaron anillos concéntricos no bien definidos de diferentes coloraciones: gris violeta (17D2) en el centro, violeta opaca (17E4), lila rojiza (14C3), violeta grisácea (17D4) y gris (17D1).

ING. Al comenzar el crecimiento se observó una coloración de blanquecina a violeta pálida (18A3) en el centro con micelio aéreo blanquecino, textura de algodonosa laxa a afelpada, con micelio ligeramente elevado; el reverso de la colonia tomó una coloración gris violeta (17E6) en el centro, con el margen blanquecino. Al final del crecimiento, la colonia presentó coloraciones de violeta opaca (17D3) a gris violeta (17B2), textura aterciopelada densa, con micelio aéreo corto en el centro y el margen algodonoso poco denso con micelio aéreo más largo. El reverso de las colonias presentó coloraciones magenta grisácea (14E3) en el centro,

naranja grisácea (6B4) y blanco amarillenta (2A2) en el margen, en ocasiones con manchas de color violeta grisáceo (17D7).

MMM. Micelio con coloración violeta grisácea (17B3), textura algodonosa laxa a afelpada con micelios aéreos blanquecinos; re-verso de la colonia con el centro de color gris violeta (17B2) y el resto blanquecino, con tonos rosados en el margen. Al final del ensayo, el crecimiento de la colonia tomó una coloración blanco rosada (7A2) en el centro y gris rosada (8B2) hacia el margen, textura aterciopelada laxa con micelio postrado en el agar, reverso de color café rojizo (9E4) en el centro, naranja café (6C4) en la parte media y blanco amarillento (2A2) en el margen.

HG. Coloración de blanquecina a lila grisácea (18A2) con micelio blanquecino en el centro, textura algodonosa laxa con micelio aéreo hirsuto y corto; reverso de la colonia de color lila (17B2). Al final del experimento la colonia presentaba una coloración blanco púrpura (14A2) con el margen blanco rosado (10A2), textura aterciopelada laxa a densa, con micelios aéreos hirsutos en el margen. El reverso de la colonia de color café oscuro (8F7) con el margen blanquecino, en ocasiones se con manchas de color lila opaco (16C3).

BAF. Colonia de coloración lila, con el margen blanquecino con tonos violeta pálido (18A3) abajo del inóculo, textura aterciopelada con micelio aéreo muy corto, reverso de la colonia grisáceo con margen blanquecino. Al término del ensayo, la colonia presentó una coloración lila grisácea (16B2) con manchas blancas en el centro y formando anillos concéntricos no bien definidos de color violeta pálido (18A4) y el margen gris (18B1), textura aterciopelada densa; sobre el inóculo se observó micelio laxo y postrado en el margen. Reverso de la colonia de color gris púrpura (14B2), violeta grisáceo en la parte media (18B3) y el margen gris (18B1).

Pruebas de crecimiento en los diferentes medios de cultivo

En el cuadro 1 se presentan los resultados de las variables tomadas en cuenta para evaluar el crecimiento de la cepa.

Caracterización de la micorriza obtenida

Las raíces de las plantas se estuvieron monitoreando a los 6, 9, 12 y 15 meses y hasta este último tiempo se detectó la presencia de micorrizas.

Cuadro 1. Variables evaluadas de la cepa de *Laccaria bicolor*.

Variable evaluada		PDA	EMA	SAB	ING	MNM	HG	BAF
Velocidad media (mm/día)	\bar{x}	1.47b	2.31a	1.59b	0.64c	0.65c	0.22c	2.03ab
	e	0.18	0.05	0.06	0.16	0.10	0.07	0.07
Diámetro final (mm)	\bar{x}	69.6bc	86.6a	62.0c	25.8de	33.0d	12.5e	79.2ab
	e	0.8	0.49	0.29	0.59	0.54	0.42	0.35
Biomasa (mg)	\bar{x}	52.1bc	105.2b	188.0a	61.5bc	22.1c	12.0c	208.3a
	e	1.09	0.93	0.68	1.05	0.49	0.28	1.05

\bar{x} Promedio de seis repeticiones; e error estándar; letras iguales en la misma línea no presentan diferencias significativas P=0.05

La micorriza presentó una morfología de simple (fig. 5) a dicotómica (fig. 6), ocasionalmente irregular. El largo del sistema ramificado fue de 2.5 a 3.6 mm; las puntas no ramificadas van desde 0.4 hasta 0.5 mm, y el diámetro de los ejes de 0.4 a 0.5 mm. La superficie del manto fue granulosa con abundantes hifas emanantes; con brillo metálico distribuido irregularmente. Coloración café clara (7D4) en las puntas no ramificadas, naranja café (7C3) en los ápices de las puntas, color café (7E6) en los ejes; las micorrizas viejas con color café oscuro (7F6). Con abundantes rizomorfos e hifas emanantes hialinas.

Manto de 23.5 a 31.4 μm de ancho, plectenquimatoso, con las hifas dispuestas en forma de red y con abundantes hifas emergentes fibuladas (fig. 7). Red de Hartig con penetración de dos a tres capas de células corticales.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Caracterización colonial

Esta cepa tomó una coloración de lila a violeta en la mayoría de los medios utilizados, excepto en MNM en el cual tomó tonos rosados; además en el medio de cultivo de SAB se pudo observar que la coloración de la colonia formó anillos concéntricos de diferentes tonalidades violetas. También se pudo observar que esta cepa no produce exudados que pigmenten el medio de cultivo como en el caso de algunas cepas de *Pisolithus tinctorius*, *Suillus* sp. y *Rhizopogon* sp. (Santiago-Martínez 1992). El color violeta de la colonia estudiada concuerda con lo reportado previamente por Hutchison (1991) en los medios de MN, HG y BAF.

Pruebas de crecimiento

Velocidad media de crecimiento. En cuanto a esta variable, se pudo observar que se obtuvo el mayor valor en el medio de EMA presentando similitud estadística con el valor observado en el BAF, este segundo no presentó diferencias significativas con los valores alcanzados en los medios de SAB y PDA, quienes presentaron diferencias significativas con el valor más alto (EMA) y los obtenidos en los medios de MNM, ING y HG que fueron los valores más bajos (cuadro 1).

Diámetro colonial final. En esta variable se encontraron los valores más altos en los medios de EMA y BAF y los más bajos en los medios de MNM, ING y HG (cuadro 1).

Producción de biomasa. En cuanto a la biomasa, los valores más altos de peso seco se presentaron en los medios de cultivo BAF y SAB, presentando similitud estadística entre ellos y diferencias con los demás medios; los valores más bajos se alcanzaron en los crecimientos en PDA, ING, MNM y HG (cuadro 1).

En la figura 1 se observa la correlación entre diámetro colonial y producción de biomasa. En los medios de ING, HG y MNM se obtuvieron los valores más bajos en las variables de diámetro colonial y producción de biomasa. A pesar de que en los medios PDA y EMA se encontraron colonias relativamente grandes, la producción de biomasa fue muy baja comparada con la que se obtuvo en los medios de SAB y BAF; por lo que estos dos últimos serían recomendables para producir masivamente esta cepa.

Caracterización de la micorriza

La micorriza obtenida en este ensayo requirió de aproximadamente 15 meses de permanencia de los simbioses en el dispositivo, tiempo mayor que el reportado por Trappe (1967) que es de 3 a 4 meses; sin embargo, de acuerdo con lo mencionado por Duddridge (1986a y 1986b), a pesar de que se redujo el contenido de azúcar en el medio empleado en el presente trabajo, el contenido de este carbohidrato pudo influir para que las micorrizas no se observaran antes de este tiempo. La morfología dicotómica y la penetración de la red de Hartig de 2 a 3 células corticales ya se habían descrito para micorrizas de *Pinus pinea* con *Laccaria laccata* (Branzati et al., 1985).

A pesar de que las colonias de esta cepa presentaron coloraciones violeta en la mayoría de los medios de cultivo utilizados en este ensayo,

la micorriza obtenida no presentó dichas coloraciones, aunque éstas se han observado en micorrizas de campo de otras especies de *Laccaria* (Agerer, 1987). Por otro lado, no se ha observado coloración violeta en micorrizas de *L. proxima* y *L. tortilis* obtenidas en síntesis *in vitro* (Ingleby et al., 1990).

Se ha mencionado que la morfología de las estructuras micorrízicas puede variar entre aislamientos de la misma especie fúngica. Así, en el caso de *Laccaria*, se han observado diferencias morfológicas en la colonización de *Pinus banksiana* con diferentes cepas de *Laccaria bicolor* (Wong et al., 1989); sin embargo, es importante realizar la descripción de las micorrizas obtenidas porque así se tienen las bases para poder diferenciar la cepa probada en ensayos de vivero y campo.

Las especies del género *Laccaria*, en especial *L. bicolor*, presentan una serie de características interesantes que las hacen atractivas para ser usadas en programas de inoculación de plantas en vivero: en primer lugar, se asocian con una amplia gama de hospederos, entre los que se pueden incluir especies de los géneros *Eucalyptus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* y *Pseudotsuga* (Baar et al., 1994; Danielson, 1984; Wong et al., 1989). Son antagonistas de patógenos de la raíz que habitan en el suelo, por lo que son potencialmente útiles como agentes de control de ciertas enfermedades (Hung y Molina, 1986).

Baar et al. (1994) observaron que *Laccaria bicolor* fue capaz de sobrevivir en lugares talados en forma de micelio o como restos de ectomicorrizas en la capa de suelo mineral o en forma saprofítica en lugares en donde se ha removido la capa de humus y el estrato herbáceo. Además, se ha utilizado ampliamente para la inoculación de plántulas en vivero y se ha logrado obtener sus fructificaciones después de seis meses de haberse inoculado a la planta, adicionando al sustrato bajas concentraciones de nitrógeno (Godbout y Fortin, 1992). Todas estas características, además de su facilidad de aislamiento y su capacidad de asociarse con *P. montezumae*, planta ampliamente distribuida en México (Perry, 1991) y frecuentemente producida en los viveros mexicanos, hacen de *L. bicolor* un hongo con gran potencial en los programas de re-forestación de nuestro país.

El sistema de micorrización *in vitro* utilizado en este ensayo presenta pocos problemas de contaminación; sin embargo, en esta técnica no se puede observar el sistema radical hasta el momento de extraer las plantas, por lo

que éstas se pierden en los moni-toreos, ya que hay que romper el frasco para extraer las raíces de la planta.

LITERATURA CITADA

- Agerer, R., 1987. Colour Atlas of Ectomycorrhizae. Einhorn-Verlag-Schwäbisch Gmünd.
- Baar, J., W. A. Ozinga and Th. W. Kuyper, 1994. Spatial distribution of *Laccaria bicolor* genets reflected by sporocarps after removal of litter and humus layer in a *Pinus sylvestris* forest. Mycological Research 98:726-728.
- Branzati, B., A. Zambonelli and G. Govi, 1985. Micorrizazione di *Pinus pinea* con *Laccaria laccata* ed *Hebeloma crustuliniforme*. Mic. Ital. 3:3-10.
- Cifuentes, J., M. Villegas y L. Pérez-Ramírez, 1986. Hongos. In: Manual para Herbario. A. Chiang (comp.) Consejo Nacional de la Flora de México. Inst. Biol. UNAM, México, D. F. pp:55-64.
- Danielson, R. M., 1984. Ectomycorrhizal associations in Jack Pine stand in Northeastern Alberta. Canadian Journal of Botany 62:932-939.
- Duddridge, J. A., 1896a. The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. III. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. and 11 species of ectomycorrhizal host *in vitro* in the absence of exogenous carbohydrate. New Phytologist 103:457-464.
- Duddridge, J. A., 1896b. The development ultrastructure of ectomycorrhizas. IV. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. and a number of ectomycorrhizal hosts *in vitro* in the presence of exogenous carbohydrate. New Phytologist 103:465-471.
- Godbout, C. and J. A. Fortin, 1992. Effects of nitrogen fertilization and photoperiod of basidiome formation of *Laccaria bicolor* associated with container-grown Jack Pine seedlings. Canadian Journal of Botany 70:181-185.
- Hung, L.-L. L., and R. Molina, 1986. Use of ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. III. Effects of commercially produced inoculum on container-grown Douglas Fir and Ponderosa Pine seedlings. Canadian Journal Forest Research 16:802-806.
- Hutchison, L. J., 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. Mycotaxon 42:387-504.
- Ingleby K., P. A. Mason, F. T. Last and L. V. Fleming, 1990. Identification of Ectomycorrhizas. Institute of Terrestrial Ecology. London, 112p.
- Kornerup, A. and J. H. Wanscher, 1978. Methuen Handbook of Colour. Eyre Methuen. London, 252p.
- Kropp, B. R. and J. A. Fortin, 1988. The incompatibility system and relative ectomycorrhizal performance of monokarions and reconstituted dicaryons of *Laccaria bicolor*. Canadian Journal of Botany 66:289-294.
- Kropp, B. R. and G. M. Mueller, 1999. *Laccaria*. In: Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile. Cairney J. W. G. Y S. M. Chambers (eds.). Springer, New York. pp: 65-88.
- Mason, P. A., 1980. Aseptic synthesis of sheathing (ecto-) mycorrhizas. In: Tissue Culture Methods for Plant Pathologist. Ingram D. S. y J. P. Helgeson (eds.). Blackwell Scientific Publications, London, pp: 173-178.
- Molina, R. and J. G. Palmer, 1982. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Schenk N. C. (Ed.) American Phytopathological Press, St. Paul. pp: 115-129.

- Moser, M., 1960. Die Gattung Phlegmacium. Die Pilze Mitteleuropas 4. J. Bad Heilbrunn.
- Mueller, G. M., 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana Bot NS* 30:1-58.
- Perry, J. P., 1991. *The Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Oregon.
- Santiago-Martínez, G., 1992. Pruebas de crecimiento, síntesis *in vitro* y caracterización de 10 cepas de hongos ectomicorrizógenos. Tesis Maestría. Fac. de Ciencias, UNAM, México, D. F. 127 p.
- Trappe, J. M., 1967. Pure culture synthesis of Douglas-fir mycorrhizae with species of *Hebeloma*, *Suillus*, *Rhizopogon* and *Astraeus*. *Forest Science* 13:121-130.
- Wong, K. K. Y., Y. Piché, D. Montpetit and B. R. Kropp, 1989. Differences in the colonization of *Pinus banksiana* roots by sib-monokaryotic and dikaryotic strains of ectomycorrhizal *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Botany* 67:1717:1726.

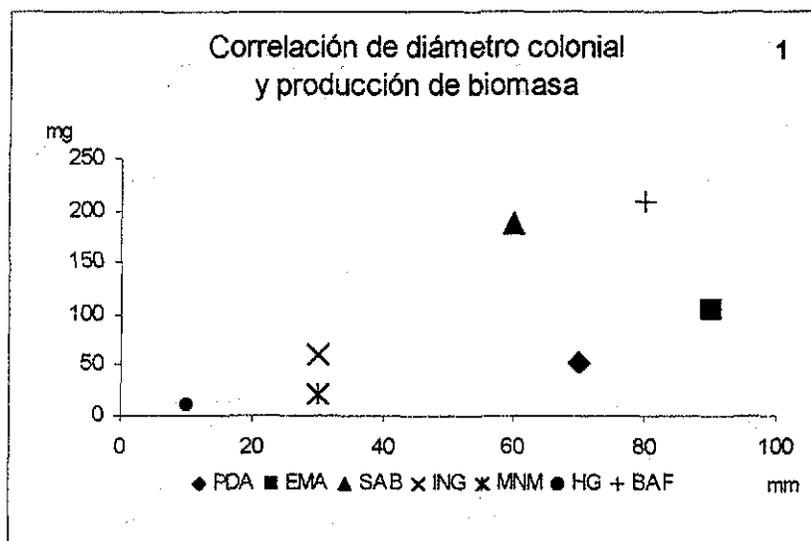
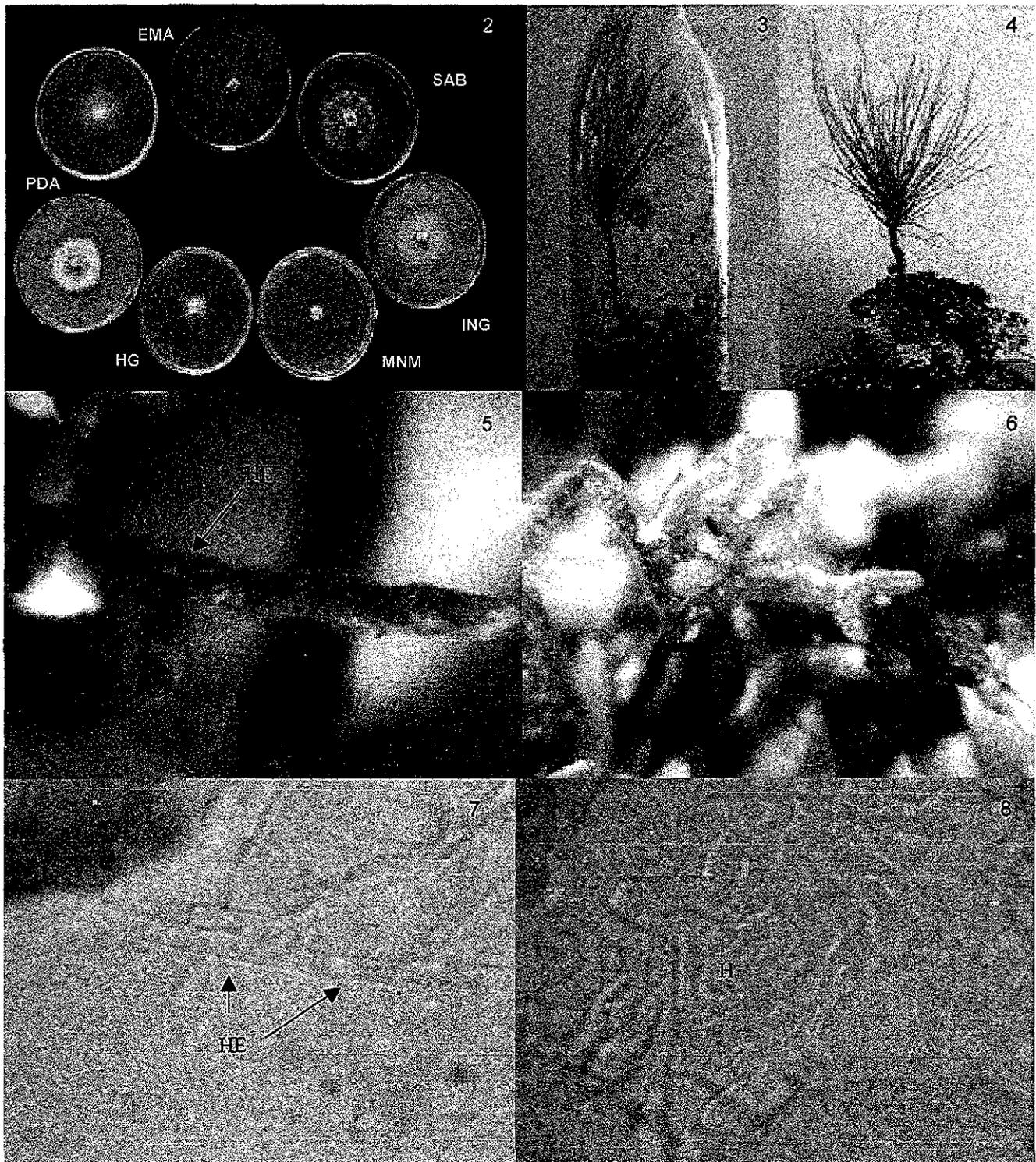


Figura 1. Correlación entre la biomasa y diámetro colonial.



Figs. 2-8. 2: Prueba de crecimiento de la cepa de *Laccaria bicolor* en diferentes medios nutritivos. 3: Dispositivo de síntesis *in vitro* en frasco lechero con turba y vermiculita. 4: Plántula de *Pinus montezumae* al momento de ser extraída del dispositivo de síntesis *in vitro*. 5: Micorriza simple de *P. montezumae* inoculado con *L. bicolor* (12.5 X). 6: Micorriza dicotómica de *P. montezumae* inoculado con *L. bicolor* (6.8 X). 7: Hifas emanantes de la micorriza obtenida *in vitro* (250 X). 8: Red de Hartig de la micorriza obtenida *in vitro* (500 X).

TESIS CON
 FOLLA DE ORIGEN

LA ECTOMICORRIZA DE *Pinus cembroides* y *Suillus tomentosus*

Ectomycorrhizae of *Pinus cembroides* and *Suillus tomentosus*

A. Xicohténcatl Ahuatzin, M.G. Santiago Martínez y A. Estrada-Torres¹

Resumen

En el presente estudio se constató la capacidad de una cepa de *Suillus tomentosus* para formar ectomicorriza con *Pinus cembroides*. Plántulas obtenidas en condiciones axénicas fueron inoculadas con el hongo en crecimiento activo. Después de dos meses se obtuvieron micorrizas de color blanquecino en las estructuras jóvenes, anaranjado pardo en los estados maduros y color café en las partes viejas, desde simples hasta coraloides, con puntas no ramificadas de torcidas a tortuosas. La superficie del manto es brillante, algodonosa y densa, cubierta por hifas emergentes rígidas en forma de espinulas. Se presentaron rizomorfos blancos, abundantes y conectados en algunos puntos de la base. Microscópicamente, el manto va desde 39.0 µm hasta 122.5 µm de grosor y está conformado por tres capas, la externa presenta hifas emanantes septadas entrelazadas, en la capa media se observa un manto plectenquimático con hifas entrelazadas y en la capa interna se observa también un manto plectenquimático con hifas dispuestas en forma de una red más densa. La red de Hartig penetra de dos a tres capas de células corticales.

Palabras clave: Rizomorfos, estructura del manto, hifas emanantes, red de Hartig.

Abstract

The capacity of one strain of *Suillus tomentosus* for forming ectomycorrhizae with *Pinus cembroides* was proven. Seedlings obtained under axenic conditions were inoculated with the fungus in active growth. After two months, we obtained simple colored ectomycorrhizas, whitish when young, brown orange in mature stages, and brown when old with bent to tortuous non-branched tips. The mantle surface is bright, cottony and dens, covered with spine-like emergent hyphae rigid. Rhizomorphous are white rigid, abundant and connected in some points at the base of ectomycorrhizae. Microscopically, fungal mantle ranges from 39.0 µm to 122.5 µm and has three layers, the outermost with abundant interwoven emanating hyphae; the middle, plectenquimatic and with interwoven hyphae; and the innermost is also plectenquimatic, but the hyphae have a reticulated arrangement. Hartig's net reaches two or three layers of cortical cells.

Key words: Rhizomorphous, mantle structure, emanating hyphae, Hartig's net.

Introducción

Muchas de las plantas forestales de zonas templadas presentan la simbiosis mutualista entre el micelio de un hongo ectomicorrizico y sus raíces tróficas (Harley y Smith, 1983). Para algunos de estos árboles dicha relación es obligada y la ausencia de sus hongos simbiotes origina que las plantas no puedan tener un desarrollo normal (Meyer, 1973). En esta asociación, el hongo rodea las raíces secundarias de las plantas formando una red de hifas entrelazadas llamada manto; en el interior de la raíz, el hongo se desarrolla intercelularmente rodeando las células corticales constituyendo la red de Hartig (Marks, 1973).

¹Laboratorio de Micología, Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala km 10.5 carretera Tlaximilcan-Tlaxcala, 90120, Tlaxcala, Tlaxcala.

Avances de la investigación micorrizica en México.

El pino piñonero (*Pinus cembroides*) forma bosques puros o casi puros en las regiones semiáridas del estado de Tlaxcala, mismos que se encuentran asociados con el matorral xerófilo sobre una porción de cerros calizos situados entre Atzayanca, Santa María de las Cuevas y el Carmen.

Actualmente se le propaga en los viveros de la entidad y se está introduciendo en algunas localidades del municipio de Totolac, intentando reforestar suelos calcáreos en los que se desarrolla en forma adecuada (Acosta *et al.*, 1991). No obstante, poco se conoce de los hongos que pueden formar asociaciones con esta conífera y del papel que pueden tener en la sobrevivencia de la planta.

Uno de los requisitos para seleccionar cepas de hongos ectomicorizógenos para programas de reforestación es su capacidad de asociarse con la planta que se desea producir, lo cual se puede constatar a través de la síntesis de su micorriza en el laboratorio. Debido al potencial que *Pinus cembroides* tiene para usarse en reforestación de zonas semi-secas, el objetivo del presente estudio fue confirmar la capacidad de *Suillus tomentosus* para asociarse con *P. cembroides* a través de la síntesis de su micorriza.

