



00381
2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

**FISIOLOGIA DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE HONGOS
ECTOMICORRIZICOS EN MEDIO SOLIDO**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)**
PRESENTA

MA. DE LOS ANGELES AQUIAHUATL RAMOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. HERMILO LEAL LARA

MEXICO. D. F.

JUNIO, 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

SINODALES

CARGO		GRADO	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	:	DR.	TEÓFILO HERRERA SUÁREZ
PRIMER VOCAL	:	DRA.	HERMILO LEAL LARA
SEGUNDO VOCAL	:	DR.	ARTURO ESTRADA TORRES
TERCER VOCAL	:	DR.	JUAN EMMANUEL RINCÓN SAUCEDO
SECRETARIO	:	DR.	SALVADOR RODRÍGUEZ ZARAGOZA
SUPLENTE	:	DR.	RONALD FERRERA CERRATO
SUPLENTE	:	DRA.	LUCIA YOLANDA VARELA FREGOSO

B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*Las más grandes obras han sido
llevadas a cabo por hombres que
mantuvieron su capacidad de
soñar grandes sueños.*

W. Bowie

*La felicidad del hombre es un
sentimiento de placer por su actividad
que reporta provecho a otros; es un
sentimiento de poder creativo
engendrado por el trabajo creador*

K. Platonov

C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A Willy, Marita, Joel

a quienes no sabría no querer, por su gran amor y grandes e invaluables enseñanzas

Con especial afecto para el Dr Sevastianos Roussos por su amistad e invaluable apoyo y dirección en los proyectos de nuestra vida.

D

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Sevastianos Roussos y al Dr. Christopher Augur del Institut de Recherche pour el Developpement (IRD) por el apoyo y facilidades brindadas para desarrollar parte del trabajo experimental en sus Laboratorios de Montpellier y Marsella en Francia.

Al Dr. Gerardo Saucedo Castañeda, Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa por el apoyo institucional y personal brindado para la realización y conclusión de este trabajo.

E

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Las micorrizas	3
1.1.1. Definición de micorriza	4
1.1.2. Clasificación y descripción general de las micorrizas	4
1.1.3. Distribución de las micorrizas en las plantas	7
1.1.4. Los hongos micorrizógenos	8
1.1.5. Ecofisiología de las micorrizas	9
1.2. Las ectomicorrizas	16
1.2.1. Importancia económica y estratégica de las ectomicorrizas	16
1.2.2. Las ectomicorrizas en México	16
1.2.3. Micorrización controlada	18
1.3. La fermentación en medio sólido (FMS)	20
1.3.1. Descripción del sistema de Cultivo en Estado Sólido (CES)	21
1.3.2. Aplicaciones y problemáticas del CES	24
1.3.3. Descripción del crecimiento fúngico en CES	25
2. ANTECEDENTES	29
2.1. Fisiología del crecimiento de HEM	29
2.1.1. Requerimientos nutrimentales	29
2.1.2. Condiciones ambientales	32
2.1.3. Producción de inoculantes de HEM	34
JUSTIFICACIÓN	36
OBJETIVOS	37
HIPÓTESIS	38
3. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. Microorganismos	39
3.2. Medios de cultivo	39
3.2.1. Medio de Papa Dextrosa Agar (PDA)	39
3.2.2. Medio semisintético BAF	40
3.3. Análisis morfológico	40
3.4. Análisis morfométrico	41
3.5. Análisis estadísticos	41
3.6. Evaluación del crecimiento micelial	42
3.6.1. Crecimiento radial	42
3.6.2. Velocidad media de crecimiento radial (Vr)	42
3.6.3. Dimensión fractal	42
3.7. Métodos de cuantificación de la biomasa	42
3.7.1. Por licuefacción del agar y filtración	42
3.7.2. En cubiertas de celofán	43
3.8. Estandarización del sistema de cultivo sólido con cubiertas de celofán	45
3.8.1. Tratamiento y análisis de muestras	45
3.8.2. Efecto de la cubierta de celofán	46
3.8.3. Efecto del sitio de obtención del inóculo micelial	46

F

3.8.4.	Efecto del tamaño de inóculo	46
3.8.5.	Efecto de la densidad de inoculación	46
3.9.	Fisiología del crecimiento micelial en agar	47
3.9.1.	Efecto de la concentración de glucosa	47
3.9.2.	Efecto de la fuente de nitrógeno	48
3.9.3.	Efecto de la actividad de agua (a_w)	48
3.10.	Diseño factorial fraccionario para determinar el efecto de factores ambientales y nutrimentales	49
3.11.	Fisiología del crecimiento micelial en soporte sólido	52
3.12.	Descripción y acondicionamiento de los soportes sólidos	52
3.12.1.	Origen de los soportes	52
3.12.2.	Tamizado y lavado del bagazo de caña	52
3.12.3.	Determinación de la densidad de los soportes	52
3.12.4.	Ajuste de la humedad del bagazo de caña e impregnación con el medio	53
3.12.5.	Selección del tamaño de partícula de bagazo de caña y ajuste de humedad	53
3.12.6.	Diseño factorial fraccionario para determinar el efecto de factores ambientales y nutrimentales	54
3.12.7.	Preparación de la mezcla de vermiculita-turba	54
3.12.8.	Ajuste de la humedad de la vermiculita-turba e impregnación con el medio de cultivo	54
3.12.9.	Esterilización de los soportes	55
3.13.	Métodos de conservación de cepas	55
3.13.1.	Resiembras en frascos de cultivo	55
3.13.2.	Resiembras periódicas en cajas de Petri	55
3.13.3.	En agua destilada estéril	56
4.	RESULTADOS	57
4.1.	Descripción morfológica de HEM.	57
4.2.	Caracterización del crecimiento micelial	59
4.3.	Producción de biomasa	62
4.4.	Dimensión fractal	64
4.5.	Estandarización de un sistema de cultivo sólido con cubierta de celofán	67
4.5.1.	Efecto de la cubierta de celofán en el crecimiento y la morfología colonial	67
4.5.2.	Efecto de la cubierta de celofán en el consumo de azúcares	69
4.5.3.	Efecto del sitio de obtención del inóculo micelial	70
4.5.4.	Efecto del tamaño de inóculo	72
4.5.5.	Efecto de la densidad de inoculación	74
4.6.	Fisiología del crecimiento micelial en agar	76
4.6.1.	Efecto de la concentración de glucosa	76
4.6.2.	Efecto de la fuente de nitrógeno	82
4.6.3.	Efecto de la actividad de agua (a_w)	86
4.6.4.	Diseño factorial fraccionario para determinar el efecto de factores ambientales y nutrimentales	88
4.7.	Fisiología del crecimiento micelial en soporte sólido	93
4.7.1.	Selección del tamaño de partícula de bagazo de caña y ajuste de humedad	93
4.7.2.	Diseño factorial fraccionario para determinar el efecto de factores ambientales y nutrimentales	93