Materiales y métodos

Preparación de los semilleros

Se usó como sustrato suelo forestal procedente de la Cañada Grande, del volcán La Malintzi, Tlaxcala, el cual se esterilizó a 120°C dos veces durante una hora en dos días consecutivos. Por otra parte, se usaron 25 semilleros (18 x 5 cm), los cuales se lavaron y se desinfectaron con alcohol, y en su base se depositó algodón y se llenó con el suelo forestal estéril.

Germinación de las semillas

Semillas de *Pinus cembroides* Zucc., proporcionadas por el vivero de San Andrés Apizaco, Tlaxcala, se desinfectaron con peróxido de hidrógeno a 30% durante 15-20 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril y se sembraron en una mezcla estéril de arena y vermiculita.

A los 20 días las plántulas se transfirieron a los semilleros que habían sido previamente preparados, mismos que se depositaron en un invernadero. Las plantas se regaron con agua corriente dos veces a la semana por las tardes (Torres, 1992).

Preparación del inóculo fúngico

Se utilizó una cepa de *Suillus tomentosus* (Kauffm.) Singer, Snell & Dick, procedente de la Cañada Grande, ladera este, volcán La Malintzi, Tlaxcala, con respaldo de herbario Kong-Luz 1 009 depositado en el herbario TLXM del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala

Dicha cepa, que se encuentra depositada en el cepario de hongos ectomicorizógenos del mismo Centro, fue resembrada en papa dextrosa agar (PDA). Posteriormente la colonia se cortó en pequeños fragmentos de 5 x 5 mm y se transfirió a matraces de 250 ml conteniendo 150 ml de medio líquido biotina

La ectomicorriza de...

aneurina ácido fólico (BAF) (Moser, 1960), adicionando únicamente 15 g de glucosa. Los matraces se mantuvieron en agitación mecánica a 150 rpm y 25°C durante dos semanas.

Inoculación de las plantas

Cuando el inóculo micelial presentaba crecimiento activo el medio nutritivo se eliminó y se enjuagó con agua destilada estéril. Este micelio se usó para inocular las plantas que ya presentaban raíces secundarias.

Observación de las raíces

El sistema radical se revisó constantemente hasta observar la formación de las primeras ectomicorizas, que fue dos meses después de la inoculación.

Caracterización de las ectomicorizas

Con las ectomicorizas obtenidas se describieron las características morfológicas y anatómicas según el criterio de Agerer (1987-1991), Agerer (1991) e Ingleby *et al.* 1990). Los colores fueron descritos tomando como referencia la tabla de colores de Methuen (Komerup y Wansher, 1978), de la cual se indica su notación alfa-numérica.

Las raíces micorizadas fueron fijadas en formalina-ácido acético-alcohol (FAA), y para la descripción microscópica se elaboraron cortes transversales y longitudinales hechos a mano.

Resultados y discusión

Características morfológicas

El sistema radical presenta una ramificación que va desde simple a dicotómica (Figuras 1 y 2) o hasta coraloide (Figura 3). El sistema midió (1.0) 1.1-2.0 (2.5) mm; las puntas no ramificadas de (0.3-) 0.4-0.7 (-0.8) mm con un diámetro de (0.2-) 0.3-0.4 (-0.5) mm, los ejes fueron de (0.1-) 0.3-0.4 (0.5) mm; las puntas no ramificadas se observaron de torcidas a tortuosas (Figuras 2 y 3), redondeadas; de color blanco (1A1) cuando jóvenes; naranja-café (6C8) cuando son maduras y café-oscuro (7F4) cuando viejas, con brillo metálico.

En seco, el manto se observa con una superficie algodonosa densa con abundantes hifas emergentes en forma de espínulas (Figura 2). La ectomicorriza presenta abundantes rizomorfos conectados en un punto por varias partes de la ectomicorriza (Figuras 1 y 2), de color blanco (1A1), vilosos.

Características anatómicas

Rizomorfos de 9.8-98 μm de diámetro, formado por hifas paralelas ligeramente indiferenciadas; las hifas delgadas son de 0.7-2.3 μm de diámetro con algunas hifas centrales de mayor diámetro que van desde 2.3-4.7 μm , con abundantes hifas emanantes a todo lo largo del sistema de 1.0-6.9 μm de diámetro, de color blanco (1A1) con abundantes pústulas.

En corte transversal la ectomicorriza presenta un manto con grosor desde 39.0 μm hasta 122.5 μm de grosor, con abundantes hifas emanantes septadas, hialinas de 1.5-3.9 μm de diámetro; células taniníferas de 24.5-49 x 14.7-29.4 μm , de circulares a elípticas, de color amarillo oscuro (4C8); células corticales de 34.3-49 x 9.8-49 μm de redondeadas a elípticas; la red de Hartig (Figuras 4 y 5) cubre de dos a tres células corticales y las separa con una o dos células hifales circulares de 3.9-7.0 μm de diámetro.

El manto está conformado por tres capas (Figuras 5 y 6), la externa mide de 7.8-11.7 μm presenta abundantes hifas emanantes (Figura 5) de 1.5-3.9 μm de diámetro, septadas y entrelazadas con abundantes pústulas, seguidas de hifas entrelazadas laxas formando un manto plectenquimatoso; la capa media mide de 7.8-19.6 μm , se observa un manto también plectenquimático formado de hifas paralelas que miden 3.1-3.9 μm de diámetro y, en la capa interna (de 3.9-19.6 μm), se observa un manto plectenquimático denso con hifas dispuestas en forma de red que miden de 0.7-3.1 μm .

Al comparar la estructura de las ectomicorizas de *Pinus cembroides-Suillus tomentosus* con la reportada en la bibliografía para otras combinaciones de *Pinus* y *Suillus* podemos observar que el tipo de ramificación de simple a coraloides ya se había descrito en las micorizas de *Pinus resinosa* con *Suillus americanus*, *S. brevipes*, *S. luteus* y *S. neobalbidipes*, *Pinus strobus* con *Suillus mericanus*, *S. brevipes*, *S. granulatus*, *S. pictus* y *S. punctipes* (Palm y Stewart, 1984), *Pinus halepensis* con *Suillus variegatus* (Torres, 1992), *Pinus montezumae* con *Suillus granulatus* (Santiago, 1992), y *Pinus patula* con *Suillus brevipes* (Mohan et al., 1993).

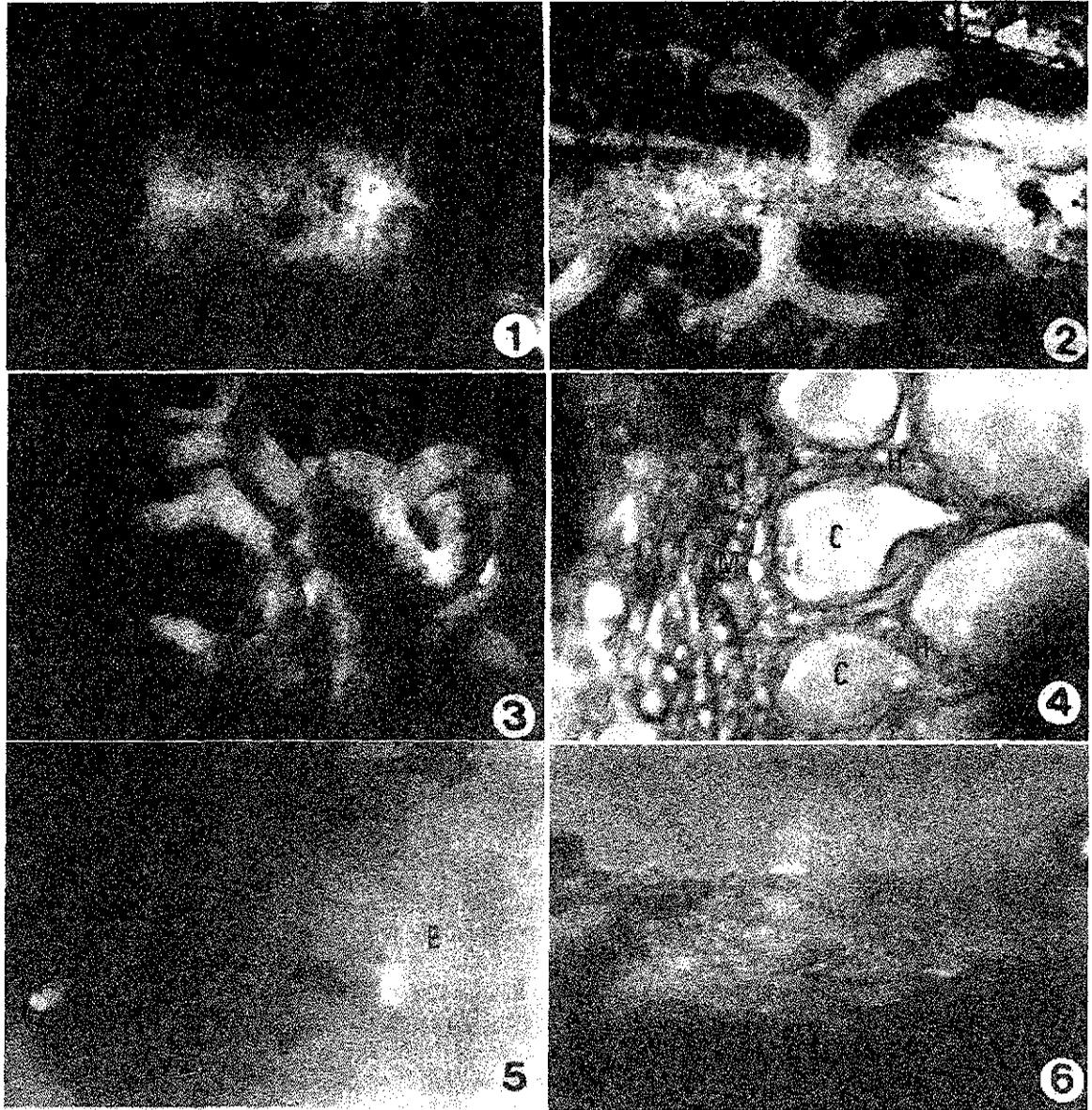
La forma tortuosa de las ramificaciones también ya se había observado en las micorizas de *Pinus patula* con *Suillus brevipes* (Mohan et al., 1993), aunque no se menciona la presencia de rizomorfos para esta combinación planta-hongo.

El color representa una característica muy importante para poder diferenciar a las ectomicorizas formadas por diferentes hongos y, en el caso de las que se han descrito para combinaciones de *Pinus* y *Suillus*, abarca una amplia gama que va desde el blanco hasta pardo grisáceos o pardo rosados (Palm y Stewart, 1984; Torres, 1992; Santiago, 1992; Mohan, 1993).

De esta manera, sólo las micorizas producidas por *Pinus resinosa* y *P. strobus* con *Suillus brevipes* (Palm y Stewart, 1984) *P. halepensis* con *Suillus collinitus* y *S. luteus* (Torres, 1992) y *P. montezumae* con *S. tomentosus* y *S. granulatus* (Santiago, 1992) tienen coloraciones similares a las encontradas en el presente trabajo, aunque en todas las combinaciones *Suillus-Pinus* reportadas en la bibliografía las ectomicorizas más viejas pueden tener coloraciones café oscuro, por lo que en esta etapa de su desarrollo es fácil confundirlas a simple vista.

Los rizomorfos también presentan colores muy variados, pero hasta ahora no se habían descrito de color blanco para ninguna combinación de *Pinus* y *Suillus*.

El grosor del manto es otro carácter altamente variable en las ectomicorizas de *Pinus* con *Suillus*, alcanzando desde 10-50 μm (Torres, 1992; Santiago, 1992; Mohan, 1993) hasta casi las 200 μm (Santiago, 1992). La mayoría de las micorizas formadas por *Pinus* y *Suillus* presentan tres capas en el manto, coincidiendo con lo encontrado en este estudio. Al igual que en la mayoría de las especies de *Suillus*, no se observaron fibulas en las hifas y el manto fúngico sólo penetra de una a dos capas de células corticales.



Figuras 1-6. Micorriza de *Pinus cembroides* con *Suillus tomentosus*.

Características morfológicas (Descripción): 1. Primeras etapas de formación de la ectomicorriza vista en seco (30X), manto tomentoso en forma de espínulas cortas, rizomorfo conectado en un solo punto (R); 2. Ectomicorrizas (10X) maduras vistas en seco, tomentosas, dicotómicas, con puntas torcidas, con rizomorfos vilosos; 3. Ectomicorrizas sumergidas en agua (10X), coraloides, con las puntas torcidas a tortuosas. **Características anatómicas:** 4. Corte transversal del manto (250X) con abundantes hifas emanantes (E), Células taniníferas (T), Red de Hartig (H), Manto (M); 5. Corte transversal del manto (250X) Manto (M), hifas emanantes (E), Células taniníferas (T), Red de Hartig (H); 6. Corte longitudinal del manto (500) con abundantes hifas emanantes entrelazadas en la capa externa, seguidas de hifas entrelazadas en forma de red, en la capa media se observan hifas paralelas y en la capa interna se observan hifas compactas en forma de red

Avances de la investigación micorrízica en México.

Por último, es importante mencionar que el método de obtención de las micorrizas en semilleros (Suelo forestal estéril + inóculo en crecimiento activo) presenta muchas ventajas, como la obtención de una buena cantidad de micorrizas en corto tiempo (2 meses) permitiendo hacer una amplia descripción de las características morfológicas y anatómicas, contaminación mínima o ausente, poco maltrato tanto de la planta como del hongo en comparación con el uso de otros dispositivos, bajo costo y seguimiento de las micorrizas sin necesidad de destruir la raíz de las plantas.

Conclusiones

1. *Suillus tomentosus* es capaz de formar micorrizas con *Pinus cembroides*, esto lo hace un buen candidato para ser utilizado en ensayos en vivero.
2. La descripción morfológica y anatómica aquí presentada permitirá el reconocimiento de este hongo en trabajos de vivero y campo, ayudando así a evaluar su competitividad y permanencia en los suelos.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento del proyecto "Selección de hongos ectomicorrízicos para producción de inoculantes en el estado de Tlaxcala", mediante el convenio número 4890-N9408.

Bibliografía

- Acosta, P.R. 1992. *Algunas Coníferas del estado de Tlaxcala*, Jardín Botánico de Tizatlán. Gobierno del estado de Tlaxcala Núm. 14, Tizatlán, Tlaxcala.
- Agerer, R. 1987-1991. *Colour atlas of ectomycorrhizae*. Munich, Einhorn-Verlag.
- Agerer, R. 1991. "Characterization of ectomycorrhizae". En: *Methods in microbiology; techniques for the study of mycorrhiza*. J.R. Norris, D.J. Read and A.K. Varma (eds.). Academic Press, London, vol. 23, p. 25-74.
- Honrubia M.; Torres, P.; Díaz, G. y Morte, A. 1993. *Bioteconología forestal: micorrización y micropropagación (Manual de prácticas)* Universidad de Murcia y Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos, Murcia.
- Harley, J.L. y Smith, S.E. 1983. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, Londres.
- Ingleby, K.; Mason, P.A.; Last, F.T. y Fleming, L.V. 1990. "Identificación of ectomycorrhizas". ITE Research publication Núm. 5. Institute of Terrestrial Ecology, Londres.
- Kornep, A. y Wanschler, J.H. 1978. *Methuen handbook of colour*. London, Eyre Methuen, p. 252.
- Marks G.C. y Foster, R.C. 1973. "Structure, morphogenesis and ultrastructure of ectomycorrhizas". En: *Ectomycorrhizae: ecology and physiology*. G.C. Marks and T.T. Kozłowski (eds.). Academic Press, Nueva York, p. 1-35.
- Meyer, F.H. 1973. "Distribution of ectomycorrhizae in native and manmade forest". En: *Ectomycorrhizae: ecology and physiology*. G.C. Marks and T.T. Kozłowski (eds.). Academic Press, Nueva York, p. 383-411.
- Mohan V.; Natarajan, K. & Ingleby, K. 1993. "Anatomical studies on ectomycorrhizas. II. The ectomycorrhizas produced by *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata* and *Suillus brevipes* on *Pinus patula*". *Mycorrhiza* 3: 43-49.

La ectomicoriza de...

- Moser, M. 1960. *Die Gattung Phlebiaclum*. Die Pilze Mitteleuropas 4.j. Bad, Heilbrunn (Germany).
- Palm E. y Stewart, L. 1984. "In vitro of mycorrhizae between presumed specific and nonspecific *Pinus* + *Suillus* combinations". *Mycologia* 76: 579-600.
- Santiago-Martínez, G. 1992. Pruebas de crecimiento, síntesis *in vitro* y caracterización de 10 cepas de hongos ectomicorizógenos. Tesis de Posgrado. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Torres, P. 1992. Estudio de las ectomicorizas de pino carrasco (*Pinus halepensis* Miller). Tesis de Doctorado. Facultad de Biología, Universidad de Murcia, España.

CAPÍTULO IV

INOCULACIÓN ESPORAL

El uso de suspensiones de esporas de hongos ectomicorrizógenos es uno de los métodos de inoculación en vivero más sencillo, económico y probablemente eficaz. La inoculación es recomendable para mejorar el desarrollo y aumentar la sobrevivencia en campo de las especies forestales (Honrubia *et al.*, 1992).

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en la tinción de esporas de algunos hongos, y los resultados de dos ensayos de inoculación de plantas de *Pinus montezumae*.

INOCULACIÓN ESPORAL

ANTECEDENTES

El uso de suspensiones de esporas de hongos ectomicorrizógenos es uno de los métodos de inoculación en vivero más sencillo, económico y probablemente eficaz, pero para su utilización como inóculo es preciso conocer los porcentajes de esporas viables y activas existentes en cada una de las suspensiones, permitiéndonos usar la concentración de esporas necesaria para conseguir una buena micorrización. Asimismo, por medio de una combinación de tinciones, se pueden conocer los porcentajes de esporas activas, en reposo y viables de los inóculos esporales almacenados en suspensiones, además de que se puede evaluar la vida media de estas suspensiones en almacenamiento (Torres, 1992)

Se han utilizado diferentes tinciones para determinar la viabilidad de esporas fúngicas e hifas, semillas, polen y protoplastos animales y vegetales. En la actualidad, la tinción con diacetato de fluoresceína (FDA) y la determinación de la actividad succinato-deshidrogenasa mediante el uso de sales de tetrazolio (MTT) son los dos métodos más utilizados para la determinación de la actividad celular. Sin embargo, Miller *et al.* (1993) mencionaron que estas tinciones vitales son predictores pobres de la viabilidad en hongos ectomicorrizógenos y proveen una mejor medida de reposo que de la viabilidad

La tinción con sales de tetrazolio es utilizada como un indicador de reposo y actividad metabólica; y la técnica de tinción de núcleos con hematoxilina es un indicador de viabilidad; una combinación de estos métodos pueden establecer el porcentaje de viabilidad y reposo de las esporas probadas (Torres, 1992).

La succinato-deshidrogenasa es una de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos que en los hongos está restringida a las mitocondrias activas (Zalokar, 1965 *vide* Torres, 1992). Las sales de tetrazolio forman un compuesto de color rojo violeta cuando son reducidas por las mitocondrias fúngicas respirando activamente (Torres, 1992)

Se ha observado que al examinar esporas de hongos ectomicorrizógenos con varias tinciones vitales, la viabilidad de las esporas es baja, con un porcentaje menor del 1%; sin embargo, son capaces de formar abundantes micorrizas cuando son inoculadas en las raíces de las plantas hospederas (Miller *et al.*, 1993).

Los inoculantes esporales, han sido utilizados ampliamente en países como Estados Unidos y España, donde las empresas forestales como Forest Mycorrhizal Application (Oregon) y Micología

Forestal Aplicada (Barcelona) comercializan los inóculos de *Suillus*, *Rhizopogon*, *Lactarius* etc. (Honrubia *et al.*, 1992)

La inoculación con esporas ha sido ampliamente utilizada por su facilidad que tiene en la aplicación (Grove y Malajczuk, 1994), su inconveniente se da en que algunas especies fúngicas producen pocos esporomas, o que las esporas tienen baja viabilidad (Grove y Malajczuk, 1994; Marx y Cordell, 1994).

El inóculo esporal se prepara fácilmente con hongos que producen muchas esporas, calculándose que géneros como *Suillus*, *Rhizopogon* o *Amanita* pueden producir desde 14 mil hasta 150 mil esporas por esporocarpo dependiendo de su madurez, y que se pueden usar algunos meses después de su preparación (Honrubia *et al.*, 1992).

La inoculación de plántulas en vivero con hongos ectomicorrizógenos es recomendable para mejorar su desarrollo y aumentar su sobrevivencia en el campo (Torres, 1992), debido a que la inoculación de plántulas puede ser utilizada para incrementar la tolerancia al estrés en campo por la actividad humana, además de proporcionar a la planta ciertos beneficios como captación de nutrimentos y agua, protección contra patógenos y resistencia a condiciones ambientales adversas, entre otras (Kropáček, 1992).

Por esto se planteó estimar los porcentajes de viabilidad-actividad de las esporas de *Amanita caesarea*, *Boletus edulis*, *Inocybe dulcamara*, *I. griseovelata* y *Suillus glandulosipes* en el momento de ser obtenidas, así como determinar su potencial como inoculantes en dos ensayos con *Pinus montezumae*, uno probando las esporas de *Amanita caesarea* y *Boletus edulis*, utilizando suelo forestal como sustrato; y otro probando las esporas de *Inocybe dulcamara*, *I. griseovelata* y *Suillus glandulosipes*, utilizando una mezcla de suelo forestal con suelo obtenido del cerro Tepeticpac.

METODOLOGÍA

En el presente estudio se utilizaron las técnicas de tinción con sales de tetrazolio como indicador de actividad metabólica y la técnica de tinción nuclear como indicador de viabilidad (Torres, 1992). La combinación de estas técnicas permitió conocer los porcentajes de esporas viables y activas y por consiguiente el de esporas en reposo en las suspensiones esporales

Preparación de las suspensiones esporales

Para la elaboración de las suspensiones se seleccionaron carpóforos maduros, los cuales se limpiaron cuidadosamente eliminando la hojarasca y suelo adherido, se separó la parte del himenio (poros o láminas), al cual se le añadió agua destilada estéril y se trituro hasta obtener una mezcla homogénea. La suspensión se filtró con una coladera para eliminar los fragmentos de tejido del

himenio; una vez obtenidas las esporas, se almacenaron en el refrigerador a 4°C hasta el momento de su uso (Castellano y Molina, 1989; Honrubia *et al.*, 1992)

Con la ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio óptico se calculó la cantidad de esporas existentes en un ml, con el fin de aplicar una concentración de 10^7 esporas por planta, que se aplicaron directamente sobre las plantas con la ayuda de jeringas, las cuales permitieron una distribución homogénea (Honrubia *et al.*, 1992).

Determinación del porcentaje de esporas activas mediante la tinción con sales de tetrazolio (MTT) (Torres, 1992).

Para la determinación de esporas activas, se tomó una alícuota de 5 ml de la suspensión esporal y se centrifugó durante 5 minutos a 2500 rpm; posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se le adicionaron los siguientes reactivos al precipitado: 1 ml de MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-bromuro de 2,5-difeniltetrazolio) al 0.1 %; 1 ml de tampón fosfato sódico 0.05 M a pH de 7.0; 1 ml de ácido succínico 0.05 M como sustrato. Posteriormente se incubaron a 37°C de una a dos horas

Después del periodo de incubación, las esporas se observaron al microscopio óptico. Las esporas activas presentaron coloraciones rojo-violeta que correspondieron con los compuestos de diformazán anteriormente citados.

El porcentaje de esporas activas se calculó contando el número de esporas teñidas en aproximadamente 100 esporas totales. Se observó un total de 600 esporas.

Determinación del porcentaje de esporas viables mediante la tinción de núcleos

Se utilizó el método de Wittman (1962 *vide* Honrubia *et al.*, 1993) descrito para la visualización de cromosomas en material vegetal, el cual consiste en una tinción con hematoxilina. Para esto las esporas se fijaron con una solución 1:3 de ácido acético-etanol absoluto durante dos o tres días.

Después de este tiempo, la solución fijadora se eliminó centrifugando durante 5 minutos a 2500 rpm, se excluyó el sobrenadante, posteriormente las esporas se lavaron dos veces con etanol al 95%, centrifugando con las mismas condiciones en cada lavado; más tarde la muestra se hidrolizó con 3 ml de etanol absoluto que se adicionó a la muestra, mientras en otro tubo de ensaye se mezclaron los siguientes reactivos: 0.1 g $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0.1 g AlN ; 0.1 g $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0.1 g ácido iódico; 3 ml ácido clorhídrico concentrado.