G

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.8.	Conservación de las cepas	99
4.8.1.	<i>Resiembras periódicas en agar</i>	99
4.8.2.	<i>En agua destilada estéril</i>	101
5.	DISCUSIÓN	102
5.1.	Descripción morfológica de HEM.	102
5.2.	Caracterización del crecimiento micelial	103
5.3.	Producción de biomasa y dimensión fractal	105
5.4.	Sistema de cultivo en cajas de Petri con agar cubierto de celofán	107
5.5.	Fisiología del crecimiento micelial en agar	109
5.5.1.	<i>Efecto de la concentración de glucosa</i>	109
5.5.2.	<i>Efecto de la fuente de nitrógeno</i>	111
5.5.3.	<i>Efecto de la actividad de agua (a_w)</i>	113
5.5.4.	<i>Diseño factorial fraccionario para determinar el efecto de factores ambientales y nutrimentales</i>	115
5.6.	Fisiología del crecimiento micelial en soporte sólido	118
5.7.	Conservación de las cepas	120
6.	CONCLUSIONES	123
7.	LITERATURA CITADA	125

tt

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Grupos y especies de hongos simbiotas que forman diferentes tipos de micorrizas.....	9
Tabla 1-2: Valores de a_w límites para el crecimiento de diversas especies de hongos saprobios en comparación con los de bacterias.	22
Tabla 3-1: Listado de especies de hongos ectomicorrizicos (HEM) y sitios de procedencia.....	39
Tabla 3-2: Medio de cultivo BAF	40
Tabla 3-3: Concentración de sustancias depresoras de a_w , para ajustar los medios de cultivo a dos valores	48
Tabla 3-4: Matriz de Hadamard de 7 factores con 8 experimentos (De Meo <i>et al.</i> , 1985).....	50
Tabla 3-5: Tratamientos y combinación de factores en tres diseños factoriales fraccionarios.....	51
Tabla 4-1: Morfología colonial y micelial de HEM en medio dos medios de cultivo: semisintético de BAF Agar y complejo PDA.....	58
Tabla 4-2: Crecimiento de <i>Suillus collinitus</i> S-24 en cajas de Petri de 60 y 90 mm con 10 mL y 25 mL de medio PDA inoculadas con 1 y 3 discos miceliales de 5 mm.....	75
Tabla 4-3: Análisis descriptivo del Crecimiento radial (mm) y Biomasa (mg) de <i>Suillus collinitus</i> S-24 en cajas de Petri con medio BAF.....	88
Tabla 4-4: Coeficientes de regresión y efectos estimados para cada factor probado sobre el crecimiento radial (mm) y la biomasa (mg) por colonia de <i>Suillus collinitus</i> en tres planes de experimentación con tres fuentes de nitrógeno.	89
Tabla 4-5: Análisis descriptivo de los resultados del crecimiento radial (mm) de colonias de <i>S. collinitus</i> cultivadas en cajas de Petri con bagazo de caña y vermiculita-turba	94
Tabla 4-6: Coeficientes de regresión y efectos estimados de siete factores sobre el crecimiento radial (mm) de colonias de <i>Suillus collinitus</i> en tres planes de experimentación con tres fuentes de nitrógeno en bagazo de caña y vermiculita-turba	95

I.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Esquema de la zona radicular (zr), zona micorrízica (zm) y pelos absorbentes (e) de las plantas.....	3
Figura 1-2: Clasificación de las micorrizas por la forma de colonización de la raíz de diferentes grupos de plantas por diversas especies de hongos micorrízicos.....	5
Figura 1-3: Representación esquemática de las principales estructuras micorrízicas desarrolladas en la zona radicular de las plantas colonizadas y no micorrizadas.....	6
Figura 3-1: Técnica de cultivo y análisis de HEM en cajas de Petri con medios de cultivo solidificados con agar cubiertas con cubierta de celofán.....	44
Figura 4-1: Morfología colonial y micelial de HEM en diferentes medios PDA y BAF.....	59
Figura 4-2: Cinéticas de crecimiento radial (mm) de especies ectomicorrízicas en medio BAF y PDA.....	60
Figura 4-3: Relación del crecimiento radial (mm) de las colonias y la velocidad radial (Vr) de 10 cepas de HEM cultivados durante 21 días en dos medios de cultivo.....	61
Figura 4-4: Evaluación de biomasa colonial de HEM cultivados durante 21 días en cajas de Petri de 90 mm con 25 mL de medio de cultivo PDA y BAF.....	62
Figura 4-5: Relación entre la biomasa y el crecimiento radial de colonias de HEM cultivadas en BAF y PDA.....	63
Figura 4-6: Relación biomasa/crecimiento radial de cepas de HEM cultivadas en BAF y PDA.....	64
Figura 4-7: Valores de dimensión fractal (D) de cepas de HEM cultivadas en BAF y PDA.....	65
Figura 4-8: Relación entre la dimensión fractal (D), el diámetro de las colonias (mm) y la biomasa (mg) de las colonias de HEM en medio BAF.....	65
Figura 4-9 Efecto de la utilización de una cubierta de celofán en los medio de cultivo sólido sobre la biomasa y diámetro colonial de cepas de HEM cultivadas en PDA.....	67
Figura 4-10: Morfología colonial y micelial de HEM en PDA con celofán.....	68
Figura 4-11: Efecto de la cubierta de celofán en las cinéticas de producción de biomasa y consumo de glucosa de <i>Sullus collinitus</i> S-24 y <i>Pisolithus tinctorius</i> F-26.....	69
Figura 4-12: Resultados de biomasa (mg) y crecimiento radial (mm) de colonias de <i>P. tinctorius</i> F-26 y <i>S. collinitus</i> S-24 cultivadas en medio PDA, con micelio obtenido de la periferia, zona media y zona central de colonias previamente cultivadas en PDA.....	70
Figura 4-13: Efecto del sitio de toma de inóculo en la Vr y dimensión fractal de colonias de <i>P. tinctorius</i> y <i>S. collinitus</i> cultivadas en cajas de Petri con PDA.....	71
Figura 4-14: Efecto del sitio de origen del inóculo micelial de <i>P. tinctorius</i> y <i>S. collinitus</i> en la producción de biomasa y consumo de glucosa.....	72
Figura 4-15: Resultados de biomasa (mg) y crecimiento radial (mm) de colonias de <i>P. tinctorius</i> F-26 y <i>S. collinitus</i> S-24 en cajas de medio PDA inoculadas con discos de tres tamaños.....	73
Figura 4-16: Efecto del tamaño del inóculo micelial en la Vr y dimensión fractal de colonias de <i>P. tinctorius</i> y <i>S. collinitus</i> cultivadas en cajas de Petri con PDA.....	73
Figura 4-17: Efecto del tamaño del inóculo en la producción de biomasa y consumo de glucosa de <i>P. tinctorius</i> F-26 y <i>S. collinitus</i> S-24.....	74

Figura 4-18: Efecto de la concentración de glucosa del medio de cultivo BAF en la producción de biomasa y diámetro de las colonias de <i>Pisolithus</i> y <i>Suillus</i>	76
Figura 4-19: Efecto de la concentración de glucosa del medio de cultivo sobre la velocidad de crecimiento radial (Vr) micelial de <i>Pisolithus</i> y <i>Suillus</i>	77
Figura 4-20: Efecto de la concentración de glucosa en medio BAF sobre la dimensión fractal de las colonias de <i>Suillus</i> y <i>Pisolithus</i>).....	78
Figura 4-21: Morfología colonial de <i>Suillus collinitus</i> , <i>Suillus tomentosus</i> S-1009; <i>Suillus tomentosus</i> S-276 en medio de cultivo BAF con tres concentraciones de glucosa.....	79
Figura 4-22: Morfología colonial de <i>Pisolithus tinctorius</i> P-5, <i>Pisolithus tinctorius</i> F-26, <i>Lactarius deliciosus</i> D-47 <i>Lactarius sanguifluus</i> S-29 en medio de cultivo BAF con tres concentraciones de glucosa.....	81
Figura 4-23: Morfología colonial de <i>Suillus collinitus</i> , <i>Suillus tomentosus</i> S-1009; <i>Suillus tomentosus</i> S-276 en medios de cultivo BAF con tres concentraciones de glucosa (1, 10 y 30 g/L) y nitrato de calcio.....	83
Figura 4-24: Morfología colonial de <i>Pisolithus tinctorius</i> P-5, <i>Pisolithus tinctorius</i> F-26, <i>Lactarius deliciosus</i> D-47 <i>Lactarius sanguifluus</i> S-29 en medios de cultivo BAF con tres concentraciones de glucosa (1, 10 y 30 g/L) y nitrato de calcio.....	84
Figura 4-25: Diámetro y biomasa de colonias de: <i>Lactarius</i> , <i>Pisolithus</i> y <i>Suillus</i> en medio BAF con tres fuentes de nitrógeno (peptona, sulfato de amonio y nitrato de calcio).....	85
Figura 4-26: Efecto de la actividad de agua (a_w) del medio de cultivo BAF ajustado (0.96 y 0.98) con Etilenglicol y Glicerol.....	87
Figura 4-27: Efecto combinado de factores ambientales y nutrimentales en el crecimiento radial de colonias de <i>S. collinitus</i> en medio BAF modificado con tres fuentes de nitrógeno.....	91
Figura 4-28: Efecto combinado de factores ambientales y nutrimentales en la biomasa de colonias de <i>S. collinitus</i> en medio BAF modificado con tres fuentes de nitrógeno.....	92
Figura 4-29: Efecto combinado de factores ambientales y nutrimentales en el crecimiento radial de colonias de <i>S. collinitus</i> S-24 en bagazo de caña impregnado con medio BAF modificado con tres fuentes de nitrógeno.....	96
Figura 4-30: Efecto combinado de factores ambientales y nutrimentales en el crecimiento radial de colonias de <i>S. collinitus</i> S-24 en vermiculita-turba impregnada con medio BAF modificado con tres fuentes de nitrógeno.....	97
Figura 4-31: Cultivos de <i>Suillus collinitus</i> en dos soportes sólidos impregnados con medio de cultivo BAF. A: bagazo de caña B: vermiculita-turba.....	98
Figura 4-32: Observación microscópica del crecimiento micelial <i>Suillus collinitus</i> entre los espacios intra particulares del bagazo de caña y vermiculita-turba.....	99
Figura 4-33: Efecto de las resiembras periódicas de <i>P. tinctorius</i> P-5, P-3, P-4 y F-26, <i>S. collinitus</i> S-24, <i>S. tomentosus</i> S-1009 y S-276 y <i>S. glandulosipes</i> S-1588) en dos sistemas y dos medios de cultivo..	100

K

RESUMEN

Las ectomicorrizas, presentes en 3-5% de plantas terrestres principalmente de tipo forestal son de gran importancia ecológica en los ecosistemas boscosos, que son fundamentales para conservar el equilibrio ambiental en la biosfera.

La introducción de HEM en plántulas de viveros, utilizando suelo forestal como fuente de inóculos o esporas obtenidas de cuerpos fructíferos son los mecanismos de inoculación generalmente aplicados para mejorar la supervivencia de las plantas que serán introducidas en suelos erosionados, de bajo nivel nutrimental..

Estos procedimientos son muy variables y en ocasiones son causantes de problemas asociados al transporte de especies patógenas, por lo que la elaboración de inoculantes de HEM seleccionados por su capacidad de micorrización y adaptación a condiciones específicas es de gran importancia.

La producción de inóculos miceliales de HEM, depende de la posibilidad de cultivarlos en condiciones de laboratorio con crecimiento controlado y conservando su potencial micorrízico, por lo que es importante hacer estudios de la fisiología del crecimiento micelial para conocer el efecto de las condiciones nutrimentales y ambientales que favorecerán su crecimiento y conservación.

En este trabajo se hizo la caracterización morfológica de 10 cepas de los géneros *Lactarius*, *Pisolithus* y *Suillus* HEM en medios de composición química definida solidificados con agar. También se hizo la descripción del crecimiento radial y biomasa de los HEM en un sistema de cultivo con cubiertas de celofán para conocer el efecto de la concentración de glucosa, de la fuente nitrogenada y de la actividad de agua en el crecimiento radial, la biomasa y consumo de azúcares en cultivos con agar.

También se hicieron diseños factoriales fraccionarios para conocer el efecto simultáneo de la glucosa, fuente de nitrógeno, pH, temperatura, luz y del extracto de malta y L-asparagina en el crecimiento radial y la biomasa de *Suillus collinitus*, en sistemas de cultivo solidificado con agar y en el bagazo de caña y vermiculita-turba como soportes sólidos.

Se encontró que la morfología de las especies ectomicorrízicas es notablemente afectada por la fuente de nitrógeno, la concentración de glucosa y la actividad de agua de los medios de cultivo, y aunque la cubierta de celofán tuvo algunos efectos en el crecimiento de los hongos, se pudo evaluar la biomasa, el consumo de azúcares y el pH final del medio de cultivo en forma sencilla y reproducible.

Se demostró que hubo diferencias intra e interespecíficas en el crecimiento micelial de las cepas de HEM cultivadas en medio sólido y que estas diferencias se aprecian en forma distinta cuando se mide el diámetro de las colonias, se evalúa el crecimiento radial, la velocidad media de crecimiento, producción de biomasa o la dimensión fractal, de tal forma que es importante definir adecuadamente los criterios de evaluación del crecimiento micelial de las especies ectomicorrízicas.

Con los cultivos de *S. collinitus* en soportes sólidos impregnados con medios de cultivo de diferente composición química se demostró que en bagazo de caña hubo un menor crecimiento que en vermiculita-turba, debido a la baja capacidad de retención de humedad del bagazo.

Los HEM se adaptaron y colonizaron los medios de cultivo y sustratos sólidos, modificando generalmente sus características morfológicas y de crecimiento sin embargo es necesario probar si este tipo de cambios estarán relacionados con su capacidad de micorrización en plántulas y de esta manera comprobar su potencial de aplicación como inoculantes.

La conservación de cepas ectomicorrízicas en agua destilada estéril fue el mejor sistema, debido a la gran sensibilidad a la manipulación y resiembra periódica que se observó en los HEM, por los que este aspecto es de gran importancia de estudiar a fin de que no llegue a ser causa de la pérdida de las cepas y mejorar la reproducibilidad de los resultados obtenidos este tipo de estudios.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las micorrizas

En la naturaleza se presentan diversas interacciones entre diferentes poblaciones microbianas y las raíces de las plantas. Las asociaciones benéficas o mutualistas más estudiadas son las que se establecen entre bacterias fijadoras de nitrógeno, como *Rhizobium*, con plantas leguminosas (Figura 1-1). En años recientes, las micorrizas que se establecen entre las hifas de hongos del suelo y las raíces han adquirido un gran interés porque son reconocidas como las principales estructuras de captación de nutrimentos, que mejoran la supervivencia de la mayoría de las plantas (Smith & Read, 1997).

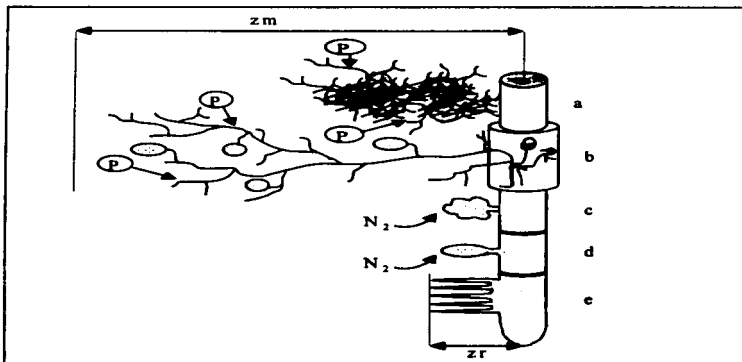


Figura 1-1: Esquema de la zona radicular (zr), zona micorrizica (zm) y pelos absorbentes (e) de las plantas, indicándose las zonas de localización de diferentes relaciones mutualistas con microorganismos del suelo: a) ectomicorrizas b) endomicorriza arbuscular c) nódulos formados por actinomicetes fijadores de nitrógeno de tipo *Frankia* d) nódulos formados por *Rhizobium* (Strullu, 1989).

Pirozynski & Malloch (1975) han sugerido que el establecimiento de esta asociación simbiótica hizo posible el surgimiento de las primeras plantas en la superficie terrestre, lo que ocurrió desde el Mesozoico tardío y han permanecido y determinado la funcionalidad de los ecosistemas terrestres durante millones de años.