Esta mezcla se adicionó a la muestra de esporas y se dejó de 8 a 12 minutos para que se realizara la hidrólisis completa. Pasado este tiempo, la muestra se centrifugó y se le adicionó un fijador que

contenía etanol absoluto, cloroformo y ácido acético glacial (6:3:1). Este fijador se reemplazó a los 5, 15 y 60 minutos. Por último, las esporas se transfirieron al colorante que contenía 10 g de hematoxilina en 50 ml de ácido propiónico 45 % + 0.25 g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4) 12 \text{H}_2\text{O}$.

Las muestras se observaron al microscopio óptico para apreciar los núcleos teñidos de un color violeta oscuro. La presencia de un núcleo intacto nos indicó la viabilidad de la espora. Para obtener el porcentaje de esporas con núcleo intacto se contó el número de esporas teñidas en aproximadamente 100 esporas totales, para lo cual, se observó un total de 600 esporas.

Por otro lado, se elaboró una suspensión de esporas de *Pleurotus ostreatus* como control para comprobar que los métodos de tinción utilizados son indicadores válidos de la actividad y viabilidad de las esporas. Este hongo saprófito posee cerca de un 100 % de germinación (Miller *et al.*, 1993) y por lo tanto un porcentaje de esporas viables y activas igualmente próximo al 100%. Parte de esta suspensión se hirvió previamente para comprobar la eficacia de las tinciones.

Se analizó un total de seis suspensiones esporales de las siguientes especies: *Amanita caesarea* (1), *Boletus edulis* (1), *Inocybe dulcamara* (1), *I. griseovelata* (1) y *Suillus glandulosipes* (2). Los carpóforos de las dos primeras especies se obtuvieron de los bosques de la Malintzi y el resto del Cerro Tepeticpac.

Se montaron dos ensayos de inoculación, los cuales se describen a continuación:

Ensayo 1. Inoculación de *Pinus montezumae* con esporas de *Amanita caesarea* y *Boletus edulis*, utilizando suelo forestal como sustrato.

En esta parte se diseñaron cuatro tratamientos los cuales consistieron en: I) suelo forestal sin esterilizar; II) suelo forestal estéril; III) suelo forestal estéril inoculado con esporas de *Boletus edulis*, IV) suelo forestal estéril inoculado con esporas de *Amanita caesarea*. Las inoculaciones se realizaron a una concentración de 1×10^7 esporas por individuo. Se sembraron 100 plantas por tratamiento divididas en 4 repeticiones, las cuales se colocaron al azar.

Para la evaluación de los tratamientos, cada 2 meses se tomaron 15 plantas al azar por réplica a las cuales se les midió altura y diámetro de la corona radicular, todo esto se realizó hasta los 6 meses; también se tomaron tres plantas al azar para valorar peso fresco y peso seco de la parte aérea; a la parte radical se le eliminó el suelo y se fijó en FAA para posteriormente cuantificar el porcentaje de micorrización.

Ensayo 2. Inoculación de *P. montezumae* con esporas de *Inocybe dulcamara*, *I. griseovelata* y *Suillus glandulosipes*, utilizando una mezcla de suelo procedente del Cerro Tepeticpac y suelo forestal.

Para montar este ensayo se recolectó suelo del cerro Tepeticpac y suelo forestal del Volcán la Malintzi, los cuales se pasteurizaron durante una hora, dos días consecutivos y se mezclaron en una proporción 3:1, respectivamente. Esta mezcla de sustratos se colocó en contenedores de plástico a los cuales se les depositó una plántula de *Pinus montezumae* recién germinada.

Por otro lado, se recolectaron ejemplares de hongos ectomicorrizógenos de las siguientes especies: *Inocybe dulcamara*, *Inocybe griseovelata* y *Suillus glandulosipes* (con dos muestras, una tomada en el mes de junio y otra en el mes de julio), todos ellos asociados con *Pinus montezumae*. Se prepararon los inóculos esporales como se describió previamente y cada uno de ellos se adicionó en una concentración de 1×10^7 esporas por planta. Se sembraron 100 plantas por tratamiento divididas en 4 repeticiones, las cuales se colocaron al azar.

Para la evaluación de los tratamientos, a los 6 meses se tomaron 15 plantas al azar por réplica a las cuales se les midió altura y diámetro de la corona radicular; también se tomaron tres plantas al azar para valorar peso fresco y peso seco de la parte aérea; a la parte radical se le eliminó el suelo y se fijó en FAA para posteriormente cuantificar el porcentaje de micorrización.

Para tener una referencia del porcentaje de micorrización obtenido en las plantas se siguieron los criterios de Marx *et al.* (1991), quienes dan una categoría de micorrización pobre cuando se tiene de 1 a 24 % de micorrización, moderada de 24-49%, buena del 50 al 74% y excelente del 75 al 100 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tinción de esporas

En el cuadro 1 se muestran los resultados de las tinciones con MTT y hematoxilina, detectándose que en la prueba preliminar que se realizó con esporas de *Pleurotus ostreatus*, se pudo observar un 77.43 % de esporas teñidas con sales de tetrazolio. En cuanto a las esporas hervidas, se detectó una reacción negativa, tal como lo describen Miller *et al.* (1993)

En estas pruebas se esperaba que los porcentajes de esporas activas deberían de ser menores o iguales a los porcentajes de esporas viables por las condiciones del estado de reposo; sin embargo, en la mayoría de las pruebas se observan porcentajes mayores de esporas activas (cuadro 1). Este tipo de respuestas ya las habían observado Torres (1992) y Torres y Honrubia (1994), atribuyéndolas a que algunos núcleos se dañan durante proceso de tinción con hematoxilina y esto hace que se tengan porcentajes de viabilidad más bajos. Además, Miller *et al.* (1993) mencionaron que los núcleos

teñidos con hematoxilina son en ocasiones difíciles de detectar en esporas con paredes gruesas o de colores oscuros, encontrando variación de los porcentajes de tinción entre las especies

Asimismo, se podría tener una sobrestimación del porcentaje de esporas activas al obtener porcentajes altos de esporas teñidas con MTT. Torres (1992) y Torres y Honrubia (1994) mencionaron que las tinciones con FDA proporcionan datos más próximos a los porcentajes de actividad, sin embargo, no se contó con un microscopio de epifluorescencia para realizar este tipo de tinción. No obstante, los resultados obtenidos nos pueden indicar una aproximación de los estados fisiológicos de las esporas.

Cuadro 1. Actividad y viabilidad de las esporas

Inóculo esporal	Porcentaje de esporas teñidas	
	MTT	Núcleos
<i>Amanita caesarea</i>	83.5*	24.0
<i>Boletus edulis</i>	61.1*	46.5
<i>Inocybe dulcamara</i>	82.7	24.0
<i>I. griseovelata</i>	80.9	39.6
<i>Suillus glandulosipes</i> (junio)	33.5	57.2
<i>S. glandulosipes</i> (julio)	24.9	21.6
<i>Pleurotus ostreatus</i>	77.4	96
<i>P. ostreatus</i> **	0	0

MTT= sales de tetrazolio; * Valores obtenidos a las 24 horas; ** Esporas hervidas.

Además, en algunos casos ciertas esporas de hongos ectomicorrizógenos pueden confundirse con levaduras que crecen sobre todo en inóculos que se almacenan en refrigeración, alterando los resultados finales (Torres, 1992).

Al revisar las esporas de *Amanita caesarea* y *Boletus edulis* sometidas a la tinción con MTT a la primera y segunda hora, se pudo observar que ninguna se tiñó del color violeta típico, por lo que se dejaron hasta las 24 horas, manifestándose la presencia de algunas esporas teñidas; sin embargo, estos resultados no se pueden comparar con las tinciones efectuadas a la hora.

Algunas esporas tienen paredes gruesas o coloreadas y esta característica dificulta la detección de los depósitos del rojo de diformazán en las reacciones positivas de las sales de tetrazolio, tal como lo

describen Miller *et al.* (1993) con las esporas de *A. brunnescens*, *Coprinus quadrifidus* y *Chroogomphus rutilus*.

Otra opción, es que algunas esporas como las de *Amanita muscaria*, presenten un promedio de tinción bajo, por lo cual se les considera como insensibles a las tinciones utilizadas (Miller *et al.*, 1993).

En cuanto a las esporas del género *Inocybe*, se pudo advertir que *I. dulcamara* presentó porcentajes de esporas activas y viables más bajos que los obtenidos en *I. griseovelata*. No obstante, Torres (1992) reportó valores de porcentaje de viabilidad todavía más bajos (10 %); además, mencionó que los porcentajes de esporas activas (con FDA) y viables en fresco fueron muy similares, indicando que no había esporas en reposo, mientras que en nuestras pruebas se observó un mayor número de esporas teñidas con MTT.

En los inóculos de *Suillus glandulosipes* se pudo observar que las esporas obtenidas en el mes de junio presentaron una viabilidad de más del 50 %, así como un porcentaje menor de esporas teñidas con MTT, lo que indica que una proporción de esporas estaba en estado de reposo. Por otro lado, las esporas recolectadas en el mes de julio presentaron menor proporción de esporas viables y activas, pero como el porcentaje de esporas teñidas con MTT fue más alto, esto indicaría que todas las esporas estaban activas.

Al comparar los porcentajes de actividad con lo reportado en la literatura, se observó que Torres (1992) y Torres y Honrubia (1994) obtuvieron resultados desde 16 hasta 44%, Miller *et al.* (1993) reportaron desde 12 hasta 80%, mientras que en nuestros ensayos se encontraron datos desde 24 hasta 33 %. Con estos resultados se puede observar que el género *Suillus* presentan respuestas muy diversas en las tinciones con MTT; sin embargo, es el taxón que presenta los valores más altos.

En cuanto al porcentaje de viabilidad, observamos valores desde 21 hasta 57 %, resultados que concuerdan con los reportados por Torres (1992) y Torres y Honrubia (1994), quienes obtuvieron desde 37 hasta 68 %; los valores más altos los reportó Miller *et al.* (1993) oscilando entre 98 y 100 %. De esta forma, *Suillus* es uno de los géneros que presentan valores de viabilidad más altos.

Dado que *Suillus* es un hongo que presenta porcentajes elevados de viabilidad y actividad de las esporas, este género puede considerarse como un buen candidato para la producción de inóculos (Torres, 1992; Miller *et al.*, 1993). No obstante, se requiere realizar más estudios ya que Miller *et al.* (1993) mencionaron que diferentes poblaciones de una misma especie pueden expresar resultados diversos de actividad y viabilidad.

Se debe de tomar en cuenta también el estado de madurez del hongo, ya que es más recomendable realizar la extracción de esporas en hongos maduros, debido a que éstos presentan porcentajes de esporas activas más altos, en tanto los hongos jóvenes tienen muchas esporas inmaduras y en los hongos viejos, la mayoría se encuentra en estado de dormancia (Torres, 1992; Torres y Honrubia, 1994).

ENSAYO 1

Este ensayo se realizó con plantas de *Pinus montezumae* inoculadas con esporas de *Amanita caesarea* y *Boletus edulis*. Se evaluó el crecimiento de las plantas cada dos meses, durante tres ocasiones. Los resultados se incluyen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Evaluación del crecimiento de las plántulas de *Pinus montezumae*

VARIABLES evaluadas	Tiempo después de la inoculación (meses)	Suelo estéril	Suelo sin esterilizar	Inóculo de <i>Amanita caesarea</i>	Inóculo de <i>Boletus edulis</i>
Altura* cm	2	9.7 b±0.39	12.1 a±0.66	7.8 c±0.45	7.4 c±0.44
	4	19.7 a±0.49	19.5 a±0.66	19.6 a±0.46	19 a±0.65
	6	21.2 a±0.79	21.3 a±0.70	19.6 a±0.47	19.5 a±0.76
Diámetro* mm	2	5.9 a±0.35	5.9 a±0.37	4.8 b±0.21	4.8 b±0.22
	4	9.7 a±0.37	8.1 b±0.45	8.2 b±0.33	7.2 b±0.34
	6	11.2 a±0.42	11.2 a±0.54	11.6 a±0.46	10.5 a±0.50
P. fresco** mg	2	3.2 a±0.99	4.4 a±0.58	2.11 a±0.39	2.4 a±0.92
	4	10.4 a±0.99	9.7 a±0.59	7.8 a±0.41	6.3 a±0.92
	6	18.7 a±0.99	9.1 b±0.62	9.9 b±0.42	8.0 b±0.93
P. seco** mg	2	0.8 a±0.27	1.2 a±0.14	0.6 a±0.11	0.6 a±0.21
	4	2.8 a±0.27	2.6 a±0.15	2.1 a±0.11	1.9 a±0.22
	6	6.1 a±0.28	2.7 b±0.15	3.4 ab±0.12	2.8 b±0.22

*Promedio de 32 repeticiones; ** promedio de 3 repeticiones. Letras iguales entre hileras no hay diferencias estadísticas significativas; ± error estándar

En la primera medición, se puede observar, que la altura de las plántulas presenta su mayor valor en las plantas que se sembraron en suelo sin esterilizar, mostrando diferencias significativas con los demás valores; siguieron los valores de las plantas crecidas en suelo estéril, los valores más bajos se observaron en las plantas inoculadas, las cuales presentaron diferencias significativas con los otros tratamientos.

En la segunda y tercera medición de la altura de las plantas, se obtuvieron valores muy parecidos en todos los tratamientos, por lo que no se encontraron diferencias significativas entre ellos.

En cuanto al diámetro de la corona radicular, los valores más altos a los dos meses se observaron en las plantas que no estaban inoculadas, indicando diferencias significativas con los otros tratamientos. En la segunda medición, el mayor valor se detectó en las plantas crecidas en suelo estéril, las cuales presentaron diferencias significativas con los otros tratamientos. En la tercera medición no se observaron diferencias estadísticas.

En cuanto a la producción de biomasa expresada en peso fresco y peso seco, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en las primeras dos evaluaciones. En la tercera evaluación, se pudo observar mayor peso fresco en las plantas crecidas en suelo estéril. En peso seco, el mayor valor se observó en las plantas crecidas en suelo estéril, mismo que presentó diferencias significativas con los otros tratamientos, excepto en donde las plantas se inocularon con *Amanita caesarea*, que a la vez presentaron similitud estadística con los otros dos tratamientos.

En cuanto al porcentaje de micorrización, al extraer el sistema radical de los contenedores y eliminar el sustrato, se pudo observar que las plantas no presentaron micorrizas en ninguno de los tratamientos, lo que pudo deberse a diferentes razones: en los tratamientos de inoculación con *Amanita caesarea* y *Boletus edulis*, no se obtuvieron micorrizas debido a que este tipo de hongos se encuentran asociados con plantas de pino de estados sucesionales de árboles maduros (Last *et al.*, 1984; 1987), por lo que se podría suponer que al inocular sus esporas en plántulas no fueron capaces de formar micorrizas; en el suelo estéril, por el sistema de descontaminación del sustrato, no se presentaron propágulos vivos que pudieran colonizar las raíces; a la vez que, el sustrato sin esterilizar pudo no haber contado con los propágulos que pudieran colonizar las raíces de las plántulas.

ENSAYO 2

Este ensayo se evaluó solamente a los seis meses, tomando las mismas variables para evaluar el crecimiento de las plantas que el ensayo anterior (cuadro 3).

En la altura de la planta, el menor valor se observó en las plantas inoculadas con *I. dulcamara*, presentando diferencias significativas con los otros tratamientos.

En el diámetro de la corona, los mayores valores se observaron en las plantas inoculadas con *S. glandulosipes*, presentando diferencias estadísticas con los otros tratamientos; los valores más bajos se observaron en las plantas inoculadas con *I. dulcamara*, *I. griseovelata* y plantas testigo. En la

producción de biomasa expresada en peso fresco y peso seco no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos.

Cuadro 3. Evaluación del crecimiento de plantas de *Pinus montezumae* inoculadas con esporas

Tratamiento	Altura de la planta* (cm)	Diám. de la corona* (mm)	P. fresco** (mg)	P. seco** (mg)	% de micorrización**
<i>Inocybe dulcamara</i>	5.2b ±0.16	1.7bc ± 0.05	430a ±24.7	119.3a ±6.1	0-1.3
<i>I. griseovelata</i>	5.7a ±0.18	1.5c ±0.05	793a ±51	240.3a ±16.2	12.4-45.9
<i>Suillus glandulosipes</i> junio	5.4 a ±0.16	1.9 a ±0.06	887a ±296	247.3a ±72.6	0-23.1
<i>S. glandulosipes</i> julio	5.9 a ±0.17	1.8 ab ±0.06	775a ±220	215a ±55.7	2.4-7.8
Testigo	5.6 a ±0.16	1.5 c ±0.04	577a ± 63	180a ±15	0

*Promedio de 80 repeticiones; **promedio de 3 repeticiones. Letras iguales entre columnas no hay diferencias estadísticas significativas; ± error estándar

En cuanto al porcentaje de micorrización, solamente una de las tres plantas inoculadas con esporas de *Inocybe dulcamara* presentó un bajo porcentaje de micorrización; en el tratamiento con esporas de *I. griseovelata*, en las tres plantas se observaron micorrizas, estimándose una micorrización de pobre a moderada; en el tratamiento con esporas de *Suillus glandulosipes* con inóculo obtenido en el mes de junio, solamente se observó micorriza en una planta de tres; en el inóculo del mes de julio, las tres plantas presentaron micorrizas pero con micorrización pobre (Marx *et al.*, 1991). En las plantas testigo no se observaron micorrizas.

Tanto *Suillus glandulosipes* como las dos especies de *Inocybe* se encontraron asociadas con plantas de pino jóvenes; asimismo, Last *et al.* (1984, 1987) mencionaron que estos hongos tienen mayor potencial para asociarse con plantas jóvenes

Estas especies fueron capaces de formar micorrizas con las plantas de pino utilizadas, pero con gran variabilidad en los porcentajes de micorrización; esto, se pudo haber debido a que el sustrato que se utilizó para montar el ensayo afectó la germinación de las esporas o el desarrollo de las micorrizas. Este sustrato presentó pH básicos, además de estar conformado por arena migajosa con alto contenido de carbonato (Werner 1988) y aunque se mezcló con suelo forestal, este sustrato parece no favorecer el establecimiento de la asociación

El uso de sustratos alternativos para la reproducción de plantas es de suma importancia, debido a que, una vez que se encuentra un sustrato que promueva la micorrización de las plantas inoculadas así como su crecimiento, el paso que seguiría sería sustituir el uso de suelo forestal. Con esta opción se disminuirían los daños ecológicos por saqueo de suelo en los bosques.

CONCLUSIONES

- Las esporas de *Amanita caesarea* y *Boletus edulis* no son buenos candidatos para realizar inoculaciones esporales, debido a que sus esporas presentan porcentajes de actividad y viabilidad muy bajos, además de que en el ensayo de inoculación con estas esporas no se obtuvieron micorrizas.
- Las esporas de *Inocybe* pueden servir para inoculaciones en vivero, pues presentan altos porcentajes de esporas viables y activas, además de ser capaces de micorrizar plantas de *Pinus montezumae*; Sin embargo, debido a la toxicidad de las especies de este género, se podría optar por alguna otra especie que de buenos resultados para asociarse con las plantas.
- Las esporas de *Suillus* se pueden considerar como buena opción para realizar inoculaciones en vivero, por tener porcentajes de viabilidad-actividad altos y asociarse con *P. montezumae*, además de provenir de especies comestibles
- El uso de suelos calcáreos para la reproducción de plantas en vivero no es recomendable, debido a que no permite una buena micorrización; aunque es recomendable evaluar por más tiempo el crecimiento y sobrevivencia de la planta.
- Es conveniente realizar ensayos de inoculaciones utilizando diferentes sustratos para determinar el que proporcione mejores condiciones para una buena micorrización, así como para el crecimiento de la planta.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En este capítulo se discuten los resultados obtenidos en cada especie de hongo estudiado, tomando en cuenta cada una de las pruebas realizadas.

DISCUSIÓN GENERAL

CARACTERÍSTICAS DE LOS TAXA ESTUDIADOS

El estudio de la biología de los hongos ectomicorrizógenos es de suma importancia, ya que nos indica de alguna manera el comportamiento que estos organismos pueden tener ante condiciones de pH o temperaturas extremas, su potencial de asimilación de diferentes compuestos, la posibilidad para reproducirlos masivamente, lo más importante, su capacidad para asociarse con diferentes hospederos. Con estos estudios, podemos tener la pauta para hacer recomendaciones sobre su uso en inoculaciones de vivero y/o campo.

Amanita

El género *Amanita* es un grupo de hongos que tiene más de 400 especies descritas (Singer, 1986) Contiene especies comestibles como *A. caesarea* y tóxicas como *A. phalloides*. Muchas de sus especies son micorrizógenas; sin embargo también existen especies que no desarrollan micorrizas pues se han encontrado en lugares sin vegetación arbórea (Yang *et al.*, 1999)

La mayoría de las cepas presentan tolerancia al cloruro de sodio, lo que quiere decir que ciertas cepas se podrían utilizar en suelos con problemas de salinidad También presentaron su mayor crecimiento a 25 °C, aunque la TLAX 41 creció a 7 °C; ninguna se desarrolló a temperaturas de 30 °C. La mayoría son capaces de degradar gelatina, lípidos y urea. Además de ser tirosinasa dominantes.

El cultivo de cepas de este género es limitado, ya que se ha intentado aislar algunos ejemplares pero no crecen en los medios de cultivo o si crecen, cuando se reaísle la colonia ya no se desarrolla, esto se puede deber a que los requerimientos de muchas especies de *Amanita* son complejos y no han sido definidos con precisión (Yang *et al.*, 1999). Por esta razón, solamente se cuenta con 8 cepas de este género, de los cuales 4 son de *A. muscaria*, una de *A. rubescens*, otra de *A. pantherina*, una que pertenece a la sección *Vaginata* y una sin identificar.

Amanita muscaria

Es un hongo que tiene amplia distribución y se asocia con diferentes plantas de importancia forestal (Yang *et al.*, 1999), también se ha encontrado en bosques maduros (Last *et al.*, 1984); su aislamiento es relativamente fácil, favoreciendo su crecimiento los medios de PDA, EMA y BAF. El crecimiento de esta especie es más lento que el de las especies de *Suillus* o *Laccaria*, por lo que para reproducirla masivamente se requiere de mayor tiempo.

Por otro lado, se determinó que las cepas probadas no crecen a pH de 3 y 8, pero sí en los medios con pH de 4 a 7, observándose su mayor crecimiento en los valores de 4 y 6; *Amanita muscaria* es capaz de modificar el pH final del medio en donde crece, aumentándolo a los pH de 3 y 4, y disminuyéndolo en los medios con pH de 5 a 8.

Las cepas probadas son tirosinasa dominante, no produce pectinasas ni amilasas, generalmente degradan fuertemente a los lípidos, de moderada a fuertemente a la gelatina, degradan en diferentes intensidades a los casaminoácidos y débilmente a la urea; son sensibles a la temperatura de 7°C aunque la cepa TLAX 41 crece más en esta temperatura que en el control. No crecen a 30 °C; son tolerantes al rosa de bengala y muestran diferentes respuestas con la cicloheximida, el verde de malaquita y el cloruro de sodio.

Amanita pantherina

Es una especie más difícil de aislar en el laboratorio que *A. muscaria*, únicamente se cuenta con una cepa, la cual crece en MNM y HG, aunque su mayor diámetro lo alcanza en MNM. Su mayor biomasa la obtiene en HG.

Amanita rubescens

Está representada por una cepa, la cual presenta su mejor crecimiento en PDA y BAF. Es una cepa tirosinasa dominante; no degrada lípidos, pectina, ni almidón; es la única cepa de *Amanita* que acidificó el medio complementado con casaminoácidos, produce débilmente ureasas y gelatinasas y no crece a temperaturas extremas de 7 y 30 °C. Es sensible al benomil, semitolerante a la cicloheximida, al rosa de bengala y al verde de malaquita, y tolerante al cloruro de sodio.

Amanita spp.

Se cuenta con dos cepas, de las cuales sólo se estudió su comportamiento fisiológico y bioquímico. La TLAX 4, que pertenece a la sección *Vaginata*, es lacasa dominante, no degrada pectina, almidón ni casaminoácidos; degrada fuertemente a la gelatina y a los lípidos, pero débilmente a la urea. Es sensible a 7°C y no crece a 30 °C. Es tolerante al benomil, rosa de bengala, verde de malaquita y cloruro de sodio, y semitolerante a la cicloheximida. Por otro lado, la cepa TLAX 47 es lacasa dominante, no degrada lípidos, pectina, casaminoácidos ni almidón; degrada fuertemente a la gelatina y moderadamente a la urea. No crece a 7 y 30 °C y es sensible a la cicloheximida, semitolerante al rosa de bengala y al verde de malaquita, y tolerante al benomil y al cloruro de sodio.

Amanita caesarea

Esta especie no creció en condiciones axénicas, a pesar de que se realizaron varios intentos; en algunos aislamientos aparentemente comenzaba a crecer la colonia, pero al resembrarla ya no se

desarrolló. Hacskeylo y Palmer, (1955) señalaron haber logrado el aislamiento de *A. caesarea*, sin embargo, no mencionan el medio de cultivo en el cual creció, por lo que sería conveniente probar otras composiciones de los medios de cultivo.

Al estudiar la viabilidad y la actividad de las esporas de este hongo se pudo advertir que no respondieron al proceso de tinción. Asimismo, al probar el inóculo esporal con plántulas de *Pinus montezumae* se percibió que las esporas no fueron capaces de inducir la formación de micorrizas. Esta especie pertenece a estados sucesionales de bosques maduros y viejos (Last *et al.*, 1984, 1987; Molina *et al.*, 1992 a, 1992 b) y se encuentra en la NOM-Ecol-059-94 como una especie sujeta a protección especial (CONABIO, 1994).

Boletus

Los hongos de este género se encuentran en los estados sucesionales de bosques maduros a viejos (Last *et al.*, 1984, 1987; Molina *et al.*, 1992 a, 1992 b). Son difíciles de aislar, ya que no crecieron en los medios probados o solo desarrollan algunas hifas, pero al resembrarlas ya no siguen creciendo, perdiéndose la colonia. En este trabajo, sólo se logró el aislamiento de la cepa TLAX 8, en la cual se pudo observar un crecimiento limitado en todos los medios probados (EMA, PDA, MNM, HG, BAF, SAB y HG), presentando su mayor crecimiento en EMA.

Por otro lado, las esporas de *Boletus edulis* se sometieron a tinción con sales de tetrazolio, pero no se lograron teñir, indicando que no hay esporas activas o algún factor está interfiriendo con el proceso de tinción. Así mismo, el inóculo esporal se usó en plantas de *P. montezumae*, pero al igual que con *Amanita caesarea* no se detectó formación de micorrizas.

Inocybe

La mayoría de las especies de este género se consideran pioneras ya que se asocian con plantas de bosques jóvenes (Last *et al.*, 1984, 1987; Molina *et al.*, 1992 a, 1992 b). No se cuenta con ninguna cepa, debido a que por lo general son hongos muy pequeños, que presentan contextos muy delgados, por lo cual al intentar aislarlos los medios de cultivo se contaminan fácilmente con bacterias.

Se han encontrado grandes cantidades de cuerpos fructíferos de *I. dulcamara* e *I. griseovelata*, en un lugar que fue reforestado en 1989, ubicado en el cerro Tepeticpac, Tlaxcala. Con estos hongos se prepararon inóculos esporales, a los cuales se les realizaron tinciones con MTT y hematoxilina, encontrándose hasta casi el 83 % de esporas activas y del 24 al 40 % de esporas viables.

Estos inóculos se probaron con *P. montezumae*, utilizando suelo con pH alcalino extraído del mismo lugar de donde se aislaron los hongos, pero mezclado con suelo forestal. Se encontraron porcentajes

de micorrización desde el 12 hasta el 45 % con *I. griseovelata*, mientras que con *I. dulcamara* algunas plantas inoculadas no presentaron micorrizas, o si estaban colonizadas se detectaron porcentajes de micorrización muy bajos (1.3%). Así las especies de *Inocybe* estudiadas son capaces de desarrollarse y formar micorrizas a pesar de las condiciones de alcalinidad del suelo estudiado. Además, Xochitiotzin (2000) encontró hasta el 75 % de raíces colonizadas en *P. montezumae* inoculado con esporas de *I. griseovelata* en una mezcla de tepetate con suelo forestal.

Aunque la mayor parte de especies de este género son tóxicas, es bueno considerar a las especies de este género en especial a *Inocybe griseovelata*, para la recuperación de cierto tipo de suelos debido a su capacidad para tolerar pH alcalinos.

Laccaria

Es un hongo común y cosmopolita, frecuentemente asociado con numerosas especies de árboles, incluyendo plantas de importancia económica; su manipulación en el laboratorio es sencilla, por lo que se han podido realizar numerosos estudios de sistemática y biogeografía, así como de interfertilidad y análisis de divergencia genética (Gardes *et al.*, 1990, 1991; Mueller, 1991, 1992; Mueller y Gardes, 1991; Mueller y Amirati, 1993; Albee *et al.*, 1996; Kropp 1997). También se han realizado numerosas pruebas de síntesis *in vitro* para probar su habilidad para asociarse con una amplia gama de hospederos (Mueller, 1992). Por otro lado, algunas especies de *Laccaria* son especies pioneras y otras se han encontrado en lugares con disturbio o asociadas con rodales jóvenes (Kroop y Mueller, 1999). Sin embargo, es un hongo pequeño con un contexto muy delgado que si no se aísla cuidadosamente los cultivos por lo general crecen asociados con bacterias siendo particularmente difícil purificar la colonia.

En el presente estudio, se obtuvo solo una cepa de *Laccaria bicolor* la cual tuvo su mayor diámetro colonial en el medio EMA, aunque su mayor biomasa la produjo en BAF y SAB.

Se encontró que la cepa trabajada no crece en medio con pH de 3 y su mayor crecimiento lo presenta en los pH de 5 a 7. Esta cepa es capaz de modificar el pH final de los medios, detectándose que en los medios con pH de 3 a 5 lo aumenta y en los de 6 a 8 lo disminuye.

También se comprobó la capacidad de *Laccaria bicolor* para asociarse con *Pinus montezumae*, mostrando una morfología de simple a dicotómica, con una coloración café clara.

Pisolithus arrhizus

Este hongo tiene amplia distribución, se asocia con diferentes árboles de importancia forestal, principalmente con plantas jóvenes y en hábitats perturbados, por lo que ha sido ampliamente

utilizado en los programas de inoculación de plantas forestales (Marx y Kenney 1982). Su crecimiento en laboratorio es relativamente fácil y rápido, lo que ha permitido realizar gran número de estudios fisiológicos, ecológicos, de especificidad de hospederos, de síntesis *in vitro* bajo condiciones controladas para conocer mejor los mecanismos genéticos que regulan el desarrollo de la interacción, así como las respuestas del crecimiento del hospedero (Chambers y Cairney, 1999).

Se ha considerado uno de los hongos ectomicorrizógenos con mayor potencial en los programas de reforestación. Sin embargo, en el estado de Tlaxcala su distribución es limitada. La cepa TLAX 37 obtuvo su mayor tasa de crecimiento en PDA, pero su mayor biomasa en BAF. Se ha observado que el micelio vegetativo de las cepas mexicanas crece mejor en los medios de BAF, MNM y PDA.

En cuanto al pH, las cepas estudiadas presentan buen crecimiento en medios con pH de 5 y 6, mientras que en pH 8 su crecimiento es muy pobre. También se observó que las cepas son capaces de modificar el pH final, reduciendo su valor.

Santiago-Martínez *et al.* (1993) confirmaron que esta especie se asocia con *Pinus montezumae* al confrontarlos en síntesis *in vitro*.

Scleroderma polyrrhizum

El género *Scleroderma* produce esporocarpos macroscópicos globosos entre el pasto, en la hojarasca o en el suelo, en áreas adyacentes a los bosques. Sus cuerpos fructíferos son secos, y se rompen cuando maduran, dispersando las basidiosporas con el viento. Existen especies que son de vida libre o saprobias que cuando se encuentran con algún hospedero son capaces de formar ectomicorrizas. Los esporocarpos aparecen en los estados tempranos de la sucesión de los bosques (Mason *et al.*, 1983) y se asocian con una gama amplia de hospederos, además de no presentar especificidad por una especie en particular (Jeffries, 1999).

La única cepa aislada de Tlaxcala, corresponde con *S. polyrrhizum*. Su mayor crecimiento colonial y biomasa se obtuvieron en los medios de BAF y PDA. Esta cepa no crece en medios con pH de 3, aunque su mejor crecimiento lo obtiene en pH de 5 y 6. Esta cepa modifica el pH del medio, aumentando los valores de 3, 4 y 5, y disminuyendo los de 6 a 8. Esta cepa también podría tener gran potencial para ser inoculada en plántulas en vivero, sin embargo, su distribución en el estado es muy limitada.

Rhizopogon

La cepa perteneciente al género *Rhizopogon* presentó buen crecimiento en condiciones asépticas, con un pH óptimo entre 5 y 6. Cambia el valor de pH final, aumentando el pH de 3, pero

disminuyéndolo en los medios con pH de 4 a 8. Las micorrizas obtenidas en la síntesis *in vitro* con *P. montezumae* fueron abundantes, de dicotómicas a coraloides y con abundantes rizomorfo

Navarro (2000) inoculó plantas de *P. montezumae* con micelio de la cepa TLAX 28 en vivero, observando que este hongo fue desplazado por las especies del vivero, ya que al revisar el sistema radical se observaron pocas micorrizas coraloides típicas de este hongo, pero gran cantidad de raíces dicotómicas (de los hongos del vivero), por lo que se considera que esta cepa es poco competitiva con los hongos presentes en el vivero.

El género presenta amplia distribución en varios países, coincidiendo con la de las Pináceas. Se ha encontrado en diversos hábitats, desde los bosques húmedos y fríos del litoral, hasta los bosques secos del interior (Molina *et al.*, 1999). Son hongos que se desarrollan rápidamente sobre las raíces de las plántulas en lugares perturbados, producen abundantes esporocarpos, son fáciles de aislar y manipular en cultivo puro, y tienen alto potencial para producir inóculos esporales (Theodorou y Bowen, 1973; Torres y Honrubia, 1994; Parladé *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 1997) Molina *et al.* (1999) los proponen como buenos candidatos para la inoculación de plántulas utilizadas en programas de reforestación. Sin embargo, en Tlaxcala y el resto del país se tienen pocos registros de *Rhizopogon*, debido probablemente a que son hongos hipogeos, difíciles de localizar en campo

Suillus

Es de gran utilidad conocer los hongos ectomicorrizógenos que pueden ser susceptibles de ser manejados en el laboratorio; en nuestra experiencia se encontró que las cepas del género *Suillus* son las más fáciles de obtener y manejar bajo condiciones asépticas, con buen crecimiento en diferentes medios de cultivo, encontrándose que los que ofrecen mejores condiciones para el crecimiento de la colonia son el PDA y BAF. El pH óptimo para el buen desarrollo de las cepas va de 4 a 6, pero la mayoría de cepas no crecen en pH de 8. Todas las cepas modifican el valor de pH del medio, disminuyéndolo en todos los casos. Las cepas de este género presentaron tolerancia al benomil, lo que quiere decir que son capaces de soportar aplicaciones de este compuesto en vivero, cuando las plantas son fumigadas. Además, las cepas de *Suillus* soportan altas concentraciones de cloruro de sodio, lo que les da potencial para la reforestación en suelos salinos.

Este género se encuentra en forma abundante en los bosques de Tlaxcala, destacando las siguientes especies: *S. glandulosipes*, *S. pseudobrevipes* y *S. tomentosus*. Al confrontar algunas cepas con *Pinus cembroides* y *P. montezumae* se obtuvieron buenos niveles de micorrización, las cuales presentaron una morfología desde dicotómica hasta coraloides. Presentan también numerosos cordones rizomórficos lo que podría conferirles un alto potencial de exploración del suelo. Por estas razones, se pueden recomendar ampliamente para realizar pruebas de vivero y campo.

La diferencia que se observó en las micorrizas formadas entre *P. montezumae* y las cepas de *Suillus* radica en el tamaño del sistema micorrízico, detectándose que los sistemas de *S. tomentosus* son más pequeños, los de *Suillus* cf. *pseudobrevipes* son de tamaño intermedio y los de *S. glandulosipes* más grandes.

Por otro lado, al comparar las micorrizas formadas por *Suillus tomentosus* con *P. cembroides* y *P. montezumae*, los sistemas micorrízicos formados con las primeras plantas son más grandes, además de presentar las puntas no ramificadas de torcidas a tortuosas, mientras que *P. montezumae* las presentó de rectas a redondeadas.

Al comparar la estructura de las ectomicorrizas obtenidas en este trabajo con las reportadas para otras combinaciones de *Pinus* y *Suillus*, se pudo observar que la ramificación de simple hasta coraloide ya se había descrito en otras micorrizas (Palm y Stewart, 1984; Treu, 1990a; True, 1990b; Torres, 1992; Santiago Martínez, 1992)

La forma tortuosa de las ramificaciones de la combinación de *P. cembroides* con *S. tomentosus* es similar a la observada en micorrizas de *P. patula* con *S. brevipes* (Mohan et al., 1993a). Además, el rizomorfo altamente diferenciado encontrado en este trabajo, también se había reportado en algunas micorrizas formadas por hongos de este género reportadas por Agerer (1995)

Los hongos de este género también se pueden utilizar para hacer inoculaciones esporales, ya que se ha observado que producen gran cantidad de esporas, las cuales son capaces de inducir una buena micorrización en ensayos de vivero utilizando como sustrato tepetate o mezclas de tepetate con suelo forestal 1:1 (Xochitiotzi, 2000).

A continuación se enumeran las características observadas en las especies estudiadas de Tlaxcala:

S. cothurnatus var hiemalis

Presenta su mayor diámetro colonial en PDA y BAF, y su mayor biomasa en BAF. Es tirosinasa dominante; no degrada pectina, lípidos, urea ni almidón; degrada débilmente los casaminoácidos. No se desarrolla en temperaturas de 7 y 30 °C. Es sensible a la cicloheximida y al rosa de bengala, semitolerante al benomil y tolerante al verde de malaquita y al cloruro de sodio.

S. glandulosipes

La mayor velocidad de crecimiento de esta especie se obtuvo en PDA. Crecen bien en los pH de 3 a 7, mientras que en 8, sólo una cepa creció ligeramente. Las cepas modificaron el pH inicial del medio disminuyendo sus valores, con excepción del medio con el pH de 3, el cual aumentaron.

Son capaces de producir lacasa y tirosinasa ubicándose en el grupo equivalente para estas enzimas. No degrada pectina, lípidos ni almidón, pero en la gelatina presenta respuestas desde negativa a débilmente positivas. Su respuesta ante los casaminoácidos es variable: negativa, débil o moderadamente positivas. Es ureasa negativa a débilmente positiva. Son sensibles a 7°C y no crecen a 30 °C. Son sensibles a la cicloheximida, tolerantes al benomil, al verde de malaquita y al cloruro de sodio; y semitolerantes a tolerantes al rosa de bengala.

El micelio de estos hongos produce abundantes micorrizas al asociarse con *Pinus montezumae* y *P. cembroides*, las cuales presentan una morfología desde dicotómica hasta coraloide con abundantes rizomorfos.

Navarro (2000) reportó una micorrización de pobre (6 meses) a moderada (12 meses), al inocular *P. montezumae* con la cepa TLAX 10. además en este ensayo se pudo observar que el hongo fue competitivo con los hongos de vivero

Estos hongos también producen gran cantidad de esporas, que al teñirse con MTT y hematoxilina dan porcentajes desde 24 hasta 33.5% de esporas activas y desde 21.6 hasta 57.2 de núcleos teñidos. Al utilizar estas esporas para inocular plantas de *P. montezumae*, utilizando suelo procedente de los Cerros Blancos como sustrato, se encontraron porcentajes de micorrización desde 0 hasta 23.1 %, predominando las raíces con porcentajes de micorrización bajos (2.4 a 7.8 %).

S. lakei

Este hongo se aisló de un bosque de *Pseudotsuga*. Solamente se realizaron pruebas fisiológicas y bioquímicas a la cepa aislada, encontrando que no produce lacasa ni tirosinasa; tampoco degrada pectina, lípidos, gelatina, casaminoácidos, urea ni almidón. Crece bien a 7 ° C, pero es inhibido a 30 °C. Es sensible a la cicloheximida y tolerante al benomil, al rosa de bengala, al verde de malaquita y al cloruro de sodio.

S. tomentosus

Esta especie presentó su mayor velocidad de crecimiento, diámetro colonial y biomasa en PDA. Las cepas crecen mejor en medios con pH de 4 a 6 y disminuyen el pH del medio después de 30 días de incubación.

La especie es lacasa dominante o negativa, degrada débilmente pectina o no, no produce lipasas, ureasas, ni amilasas, degrada moderadamente la gelatina, y débilmente los casaminoácidos. Es sensible a 7 °C y no crece a 30 °C. Es tolerante al benomil, rosa de bengala, verde de malaquita y cloruro de sodio, y semitolerante a tolerante a la cicloheximida.

Al confrontar la cepa TLAX 24 con *P. montezumae*, se obtuvieron abundantes micorrizas las cuales tienen una morfología parecida a otras confrontaciones de cepas de *Suillus* con esta planta

Xochitiotzin (2000) reportó que *Suillus tomentosus* presenta 55.2 % de esporas teñidas con MTT y 74.7 % de esporas con núcleos teñidos a los 30 días de estar almacenadas, reduciendo los porcentajes a 21.4 % y 12.7 % respectivamente, a los 90 días de almacenamiento a 4 °C. Asimismo, al inocular estas esporas en *P. montezumae* se obtuvo una micorrización excelente en tepetate, mientras que una buena micorrización en una mezcla de tepetate y suelo forestal.

Suillus cf. pseudobrevipes

Las cepas de esta especie presentaron resultados muy diferentes, posiblemente porque provienen de sitios con condiciones ambientales diferentes: el cerro Tepeticpac y los bosques de Españita. La cepa TLAX 33 obtiene los mayores valores de las variables de crecimiento en el PDA, mientras que la TLAX 36 los presentó en EMA, PDA y SAB; además esta cepa no creció en los medios de HG y MNM.

Son consistentes en las pruebas fisiológicas y bioquímicas, al presentar respuestas negativas con la pectina, lípidos, gelatina y almidón, ser sensibles a los 30 °C y tolerantes al benomil, rosa de bengala y cloruro de sodio. No obstante, son inconsistentes en sus respuestas para evidenciar producción de lacasas y tirosinasas y de degradación de los casaminoácidos y urea. Es semitolerante a tolerante a temperaturas de 7°C, sensible a tolerante a la cicloheximida y de semitolerante a tolerante con el verde de malaquita.

Esta especie se asocia con *P. montezumae* en ensayos de síntesis *in vitro*, presentando la morfología típica del género

Suillus cf. unicolor

Sólo se estudió una cepa, a la cual se le realizaron pruebas fisiológicas y bioquímicas, encontrando que es tirosinasa dominante, no produce pectinasas, ureasas, ni amilasas, degrada moderadamente los lípidos y la gelatina, y débilmente los casaminoácidos. Es sensible a 7 °C y no crece a 30 °C. Es sensible a la cicloheximida, semitolerante al verde de malaquita y tolerante al benomil, rosa de bengala y cloruro de sodio.

Adicionalmente, se estudiaron tres cepas de *Suillus* sp., encontrando que la cepa TLAX 32 obtiene su mayor velocidad de crecimiento y diámetro colonial en el medio EMA, y su mayor biomasa en el SAB. No crece a pH de 3 y 8, y obtiene su mayor velocidad de crecimiento, diámetro colonial y biomasa en los medios con pH de 6. Esta cepa disminuye el pH de los medios donde crece. La cepa

TLAX 20 tiene buen crecimiento en los pH de 4 a 6 y su mayor diámetro colonial y biomasa en el pH de 6. Los valores de pH de 4 a 8 los disminuye con su crecimiento y aumenta el de 3

Las tres cepas respondieron negativamente a la pectina, los lípidos y el almidón y no crecieron a 30 °C. Son asimismo, sensibles a la cicloheximida y tolerantes al benomil y al cloruro de sodio. Las respuestas a otras pruebas fueron muy variables.

Terfezia olbiensis

Terfezia olbiensis es un hongo hipogeo que se encuentra en hábitats xerofíticos asociado con arbustos de la familia Cistaceae, formando endo y ectendomicorriza con ellos (Awamed, 1981; Dexheimer *et al.*, 1985; Morte y Honrubia, 1995; Taylor *et al.*, 1995; Bratek *et al.*, 1996; Leduc *et al.*, 1986). La cepa TLAX 16 alcanzó su mayor crecimiento en el medio BAF. Sin embargo, produjo la mayor biomasa en MNM; además, esta cepa no crece a pH ácidos de 3 y 4, encontrando que aumenta su crecimiento conforme aumenta el pH del medio. Presentó su mayor crecimiento en medios con pH de 8. Este hongo disminuye el pH inicial de los medios a valores más bajos.

Terfezia olbiensis fue capaz de colonizar la raíz de *Pinus cembroides*, pero en esta micorriza no se observó cambio en la morfología de la raíz; sin embargo, se pudo observar un manto muy delgado, hialino y discontinuo, células taniníferas bien definidas y una red de Hartig que penetró de 3 a 4 capas de células.

Selección de hongos para reforestación

La utilización de cepas exóticas para realizar inoculaciones de plantas de interés forestal no es recomendable, debido a que estas cepas están condicionadas a los lugares de donde fueron extraídas, con características ambientales muy diferentes a las que se encuentran en nuestro país.

Le tacón *et al.* (1992) mencionaron que la técnicas para producción de plántulas colonizadas con hongos ectomicorizógenos están disponibles para su uso en viveros tradicionales después de fumigar el suelo, o para la producción de plántulas micorrizadas en contenedores, utilizando sustratos artificiales.

No obstante, para hacer una buena selección de los hongos que puedan servir para micorrizar plantas que toleren el estrés de los lugares con disturbio, es necesario evaluar los efectos de varios simbiontes fúngicos que hayan sido extraídos de bosques jóvenes (Kropáček, 1992)

CONCLUSIONES GENERALES

- Las cepas de *Suillus* son susceptibles de utilizarse como inóculo, debido a que las especies de este género son abundantes en el campo, son fáciles de aislar y manipular en el laboratorio, se asocian a *Pinus cembroides*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* formando abundantes micorrizas, son capaces de tolerar ciertas concentraciones de benomil en las fumigaciones del vivero, también soporta suelos salinos. Para realizar inoculaciones, se puede utilizar inóculo miceliar o esporal y lo más importante es que podrían ser una alternativa alimenticia.
- La cepa de *Terfezia olbiensis* podría ser buen candidato para hacer pruebas de inoculación miceliar debido a que es una cepa que se puede asociar a plantas de *P. cembroides* y además soporta suelos alcalinos
- El género *Inocybe*, es de gran importancia por su característica pionera en los ecosistemas forestales; además, es conveniente considerar a las especies de este género para la recuperación de ciertos tipos de suelos como el del cerro Tepeticpac que tiene condiciones alcalinas con abundantes carbonatos, ya que en este lugar se encuentran cuerpos fructíferos en grandes cantidades, pudiéndose considerar como fuente de inóculo esporal. Desafortunadamente comprende muchas especies tóxicas.
- Las especies de *Laccaria* también pueden ser una buena opción para producir inóculos tanto esporales como miceliares. son hongos comestibles que se encuentran en los bosques jóvenes asociado con una gama amplia de hospederos.
- *Pisolithus tinctorius* es una especie que se ha trabajado mucho en otros países, en donde se ha comprobado su utilidad en programas de inoculación en vivero, sin embargo, es necesario estudiar más las cepas mexicanas.
- El género *Scleroderma* podría tener potencial para realizar inoculaciones, esto podría ser a partir de micelio porque crece relativamente rápido en los medios de BAF o PDA, o a partir de esporas ya que los cuerpos fructíferos las producen en gran cantidad.
- El género *Rhizopogon* es recomendado ampliamente para realizar inoculaciones esporales o miceliares; sin embargo, en nuestro territorio, los cuerpos fructíferos se encuentran de una manera muy esporádica y puntual por lo que se han realizado pocos estudios con estos hongos.
- El género *Amanita* es difícil de trabajar, pero las cepas que se tienen se pueden explotar por algunas de sus características como la de soportar ciertas concentraciones de salinidad.
- El estudio de los hongos del género *Boletus* es difícil de estudiar por la dificultad que se tiene para su aislamiento, por lo que sería conveniente investigar este género utilizando otros procedimientos

- La mayoría de los hongos que nos han dado buenos resultados en el aislamiento, repropagación, síntesis *in vitro*, o en su caso inoculaciones esporales pertenecen a los bosques en estados juveniles.
- Las pruebas fisiológicas y bioquímicas realizadas a las cepas de *Amanita* y *Suillus* nos pueden servir como herramienta taxonómica para estos dos géneros.
- El hecho de realizar la caracterización de las micorrizas obtenidas en síntesis *in vitro* es de gran utilidad para que posteriormente se puedan identificar las micorrizas de los hongos utilizados, en vivero y/o campo

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En este capítulo se discuten los resultados obtenidos en cada especie de hongo estudiado, tomando en cuenta cada una de las pruebas realizadas.