1.1.1. Definición de micorriza

El término micorriza proviene de la fusión de dos palabras griegas (*mykes*=hongo, *rhiza*=raíz) que describe a la asociación mutualista que se establece entre las raíces de plantas y el micelio de ciertos hongos del suelo que mejoran el crecimiento y nutrición mineral de las plántulas en comparación con el de plántulas no colonizadas por el hongo (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Aunque Haeskeylo, en 1953 las describió como "un parasitismo recíproco y fisiológicamente bien balanceado" autores como Malloch *et al.* (1980) sugieren que las micorrizas son una regla en la naturaleza más que una excepción aunque el efecto benéfico de los hongos asociados puede ser variable en los diferentes tipos de planta huésped.

1.1.2. Clasificación y descripción general de las micorrizas

Las micorrizas, inicialmente descritas por Frank, 1885 fueron identificadas como ectotróficas y endotróficas, por la localización de la especie fúngica en las raíces; posteriormente se describieron tres grupos morfológicos: Endomicorrizas, Ectomicorrizas y Ectendomicorrizas de acuerdo con las características estructurales y funcionales de la asociación (Figura 1-2), así como por el tipo de plantas y de hongos participantes (Smith & Read, 1997).

En la actualidad se proponen hasta siete tipos de micorriza, de acuerdo con su estructura morfológica y los tipos de plantas y especies fúngicas que participan (Brudnett *et al.*, 1996), sin embargo se sigue considerando la clasificación anterior en estudios de descripción morfológica con los cuales se pueden diferenciar las ectomicorrizas y ectendomicorrizas (Agerer, 1988), pero que en las endomicorrizas es de menor utilidad para identificarlas (Smith & Read, 1997).

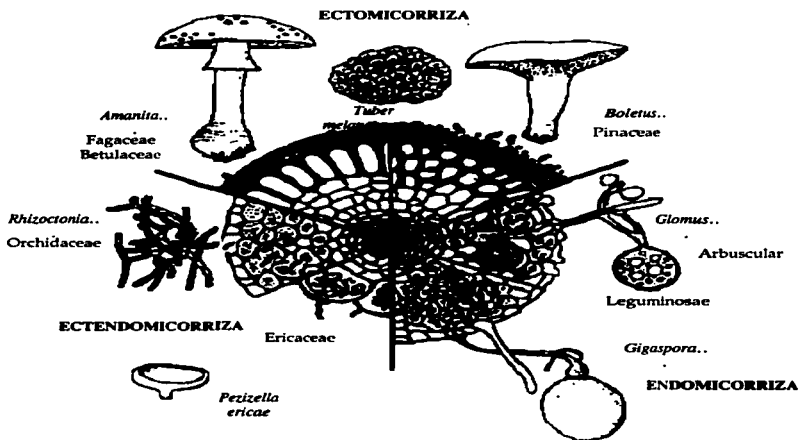


Figura 1-2: Clasificación de las micorrizas por la forma de colonización de la raíz de diferentes grupos de plantas por diversas especies de hongos micorrizicos (Strullu, 1989).

1.1.2.1. Las endomicorizas

Las hifas fúngicas de la endomicoriza (Gr. *endos*=dentro+micorriza), penetran las paredes celulares de la planta huésped y se desarrollan en el interior de las células corticales de la raíz sin modificar la morfología externa, las plantas con las que establecen la relación micorrizica definen los tipos de micorriza que se formarán así por ejemplo: de tipo ericoide se encuentran en ericáceas; las de tipo orquideoide en raíces y embriones de orquidáceas y las de tipo arbuscular (MA) se encuentran en la mayoría de las plantas de interés agrícola, frutícola y ornamental.

En la MA, el hongo penetra las células corticales de la raíz y desarrolla estructuras muy ramificadas de tipo haustorio (L. *haustor*=chupador) conocidas como arbusculos, caracterizados por una

gran área superficial de contacto entre el hongo y el huésped (Figura 1-3). Se considera que los arbuscúlos son el principal sitio de transferencia bidireccional de metabolitos y nutrientes entre ambos participantes (Alexopoulos *et al.*, 1996). Como el micelio del hongo también se puede extender hacia el suelo, de esta manera se incrementan el área superficial de absorción de nutrientes (Rousseau *et al.*, 1994), de captación de agua (Boyd *et al.*, 1986) y la interacción con otros organismos del suelo (Garbaye, 1994).

1.1.2.2. Las ectomicorrizas

En las ectomicorrizas (Gr. *ekto*=fuera+micorriza), la raíz se cubre de tejido fúngico pseudo parenquimatoso (manto) de estructura y grosor variable de acuerdo con la especie de planta huésped. El manto es la interfase entre la planta y el suelo, del que salen numerosas hifas que penetran las partículas del suelo incrementando la absorción y traslocación de nutrientes a la planta huésped (Vogt *et al.*, 1982).

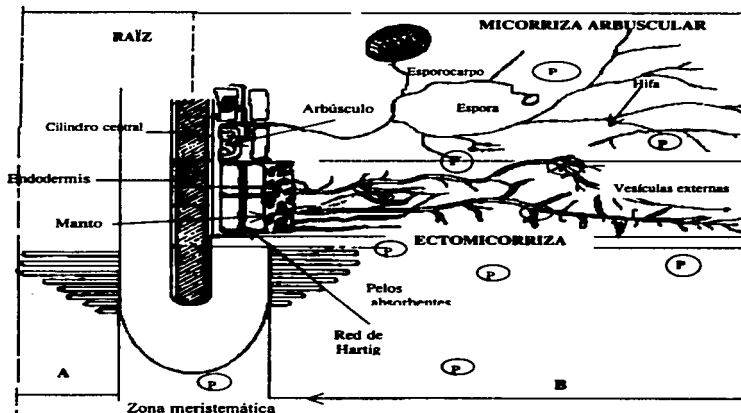


Figura 1-3: Representación esquemática de las principales estructuras micorrízicas desarrolladas en la zona radicular de las plantas colonizadas (B) con respecto a las no micorrizadas (A) y el área superficial de captación de fósforo (P). (Strullu, 1991).

Algunas hifas intercelulares del manto también pueden colonizar otras capas celulares de la corteza radicular sin penetrar las paredes celulares y formar una red de micelio superficial conocida como red de Hartig (Figura 1-3), que es la interfase entre el micelio del hongo y las células radiculares de la planta huésped a través de la cual se lleva a cabo el intercambio de carbohidratos de la planta hacia el hongo y de minerales del hongo hacia la planta (Strullu, 1991).

1.1.2.3. Las ectendomicorizas

Las ectendomicorizas, son las menos estudiadas y se encuentran en un limitado número de plantas del grupo de las coníferas, en algunas ericáceas como *Vaccinium* y *Arbutus*, así como en varias angiospermas parásitas de tipo *Monotropa* que es una herbácea clorofílica. Las raíces de estas plantas presentan características combinadas; el manto puede estar reducido o ausente, y tienen una red de Hartig bien desarrollada con penetración de las hifas en las células de la raíz (Smith & Read, 1997).

1.1.3. Distribución de las micorizas en las plantas

Las endomicorizas se encuentran en más de 1000 géneros (90-95 %) de las 300 000 especies de plantas vasculares conocidas, de las 70% son de tipo arbuscular (MA), e incluyen especies de interés agrícola como: Leguminosas, cereales, frutales y ornamentales tanto angiospermas como gimnospermas (Gianinazzi *et al.*, 1994).

Las ectomicorizas se encuentran únicamente en 3-5% de especies de plantas vasculares principalmente de tipo forestal, se encuentran en plantas arbustivas de zonas boreales y sobre todo árboles de bosques templados pertenecientes al grupo de dicotiledóneas y gimnospermas de raíces primarias cortas de los grupos de coníferas (*Pinus*) y abetos (*Abies*) que se localizan en grandes zonas del hemisferio norte, así como en cedros (*Cedrus*) y encinos (*Quercus*) de regiones cercanas al ecuador. Algunas especies de árboles como el eucalipto (*Eucalyptus*) son ectomicorizadas pero también pueden asociarse con endomicorizas VA y son de amplia distribución (Chilvers & Pryor, 1965; Marx & Cordell, 1994).

En zonas tropicales y subtropicales de América, África, Asia y Australia con suelos de baja fertilidad, con poca retención mineral y periodos de sequía muy intensa también las ectomicorrizas son de gran importancia en algunas leguminosas arbóreas como: *Acacia*, *Aldinia*, *Macrolobium*, *Pericopsis*, *Casuarina*, *Allocauarina*, *Anisoptera*, *Dipterocarpus* y *Shorea* entre otras (Garbaye, 1988).

1.1.4. Los hongos micorrizógenos

Las especies de hongos micorrizógenos identificadas son muy numerosas (Tabla 1-1); los que forman endomicorrizas arbusculares son principalmente los zigomicetes, pertenecientes en su mayoría a los Glomales, que se caracterizan por su micelio no septado y presentar esporas con paredes celulares de diferente composición química y ornamentación, donde los géneros *Acaulospora*, *Entrophospora*, *Gigaspora*, *Glomus*, *Sclerocystis* y *Scutellospora* son los únicos encontrados (Schenck, 1982).

Los hongos formadores de endomicorrizas en orquidáceas incluyen diversos basidiomicetos que durante mucho tiempo se habían identificado como pertenecientes al género *Rhizoctonia* pero que en la actualidad se clasifican en los géneros *Corticium*, *Ceratobasidium*, *Sebacina*, *Tulasnella*, *Marasmius*, *Xerotus* y *Armillaria* (Strullu, 1989).

En relación con los hongos formadores de ectomicorrizas (HEM) y ectendomicorrizas, éstos son generalmente basidiomicetos de micelio septado, donde los Agaricales como *Suillus*, *Boletus*, *Russula* y *Lactarius*, los Sclerodermatales como *Pisolithus* e Hymenogastrales como *Rhizopogon* son muy abundantes (Strullu, 1991). Entre los ascomicetos se encuentran *Cenococcum geophilum* y algunas especies de Tuberales y Pezizales como *Tuber* y *Helvella* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

La especificidad de las especies micorrizógenas por la planta huésped es muy variable en los diferentes tipos de micorriza; son de baja especificidad en las endomicorrizas arbusculares mientras que entre las ectomicorrizas se encuentran hongos como *Cenococcum geophilum* y *Pisolithus tinctorius* que pueden asociarse simultáneamente con más de veinte géneros de plantas vasculares, a diferencia de *Suillus grevillei* que sólo se asocia con algunas especies de plantas (Trappe, 1977; Harley & Smith, 1983).

Tabla 1-1: Grupos y especies de hongos simbiotes que forman diferentes tipos de micorrizas.

Tipo de Micorriza	Grupo de Hongos			
	Zigomicetos	Ascomicetos	Basidiomicetos	
Endomicorrizas	Glomales <i>Acaulospora</i> <i>Gigaspora</i> <i>Glomus</i> <i>Sclerocystis</i> <i>Entrophospora</i> <i>Scutellospora</i>	Pezizales <i>Oidiodendron</i> <i>Pezizella</i> <i>Pterostylis</i>	Aphyllphorales <i>Corticium</i> <i>Ceratobasidium</i> <i>Hymenochaete</i> <i>Ypsilonidium</i> <i>Sebacina</i> <i>Fomes</i> <i>Clavaria</i> <i>Tulasnella</i>	Agaricales <i>Armillaria</i> <i>Marasmius</i> <i>Xerotus</i>
Ectomicorrizas	Endogonales <i>Endogone</i>	Eurotiales <i>Elaphomyces</i> <i>Cenococcum</i> Tuberales <i>Tuber</i> <i>Terfezia</i> Pezizales <i>Helvella</i> <i>Otidea</i>	Agaricales <i>Amanita</i> <i>Tricholoma</i> <i>Cortinarius</i> <i>Inocybe</i> <i>Rozites</i> <i>Laccaria</i> <i>Entoloma</i> <i>Suillus</i> <i>Boletus</i> <i>Armillaria</i> Hymenogastreales <i>Rhizopogon</i>	Russulales <i>Russula</i> <i>Lactarius</i> <i>Paxillus</i> Aphyllphorales <i>Piloderma</i> <i>Cantharellus</i> <i>Craterellus</i> <i>Telephora</i> Sclerodermatales <i>Pisolithus</i> <i>Astraeus</i> <i>Scleroderma</i>
Ectendomicorrizas			Agaricales <i>Amanita</i> <i>Boletus</i> <i>Paxillus</i> <i>Laccaria</i>	Russulales <i>Lactarius</i> Hymenogastreales <i>Rhizopogon</i>

1.1.5. Ecofisiología de las micorrizas

Las plantas son organismos fotosintéticos y por lo tanto autosuficientes en sus requerimientos de carbono, que sólo dependen de una adecuada fertilización mineral y condiciones ambientales favorables. Sin embargo, se ha demostrado que aún en condiciones de cultivo óptimas, casi todas las plantas requieren de micorrizas (Mikola, 1973) y crecen mal en suelos de buena fertilidad en los que los HEM han sido

eliminados, por lo que su presencia parece estar relacionada con otros efectos benéficos adicionales al mejoramiento nutricional (Budi *et al.*, 1998).

Actualmente, se reconocen como asociaciones obligadas que garantizan el crecimiento saludable de las plantas tanto silvestres como cultivadas (Alexopoulos *et al.*, 1996), por los beneficios que les proporcionan, entre los que se pueden mencionar:

- Mejoran la nutrición mineral
- Proporcionan mayor resistencia contra patógenos causantes de enfermedades de la raíz
- Favorecen el crecimiento en condiciones de sequía
- Tienen efecto protector frente a metales pesados.

Los hongos micorrízicos, tienen una capacidad reducida de utilización de polímeros complejos del suelo, tales como la celulosa o la lignina (Hutchinson, 1990), por lo que se ha propuesto que únicamente en la asociación micorrízica, el hongo puede disponer de la fuente de carbono que requiere en un ambiente de gran competencia con otras poblaciones de hongos saprobios y bacterias, de tal forma que el crecimiento de estos hongos dependerá exclusivamente de los azúcares simples proporcionados por las raíces de las plantas (Harley, 1969).

Aunque algunas especies de HEM sí se han podido aislar y cultivar por propagación vegetativa en condiciones de laboratorio, no se ha logrado la fructificación sin la planta huésped, lo cual demuestra que la dependencia no es solamente nutricional sino que implica un mayor número de factores aún desconocidos (Mayer, 1989).

1.1.5.4. Nutrición vegetal

Los estudios comparativos a nivel de laboratorio y viveros experimentales sobre la nutrición de las plantas han demostrado que existen diferencias en la composición química de las plantas micorrizadas y no micorrizadas cultivadas en soluciones nutritivas controladas. Una de las principales diferencias es que las plantas micorrizadas contienen mayor cantidad de fósforo y nitrógeno lo cual se ha explicado por cambios en la asimilación de estos elementos (Strullu, 1989).

Efectos sobre la asimilación de fósforo: El fósforo (P) es uno de los elementos esenciales para el crecimiento de las plantas, es indispensable en la estructura y funcionalidad de las cubiertas celulares, así como para la reserva y transferencia de energía en la división y crecimiento celular.

Las plantas únicamente absorben el P como ortofosfato ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}) de la solución del suelo; y en la mayoría de los suelos estos compuestos se encuentran en niveles muy bajos, por lo que son frecuentemente limitantes del crecimiento vegetal. Los bajos niveles de fósforo en los suelos son resultado de la poca retención de los fosfatos en el complejo de adsorción del suelo y la formación de fosfatos insolubles de Ca^{2+} y Mg^{2+} en suelos alcalinos y de Al^{3+} y Fe^{3+} en suelos ácidos, los cuales son formas no disponibles para las plantas (Paul & Clark, 1989).