DISCUSIÓN GENERAL

CARACTERÍSTICAS DE LOS TAXA ESTUDIADOS

El estudio de la biología de los hongos ectomicorrizógenos es de suma importancia, ya que nos indica de alguna manera el comportamiento que estos organismos pueden tener ante condiciones de pH o temperaturas extremas, su potencial de asimilación de diferentes compuestos, la posibilidad para reproducirlos masivamente, lo más importante, su capacidad para asociarse con diferentes hospederos. Con estos estudios, podemos tener la pauta para hacer recomendaciones sobre su uso en inoculaciones de vivero y/o campo.

Amanita

El género *Amanita* es un grupo de hongos que tiene más de 400 especies descritas (Singer, 1986) Contiene especies comestibles como *A. caesarea* y tóxicas como *A. phalloides*. Muchas de sus especies son micorrizógenas; sin embargo también existen especies que no desarrollan micorrizas pues se han encontrado en lugares sin vegetación arbórea (Yang *et al.*, 1999)

La mayoría de las cepas presentan tolerancia al cloruro de sodio, lo que quiere decir que ciertas cepas se podrían utilizar en suelos con problemas de salinidad También presentaron su mayor crecimiento a 25 °C, aunque la TLAX 41 creció a 7 °C; ninguna se desarrolló a temperaturas de 30 °C. La mayoría son capaces de degradar gelatina, lípidos y urea. Además de ser tirosinasa dominantes.

El cultivo de cepas de este género es limitado, ya que se ha intentado aislar algunos ejemplares pero no crecen en los medios de cultivo o si crecen, cuando se reaísle la colonia ya no se desarrolla, esto se puede deber a que los requerimientos de muchas especies de *Amanita* son complejos y no han sido definidos con precisión (Yang *et al.*, 1999). Por esta razón, solamente se cuenta con 8 cepas de este género, de los cuales 4 son de *A. muscaria*, una de *A. rubescens*, otra de *A. pantherina*, una que pertenece a la sección *Vaginata* y una sin identificar.

Amanita muscaria

Es un hongo que tiene amplia distribución y se asocia con diferentes plantas de importancia forestal (Yang *et al.*, 1999), también se ha encontrado en bosques maduros (Last *et al.*, 1984); su aislamiento es relativamente fácil, favoreciendo su crecimiento los medios de PDA, EMA y BAF. El crecimiento de esta especie es más lento que el de las especies de *Suillus* o *Laccaria*, por lo que para reproducirla masivamente se requiere de mayor tiempo.

Por otro lado, se determinó que las cepas probadas no crecen a pH de 3 y 8, pero sí en los medios con pH de 4 a 7, observándose su mayor crecimiento en los valores de 4 y 6; *Amanita muscaria* es capaz de modificar el pH final del medio en donde crece, aumentándolo a los pH de 3 y 4, y disminuyéndolo en los medios con pH de 5 a 8.

Las cepas probadas son tirosinasa dominante, no produce pectinasas ni amiliasas, generalmente degradan fuertemente a los lípidos, de moderada a fuertemente a la gelatina, degradan en diferentes intensidades a los casaminoácidos y débilmente a la urea; son sensibles a la temperatura de 7°C aunque la cepa TLAX 41 crece más en esta temperatura que en el control. No crecen a 30 °C; son tolerantes al rosa de bengala y muestran diferentes respuestas con la cicloheximida, el verde de malaquita y el cloruro de sodio.

Amanita pantherina

Es una especie más difícil de aislar en el laboratorio que *A. muscaria*, únicamente se cuenta con una cepa, la cual crece en MNM y HG, aunque su mayor diámetro lo alcanza en MNM. Su mayor biomasa la obtiene en HG.

Amanita rubescens

Está representada por una cepa, la cual presenta su mejor crecimiento en PDA y BAF. Es una cepa tirosinasa dominante; no degrada lípidos, pectina, ni almidón; es la única cepa de *Amanita* que acidificó el medio complementado con casaminoácidos, produce débilmente ureasas y gelatinasas y no crece a temperaturas extremas de 7 y 30 °C. Es sensible al benomil, semitolerante a la cicloheximida, al rosa de bengala y al verde de malaquita, y tolerante al cloruro de sodio.

Amanita spp.

Se cuenta con dos cepas, de las cuales sólo se estudió su comportamiento fisiológico y bioquímico. La TLAX 4, que pertenece a la sección *Vaginata*, es lacasa dominante, no degrada pectina, almidón ni casaminoácidos; degrada fuertemente a la gelatina y a los lípidos, pero débilmente a la urea. Es sensible a 7°C y no crece a 30 °C. Es tolerante al benomil, rosa de bengala, verde de malaquita y cloruro de sodio, y semitolerante a la cicloheximida. Por otro lado, la cepa TLAX 47 es lacasa dominante, no degrada lípidos, pectina, casaminoácidos ni almidón; degrada fuertemente a la gelatina y moderadamente a la urea. No crece a 7 y 30 °C y es sensible a la cicloheximida, semitolerante al rosa de bengala y al verde de malaquita, y tolerante al benomil y al cloruro de sodio.

Amanita caesarea

Esta especie no creció en condiciones axénicas, a pesar de que se realizaron varios intentos; en algunos aislamientos aparentemente comenzaba a crecer la colonia, pero al resembrarla ya no se

desarrolló. Hacskeylo y Palmer, (1955) señalaron haber logrado el aislamiento de *A. caesarea*, sin embargo, no mencionan el medio de cultivo en el cual creció, por lo que sería conveniente probar otras composiciones de los medios de cultivo.

Al estudiar la viabilidad y la actividad de las esporas de este hongo se pudo advertir que no respondieron al proceso de tinción. Asimismo, al probar el inóculo esporal con plántulas de *Pinus montezumae* se percibió que las esporas no fueron capaces de inducir la formación de micorrizas. Esta especie pertenece a estados sucesionales de bosques maduros y viejos (Last *et al.*, 1984, 1987; Molina *et al.*, 1992 a, 1992 b) y se encuentra en la NOM-Ecol-059-94 como una especie sujeta a protección especial (CONABIO, 1994).

Boletus

Los hongos de este género se encuentran en los estados sucesionales de bosques maduros a viejos (Last *et al.*, 1984, 1987; Molina *et al.*, 1992 a, 1992 b). Son difíciles de aislar, ya que no crecieron en los medios probados o solo desarrollan algunas hifas, pero al resembrarlas ya no siguen creciendo, perdiéndose la colonia. En este trabajo, sólo se logró el aislamiento de la cepa TLAX 8, en la cual se pudo observar un crecimiento limitado en todos los medios probados (EMA, PDA, MNM, HG, BAF, SAB y HG), presentando su mayor crecimiento en EMA.

Por otro lado, las esporas de *Boletus edulis* se sometieron a tinción con sales de tetrazolio, pero no se lograron teñir, indicando que no hay esporas activas o algún factor está interfiriendo con el proceso de tinción. Así mismo, el inóculo esporal se usó en plantas de *P. montezumae*, pero al igual que con *Amanita caesarea* no se detectó formación de micorrizas.

Inocybe

La mayoría de las especies de este género se consideran pioneras ya que se asocian con plantas de bosques jóvenes (Last *et al.*, 1984, 1987; Molina *et al.*, 1992 a, 1992 b). No se cuenta con ninguna cepa, debido a que por lo general son hongos muy pequeños, que presentan contextos muy delgados, por lo cual al intentar aislarlos los medios de cultivo se contaminan fácilmente con bacterias.

Se han encontrado grandes cantidades de cuerpos fructíferos de *I. dulcamara* e *I. griseovelata*, en un lugar que fue reforestado en 1989, ubicado en el cerro Tepeticpac, Tlaxcala. Con estos hongos se prepararon inóculos esporales, a los cuales se les realizaron tinciones con MTT y hematoxilina, encontrándose hasta casi el 83 % de esporas activas y del 24 al 40 % de esporas viables.

Estos inóculos se probaron con *P. montezumae*, utilizando suelo con pH alcalino extraído del mismo lugar de donde se aislaron los hongos, pero mezclado con suelo forestal. Se encontraron porcentajes

de micorrización desde el 12 hasta el 45 % con *I. griseovelata*, mientras que con *I. dulcamara* algunas plantas inoculadas no presentaron micorrizas, o si estaban colonizadas se detectaron porcentajes de micorrización muy bajos (1.3%). Así las especies de *Inocybe* estudiadas son capaces de desarrollarse y formar micorrizas a pesar de las condiciones de alcalinidad del suelo estudiado. Además, Xochitiotzin (2000) encontró hasta el 75 % de raíces colonizadas en *P. montezumae* inoculado con esporas de *I. griseovelata* en una mezcla de tepetate con suelo forestal.

Aunque la mayor parte de especies de este género son tóxicas, es bueno considerar a las especies de este género en especial a *Inocybe griseovelata*, para la recuperación de cierto tipo de suelos debido a su capacidad para tolerar pH alcalinos.

Laccaria

Es un hongo común y cosmopolita, frecuentemente asociado con numerosas especies de árboles, incluyendo plantas de importancia económica; su manipulación en el laboratorio es sencilla, por lo que se han podido realizar numerosos estudios de sistemática y biogeografía, así como de interfertilidad y análisis de divergencia genética (Gardes *et al.*, 1990, 1991; Mueller, 1991, 1992; Mueller y Gardes, 1991; Mueller y Amirati, 1993; Albee *et al.*, 1996; Kropp 1997). También se han realizado numerosas pruebas de síntesis *in vitro* para probar su habilidad para asociarse con una amplia gama de hospederos (Mueller, 1992). Por otro lado, algunas especies de *Laccaria* son especies pioneras y otras se han encontrado en lugares con disturbio o asociadas con rodales jóvenes (Kroop y Mueller, 1999). Sin embargo, es un hongo pequeño con un contexto muy delgado que si no se aísla cuidadosamente los cultivos por lo general crecen asociados con bacterias siendo particularmente difícil purificar la colonia.

En el presente estudio, se obtuvo solo una cepa de *Laccaria bicolor* la cual tuvo su mayor diámetro colonial en el medio EMA, aunque su mayor biomasa la produjo en BAF y SAB.

Se encontró que la cepa trabajada no crece en medio con pH de 3 y su mayor crecimiento lo presenta en los pH de 5 a 7. Esta cepa es capaz de modificar el pH final de los medios, detectándose que en los medios con pH de 3 a 5 lo aumenta y en los de 6 a 8 lo disminuye.

También se comprobó la capacidad de *Laccaria bicolor* para asociarse con *Pinus montezumae*, mostrando una morfología de simple a dicotómica, con una coloración café clara.

Pisolithus arrhizus

Este hongo tiene amplia distribución, se asocia con diferentes árboles de importancia forestal, principalmente con plantas jóvenes y en hábitats perturbados, por lo que ha sido ampliamente

utilizado en los programas de inoculación de plantas forestales (Marx y Kenney 1982). Su crecimiento en laboratorio es relativamente fácil y rápido, lo que ha permitido realizar gran número de estudios fisiológicos, ecológicos, de especificidad de hospederos, de síntesis *in vitro* bajo condiciones controladas para conocer mejor los mecanismos genéticos que regulan el desarrollo de la interacción, así como las respuestas del crecimiento del hospedero (Chambers y Cairney, 1999).

Se ha considerado uno de los hongos ectomicorrizógenos con mayor potencial en los programas de reforestación. Sin embargo, en el estado de Tlaxcala su distribución es limitada. La cepa TLAX 37 obtuvo su mayor tasa de crecimiento en PDA, pero su mayor biomasa en BAF. Se ha observado que el micelio vegetativo de las cepas mexicanas crece mejor en los medios de BAF, MNM y PDA.

En cuanto al pH, las cepas estudiadas presentan buen crecimiento en medios con pH de 5 y 6, mientras que en pH 8 su crecimiento es muy pobre. También se observó que las cepas son capaces de modificar el pH final, reduciendo su valor.

Santiago-Martínez *et al.* (1993) confirmaron que esta especie se asocia con *Pinus montezumae* al confrontarlos en síntesis *in vitro*.

Scleroderma polyrrhizum

El género *Scleroderma* produce esporocarpos macroscópicos globosos entre el pasto, en la hojarasca o en el suelo, en áreas adyacentes a los bosques. Sus cuerpos fructíferos son secos, y se rompen cuando maduran, dispersando las basidiosporas con el viento. Existen especies que son de vida libre o saprobias que cuando se encuentran con algún hospedero son capaces de formar ectomicorrizas. Los esporocarpos aparecen en los estados tempranos de la sucesión de los bosques (Mason *et al.*, 1983) y se asocian con una gama amplia de hospederos, además de no presentar especificidad por una especie en particular (Jeffries, 1999).

La única cepa aislada de Tlaxcala, corresponde con *S. polyrrhizum*. Su mayor crecimiento colonial y biomasa se obtuvieron en los medios de BAF y PDA. Esta cepa no crece en medios con pH de 3, aunque su mejor crecimiento lo obtiene en pH de 5 y 6. Esta cepa modifica el pH del medio, aumentando los valores de 3, 4 y 5, y disminuyendo los de 6 a 8. Esta cepa también podría tener gran potencial para ser inoculada en plántulas en vivero, sin embargo, su distribución en el estado es muy limitada.

Rhizopogon

La cepa perteneciente al género *Rhizopogon* presentó buen crecimiento en condiciones asépticas, con un pH óptimo entre 5 y 6. Cambia el valor de pH final, aumentando el pH de 3, pero

disminuyéndolo en los medios con pH de 4 a 8. Las micorrizas obtenidas en la síntesis *in vitro* con *P. montezumae* fueron abundantes, de dicotómicas a coraloides y con abundantes rizomorfos

Navarro (2000) inoculó plantas de *P. montezumae* con micelio de la cepa TLAX 28 en vivero, observando que este hongo fue desplazado por las especies del vivero, ya que al revisar el sistema radical se observaron pocas micorrizas coraloides típicas de este hongo, pero gran cantidad de raíces dicotómicas (de los hongos del vivero), por lo que se considera que esta cepa es poco competitiva con los hongos presentes en el vivero.

El género presenta amplia distribución en varios países, coincidiendo con la de las Pináceas. Se ha encontrado en diversos hábitats, desde los bosques húmedos y fríos del litoral, hasta los bosques secos del interior (Molina *et al.*, 1999). Son hongos que se desarrollan rápidamente sobre las raíces de las plántulas en lugares perturbados, producen abundantes esporocarpos, son fáciles de aislar y manipular en cultivo puro, y tienen alto potencial para producir inóculos esporales (Theodorou y Bowen, 1973; Torres y Honrubia, 1994; Parladé *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 1997) Molina *et al.* (1999) los proponen como buenos candidatos para la inoculación de plántulas utilizadas en programas de reforestación. Sin embargo, en Tlaxcala y el resto del país se tienen pocos registros de *Rhizopogon*, debido probablemente a que son hongos hipogeos, difíciles de localizar en campo

Suillus

Es de gran utilidad conocer los hongos ectomicorrizógenos que pueden ser susceptibles de ser manejados en el laboratorio; en nuestra experiencia se encontró que las cepas del género *Suillus* son las más fáciles de obtener y manejar bajo condiciones asépticas, con buen crecimiento en diferentes medios de cultivo, encontrándose que los que ofrecen mejores condiciones para el crecimiento de la colonia son el PDA y BAF. El pH óptimo para el buen desarrollo de las cepas va de 4 a 6, pero la mayoría de cepas no crecen en pH de 8. Todas las cepas modifican el valor de pH del medio, disminuyéndolo en todos los casos. Las cepas de este género presentaron tolerancia al benomil, lo que quiere decir que son capaces de soportar aplicaciones de este compuesto en vivero, cuando las plantas son fumigadas. Además, las cepas de *Suillus* soportan altas concentraciones de cloruro de sodio, lo que les da potencial para la reforestación en suelos salinos.

Este género se encuentra en forma abundante en los bosques de Tlaxcala, destacando las siguientes especies: *S. glandulosipes*, *S. pseudobrevipes* y *S. tomentosus*. Al confrontar algunas cepas con *Pinus cembroides* y *P. montezumae* se obtuvieron buenos niveles de micorrización, las cuales presentaron una morfología desde dicotómica hasta coraloides. Presentan también numerosos cordones rizomórficos lo que podría conferirles un alto potencial de exploración del suelo. Por estas razones, se pueden recomendar ampliamente para realizar pruebas de vivero y campo.

La diferencia que se observó en las micorrizas formadas entre *P. montezumae* y las cepas de *Suillus* radica en el tamaño del sistema micorrízico, detectándose que los sistemas de *S. tomentosus* son más pequeños, los de *Suillus* cf. *pseudobrevipes* son de tamaño intermedio y los de *S. glandulosipes* más grandes.

Por otro lado, al comparar las micorrizas formadas por *Suillus tomentosus* con *P. cembroides* y *P. montezumae*, los sistemas micorrízicos formados con las primeras plantas son más grandes, además de presentar las puntas no ramificadas de torcidas a tortuosas, mientras que *P. montezumae* las presentó de rectas a redondeadas.

Al comparar la estructura de las ectomicorrizas obtenidas en este trabajo con las reportadas para otras combinaciones de *Pinus* y *Suillus*, se pudo observar que la ramificación de simple hasta coraloide ya se había descrito en otras micorrizas (Palm y Stewart, 1984; Treu, 1990a; True, 1990b; Torres, 1992; Santiago Martínez, 1992)

La forma tortuosa de las ramificaciones de la combinación de *P. cembroides* con *S. tomentosus* es similar a la observada en micorrizas de *P. patula* con *S. brevipes* (Mohan et al., 1993a). Además, el rizomorfo altamente diferenciado encontrado en este trabajo, también se había reportado en algunas micorrizas formadas por hongos de este género reportadas por Agerer (1995)

Los hongos de este género también se pueden utilizar para hacer inoculaciones esporales, ya que se ha observado que producen gran cantidad de esporas, las cuales son capaces de inducir una buena micorrización en ensayos de vivero utilizando como sustrato tepetate o mezclas de tepetate con suelo forestal 1:1 (Xochitiotzi, 2000).

A continuación se enumeran las características observadas en las especies estudiadas de Tlaxcala:

S cothurnatus var hiemalis

Presenta su mayor diámetro colonial en PDA y BAF, y su mayor biomasa en BAF. Es tirosinasa dominante; no degrada pectina, lípidos, urea ni almidón; degrada débilmente los casaminoácidos. No se desarrolla en temperaturas de 7 y 30 °C. Es sensible a la cicloheximida y al rosa de bengala, semitolerante al benomil y tolerante al verde de malaquita y al cloruro de sodio.

S. glandulosipes

La mayor velocidad de crecimiento de esta especie se obtuvo en PDA. Crecen bien en los pH de 3 a 7, mientras que en 8, sólo una cepa creció ligeramente. Las cepas modificaron el pH inicial del medio disminuyendo sus valores, con excepción del medio con el pH de 3, el cual aumentaron.

Son capaces de producir lacasa y tirosinasa ubicándose en el grupo equivalente para estas enzimas. No degrada pectina, lípidos ni almidón, pero en la gelatina presenta respuestas desde negativa a débilmente positivas. Su respuesta ante los casaminoácidos es variable: negativa, débil o moderadamente positivas. Es ureasa negativa a débilmente positiva. Son sensibles a 7°C y no crecen a 30 °C. Son sensibles a la cicloheximida, tolerantes al benomil, al verde de malaquita y al cloruro de sodio; y semitolerantes a tolerantes al rosa de bengala.

El micelio de estos hongos produce abundantes micorrizas al asociarse con *Pinus montezumae* y *P. cembroides*, las cuales presentan una morfología desde dicotómica hasta coraloide con abundantes rizomorfos.

Navarro (2000) reportó una micorrización de pobre (6 meses) a moderada (12 meses), al inocular *P. montezumae* con la cepa TLAX 10. además en este ensayo se pudo observar que el hongo fue competitivo con los hongos de vivero

Estos hongos también producen gran cantidad de esporas, que al teñirse con MTT y hematoxilina dan porcentajes desde 24 hasta 33.5% de esporas activas y desde 21.6 hasta 57.2 de núcleos teñidos. Al utilizar estas esporas para inocular plantas de *P. montezumae*, utilizando suelo procedente de los Cerros Blancos como sustrato, se encontraron porcentajes de micorrización desde 0 hasta 23.1 %, predominando las raíces con porcentajes de micorrización bajos (2.4 a 7.8 %).

S. lakei

Este hongo se aisló de un bosque de *Pseudotsuga*. Solamente se realizaron pruebas fisiológicas y bioquímicas a la cepa aislada, encontrando que no produce lacasa ni tirosinasa; tampoco degrada pectina, lípidos, gelatina, casaminoácidos, urea ni almidón. Crece bien a 7 ° C, pero es inhibido a 30 °C. Es sensible a la cicloheximida y tolerante al benomil, al rosa de bengala, al verde de malaquita y al cloruro de sodio.

S. tomentosus

Esta especie presentó su mayor velocidad de crecimiento, diámetro colonial y biomasa en PDA. Las cepas crecen mejor en medios con pH de 4 a 6 y disminuyen el pH del medio después de 30 días de incubación.

La especie es lacasa dominante o negativa, degrada débilmente pectina o no, no produce lipasas, ureasas, ni amilasas, degrada moderadamente la gelatina, y débilmente los casaminoácidos. Es sensible a 7 °C y no crece a 30 °C. Es tolerante al benomil, rosa de bengala, verde de malaquita y cloruro de sodio, y semitolerante a tolerante a la cicloheximida.

Al confrontar la cepa TLAX 24 con *P. montezumae*, se obtuvieron abundantes micorrizas las cuales tienen una morfología parecida a otras confrontaciones de cepas de *Suillus* con esta planta

Xochitiotzin (2000) reportó que *Suillus tomentosus* presenta 55.2 % de esporas teñidas con MTT y 74.7 % de esporas con núcleos teñidos a los 30 días de estar almacenadas, reduciendo los porcentajes a 21.4 % y 12.7 % respectivamente, a los 90 días de almacenamiento a 4 °C. Asimismo, al inocular estas esporas en *P. montezumae* se obtuvo una micorrización excelente en tepetate, mientras que una buena micorrización en una mezcla de tepetate y suelo forestal.

Suillus cf. pseudobrevipes

Las cepas de esta especie presentaron resultados muy diferentes, posiblemente porque provienen de sitios con condiciones ambientales diferentes: el cerro Tepeticpac y los bosques de Españita. La cepa TLAX 33 obtiene los mayores valores de las variables de crecimiento en el PDA, mientras que la TLAX 36 los presentó en EMA, PDA y SAB; además esta cepa no creció en los medios de HG y MNM.

Son consistentes en las pruebas fisiológicas y bioquímicas, al presentar respuestas negativas con la pectina, lípidos, gelatina y almidón, ser sensibles a los 30 °C y tolerantes al benomil, rosa de bengala y cloruro de sodio. No obstante, son inconsistentes en sus respuestas para evidenciar producción de lacasas y tirosinasas y de degradación de los casaminoácidos y urea. Es semitolerante a tolerante a temperaturas de 7°C, sensible a tolerante a la cicloheximida y de semitolerante a tolerante con el verde de malaquita.

Esta especie se asocia con *P. montezumae* en ensayos de síntesis *in vitro*, presentando la morfología típica del género

Suillus cf. unicolor

Sólo se estudió una cepa, a la cual se le realizaron pruebas fisiológicas y bioquímicas, encontrando que es tirosinasa dominante, no produce pectinasas, ureasas, ni amilasas, degrada moderadamente los lípidos y la gelatina, y débilmente los casaminoácidos. Es sensible a 7 °C y no crece a 30 °C. Es sensible a la cicloheximida, semitolerante al verde de malaquita y tolerante al benomil, rosa de bengala y cloruro de sodio.