Se ha comprobado con P^{32} que en suelos y medios de cultivo las plantas micorrizadas y no micorrizadas utilizan las mismas fuentes de fósforo, pero que las plantas micorrizadas pueden acumularlo más que las no micorrizadas debido a un aumento en la tasa de absorción del fósforo en las raíces de las primeras (Strullu, 1991). El incremento en absorción del fósforo se explica por una mayor área de exploración del suelo por las hifas de la fase extramatricial de la micorriza (Figura 1-3) que a su vez dependerá de las condiciones de cultivo y el estado fisiológico de la planta huésped (Mosse *et al.*, 1973; Mousain, 1989).

Una vez que las hifas absorben el fosfato, lo acumulan como polifosfatos o lo transportan y transfieren a la planta a través de la interfase que se establece entre el hongo y la planta huésped, en los arbuscúlos de las endomicorrizas y la red de Hartig en ectomicorrizas (Figura 1-3).

Aunque gran parte del fósforo del suelo se encuentra en forma inorgánica insoluble, es importante mencionar que también la fracción orgánica (fosfolípidos, ácidos nucleicos, fosfato de inositol, azúcares fosfatados) puede ser una reserva muy abundante de este elemento en el suelo. Sin embargo, estos compuestos también son formas no disponibles para las plantas y su utilización requiere la participación de sistemas enzimáticos de tipo fosfatasa que al principio se pensó estaban reguladas por el fósforo inorgánico del medio aunque parece ser que en algunas especies de hongos, también pueden ser constitutivas (Mousain, 1989; Tibbett *et al.*, 1998).

Efectos sobre la asimilación de nitrógeno: El nitrógeno es un elemento esencial para la nutrición de las plantas por ser componente de la clorofila, las proteínas y los ácidos nucleicos; además, es indispensable para la utilización de carbohidratos y la asimilación de otros nutrimentos porque estimula el crecimiento radicular y el desarrollo de la planta. Este elemento puede ser asimilado por las plantas en forma de amonio (NH_4^+) o nitrato (NO_3^-) (France & Reid, 1983).

Los ecosistemas forestales de regiones templadas y boreales generalmente tienen limitaciones en la disponibilidad de nitrógeno para la nutrición vegetal, debido a que hasta el 90 % del nitrógeno total del suelo forestal puede encontrarse acumulado en forma orgánica. La mineralización del nitrógeno realizada por numerosas poblaciones de microorganismos heterótrofos lo hace nuevamente disponible; sin embargo es a una tasa muy baja en relación con sistemas tropicales (Plassard *et al.*, 1997).

La presencia de los hongos micorrizicos en las raíces de las plantas también favorece la movilización y asimilación de formas de nitrógeno y fósforo de las fuentes orgánicas o minerales. Sin embargo, la eficacia de la micorriza dependerá sobre todo de la capacidad del hongo para transferir estos elementos a la planta huésped (France & Reid, 1983).

En cultivos de leguminosas se ha demostrado que la micorrización mejora en forma muy importante la fijación biológica de nitrógeno por *Rhizobium*, por un incremento en la nutrición fosforada de tal forma que la doble inoculación de estas plantas favorecerá mejores rendimientos en la producción de alimentos (Strullu, 1991).

1.1.5.5. Protección de la planta contra patógenos

En condiciones naturales, la mayoría de los vegetales son atacados por diversas especies patógenas, tanto en sus partes aéreas como en la raíz; las enfermedades de la raíz generalmente son causadas por especies de *Phyium*, *Fusarium* y *Phytophthora*. Estos patógenos se controlan en los viveros por medio de la desinfección del suelo con funguicidas; sin embargo, muchas de estas especies ya son resistentes a las sustancias utilizadas (Smith & Read, 1997).

Se ha demostrado en diversos estudios que las plantas micorrizadas tienen una gran resistencia al ataque por patógenos. En las plántulas de *Pinus* spp., el impacto de *Phytophthora cinnamomi* se reduce fuertemente al inocularlas con *Pisolithus tinctorius* y *Telephora terrestris* (Marx, 1972). La inoculación de *Pseudotsuga menziesii*, *Picea abies* y *Pinus sylvestris* con *Laccaria laccata* también reduce la incidencia de enfermedades causadas por *Fusarium oxysporum* (Smith & Read, 1997).

El efecto protector de los HEM en plántulas micorrizadas se ha explicado por un mecanismo físico debido a la barrera impuesta por el manto hifal que evita la entrada de los patógenos a la raíz (Smith & Read, 1997) o por efectos fisiológicos en la parte activa del manto, donde pueden degradarse las toxinas y enzimas producidas por los patógenos (Marx, 1972). También se ha sugerido que la liberación de sustancias antagónicas, producidas por las plantas en respuesta a la presencia del hongo micorrízico mejora su resistencia e incluso que el HEM puede producir sustancias antibióticas (Duchesne *et al.*, 1989). En 1994, Garbaye reportó que las micorrizas estimulan dos o tres veces más el desarrollo de una microbiota protectora en la rizósfera que mejoran la micorrización.

Con el aislamiento e identificación de sustancias como las formas hidroxiladas del ácido benzol fórmico y mandélico conocidas como pisolitina A y B de *Pisolithus tinctorius* en cultivo puro y carpóforos que son inhibitorias de especies patógenas, también se sugiere que el efecto benéfico de los HEM es más complejo (Kope & Fortin., 1990).

1.1.5.6. Protección de las plantas contra la sequía

En condiciones naturales, la disponibilidad del agua es el factor ambiental que mayormente limita la producción vegetal, sobre todo en zonas climáticas con largos periodos de sequía. Todas las plantas vasculares terrestres toman el agua necesaria por las raíces, después el agua pasa a los vasos leñosos del tallo y ramas en forma de savia bruta y la mayor parte de esta agua es transpirada a la atmósfera a través de los estomas de las hojas, es decir solamente una pequeña cantidad de agua es incorporada a la biomasa o redistribuida en los diferentes órganos de la planta en forma de savia elaborada, de aquí la importancia del agua para las plantas.

Introducción

Estudios de micorrización de las plantas en condiciones de bajo potencial hídrico (ψ) de suelos, caracterizados por bajos niveles de humedad han demostrado que el efecto benéfico se manifiesta por un aumento en la superficie de contacto entre las raíces de la planta y el suelo debido a que el diámetro de las hifas fúngicas (2.5 μm) es menor al de una raíz corta (100-500 μm), por lo que pueden tener acceso a poros del suelo más pequeños y absorber el agua que normalmente no se encuentra disponible para las raíces sin micorrizar (Garbaye, 2000).

También los HEM han desarrollado diferentes estrategias de absorción del agua por las hifas, las especies de *Laccaria*, *Tuber*, *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma* y *Telephora terrestris* desarrollan hifas individuales o poco agregadas en los suelos relativamente húmedos con capacidad de absorber la película del agua que las rodea, es decir tienen una superficie hidrófila (Garbaye *et al.*, 1993).

Por otro lado, en las especies de los géneros *Boletus*, *Suillus*, *Paxillus*, *Scleroderma*, *Rhizopogon*, *Cortinarius* y *Lactarius* las hifas se agregan en cordones más o menos estructurados conocidos como rizomorfos (*rhiza*=raíz + *morphe*=forma), que dan la apariencia de vasos capilares verdaderos rodeados por un córtex de hifas y que se ramifican en las zonas del suelo donde hay mayor cantidad de agua y elementos nutritivos (Alexopoulos *et al.*, 1996). El agua se absorbe por las puntas de las hifas y es conducida por vía interna, por lo que se les considera como hongos de hifas de superficie hidrófoba (Brown, 1990).