Adicionalmente, se estudiaron tres cepas de *Suillus* sp., encontrando que la cepa TLAX 32 obtiene su mayor velocidad de crecimiento y diámetro colonial en el medio EMA, y su mayor biomasa en el SAB. No crece a pH de 3 y 8, y obtiene su mayor velocidad de crecimiento, diámetro colonial y biomasa en los medios con pH de 6. Esta cepa disminuye el pH de los medios donde crece. La cepa

TLAX 20 tiene buen crecimiento en los pH de 4 a 6 y su mayor diámetro colonial y biomasa en el pH de 6. Los valores de pH de 4 a 8 los disminuye con su crecimiento y aumenta el de 3

Las tres cepas respondieron negativamente a la pectina, los lípidos y el almidón y no crecieron a 30 °C. Son asimismo, sensibles a la cicloheximida y tolerantes al benomil y al cloruro de sodio. Las respuestas a otras pruebas fueron muy variables.

Terfezia olbiensis

Terfezia olbiensis es un hongo hipogeo que se encuentra en hábitats xerofíticos asociado con arbustos de la familia Cistaceae, formando endo y ectendomicorriza con ellos (Awamed, 1981; Dexheimer *et al.*, 1985; Morte y Honrubia, 1995; Taylor *et al.*, 1995; Bratek *et al.*, 1996; Leduc *et al.*, 1986). La cepa TLAX 16 alcanzó su mayor crecimiento en el medio BAF. Sin embargo, produjo la mayor biomasa en MNM; además, esta cepa no crece a pH ácidos de 3 y 4, encontrando que aumenta su crecimiento conforme aumenta el pH del medio. Presentó su mayor crecimiento en medios con pH de 8. Este hongo disminuye el pH inicial de los medios a valores más bajos.

Terfezia olbiensis fue capaz de colonizar la raíz de *Pinus cembroides*, pero en esta micorriza no se observó cambio en la morfología de la raíz; sin embargo, se pudo observar un manto muy delgado, hialino y discontinuo, células taniníferas bien definidas y una red de Hartig que penetró de 3 a 4 capas de células.

Selección de hongos para reforestación

La utilización de cepas exóticas para realizar inoculaciones de plantas de interés forestal no es recomendable, debido a que estas cepas están condicionadas a los lugares de donde fueron extraídas, con características ambientales muy diferentes a las que se encuentran en nuestro país.

Le tacón *et al.* (1992) mencionaron que la técnicas para producción de plántulas colonizadas con hongos ectomicorizógenos están disponibles para su uso en viveros tradicionales después de fumigar el suelo, o para la producción de plántulas micorrizadas en contenedores, utilizando sustratos artificiales.

No obstante, para hacer una buena selección de los hongos que puedan servir para micorrizar plantas que toleren el estrés de los lugares con disturbio, es necesario evaluar los efectos de varios simbiontes fúngicos que hayan sido extraídos de bosques jóvenes (Kropáček, 1992)

CONCLUSIONES GENERALES

- Las cepas de *Suillus* son susceptibles de utilizarse como inóculo, debido a que las especies de este género son abundantes en el campo, son fáciles de aislar y manipular en el laboratorio, se asocian a *Pinus cembroides*, *P. montezumae* y *P. pseudostrobus* formando abundantes micorrizas, son capaces de tolerar ciertas concentraciones de benomil en las fumigaciones del vivero, también soporta suelos salinos. Para realizar inoculaciones, se puede utilizar inóculo miceliar o esporal y lo más importante es que podrían ser una alternativa alimenticia.
- La cepa de *Terfezia olbiensis* podría ser buen candidato para hacer pruebas de inoculación miceliar debido a que es una cepa que se puede asociar a plantas de *P. cembroides* y además soporta suelos alcalinos
- El género *Inocybe*, es de gran importancia por su característica pionera en los ecosistemas forestales; además, es conveniente considerar a las especies de este género para la recuperación de ciertos tipos de suelos como el del cerro Tepeticpac que tiene condiciones alcalinas con abundantes carbonatos, ya que en este lugar se encuentran cuerpos fructíferos en grandes cantidades, pudiéndose considerar como fuente de inóculo esporal. Desafortunadamente comprende muchas especies tóxicas.
- Las especies de *Laccaria* también pueden ser una buena opción para producir inóculos tanto esporales como miceliares. son hongos comestibles que se encuentran en los bosques jóvenes asociado con una gama amplia de hospederos.
- *Pisolithus tinctorius* es una especie que se ha trabajado mucho en otros países, en donde se ha comprobado su utilidad en programas de inoculación en vivero, sin embargo, es necesario estudiar más las cepas mexicanas.
- El género *Scleroderma* podría tener potencial para realizar inoculaciones, esto podría ser a partir de micelio porque crece relativamente rápido en los medios de BAF o PDA, o a partir de esporas ya que los cuerpos fructíferos las producen en gran cantidad.
- El género *Rhizopogon* es recomendado ampliamente para realizar inoculaciones esporales o miceliares; sin embargo, en nuestro territorio, los cuerpos fructíferos se encuentran de una manera muy esporádica y puntual por lo que se han realizado pocos estudios con estos hongos.
- El género *Amanita* es difícil de trabajar, pero las cepas que se tienen se pueden explotar por algunas de sus características como la de soportar ciertas concentraciones de salinidad.
- El estudio de los hongos del género *Boletus* es difícil de estudiar por la dificultad que se tiene para su aislamiento, por lo que sería conveniente investigar este género utilizando otros procedimientos

- La mayoría de los hongos que nos han dado buenos resultados en el aislamiento, repropagación, síntesis *in vitro*, o en su caso inoculaciones esporales pertenecen a los bosques en estados juveniles.
- Las pruebas fisiológicas y bioquímicas realizadas a las cepas de *Amanita* y *Suillus* nos pueden servir como herramienta taxonómica para estos dos géneros.
- El hecho de realizar la caracterización de las micorrizas obtenidas en síntesis *in vitro* es de gran utilidad para que posteriormente se puedan identificar las micorrizas de los hongos utilizados, en vivero y/o campo

LITERATURA CITADA

- Agerer, R., 1987-1991. **Colour Atlas of Ectomycorrhizae**. Einhorn-Verlag. Schwäbisch Gmünd
- Agerer, R., 1991. Characterization of Ectomycorrhiza In: Norris, J. R., D. J. Reid y K. Varma (Eds.). **Methods in Microbiology. Techniques for the Study of Mycorrhiza**. Academic Press, London, New York, 26-64.
- Agerer, R., 1995. Anatomical Characteristic of Identified Ectomycorrhizas: An Attempt Towards a Natural Classification. In: Varma A. y B. Hock. (Eds.) **Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 685-727.
- Aguilar, A. R., L. Varela y Y. A. Carreón, 2002. Estudio Preliminar del Efecto de la Asociación Ectomicorrízica en Etapas Iniciales del Crecimiento de *Pinus michoacana* bajo Condiciones de Vivero. In: Guzmán G. y G. Mata (eds.) **Estudio Sobre los Hongos Latinoamericanos. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología**. Xalapa, Veracruz, 363.
- Albee, S. R., G. M. Mueller y B. R. Kropp, 1996. Polymorphisms in the Large Intergenic Spacer of the Nuclear Ribosomal Repeat Identify *Laccaria proxima* Strains. **Mycologia** 88:970-976.
- Allen, E. B., M. F. Allen D. J. Helm, J. M. Trappe, R. Molina y E. Rincón, 1995. Patterns and Regulation of Mycorrhizal Plant and Fungal Diversity. In: Collins H. P., G. P. Robertson y M. J. Klug (eds). **The Significance and Regulation of Soil Biodiversity**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Álvarez, I., 1985. Producción y Manejo de Inóculo. **Técnicas de Inoculación con MEC**. Informe Provisional No. 8 1985, Ciclo Lectivo Sobre el Tema Técnicas de Investigación en Micorriza. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza-CATIE. 131-136.
- Amaranthus, M. P. y D. A. Perry, 1994. The Functioning of Ectomycorrhizal Fungi in the Field: Linkages in Space and Time. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (eds) **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 133-140.
- Anderson, A., 1991. The Influence of the Plant Root on Mycorrhizal Formation. In: Allen M. (Ed) **Mycorrhiza Functioning**. Chapman y Hall, New York, 37-64.
- Aquihuatl, M. A., W. Rodríguez y S. Roussus, 1998a. Efecto de la Glucosa en el Crecimiento de Hongos Ectomicorrízicos del Género *Suillus*. **Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica**. Colima, Col. 79.
- Aquihuatl, M. A., W. Rodríguez y S. Roussus, 1998b. Velocidad de Extensión Radial Versus Fuentes de nitrógeno en *Lactarius* y *Pisolithus*. **Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica**. Colima, Col. 80.
- Aquihuatl, M. A., W. Rodríguez, I. Reyes y S. Roussos, 2000. Cultivo de Hongos Ectomicorrízicos en Soporte: Fisiología del Crecimiento de *Suillus collinitus*. **Memorias VII Congreso Nacional de Micología**. Querétaro, Qro, 213.
- Arias, M. y O. Garza, 1997 a. Descripción de Ectomicorrizas por Cuatro Especies de Hongos en Vivero. **Memorias VI Congreso Nacional de Micología**. Tapachula, Chiapas, 132.
- Arias, M. y O. Garza, 1997 b. Inoculaciones Individuales y Mixtas de 4 Hongos Micorrízicos en 2 Especies de Pinos. **Memorias VI Congreso Nacional de Micología**. Tapachula, Chiapas, 133.
- Arnolds, E., 1991. Decline of Ectomycorrhizal Fungi in Europe. **Agric. Ecosystems Environ.** 35:209-244.
- Augé R., G. Beauchesne, J. Boccon-Gibod, L. Decourtye, B. Digat, J. Galandrin, R. Minier, J. Morand y H. Vidalie, 1986. **Cultivo in vitro**. Ed. Científica, México.
- Ávila, Z. H., 1988. **Aislamiento, Caracterización y Confirmación de Micelios de Cuatro Especies de Amanita (Agaricales) de México**. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México D. F.
- Awamed, M. S., 1981. The Response of *Heliantemum salicifolium* and *H. ledifolium* to Infection by Desert Truffle *Terfezia boudieri*. **Mushroom Sci.** 11:343-353.
- Banniza, S. y M A. Rutherford, 2001. Diversity of Isolates of *Rhizoctonia solani* AG-1 1A and their Relationship to other Anastomosis Groups based on Pectic Zymograms and Molecular Analysis. **Mycol. Res.** 105:33-40

- Bárceñas, E., E. Pérez-Silva, A. Burrola y G. Serrano, 1996. Taxonomía y Descripción de Ectomicorrizas de Hongos Agaricales de bosques de Pino-Encino en el Estado de México. I **Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica**. Resumen, Jalapa. Veracruz, 50
- Bárceñas, E., C. Serrano, A. E. Díaz y C. Burrola, 2000. Determinación del Porcentaje de Micorrización en Plántulas de *Pinus*, en los Viveros de Probosque. **Memorias VII Congreso Nacional de Micología**. Querétaro, Qro, 112.
- Beckjord P. R. y M. S. McIntosh, 1984. Growth and Fungal Persistence by *Quercus rubra* Inoculated with Ectomycorrhizal Fungi and Planted on a Clear-cutting and Strip Mine. **Can. J. Bot.** 62:1571-1574.
- Benyon, F. H. L., L. W. Burgess y P. J. Sharp, 2000. Molecular Genetic Investigations and Reclassifications of *Fusarium* species in Sections *Fusarium* and *Roseum*. **Mycol. Res.** 104:1164-1174
- Berrediem, A., A. Garnier, D. Prima Putra y B. Botton, 1998. Effect of Nitrogen and Carbon Sources on Growth and Activities of NAD and NADP Dependent Isocitrate the Hydrogenases of *Laccaria bicolor*. **Mycol. Res.** :427-434.
- Bouher, N. L., T. S. Grove y N. Malajczuk, 1990. Growth and Phosphorus Acquisition of Karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) Seedlings Inoculated with Ectomycorrhizal Fungi in Relation to Phosphorus Supply. **New Phytol.** 114:77-85.
- Bratek, Z., E. Jakucs, K. Bóka y G. Szedlay, 1996. Mycorrhizae between Black Locust (*Robinia pseudoacacia*) y *Terfezia terfezioides*. **Mycorrhiza** 6:271-274.
- Brownlee, C. J. A. Duddridge, A. Malibari y D. J. Read. 1983. The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. **Plant and Soil** 71:433-443.
- Bruns, T. D., R. Fogel, T. J. White y J. D. Palmer, 1989. Accelerated Evolution of a False-Truffle from a Mushroom Ancestor. **Nature** 339:140-142.
- Burrola A. C., E. Bárceñas y E. Pérez-Silva, 1997. Caracterización de la Ectomicorriza en el Género *Amanita*. **Memorias VI Congreso Nacional de Micología**. Tapachula, Chiapas, 189.
- Cairney, J. W. G. Y R. M. Burke, 1994. Fungal Enzymes Degrading Plant Cell Wall: Their Possible Significance in the Ectomycorrhizal Symbiosis. **Mycol. Res.** 98:1345-1356.
- Cámara, M. P. S., M. E. Palm, P. Berkum y E. L. Stewart, 2001. Systematics of *Paraphaeosphaeria*: a Molecular and Morphological Approach. **Mycol. Res.** 105:41-56.
- Cao, W. Y D. L. Crawford, 1993. Carbon Nutrition and Hydrolytic and Cellulytic Activities in the Ectomycorrhizal Fungus *Pisolithus tinctorius*. **Can. J. Microbiol.** 39:529-535.
- Castellano, M. A., 1989. **The Taxonomy of the Genus *Hysterangium* (Basidiomycotina, Hysterangiaceae) with Notes on its Ecology**. Ph D. Thesis, Oregon State University, Corvallis.
- Carranza, T. N., A. Hernández, L. Varela y G. Chávez, 1998. Validación de Métodos de Conservación a Corto, Mediano y Largo Plazo para Hongos Ectomicorrízicos. **Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica**. Colima, Col. 81.
- Castellano, M. A. y N. L. Bougher, 1994. Consideration of Taxonomy and Biodiversity of Australian Ectomycorrhizal Fungi. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (eds). **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 37-46.
- Castellano, M. A. y R. Molina, 1989. Mycorrhizae. In: Landis, T. D., R. W. Tinus, S. E. McDonald y J. P. Barnett (eds). **The Container Tree Nursery Manual. Volume 5, Agricultural Handbook 674**. United States Department of Agriculture, Forest Service, Washington, D. C. 101-167.
- Castillo, J., J. García y F. E. San Martín, 1979. Algunos Datos sobre la Distribución Ecológica de los Hongos, Principalmente los Macromicetos, en el estado de Nuevo León. **Bol. Soc. Mex. Mic.** 13:229-238.
- Cigarrero, C., L. Varela y E. Amora-Lazcano, 2002. Evaluación de la Micorrización de *Pinus montezumae* y Control de Calidad del Inoculante Aplicado en el Vivero de San Luis Tlaxialtemalco, México. In: Guzmán G. y G. Mata (eds.) **Estudio Sobre los Hongos Latinoamericanos. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología**. Xalapa, Veracruz, 365.
- Cline, M. L., R. France y C. P. P. Reid, 1987. Intraspecific and Interspecific Growth Variation of Ectomycorrhizal Fungi at Different Temperatures. **Can. J. Bot.** 65:869-875

- Chambers, S. M. y J. W. G. Cairney, 1999. *Pisolithus*. In: Cairney J. W. G. y S. M. Chambers (Eds.) **Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile**. Springer, New York. 1-30.
- Chambers, S. M., R. M. Burke, P. R. Brooks y J. W. G. Cairney, 1999. Molecular and Biochemical Evidence for Manganese-dependent Peroxidase Activity in *Tylospora fibrilosa*. **Mycol. Res.** **103**:1098-1102.
- Chapman, W. K., S. M. Berch y T. M. Ballard, 1990. *In Vitro* Growth of Ectomycorrhizal Fungi on Dilute Agar. **Mycologia** **82**:526-527.
- Chilvers, G. A., P. A. Douglas y F. F. Lapeyrie, 1986. A Paper-sandwich Technique for Rapid Synthesis of Ectomycorrhizas. **New Phytol.** **103**:397-402.
- Chilvers, G. A., F. F. Lapeyrie y D. P. Horan, 1987. Ectomycorrhizal vs. Endomycorrhizal Fungi within the Same Root Systems. **New Phytologist** **107**:441-448.
- Colpaert, J. V., 1999. *Thelephora*. In: Cairney, J. W. G. Y S. M. Chambers (eds.) **Ectomycorrhizal Fungi: Key Genera in Profile**. School of Science, University of Western Sydney, 325-245.
- CONABIO, 1994. Listado de Especies de Plantas y Hongos que se Encuentran en la NOM-Ecol-059-94 www.conabio.gob.mx/biodiversidad/LPLANNOM.HTM.
- Cordell, C. E., D. H. Marx y C. Caldwell, 1991. Operational Application of Specific Ectomycorrhizal Fungi in Mineland Reclamation. In: **National Meeting of the American Society for Surface Mining and Reclamation**. Durango, 8
- Crisci, J. V. y M. F. López, 1983. **Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica**. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington.
- Cruz-Ulloa, B. S., 1990. **Cultivo in vitro y Caracterización de Micelios de Basidiomicetos Ectomicorrizógenos**. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F.
- Cruz-Ulloa, B. S., 1991. Características Miceliales de *Pisolithus tinctorius* y Tres Especies de *Rhizopogon*. **Memorias IV Congreso Nacional de Micología**. Tlaxcala. Tlax. 137.
- Cuaxilo, L. V., 1991. **Desarrollo de Tres Cepas del Hongo Ectomicorrizico *Laccaria bicolor* (Maire) Orton Aislada de los Bosques de la Malintzin sobre Medios de Cultivo a Base de Espirulina**. Tesis Profesional, Depto. de Ingeniería y Tecnología. Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala.
- Cuevas-Rangel, R. A., 1979. Pruebas de Inoculación con el Hongo Micorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch, en Plántulas de *Pinus montezumae* Lamb. en Suelos de Vivero. **Ciencia Forestal** **4**:19:46-62.
- Cuevas-Rangel, R. A. y M. Zamora Martínez, 2000. Efecto de Algunos Hongos Ectomicorrizógenos y Ácidos Fúlvicos en la Producción de Biomasa de Tres Especies de *Eucalyptus*, en Vivero. In: Guzmán G. y G. Mata (eds.) **Estudio Sobre los Hongos Latinoamericanos. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología**. Xalapa, Veracruz, 366.
- Dallas, E. J., 2000. **Métodos Multivariados Aplicados al Análisis de Datos**. Internacional Thomson Editores, México, D.F.
- Deacon, J. W. y L. V. F. Fleming, 1992. Interactions of Ectomycorrhizal Fungi. In: Allen, M. (Ed.) **Mycorrhizal Functioning**. Chapman & Hall, New York. 249-300.
- Dennis, J. J., 1985. Effect of pH and Temperature on *in vitro* Growth of Ectomycorrhizal Fungi. Information Report BC-X-273. Pacific Forestry Centre.
- Dexheimer, J., J. Gerard, J. P. Leduc y G. Chevalier, 1985. Étude Ultrastructurale Comparée des Associations Symbiotiques Mycorrhiziennes *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia Claveryi* et *Helianthemum salicifolium*-*Terfezia leptoderma*. **Can. J. Bot** **63**:582-591.
- Dighton, J., J. M. Poskitt y D. M. Howard, 1986. Changes in Occurrence of Basidiomycete Fruit Bodies During Forest Stands Development with Specific Reference to Mycorrhizal Species. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **87**:163-171.
- Dixon, R. K., H. E. Garret, J. A. Bixby, G. S. Cox y J. G. Tompson, 1981. Growth Ectomycorrhizal Development and Root Soluble Carbohydrates of Black Oak Seedlings Fertilized by two Methods. **Forest Sci.** **270**:617-624.
- Dodd, J. C. y B. D. Thomson, 1994. The Screening and Selection of Inoculant Arbuscular-Mycorrhizal and Ectomycorrhizal Fungi. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (eds.) **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 149-158.

- Dodd, S. L., N. Crowhurst, A. G. Rodrigo, G. J. Samuels, R. A. Hill y A. Stewart, 2000. Examination of Pathogenies *Typhula* Phylogenies Derived from Ribosomal DNA Sequence Data. **Mycol. Res.** 104:23-34.
- Donnelly, P. K., 1991. **Degradation of the Aromatic Compound in Lignin, the Polycyclic Compound of Cellulose, and the Two Aromatic Herbicides Atrazine and 2, 4-D by Mycorrhizal Fungi.** Ph. D. Dissertation, University of Idaho, Moscow, Hidaho.
- Duddridge, J. A., 1986. The Development and Ultrastructure of Ectomycorrhizas. III. Compatible and Incompatible Interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. and 11 Species of Ectomycorrhizal Host *In Vitro* in the Absence of Exogenous Carbohydrate. **New Phytol.** 103:457-464.
- Duddridge, J. A. y D. J. Read, 1984. The Development and Ultrastructure of Ectomycorrhizas. II. Ectomycorrhizal Development in Pine *in Vitro*. **New Phytol** 96:575-582.
- Duddridge, J. A., R. D. Finlay, D. J. Read y B. Söderström, 1988. The Structure and Function of the Vegetative Mycelium of Ectomycorrhizal Plants. III. Ultrastructural and Autoradiographic Analysis of Inter-plant Carbon Distribution through Intact Mycelial Systems. **New Phytol** 108:183-183.
- Ek, M., P. O. Ljungqvist y E. Stenström, 1983. Indol-3-acetic Acid Production by Mycorrhizal Fungi Determined by Gas Chromatography-mass Spectrometry. **New Phytol** 94:401-407.
- Estrada-Torres, A. y M. Valdés, 1986. El Crecimiento y la Micorrización de Plántulas de Pino Inoculadas con *Pisolithus tinctorius* en el Semillero o en el Envase de Trasplante. **Biótica** 11:137-142
- Estrada-Torres, A. y L. Varela, 1998. Hacia el Estudio de la Diversidad y la Conservación de Germoplasma de Hongos Micorrizógenos de México. In: Zulueta, R. R., M. A. Escalona y D. Trejo (Eds.) **Avances de la Investigación Micorrízica en México.** Universidad Veracruzana. Xalapa. 1-7.
- Finlay, R. D. y A. Frostegård 1990. Utilization of Organic and Organic Nitrogen Sources by Different Ectomycorrhizal Fungi Grown in Culture and in Symbiosis whit *Pinus contorta* (Dougl. ex Loud). **8th NACOM-Wioming**, september, 1.
- Fortin, J. A. y Y. Piché, 1979. Cultivation of *Pinus strobus* Root Hypocotyl Explants for Synthesis of Ectomycorrhizae. **New Phytol.** 81:109-119.
- Francis, R. y D. J. Read, 1994. The Contributions of Mycorrhizal Fungi to the Determination of Plant Comunity Structure. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (eds). **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry.** Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 11-25.
- Fries, N., M. Bardet y K. Serch-Hanssen, 1985. Growth of Ectomycorrhizal Fungi Stimulated by Lipids from a Pine Root Exudate. **Plant Soil** 86: 287-290.
- Galindo-Flores, G. Y A. Estrada-Torres, 1998. Efecto de Diferentes Concentraciones de Glucosa en el Crecimiento de Diez Cepas de Hongos Ectomicorrizógenos Asociados con *Pseudotsuga macrolepis*. **Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica.** Colima, Col 78.
- Garza-Ocañas, F., 1986. Hongos Ectomicorrízicos en el Estado de Nuevo León. **Rev. Mex. Mic.** 2:197-206.
- Garza, E. E. Rincón, L. Varela y A. Estrada-Torres, 1996. Las Ectomicorrizas de un bosque de Encino en la Reserva ecológica del Ajusco, México, D. F. **I Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica.** Resumen, Jalapa, Veracruz, 51.
- Gardes, M., J. A. Fortin, G. M. Mueller y B. R. Kropp, 1990. Restriction Fragment Length Polymorphisms in the Nuclear Ribosomal DNA of Four *Laccaria* spp.: *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima*, and *L. amethystina*. **Phytopathology** 80:1312-1317.
- Gardes, M., G. M. Mueller, J. A. Fortin, B. R. Kropp, 1991. Mitochondrial DNA Polymorphisms in *Laccaria bicolor*, *L. laccata*, *L. proxima* and *L. amethystina*. **Mycol. Res** 95:206-216.
- Garraway, M. O. y R. C. Evans, 1991. **Fungal Nutrition and Physiology.** Krieger Publishing Company Malabon, Florida.
- Gianinazzi-Pearson V. y S. Gianinazzi, 1989. Phosphorus Metabolism in Mycorrhizas. In: Boddy L. R. Marchant y D. J. Reid (eds). **Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilization by Fungi.** Cambridge University Press, Cambridge, 227-242.