Boyd *et al.* (1986) demostraron que al cortar los rizomorfos de *Suillus bovinus* que conectaban a las plántulas de *Pinus sylvestris* con el suelo húmedo hubo una rápida reducción en la transpiración de las plantas. Hay un gran interés en poder aumentar la tolerancia de las plantas a la carencia de agua con la aplicación de hongos micorrizicos seleccionados, que aseguren su supervivencia y establecimiento en zonas de prolongada sequía (Smith & Read, 1997).

1.1.5.7. Protección contra metales pesados

En la actualidad, grandes extensiones de suelo del mundo están fuertemente dañadas por diversas actividades humanas. Así, en las zonas cercanas a las áreas industriales y a las minas los suelos generalmente se encuentran contaminados con metales tóxicos como: arsénico (As), cobre (Cu), níquel (Ni), plomo (Pb), zinc (Zn) y cadmio (Cd) en forma separada o combinados por lo que los estudios del efecto benéfico de los hongos micorrízicos en la reducción de la toxicidad por metales pesados son de gran importancia (Ruhling & Soderstrom, 1990). Además, los suelos con pH ácido contienen también cantidades elevadas de aluminio (Al) y fierro (Fe), que generalmente son tóxicos para muchas especies de plantas, lo cual limita su establecimiento en tales zonas (Wilkins, 1991).

Se han aislado cepas de *Suillus luteus* de suelos contaminados con Zn, con capacidad para crecer en medios de cultivo con 1 mg de este elemento en forma notablemente mayor al de cepas de la misma especie obtenidas de suelos sin contaminar. En pruebas posteriores de inoculación de *Pinus sylvestris* con cepas resistentes y no resistente al Zn, se demostró mayor tolerancia a este elemento en el sustrato de cultivo de las plántulas inoculadas con cepas resistentes, lo que se explica por una capacidad de captación y enlace del metal en el micelio extra radical del hongo (Colpaert & Van Assche, 1992).

Con relación al aluminio, se ha encontrado que hay un incremento en la asimilación del fósforo por el tejido vegetal en plántulas de pino inoculadas con *P. tinctorius* en dosis hasta de 200 μM de Al debido a una menor cantidad de fósforo precipitado por el aluminio (Cumming & Weinstein, 1990).

Ruhling & Soderstrom (1990), demostraron que los cuerpos fructíferos de *Amanita muscaria* y otras especies de basidiomicetos de bosques de coníferas en el Norte de Suecia, acumulan cantidades importantes de metales pesados, como mecanismo de disminución de la toxicidad de estos elementos en los ecosistemas.

1.2. Las ectomicorrizas

1.2.1. Importancia económica y estratégica de las ectomicorrizas

Los bosques son productores de oxígeno y reguladores del clima global que a su vez influye en el ciclo del agua por lo que deben ser considerados como ecosistemas de interés. Incluso en muchos países son fuente de alimentos y recursos de alto valor (materiales de construcción, papel, resinas, etc.). La aplicación de las ectomicorrizas puede ser una estrategia importante que permitirá no sólo su recuperación y conservación sino también el incremento de los recursos forestales en forma sustentable (Villarreal & Pérez-Moreno, 1989).

En algunos países de Europa, como Francia hay organizaciones comerciales que están inoculando diversas especies de árboles con HEM de calidad gastronómica y de gran valor agregado como la trufa negra (*Tuber melanosporum*) y setas como *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius* y *Tricholoma matsutake*, especies que solamente podían ser recolectadas en zonas naturales durante las épocas de fructificación (Smith & Read, 1997). Esto es un ejemplo de que la inoculación de áreas de bosques con micelio de especies comestibles deseables puede contribuir al desarrollo sustentable del bosque y favorecer el aprovechamiento comercial de diversos productos del mismo.

La importancia de estudiar estos sistemas se realiza si además esta alternativa de inoculación de especies seleccionadas en áreas específicas, puede oponerse a la práctica actual de hacer recolectas intensivas de cuerpos fructíferos que no toman en cuenta la biología de reproducción de las especies y son un riesgo potencial de desaparición de poblaciones fúngicas micorrizógenas de los suelos.

1.2.2. Las ectomicorrizas en México.

Uno de los problemas mundiales más preocupantes en la actualidad, es la alteración de los ecosistemas, ocasionada principalmente por la presión humana sobre los recursos naturales para cubrir sus necesidades básicas de alimentación (Kropp & Langlois, 1990). Los recursos forestales en diferentes partes del mundo han sido fuertemente afectados por esta situación sobre todo en países como México, donde anualmente se pierden alrededor de 500 000 has. de bosques y selvas por la destrucción de su

cubierta forestal original, la sustitución del bosque por zonas de cultivos inadecuados a las condiciones ecológicas y por la creciente urbanización (Pérez-Moreno & Ferrera, 1997).

En México, hay un limitado conocimiento de la diversidad de especies de HEM, únicamente se han reportado alrededor de 550 especies (Varela & Estrada-Torres, 1995) de las probablemente más numerosas de acuerdo con los cálculos realizados por Hawksworth (1991), quien sugiere que en nuestro país pueden encontrarse alrededor de 110 000 especies fúngicas.

Por otro lado, después de una serie de visitas a viveros y de hacer revisiones bibliográficas se encontró que los encargados de la producción de plántulas para reforestación, generalmente no consideran la utilización de HEM como práctica cotidiana a pesar de ser apoyados por los programas oficiales de implementación de plantaciones forestales. Esto puede explicarse por diversos factores, como:

- Reducido número de grupos de investigación en Micorrizas
- Falta de continuidad en programas de gobierno
- Falta de interacción entre grupos de investigación y los productores de plantas

En relación con el primer punto, se ha reportado que en nuestro país hay un limitado número de especialistas en taxonomía de hongos (solamente en 10 de las 32 entidades federativas), y que los grupos de investigación de Micorrizas consolidados se reducen a alrededor de cinco, lo que dificulta el estudio de un mayor número de especies y la aplicación de estas en pruebas de micorrización (Varela & Estrada-Torres, 1995).

Analizando el número de trabajos de investigación presentados en las reuniones de Simbiosis Micorrízica de los últimos años, organizados por el Comité de Investigación y Enseñanza de la Micorriza, se puede comprobar que únicamente alrededor de 5-10 % corresponden a estudios de ectomicorrizas por lo que es necesario insistir en la necesidad de incluir y apoyar mejor líneas de investigación en estas áreas.

En relación con esto puede mencionar que hay algunos antecedentes de apoyo por organismos federales o estatales como la Secretaría de Trabajo y Provisión Social (STPS) y la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (Varela & Estrada-Torres, 1995), pero que al haber cambios en sus políticas también se suspendieron los programas de investigación, sin embargo recientemente se están

proponiendo nuevas propuestas de apoyos gubernamentales convocadas por SEMARNAT y SAGARPA que podrían favorecer un mejor desarrollo de estas áreas de investigación.

Finalmente, sería importante promover que las investigaciones realizadas se hagan llegara los posibles usuarios, es decir a campesinos y/o responsables de viveros, los que continúan realizando prácticas tradicionales de producción de las plantas al no conocer tales alternativas.

Por las ventajas que tienen las plantas micorrizadas sobre las no micorrizadas, en general se sugiere el uso de HEM selectos para la inoculación de plántulas de especies forestales, como una estrategia de producción de plántulas de calidad certificada con gran potencial para la recuperación de suelos erosionados y de zonas boscosas con problemas de deforestación (Mikola, 1973; Estrada & Valdés, 1986; Harvey *et al.*, 1994; Marx & Cordell, 1994).

Para introducir especies ectomicorrizas en los sistemas naturales, es necesario desarrollar estrategias de micorrización controlada a nivel de viveros que permitan la producción exitosa de numerosas plantas biológicamente mejoradas (Marks & Koslowsky, 1973).