- Giltrap, N. J., 1982. Production of Polyphenol Oxidases by Ectomycorrhizal Fungi with Special Reference to *Lactarius* spp. **Trans. Br. Mycol. Soc.** **78**:75-81.
- Glenn, J. K. y M. H. Gold, 1983. Decolorization of Several Polymeric Dyes by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** **45**: 1741-1747.
- Glen, M., I. C. Tommerup, N. L. Bougher y P. A. O'Brien, 2001. Specificity, Sensitivity and Discrimination of Primers for PCR-RFLP of Larger Basidiomycetes and their Applicability to Identification of Ectomycorrhizal Fungi in *Eucalyptus* Forests and Plantations. **Mycol. Res.** **105**:138-149.
- Godbout, C. y J. A. Fortin, 1985. Synthetized Ectomycorrhizae of Aspen: Fungal Genus Level of Structural Characterization. **Can. J. Bot.** **63**:252-262.
- Graham, J. H. y R. G. Linderman, 1981. Inoculation of Containerized Douglas-fir with the Ectomycorrhizal Fungus *Cenococcum geophilum*. **For. Sci.** **27**:27-31.
- Grams, G., Th. Günther y W. Fritsche, 1998. Spot Test Oxidative Enzymes in Ectomycorrhizal, Wood-, and Litter Decaying Fungi. **Mycol. Res.** **102**:67-72.
- Grove, T. S. y N. Malajczuk, 1994. The potential for Management of Ectomycorrhiza in Forestry. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (eds.), **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 159-170.
- Gomes, E. A., L. M. Abreu, A. C. Borges y E. F. Araújo, 2000. ITS Sequences and Mitochondrial DNA Polymorphism in *Pisolithus* Isolates. **Micol. Res.** **104**:911-918.
- González, P. C., 1992. Los Bosques y Selvas de México, sus Habitantes y las Empresas Forestales. In: Juan Pablos (Ed.). **El Sector Agropecuario Mexicano Frente al Tratado de Libre Comercio**. Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Gottlieb, A. M., E. Ferrer y J. E. Wright, 2000. rDNA Analyses as an Aid to the Taxonomy of Species of *Ganoderma*. **Mycol. Res.** **104**:1033-1045.
- Grove, T. S. y N. Malajczuk, 1994. The potential for Management of Ectomycorrhiza in Forestry. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (eds.), **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 159-170.
- Grünig C. R., T. N. Sieber y O. Holdenrieder, 2001. Characterisation of Dark Septate Endophytic Fungi (DSE) using Inter-simple-sequence-repeat-anchored Polymerase Chain Reaction (ISSR-PCR) Amplification. **Mycol. Res.** **105**:24-32.
- Guzmán, G., 2000. Nuevos Datos Taxonómicos y Biogeográficos de *Scleroderma stellatum* (Basidiomycotina, Sclerodermatales). **Memorias VII Congreso Nacional de Micología Querétaro, Qro**, 129.
- Hacskaylo, E., 1953. Pure Culture Synthesis of Pine Mycorrhizae in Terra-Lite. **Mycologia** **45**:971-975.
- Hacskaylo, E. y J. G. Palmer, 1955. Hymenomycetous Species Forming Mycorrhizae with *Pinus virginiana*. **Mycologia** **47**:145-147.
- Hacskaylo, E., J. G. Palmer y J. A. Vozzo, 1965. Effect of Temperature on Growth and Respiration of Ectotrophic Mycorrhizal Fungi. **Mycologia** **57**:748-756.
- Hair, J., R. E. Anderson, R. L. Tatham, W. C. Black, 1999. **Análisis Multivariante**. Prentice Hall México.
- Hantula, J., A. Lilja, H. Nuorteva, P. Parikka y S. Werres, 2000. Pathogenicity, Morphology and Genetic Variation of *Phytophthora cactorum* from Strawberry, Apple, Rhododendrom, and Silver Birch. **Mycol. Res.** **104**:1062-1068.
- Harkin, J. M., M. J. Larsen y J. R. Obst, 1974. Use of Syringaldazine for Detection of Laccase in Sporophores of Wood Rotting Fungi. **Mycologia** **66**:469-476.
- Harley, J. L. y S. E. Smith, 1983. **Mycorrhizal Symbiosis**. Academic Press, London.
- Harvey, P. R., P. J. Butterworth, B. G. Hawke y C. E. Pankhurst, 2001. Genetic and Pathogenic Variation among Cereal, Medic and Sub-clover Isolates of *Pythium Irregularare*. **Mycol. Res.** **105**:85-93.
- Haselwandter, K., O. Bobleter y D. J. Read, 1990. Degradation of ¹⁴C-Labelled Lignin and Dehydropolymer of Conyferyl Alcohol by Ericoid and Ectomycorrhizal Fungi. **Archives of Microbiology** **153**:352-354.
- Hetrick, B. A. D., 1989. Acquisition of Phosphorus by VA Mycorrhizal Fungi and the Growth of their Host Plants. In: Boddy L. R. Marchant y D. J. Reid (eds) **Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilization by Fungi**. Cambridge University Press, Cambridge, 205-226.

- Honrubia, M., P. Torres, G. Díaz y A. Cano, 1992. **Manual para Micorrizar Plantas en Viveros Forestales**. ICONA. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. LUCDEME VII. Murcia
- Honrubia, M., P. Torres, G. Díaz y A. Morte, 1993. **Biotecnología Forestal: Micorrización y Micropropagación**. (Manual de Prácticas) Universidad de Murcia y Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos, Murcia.
- Hsiang, T. y C. Wu, 2000. Genetic Relationships of Pathogenic Typhula Species Assessed by RAPD, ITS-RFLP and ITS Sequencing. **Mycol. Res.** **104**: 16-22.
- Hughes, K. W., R. H. Petersen, J. E. Johnson, J-M. Moncalvo, R. Vilgalys, S. A. Redhead, T. Thomas y L. L. McGhee, 2001. Infragenic Phylogeny of *Collybia* s. str. Based on Sequences of Ribosomal ITS and LSU Regions. **Mycol. Res.** **105**: 164-172.
- Hutchinson, L. J., 1990a. Studies on the Systematics of Ectomycorrhizal Fungi in Axenic Culture II. The Enzymatic Degradation of Selected Carbon and Nitrogen Compounds. **Can. J. Bot.** **68**: 1522-1530.
- Hutchinson, L. J., 1990b. Studies on the Systematics of Ectomycorrhizal Fungi in Axenic Culture III. Patterns of Polyphenol Oxidase Activity. **Mycologia** **82**: 424-435.
- Hutchinson, L. J., 1990c. Studies on Systematics of Ectomycorrhizal Fungi in Axenic Culture IV. The Effect of Some Selected Fungitoxic Compounds upon Linear Growth. **Can. J. Bot.** **68**: 2172-2178.
- Hutchinson, L. J., 1990d. Studies on Systematics of Ectomycorrhizal Fungi in Axenic Culture V. Linear Growth Response to Standard Extreme Temperatures Used as a Taxonomic Character. **Can. J. Bot.** **68**: 2179-2184.
- Hutchinson, L. J., 1991. Description and Identification of Cultures of Ectomycorrhizal Fungi Found in North America. **Mycotaxon** **42**: 387-504.
- Hutchinson, L. J. y D. W. Malloch, 1988. A Verification Protocol for Cultural Isolates of Ectomycorrhizal Basidiomycetes. In: Lalonde M. y Y. Piché. (Eds.) **Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry**. Université Laval, Ste-Foy, Québec. 121-124.
- Hutchinson, L. J. y R. C. Summerbell, 1990. Studies on the Systematics of Ectomycorrhizal Fungi in Axenic Culture. Reactions of Mycelia to Diazonium Blue B Staining. **Mycologia** **82**: 36-42.
- Ingleby, K., P. A. Mason, F. T. Last y L. V. Fleming, 1990. **Identification of Ectomycorrhizas**. ITE Research Publication No. 5. Institute of Terrestrial Ecology, Londres.
- Jasper, D. A., 1994. Management of Mycorrhizas in Revegetation. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (eds.), **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 211-219.
- Jeffries, P., 1999. *Scleroderma*. In: Cairney J. W. G. y S. M. Chambers (Eds.) **Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile**. Springer, New York. 129-161.
- Jennings, D. H., 1989. Some Perspectives on Nitrogen and Phosphorus Metabolism in Fungi. In: Boddy L. R. Marchant y D. J. Reid (eds). **Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilization by Fungi**. Cambridge University Press, Cambridge, 1-32.
- Juárez, L., A. Montoya-Esquivel y A. Kong-Luz, 2000. Estudio Taxonómico sobre el Género *Amanita* en el Parque Nacional la Malinche. **Memorias VII Congreso Nacional de Micología**. Querétaro, Qro, 119.
- Keller, G., 1996. Utilization of Inorganic and Organic Nitrogen Sources by High-Subalpine Ectomycorrhizal Fungi of *Pinus cembra* in Pure Culture. **Mycol. Res.** **100**: 989-998.
- Kim, M-S., N. B. Klopffenstein, G. I. McDonald, K. Arumuganathan y A. K. Vidaver, 2001. Use of Flow Cytometry, Fluorescence Microscopy, and PCR-based Techniques to Assess Intraspecific and Interspecific Mating of *Armillaria* Species. **Mycol. Res.** **105**: 153-163.
- Klán, J., Baudišová, D. Y I. Rulfová, 1989. Cultural, Enzymatic and Cytological Studies in the Genus *Pholiota*. **Mycotaxon** **36**: 249-271.
- Kohlmann, C. B. 1994. VI Algunos Aspectos de la Taxonomía Numérica y sus Usos en México. In: Llorente B. J. y I. V. Luna (Eds.). **Taxonomía Biológica**. Fondo de Cultura Económica México.
- Kong-Luz A. y G. Santiago-Martínez, 1991. Ectomicorriza de *Russula brevipes* con *Abies religiosa*. **Memorias del IV Congreso Nacional de Micología**, Tlaxcala, Tlax., 138.
- Kong-Luz A., G. Galindo, A. Estrada-Torres, 2000. Hongos Ectomicorrizógenos asociados con *Picea chihuahuana*. **Memorias VII Congreso Nacional de Micología**. Querétaro, Qro, 69.

- Kong-Luz, A. y A. Estrada-Torres, 2000. El Género *Russula* en el Paque Nacional la Malinche. **Memorias VII Congreso Nacional de Micología**. Querétaro, Qro, 120
- Kornerup, A y J. H. Wanscher, 1978. **Methuen Handbook of Colour** 3rd ed Eyre Methuen Ltd., Londres.
- Krauss, U., P. Matthews, R. Bidwell, M. Hocart y F. Anthony, 2001. Strain Discrimination by Fungal Antagonists of *Colletotricum musae*: Implications for Biocontrol of Crown Rot of Banana. **Mycol. Res.** **105**:67-76
- Kropp, B. R., 1997. Inheritance of the Ability for Ectomycorrhizal Colonization of *Pinus strobus* by *Laccaria bicolor*. **Mycologia** **89**:578-585
- Kropp, B. R. y A. J. Anderson, 1994. Molecular and Genetic Approaches to Understanding Variability in Mycorrhizal Formation and Functioning. In: Pflieger F. L. Y R. G. Linderman (eds). **Mycorrhizae and Plant Health**. The American Phytopathological Society. St. Paul. 309-336.
- Kroop B. R. y G. M. Mueller, 1999. *Laccaria*. In: Cairney J. W. G. y S. M. Chambers (Eds.) **Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile**. Springer, New York. 65-88.
- Kropp, B. R., M. A. Castellano, y J. M. Trappe, 1985. Performance of Outplanted Western Hemlock (*Tsuga heterophylla* (Raf. Sarg.) Seedlings Inoculated with *Conococcum geophyllum*. **Tree Planter's Notes** **36**:13-16.
- Kropáček, K. 1992. Effect of Mycorrhizal Inoculation in Forest Nurseries. In: Read, D. J., D. H. Lewis, A. H. Fitter y I. J. Alexander. **Mycorrhizas in Ecosystems**. CAB International, Cambridge. 387-388.
- Kullnig, C., G. Szakacs y C. P. Kubicek, 2000. Molecular Identification of *Trichoderma* Species from Russia, Siberia and the Himalaya. **Micol. Res.** **104**:1117-1125.
- Laiho, O., 1988. The Structure of Mycorrhizae and Mycorrhizal in Forest Soil and Nurseries. **Karstenia** **28**:63
- Largent, D. L., I. N. Sugihara y C. Wishner, 1980. Occurrence of Mycorrhizae on Ericaceous and Pyrolaceous Plants in Northern California. **Can. J. Bot.** **58**:2274-2279.
- Last, F. T., P. A. Mason, K. Ingleby y L. V. Fleming, 1984. Succession of Fruit Bodies of Sheathing Mycorrhizal Fungi Associated with *Betula pendula*. **Forest Ecology and Management** **9**:229-234.
- Last, F. T., J. Dighton y P. A. Mason, 1987. Successions of Sheathing Mycorrhizal Fungi. **Trends in Ecology and Evolution** **2**:157-161
- Leduc, J. P., J. Dexheimer y G. Chevalier, 1986. Étude Ultrastructurale Comparée des Associations de *Terfezia leptoderma* avec *Helianthemum salicifolium*, *Cistus albidus* et *Cistus salviaefolius*. In: **Mycorrhizae: Physiology and Genetics**. 1st ESM, Dijon, 1-5 July 1985, Paris.
- León, G. y G. Guzmán, 1980. Las Especies de Hongos Micorrízicos Conocidas en la Región de Uxpanapa-Coatzacoalcos-Los Tuxtlas-Papaloapan-Xalapa. **Bol. Soc. Mex. Mic.** **14**:27-38.
- Le Tacon F. y D. Bouchard, 1986. Effects of Different Ectomycorrhizal Fungi on Growth of Larch, Douglas Fir, Scots Pine and Norway Spruce Seedlings in Fumigated Nursery Soil. **Acta Oecologia/Oecologia Applicata** **7**:389-402.
- Le Tacon, F., J. Garbaye, D. Bouchard, G. Chevalier, J. M. Olivier, J. Guimberteau, N. Poitou y H. Frochot, 1988. Field Results from Ectomycorrhizal Inoculation in France. In: Lalonde, M. y Y. Piché (eds) **Canadian Workshop on Mycorrhizae in Forestry**. Université Laval, Paris. 51-74.
- Le Tacon, F., I. F. Álvarez, D. Bouchard, B. Henrion, R. M. Jackson, S. Luff, J. I. Parlade, J. Pera, E. Stenström, N. Villeneuve y C. Walker, 1992. Variations in Field Response of Forest Trees to Nursery Ectomycorrhizal Inoculation in Europe. In: Read, D. J., D. H. Lewis, A. H. Fitter y I. J. Alexander. **Mycorrhizas in Ecosystems**. CAB International, Cambridge. 119-134.
- López-Olivares C. R. y A. M. Fierros-González, 1990. Estudio Morfológico de Ectomicorrizas en Plantaciones de *Pinus Caribaea* var. *hodurensis* en la Sabana, Oaxaca, México. **Mic. Neotrop. Aplic.** **3**:31-40.
- López-Olivares C. R. F. J. Zamudio-Sánchez y A. M. Fierros-González, 1990. Evaluación Micorrízica y su Relación con el Crecimiento en Plantaciones de *Pinus Caribaea* var. *hodurensis* en la Sabana, Oaxaca, México. **Mic. Neotrop. Aplic.** **3**:53-66.
- Lumbsch, H. T., I. Schmitt, H. Döring y M. Wedin, 2001. Molecular Systematics Supports the Recognition of an Additional Order of Ascomycota: the *Agyriales*. **Mycol. Res.** **105**:16-23.

- Marks, G. C., 1991. Causal Morphology and Evolution of Mycorrhizas. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, **35**:89-104.
- Marr, C. D., 1979. Laccase and Tyrosinase Oxidation of Spot Test Reagents. **Mycotaxon** **9**:244-276
- Marr, D. C. 1984. Spot Tests for Detection of Tyrosinase. **Mycotaxon** **19**:299-305.
- Marr, C. M., D. W. Grund y K. A. Harrison, 1986. The Taxonomic Potential of Laccase and Tyrosinase Spots Tests. **Mycologia** **78**:169-184.
- Martin, F., P. Laurent, D. De Carvalho, T. Burgess, P. Murphy, U. Nehls y D. Tagu, 1994a. Fungal Gene Expression During Ectomycorrhiza Formation. **Can. J. Bot.** **73** (suppl. 1) S541-S547.
- Martin, F., I. C. Tommerup y D. Tagu, 1994b. Genetics of Ectomycorrhizal Fungi: Progress and Prospects. In: Robson, A. D., L. K. Abbott y N. Malajczuk (eds.), **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 159-170
- Marx, D. J., 1969. The Influence of Ectotrophic Mycorrhizal Fungi on the Resistance of Pine Roots to Pathogenic Infections. I. Antagonism of Mycorrhizal Fungi to Root Pathogenic Fungi and Soil Bacteria. **Phytopathology** **59**:153-163.
- Marx, D. H., 1973. Mycorrhizal and Feeder Root Disease. In: Marks G. C. and T. T. Kozlowski (eds) **Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology**. Academic Press, New York, 351-382.
- Marx, D. H., 1980. Ectomycorrhizal Fungus Inoculations: A Tool for Improving Forestation Practices. In: Mikola, P. (Ed) **Tropical Mycorrhiza Research**. Clarendon Press, Oxford. 11-71.
- Marx, D. H. y W. Bell, 1985. Formation of *Pisolithus tinctorius* Ectomycorrhizae on Loblolly Pine Seedlings with Spore Pellet Inoculum Applied at Different Times **USDA For. Res. SE-249**. 7 pp
- Marx, D. H. y W. C. Bryan, 1975. Growth and Ectomycorrhizal Development of Loblolly Pine Seedlings in Fumigated Soil Infested with the Fungal Symbiont *Pisolithus tinctorius* **Forest Sci.** **21**:245-254.
- Marx D. H. y C. E. Cordell, 1994. The Use of Specific Ectomycorrhizas to Improve Artificial Forestation Practices. In: Wipps J. M. y R. D. Lumsden (eds). **Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth**. University Press, Cambridge, 1-25.
- Marx, D. H. y G. E. Hatchell, 1986. Root Stripping of Ectomycorrhizae Decreases Field Performance of Loblolly and Longleaf Pine Seedlings. **Southern J. Appl. For.** **10**:173-179
- Marx, D. H. y D. S. Kenney, 1982. Production of Ectomycorrhizal Fungus Inoculum. In: Schenck, N. C. (ed.) **Methods and Principles of Mycorrhizal Research**. The American Phytopathological Society, St. Paul, 131-146
- Marx, D. H. y S. V. Krupa, 1978. Mycorrhizae. In: Dommergues, Y. R. Y S. V. Krupa. **Interacciones Between Non-Pathogenic Soil Microorganisms and Plants**. Elsevier, Scientific Publication, Amstrdam. 401-442
- Marx, D. H., J. L. Ruehle, D. S. Kenney, C. E. Cordell, J. W. Riffle, R. J. Molina, W. H. Pawuk, S. Navratil, R. W. Tinus y O. C. Goodwin, 1982. Commercial Vegetative Inoculum of *Pisolithus tinctorius* and Inoculation Techniques For Development of Ectomycorrhizae on Container-grown Tree Seedlings. **For. Sci.** **28**:373-400.
- Marx, D. H., J. L. Ruehle y C. E. Cordell, 1991. Methods for Studying Nursery and Field Response of Trees to Specific Ectomycorrhiza. In: Norris, J. R. (Ed.) **Techniques for the Study of Mycorrhiza. Vol 23**. 383-411.
- Mason, P. A., 1975. The Genetics of Mycorrhizal Associations between *Amanita muscaria* and *Betula verrucosa*. In: Torrey, J. G. Y D. T. Clarkson (Eds.) **Development and Funtioning of Roots**. Nueva York: 567-574.
- Mason, P. A., 1980. Aseptic Synthesis of Sheathing (ecto-) mycorrhizas. In: Ingram D. S. y J. P.. Helgeson (eds.), **Tissue Culture Methods for Plant Pathologist**. Blackwell. Scientific Publications, Londres. 173-178.
- Mason, P. A., J. Wilson y F. T. Last, 1983. The Concept on Succession in Relation to the Spread of Sheathing Mycorrhizal Fungi on Inoculated Tree Seedlings in Unsterile Soil. **Plan Soil** **71**:247-256.
- Massicotte, H. B., R. Molina, D. L. Luoma y J. E. Smith, 1994. Biology of the Ectomycorrhizal Genus, *Rhizopogon*. II. Patterns of Host-Fungus Specificity Following Spore Inoculation of Diverse Host Grown in Mono Culture and Dual Culture. **New Phytol.** **127**:677-690.

- Matsumoto, C., K. Kageyama, H. Suga y M. Hyakumachi, 2000. Intraspecific DNA Polymorphisms of *Pythium irregulare*. **Mycol. Res.** **104** 1333-1341
- Meyer, F. H., 1973. Distribution of Ectomycorrhiza in Native and Manmade Forest. In Marks G. C. y T. T. Kozlowski (Eds.) **Ectomycorrhizae**. Academic Press, New York. 79-105.
- Miller S. L. y E. B. Allen, 1992. Mycorrhizae, Nutrient Traslocation, and Interactions Between Plants. In: Allen M. F. (Ed) **Mycorrhizal Funtioning**. Chapman & Hall, New York, 301-332
- Miller, O. K. Jr., T. Jenkins y P. Dery, 1986. Mycorrhizal Synthesis of *Amanita muscaria* var *persicina* with Hard Pines. **Mycotaxon** **26**:165-172
- Miller, S. L., P. Torres y T. M. McClean, 1993. Basidiospore Viability and Germination in Ectomycorrhizal and Saprotrophic Basidiomycetes **Mycol. Res.** **97**:141-149.
- Mikola, P., 1973. Aplication of Mycorrhizal Symbiosis in Forestry Practice. In Marks G. C. y T. T. Koslowski (eds) **Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology**. Academic Press, New York, 383-410
- Mohan, V., K. Natarajan y K. Ingleby, 1993 a. Anatomical Studies on Ectomycorrhizas II The Ectomycorrhizas Produced by *Amanita muscaria*, *Laccaria laccata* and *Suillus brevipes* on *Pinus patula*. **Mycorrhiza** **3** 43-49.
- Mohan, V., K. Natarajan y K. Ingleby, 1993b. Anatomical Studies on Ectomycorrhizas. III. The Ectomycorrhizas Produced by *Rhizopogon luteolus* and *Scleroderma citrinum* on *Pinus patula*. **Mycorrhiza** **3**:51-56.
- Molina, R., 1979. Pure Culture Synthesis and Host Specificity of Red Alder Mycorrhizae. **Can. J. Bot.** **57**:1223-1228.
- Molina, R. y J. G. Palmer, 1982. Isolation, Maintenance and Pure Culture Manipulation of Ectomycorrhizal Fungi. In: Schenk N. C. (Ed.) **Methods and Principles of Mycorrhizal Research**. American Phytopathological Society, St. Paul, 115-129
- Molina, R. y J. M. Trappe, 1982. Lack of Mycorrhizal Specificity by The Ericaceous Host *Arbutus menziesii* and *Artostaphylos uva-ursi*. **New Phytologist** **90**:495-509.
- Molina, R. y J. M. Trappe, 1984. Mycorrhiza Management in Bareroot Nurseries. In: Duryea M. L. y T. D. Landis (eds). **Forest Nurseries Manual: Production of Bareroot Seedlings**. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, La Haya. 211-223
- Molina, R., H. Massicotte y J. M. Trappe, 1992a. Specificity Phenomena in Mycorrhizal Symbiosis: Community-Ecological Consecuences and Practical Implications. In: Allen M. F. (Ed) **Mycorrhizal Funtioning**. Chapman & Hall, New York, 357-423.
- Molina, R., H. B. Massicotte y J. M. Trappe, 1992b. Ecological Role of Specificity Phenomena in Ectomycorrhizal Plant Communities: Potentials for Interplant Linkages and Guild Development. In: Read, D. J., D. H. Lewis, A. H. Fitter y I. J. Alexander. **Mycorrhizas in Ecosystems**. CAB International, Cambridge 106-112.
- Molina, R., J. E. Smith, D. McKay y L. H. Melville, 1997. Biology of the Ectomycorrhizal Genus, *Rhizopogon*. III. Influence of Co-cultured Cinifer Species on Mycorrhizal Specificity with the Arbutoid Hosts *Arctostaphylos uva-ursi* and *Arbutus menziesii*. **New Phytol** **137**:519-528
- Molina, R., J. M. Trappe, L. C. Grubisha y J. W. Spatafora, 1999. *Rhizopogon*. In: Cairney J. W. G. y S. M. Chambers (Eds.) **Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile**. Springer, New York 131-161
- Morte, M. A. Y M. Honrubia, 1995. Improvement of Mycorrhizal Synthesis between Micropropagated *Helianthemum almeriense* Plantlets with *Terfezia clavaryi* (desert truffle) In: Elliott, T. J. (Ed) **Science and Cultivation of Edible Fungi**. Balkema, Rotterdam, 863-868
- Moser, M., 1958. Der Einfluss Tiefer Temperaturen auf das Wachstum und die Lebenstätigkeit höherer Pilze mit specieller Berücksichtigung von Mykorrhizaplizen. **Sydowia** **12**:386-399.
- Moser, M., 1960. Die Gattung Phlegmacium (Schleimköpfe) in **Die Pilze Mitteleuropas** 4:1-440 Julius Klinkhardt, Bad Heilbrunn.
- Mueller, G. M., 1991. *Laccaria laccata* Complex in North America and Sweden: Intercollecion Pairing and Morphometric Analyses **Mycologia** **83** 578-594.
- Mueller, G. M., 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the Continental United States and Canada, with Discussions on Extralimital Taxa and Descriptions of Exrant Types. **Fieldiana Bot.** **NS 30** 1-158.

- Mueller, G. M. y J. F. Ammirati, 1993. Cytological Studies in *Laccaria* (Agaricales) II. Assessing Phylogenetic Relationships among *Laccaria*, *Hydnangium*, and other Agaricales. **Am. J. Bot.** **80**:322-329.
- Mueller, G. M. y M. Gardes, 1991. Intra- and Interspecific Relations within *Laccaria bicolor* sensu lato. **Mycol. Res.** **95**:592-601.
- Navarro, L. L., 2000. **Inoculación Miceliar de Dos Cepas de Hongos Ectomicorrizógenos (*Suillus glandulosipes* y *Rhizopogon* sp.) en *Pinus montezumae* en Condiciones de Vivero.** Tesis de Licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla.
- Nobles, M. K., 1958. Cultural Characters as a Guide to the Taxonomy and Phylogeny of the Polyporaceae. **Can. J. Bot.** **36**:883-926.
- NTESYS, 2000. Versión 2.10C. <http://www.ExeterSoftware.com>
- Oria de Rueda, S. J. A., 1991. Independencia y Ecología Ectomicorrícica en Varias Especies de los Géneros *Quercus*, *Pinus* y *Eucalyptus*. **Acta Bot. Malac.** **16**:105-113.
- Orozco-García, J. P., 1991. Inoculación de Esporas de Hongos Ectomicorrizicos en *Pinus* spp. **Memorias IV Congreso Nacional de Micología.** Tlaxcala. Tlax. 144.
- Orozco-García, J. P., L. A. Camacho, P. V. Zúñiga y Ma. G. Lomeli-Ramírez, 2002. Efecto de la Inoculación de *Pisolithus arhizus* y *Cenococcum geophilum* en *Pinus douglasiana* y *P. pseudostrobus* en Vivero Comercial. In: Guzmán G. y G. Mata (eds.) **Estudio Sobre los Hongos Latinoamericanos. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología** Xalapa, Veracruz, 373.
- Palm, M. E. y E. L. Steward, 1984. *In vitro* Synthesis of Mycorrhizae Between Presumed Specific and Nonspecific *Pinus* + *Suillus* Combinations. **Mycologia** **76**:579-600.
- Parada M. A. y A. Kong-Luz, 2000. Agaricales Ectomicorrizógenos del Parque Nacional la Malinche. **Memorias VII Congreso Nacional de Micología.** Querétaro, Qro, 68.
- Parladé J., J. Pera y I. F. Álvarez, 1996. Inoculation of Containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* Seedlings with Spores of Five Species of Ectomycorrhizal Fungi. **Mycorrhiza** **6**:236-245.
- Pei, M. H. y C. Ruiz, 2000. AFLP Evidence of the Distinctive Patterns of Life-cycle in Two Forms of *Melampsora* Rust on *Salix vitaminialis*. **Mycol. Res.** **104**:937-942.
- Pensado P. C. M. y Garza O.F., 1998. Las Ectomicorrizas y sus Hongos en el Bosque de *Pinus culminicola* Andersen & Beaman del Cerro Potosí, Galeana, Nuevo León, México. **Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrizica** Colima, Col. 61.
- Penttilä, M y M. Saloheimo, 1999. Lignocellulose Breakdown and Utilization by Fungi. In Oliver R y M Schweizer (eds.). **Molecular Fungal Biology.** Cambridge University Press, Cambridge 272-293.
- Peña-Cabriales, J. J. y M. Valdés, 1974. Rhizosphere du Sapin (*Abies religiosa*). II. Mycorrhizes Isolement et Culture. **Can. J. Microbiol.** **20**:412-417.
- Pérez-Moreno, J., 1995. La Simbiosis Ectomicorrizica y su Importancia Ecológica. In: Ferrera-Cerrato, R. y J. Pérez-Moreno (eds). **Agromicrobiología un Elemento Útil en la Agricultura Sustentable.** Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Edo. de México. 200-225.
- Pérez-Moreno, J. Y R. Ferrera-Cerrato, 1991. Aislamiento y Caracterización de Quince Cepas de Hongos Ectomicorrizicos. **Memorias IV Congreso Nacional de Micología.** Tlaxcala. Tlax 135.
- Perotto, S., J. D. Coisson, I. Perugini, V. Cometti y P. Bofante, 1997. Production of Pectin-Degrading Enzymes by Ericoid Mycorrhizal Fungi. **New Phytol.** **135**:151-162.
- Peterson, R. L., 1991. Histochemistry of Ectomycorrhiza. In: Morris, J. R., D. J. Read y A. K. Varma (Eds.) **Methods in Microbiology, Techniques for the Study of Mycorrhiza.** No. 23. Academic Press, Londres. New York. 107-118.
- Pfunder, M., S. Schürch y B. A. Roy, 2001. Sequence Variation and Geographic Distribution of Pseudoflower-forming Rust fungi (*Uromyces pisi* s. Lat.) On *Euphorbia cyparissias*. **Mycol. Res.** **105**:57-66.
- Piché, Y. y J. A. Fortin, 1982. Development of Mycorrhizae, Extramatrical Mycelium and Sclerotia in *Pinus strobus* Seedlings. **New Phytol.** **91**:211-220.

- Pirozinski, K. A. y D. L. Hawksworth, 1988. Coevolution of Fungi with Plants and Animals: Introduction and Overview. In: EDITORES. **Coevolution of Fungi with Plants and Animals**. Academic Press. New York. 1-29
- Plassard, C., f. Martin, D. Mousain y L. Salsac, 1986. Physiology of Nitrogen Assimilation by Mycorrhiza. **Mycorrhizae: Physiology and Genetics**. 1st ESM INRA Paris, 111-120.
- Posada, M. L., B. Patiño, A. De la Heras, S. Mirete, C. Vázquez y M. T. González-Jaén, 2000. Comparative Analysis of an Endopolygalacturonase Coding Gene in Isolates of Seven *Fusarium* Species. **Mycol. Res.** **104**:1342-1347.
- Posada, M. L., B. Patiño, S. Mirete, M. C. Muñoz, C. Vázquez y M. T. González-Jaén, 2001. Comparative Analysis of Polygalacturonases in Isolates of Seven Species of *Fusarium* from *Pinus pinea*. **Mycol. Res.** **105**:100-104.
- Purwantara, A., J. M. Barrins, A. J. Cozijnsen, P. K. Ades y B. J. Howie, 2000. Genetic Diversity of Isolates of the *Leptosphaeria maculans* Species Complex from Australia, Europe and North America using Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. **Mycol. Res.** **104**:772-781.
- Quintos, M. y M. Valdés, 1987. El Desarrollo de Micorriza y el Crecimiento de Plántulas de Pino Real (*Pinus engelmannii*) al Inocularse con *Pisolithus tinctorius*. **Rev. Lat-Amer. Microbiol.** **29**:189-192.
- Quintos, M., L. Varela y M. Valdés, 1984. Contribución al Estudio de los Micromicetos, Principalmente los Ectomicorrízicos en el Estado de Durango. **Bol. Soc. Méx. Mic.** **19**:283-290.
- Ramírez, J., J. Castillo, M. Ibarra, G. Olalde y F. Landeros, 2000. La Familia Amanitaceae y Russulaceae en el Estado de Querétaro. **Memorias VII Congreso Nacional de Micología**. Querétaro, Qro, 123.
- Read, D. J., R. Leake y A. R. Langdale, 1989. The Nitrogen Nutrition of Mycorrhizal Fungi and Their Host Plants. In: Boddy L. R. Marchant y D. J. Reid (eds). **Nitrogen, Phosphorus and Sulphur Utilization by Fungi**. Cambridge University Press, Cambridge, 181-204.
- Reyes, I., y M. Aquiahuatl, 2000. Micromicetos del Bosque de Encino de Rincón de Ugarte Tejupilco de Hidalgo, México. **Memorias VII Congreso Nacional de Micología**. Querétaro, Qro, 113.
- Reyes, J. I. y S. Palacios, 1998. Micorrización de *Quercus hintonii* Warb., Especie Endémica del Estado de México. **Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica**. Colima, Col. 84.
- Richter, D. L. y J. N. Bruhn, 1986. Pure Culture Synthesis of *Pinus resinosa* Ectomycorrhiza with *Amanita*, *Suillus*, and *Lactarius*. **Forest Sci.** **19**:242-250.
- Ruehle, J. L., 1982. Field Performance of Container-grown Loblolly Pine Seedlings with Specific Ectomycorrhizae on a Reforestation Site in Southern. **J. Appl. For.** **6**:30-33.
- Ruehle, J. L., D. H. Marx y M. Abourough, 1981. Development of *Pisolithus tinctorius* and *Thelephora terrestris* Ectomycorrhizae on Seedlings of Coniferous Trees Important to Morocco. **Annales de la Recherche Forestiere Au Maroc**:283-296.
- Salas-Portugal, A., 1996. Ecología. **Ciencias** **43**:3.
- Samson, J., y J. A. Fortin, 1986. Ectomycorrhizal Fungi of *Larix laricina* and the Interspecific and Intraspecific Variation in Response to Temperature. **Can. J. Bot.** **64**:3020-3028.
- Santiago-Martínez, G., 1992. **Pruebas de Crecimiento, Síntesis In Vitro y Caracterización de 10 Cepas de Hongos Ectomicorrízicos**. Tesis de Maestría. Fac. Ciencias, UNAM, D. F.
- Santiago-Martínez, G. y V. Cuaxilo, 1991. Pruebas de Crecimiento de Cultivos Puros de Hongos Ectomicorrízicos en Diferentes Medios Nutritivos. **Memorias IV Congreso Nacional de Micología**. Tlaxcala. Tlax. 136.
- Santiago-Martínez G., L. Varela y A. Estrada-Torres, 1993. Síntesis *in vitro* de la micorriza de *Pisolithus tinctorius* y *Pinus montezumae*. **Rev. Mex. Mic.** **9**:77-83.
- Santiago-Martínez, G. A. Estrada-Torres y L. Varela, 1994. Síntesis *in vitro* de la Micorriza entre *Pinus montezumae* y *Laccaria bicolor*. **Memorias V Congreso Nacional de Micología**. Guanajuato, Guanajuato. 51.
- Santiago-Martínez, G., L. Varela, A. Estrada-Torres y V. Cuaxilo, 1995. Efecto de Seis Medios de Cultivo sobre el Crecimiento de Tres Cepas de *Pisolithus tinctorius*. **Rev. Mex. Mic.** **11**:57-68.
- SARH, 1991-1992. Inventario Nacional Forestal de Gran Visión. Subsecretaría Forestal. México.
- Serrano, G., E. Bárcenas y E. Pérez-Silva, 1997. Estudio del Género *Lactarius* como Hongo Ectomicorrízico en Dos Zonas Forestales del Estado de México. **Memorias VI Congreso Nacional de Micología**, Chiapas, 135.

- Shán I, L., 1966. Heterogenous Laccase Production by Mycelium of White Rot Fungi. **Biol. Pl.** 8:292-298
- Singer, R., 1986. **The Agaricales in Modern Taxonomy**. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- SDS e INE, 1993. Informe de la Situación General en Materia de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente 1991-1992. Secretaria de Desarrollo Social, México.
- Schüßler, A. H., Gehrig, D., Schwarzott y C. Walker, 2001. Analysis of Partial Glomales SSU rRNA Gene Sequences: Implications for Primer Design and Phylogeny. **Mycol. Res.** 105:5-15.
- Smith, R. E., 1977. Rapid Tube Test for Detecting Fungal Cellulase Production. **Appl. Environ. Microbiol.** 33:980-981.
- Smith, B. J. y K. Sivasithamparam, 2000. Isozymes of *Ganoderma* Species from Australia. **Micol. Res.** 104:952-961.
- Stalpers, J. A., 1978. Identification of Wood-Inhabiting Aphyllophorales in Pure Culture. **Stud. Mycol.** 16:1-248.
- Stein, A. y J. A. Fortin, 1990. Pattern of Root Initiation by an Ectomycorrhizal Fungus on Hypocotyl Cuttings of *Larix laricina*. **Can. J. Bot.** 68:492-498.
- Stribley, D. P., 1987. Mineral Nutrition. In: Safir G. R. (Ed) **Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants**. CRC Press, Florida, 59-70.
- Stummer, B. E., T. Zanker, E. S. Scott y D. L. Whisson, 2000. Genetic Diversity in Populations of *Uncinula necator*: Comparison of RFLP- and PCR-based Approaches. **Mycol. Res.** 104:44-52.
- Suárez-Islas A. y L. Villareal, 1998. Producción del Hongo de Ocote (*Tricholoma magnivelare* (Peck) Redhead) en Dos Rodales de la Sierra de Pachuca, Hidalgo. **Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica**. Colima, Col. 83.
- Summerbell, R. C., 1985. The Staining of Filamentous Fungi with Diazonium Blue B. **Mycologia** 77:587-593.
- Summerbell, R. C., S. A. Rosenthal y J. Kane, 1988. Rapid Method for Differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and Related Dermatophyte Species. **J. Clin. Microbiol.** 26:2279-2282.
- Swedjemark, G. y J. Stenlid, 2001. A highly Diverse Population of *Heterobasidion annosum* in a Single Stump of *Picea abies*. **Mycol. Res.** 105:183-189.
- Taber, J. B. y R. A. Taber, 1987. Carbon Nutrition and Respiration of *Pisolithus tinctorius*. **Trans. Br. Mycol. Soc.** 89:13-26.
- Taylor, J. B., 1974. Biochemical Tests For Identification of Mycelial Cultures of Basidiomycetes. **Ann. Appl. Biol.** 78:113-123.
- Taylor, T. N., 1990. Fungal Associations in the Terrestrial Paleocosystem. **Tree** 5:21-25.
- Taylor, F. W., D. M. Thamege, N. Baker, N. Roth-Bejerano y V. Kagan-Zur, 1995. Notes on the Kalahari Desert Truffle, *Terfezia Pfeillii*. **Mycol. Res.** 99:874-878.
- Tejocote, P. M., J. J. García, E. G. Bárcenas, C. A. Burrola, y A. E. B. González Borja, 2000. Obtención y Manejo de Germoplasma Implicado en la Síntesis de Ectomicorrizas *in vitro*. **Memorias VII Congreso Nacional de Micología**. Querétaro, Qro, 111.
- Theodorou, C. y G. D. Bowen, 1970. Mycorrhizal Responses of Radiata Pine in Experiments with Different Fungi. **Aust. For.** 34:183-191.
- Theodorou, C. y G. D. Bowen, 1971. Influence of Temperature on the Mycorrhizal Associations of *Pinus radiata* D. Don. **Aust. J. Bot.** 19:13-20.
- Theodorou, C. y G. D. Bowen, 1973. Inoculation of Seeds and Soil with Basidiospores of Mycorrhizal Fungi. **Soil Biol. Biochem** 5:763-771.
- Thiers, H. D., 1984. The Scotioid Syndrome. **Mycologia** 76:1-8.
- Thomas G. W. y R. M. Jackson, 1983. Growth Responses of Sitka Spruce Seedlings to Mycorrhizal Inoculation. **New Phytol** 95:223-229.
- Toledo, V. M., 1988. La Diversidad Biológica de México. **Ciencia y Desarrollo** 81:17-29.
- Torres, A., G. Santiago-Martínez y A. Estrada-Torres, 1997. Síntesis de la Ectomicorriza de *Pinus montezumae* y *Rhizopogon* sp. **Memorias VI Congreso Nacional de Micología**. Tapachula, Chiapas, 191.
- Torres, P., 1992. **Estudio de las Ectomicorrizas de Pino Carrasco (*Pinus halepensis* Miller)**. Tesis de Doctorado, Universidad de Murcia, Murcia.
- Torres, P. y M. Honrubia, 1993. Descripción de Algunos Hongos Ectomicorrícicos en Cultivo Puro. **Bol. Soc. Micol. Madrid** 18:163-170.

- Torres P. y M. Honrubia, 1994. Inoculation of Containerized *Pinus halepensis* (Miller) Seedlings with Basidiospores of *Pisolithus arhizus* (Pers.) Rauschert, *Rhizopogon roseolus* (Corda) and *Suillus collinitus* (Fr.) O. Kuntze. **Ann Sci. For** 51:521-528.
- Torres, P. y M. Honrubia, 1994. Basidiospore viability in stored slurries. **Mycol. Res.** 98:527-530.
- Torres, P., M. Honrubia y M. A. Morte, 1991. *In vitro* Synthesis of Ectomycorrhizae between *Suillus collinitus* (Fr.) O. Kuntze and *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. M. Fr. with *Pinus halepensis* Miller. **Mycotaxon** 41:437-443.
- Trappe, J. M., 1962. Fungus Associates of Ectotrophic Mycorrhizae. **Bot. Rev.** 28:538-606.
- Trappe, J. M., 1967. Pure Culture Synthesis of Douglas-fir Mycorrhizae with Species of *Hebeloma*, *Suillus*, *Rhizopogon* and *Astraeus*. **Forest Sci.** 13:121-130.
- Trappe, J. M., 1977. Selection of Fungi for Ectomycorrhizal Inoculation in Nurseries. **Annu. Rev. Phytopathol.** 15:203-222.
- Trappe, J. M., 1987. Phylogenetic and Ecologic Aspects of Mycotrophy in the Angiosperms from Evolutionary Standpoint. In: Safir G. R. (Ed). **Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants**. CRC Press, Florida, 2-25.
- Trappe, J. M., C. Y. Li, K. C. Lu y W. B. Bollen, 1973. Differential Response of *Poria weirii* to Phenolic Acids from Douglas Fir and Red Alder Roots. **Forest Sci.** 19:191-196.
- Treu, R., 1990a. *Suillus plorans*. In Agerer, R. (Ed.). **Colour Atlas of Ectomycorrhizae**, Plate 46. Einhorn-Verlag, Schäbisch Günd.
- Treu, R., 1990b. *Suillus sibiricus*. In Agerer, R. (Ed.). **Colour Atlas of Ectomycorrhizae**, Plate 47. Einhorn-Verlag, Schäbisch Günd.
- Trojanowski, J., K. Haider y A. Huttermann, 1984. Descomposition of ¹⁴C-Labelled Lignin, Holocellulose and Lignocellulose by Mycorrhizal Fungi. **Arch. Microbiol.** 139:202-206.
- Uhl, 1988. Studies on Mycorrhizae. XV. Mycorrhizae Formed by *Rhizopogon luteolus* on *Pinus sylvestris*. **Persoonia** 13:449-458.
- Uribe-Arróyave, I., L. Varela y R. Valenzuela, 1997. Nuevos Registros de Hongos Hipogeos y una Nueva Especie de *Protuberia* en el Estado de Tlaxcala. **Memorias VI Congreso Nacional de Micología**. Tapachula, Chiapas, 198.
- Valdés, M. 1986. Survival and Growth of Pines with Specific Ectomycorrhizae after Three Years on a Highly Eroded Site. **Can. J. Bot.** 64:885-888.
- Valdés, M., 1986. Sobrevivencia y Crecimiento de Pinos con Ectomicorrizas Específicas Después de Tres Años en un Sitio Altamente Erosionado. **Informe Provisional No. 8**, 1985, Ciclo Lectivo Sobre el Tema Técnicas de Investigación en Micorriza. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza-CATIE Turrialba, Costa Rica 18-28 septiembre. 409-424.
- Valdés, M. y R. Grada-Yautentzi, 1980. Mycorrhizal Inoculation and the Afforestation of the Valley of México City. In: **Tropical Mycorrhizae Research**. 93-96.
- Valdés, M., F. Piña y R. Grada-Yautentzi, 1983. Inoculación Micorrízica y Crecimiento de Plántulas de Pino en Suelo erosionado. **Bol. Soc. Mex. Mic.** 18:65-70.
- Varela, L. y A. Estrada-Torres, 1997. Diversity and Potential Use of Mycorrhizae for Sustainable Development in Mexico. In: Palm M. E. y I. H. Chapela (Eds.) **Mycology in Sustainable Development: Expanding Concepts, Vanishing Borders**. Parway, North Carolina, 160-182.
- Vázquez-Marrufo, G., M. m. Gálvez-Guerra y V. Olalde-Portugal, 1998. Caracterización Fisiológica de Dos Cepas del Género *Amanita* (Basidiomycetes). **Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica**. Colima, Col. 77.
- Villa, C. J., 1998. Producción de Plantas de *Pinus douglasiana* Micorrizadas con *Pisolithus tinctorius*. **Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica**. Colima, Col. 85.
- Vozzo, J. A. y E. Hacskeylo, 1971. Inoculation of *Pinus caribea* with Ectomycorrhizal Fungi in Puerto Rico. **Forest Sci.** 17:239-245.
- Villé, A. C., 1988. **Biología Celular**. Mac Graw Hill, México.
- Warcup, J. H., 1988. Mycorrhizal Associations of Isolates of *Sebacina vermifera*. **New Phytol.** 110:227-231.
- Werner, G. 1988. **Los Suelos en el Estado de Tlaxcala**. Gobierno del Estado de Tlaxcala y Universidad Autónoma de Tlaxcala. Talleres Gráficos del Estado de Tlaxcala, S. A. Tlaxcala.
- Werner, D., 1992. **Symbiosis of Plants and Microbes**. Chapman & Hall, London. 339-380.

- Xicohténcatl, A., G. Santiago-Martínez y A. Estrada-Torres, 1997. Ectomicorriza de *Pinus montezumae* con Dos Especies de *Suillus*. **Memorias VI Congreso Nacional de Micología**. Tapachula, Chiapas, 192.
- Xochitiotzin, H. M., 2000. **Inoculación Esporal de *Pinus montezumae* con *Suillus tomentosus* e *Inocybe griseovelata*, en Tres Sustratos Bajo Condiciones de Vivero**. Tesis de Licenciatura, Departamento de Agrobiología, Universidad Autónoma de Tlaxcala
- Yang, C. S. y H. E. Wilcox, 1984. Technique for Observation of Mycorrhizal Development Under Monoxenic Conditions. **Can. J. Bot.** **62**:251-254.
- Yang, Z. L., M. Weiß, I. Kottke, F. Oberwinkler, U. Nehls, M. Guttenberg y R. Hampp, 1999. *Amanita*. In: Cairney J. W. G. y S. M. Chambers (Eds.) **Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile**. Springer, New York. 201 -230.
- Zak, B. y W. C. Bryan, 1963. Isolation of Fungal Symbiosis from Pine Mycorrhizae. **Forest Sci.** **9** 270-278.
- Zak, B. y D. H. Marx, 1964. Isolation of Mycorrhizal Fungi from Roots of Individual Slash Pines. **Forest Sci.** **10**:214-222
- Zamora-Martínez, M., L. Varela y E. Amora, 2002. Marco Legal para la Producción de Plantas Micorrizadas en México. In: Guzmán G. y G. Mata (eds.) **Estudio Sobre los Hongos Latinoamericanos. Resúmenes del IV Congreso Latinoamericano de Micología**. Xalapa, Veracruz, 376.