1.2.3. Micorrización controlada

Uno de los primeros estudios en condiciones axénicas de inoculación *in vitro* de ectomicorrizas en plántulas fueron los de Melin (1921), utilizando arena impregnada con nutrimentos, en los que ponía en contacto las plántulas de pino cultivadas a partir de semilla con el hongo obtenido en cultivo puro.

Posteriormente, Hacskeylo (1953) reemplazó la arena por vermiculita, un soporte con mejor estructura y aireación que al ser mezclada con turba favorecía la capacidad amortiguadora del sustrato y la síntesis axénica de la ectomicorriza, principalmente a nivel de laboratorio.

Los sistemas ectomicorrizicos más estudiados incluyen plantas forestales de especies de *Pinus*, *Betula*, *Eucalyptus* y *Castanea*, con especies de hongos de los géneros: *Paxillus*, *Pisolithus*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Boletus*, *Amanita* y *Cenococcum* (Strullu, 1991). La introducción de los HEM al suelo se ha realizado por tres procedimientos principales: a) el acarreo de suelo natural del bosque conteniendo

propágulos de hongos, b) la incorporación de esporocarpos o esporas (Theodorou & Bowen, 1973) y c) la inoculación con cultivos puros de micelio vegetativo (Strullu, 1991).

-La inoculación con suelo iniciada a mediados del presente siglo, se sigue utilizando debido a su bajo costo y facilidad de manejo a pesar de ser poco eficiente, inespecífica y con problemas asociados con la introducción de especies patógenas (Marx *et al.*, 1984).

-La utilización de esporocarpos de *Pisolithus tinctorius* y *Rhizopogon luteolus* maduros, secos o frescos, fragmentados y mezclados con el suelo o dispersados en el agua de riego han dado buenos resultados al ser usados como inoculantes en la micorrización de plántulas en viveros. No obstante su uso se limita a los periodos de fructificación de las especies (Theodorou & Bowen, 1973) y generalmente se retrasa la formación de la micorriza en 3-4 semanas debido a que las esporas son células haploides que deberán germinar y formar dicariotes antes de colonizar las raíces (Smith & Read, 1997).

-La introducción de cultivos puros de especies ectomicorrízicas seleccionadas es la metodología más recomendable y que garantiza una micorrización efectiva. Desafortunadamente, muchas especies de HEM se desarrollan pobremente o no crecen en las condiciones de cultivo, por lo que la disponibilidad de inoculantes miceliales es una de las limitantes más importantes para su aplicación.

1.2.3.1. Aislamiento de cepas de HEM

El aislamiento de su ambiente natural es la primera etapa para estudiar cualquier microorganismo. Los HEM generalmente se buscarán en zonas cercanas a las plantas de interés, como cuerpos fructíferos o tomando muestras de raíces con características morfológicas típicas de la micorriza (Agerer, 1988).

El aislamiento de las especies ectomicorrízicas se puede hacer en distintos medios de cultivo ya sean de uso general como el Papa Dextrosa Agar (PDA) y Extracto de Malta Agar (EMA) o más específicos como los de Hagem, Medio modificado de Melin-Norkrans (MNM), Medio de Biotina, Aneurina y Ácido Fólico Agar (BAF) entre otros (Melin, 1953; Ainsworth, 1995). Estos medios de cultivo son de composición química variable e incluyen distintas fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales (Jackson & Mason, 1984, Santiago-Martínez *et al.*, 1993).

Se han aislado y conservado como cultivos puros diversas especies de HEM como: *Hebeloma*, *Lactarius*, *Laccaria*, *Suillus*, *Rhizopogon*, *Pisolithus*. La mayoría de estas especies se desarrollan a velocidades de crecimiento bajas (alrededor de 1.0 mm/día), con características variables dependiendo del medio de cultivo y de las condiciones de incubación (Hutchinson, 1990).

Otra problemática común de estos hongos es su conservación por periodos largos, ya que es frecuente que al aplicar las metodologías reportadas para hongos saprobios ocurran pérdidas de viabilidad o se modifiquen sus propiedades micorrízicas (Trappe, 1977).

1.2.3.2. Selección de cepas de HEM

Los estudios de cultivo y de micorrización controlada en especies ectomicorrízicas han demostrado diferencias fisiológicas y ecológicas entre estas, así como en la especificidad por la planta huésped (Marx & Cordell, 1994). La selección de especies de HEM es muy importante para la producción de inoculantes y los principales criterios para hacerla son :

- capacidad de formar micorrizas con la planta huésped
- capacidad de adaptación a las condiciones del ambiente en que serán introducidas
- posibilidad de propagarse en grandes cantidades
- de fácil conservación en el laboratorio.

1.3. La fermentación en medio sólido (FMS)

Los procesos de Fermentación en Medio Sólido (FMS) se remontan a muchos siglos atrás, sobre todo en la producción de alimentos fermentados tradicionales como el koji en el oriente, el ensilaje y compostaje de residuos agroindustriales. La FMS se define como un proceso de cultivo con sustratos insolubles en agua que pueden ser utilizados para el crecimiento microbiano en ausencia de agua libre (Hesseltine, 1977).

Estos procesos también son conocidos como fermentaciones en sustrato sólido (FSS) o en estado sólido (FES), cultivo en estado sólido (CES), procesos en estado sólido y fermentación semisólida

(Hesseltine, 1977; Lonsane *et al.*, 1982) e incluso se ha cuestionado el uso del término "fermentación" como impreciso e inespecífico de este tipo de procesos.

Con el fin de homogeneizar la terminología del llamado Cultivo Líquido Sumergido (CLS) se propone utilizar preferentemente el término de Cultivo en Estado Sólido (CES) para referirse a estos procesos (Mitchell & Lonsane, 1992), el cual se utilizará en este trabajo.

1.3.1. Descripción del sistema de Cultivo en Estado Sólido (CES).

Aunque los procesos de CES se conocían desde la antigüedad, su mayor desarrollo fue posterior a los trabajos de Hesseltine (1977), por el creciente interés de la biotecnología en el cultivo de los hongos filamentosos y la utilización de residuos lignocelulósicos como sustratos de bajo costo en sistemas alternativos a la fermentación líquida (FL), que pudieran ser escalados a niveles industriales.

1.3.1.1. Microorganismos

Hay numerosos microorganismos como bacterias y hongos capaces de crecer y colonizar exitosamente diversos sustratos sólidos dependiendo de las condiciones ambientales y nutrimentales. Las bacterias y levaduras, a diferencia de los hongos filamentosos requieren de mayores niveles de humedad y de nutrimentos fácilmente asimilables pero son menos dependientes del oxígeno; su crecimiento en medio sólido es más localizado en la superficie y cavidades de una matriz sólida debido a que se reproducen por fisión binaria o gemación (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994).

Los hongos filamentosos, crecen en forma apical y son capaces de colonizar completamente sustratos sólidos heterogéneos, con niveles de humedad muy reducidos y sin que el oxígeno sea limitante para su crecimiento. Estas formas de cultivo se han aplicado para la producción de diferentes metabolitos y hongos comestibles a partir de la utilización de diferentes residuos agroindustriales de naturaleza lignocelulósica, debido a su gran capacidad hidrolítica de sustratos complejos (Guzmán *et al.*, 1987; Roussos *et al.*, 1997; Martínez-Carrera, 2000).

1.3.1.2. Factores ambientales y su control

Actividad de agua y humedad. El agua es esencial para el crecimiento de los microorganismos, actúa como solubilizador y transportador de nutrimentos, enzimas, metabolitos y de gases y constituye de 80-90% del peso total de la célula. La actividad de agua (a_w) es un concepto inicialmente utilizado como una variable intrínseca de los alimentos, representa el agua disponible en un sistema para el crecimiento microbiano y que para una solución ideal, se define como: $a_w = \frac{P}{P_0}$

donde P es la presión de vapor de la solución y P_0 es la presión de vapor del agua sin solutos.

Aunque los medios de cultivo no son soluciones ideales, por la ecuación presentada, se espera que el agua pura tendrá un valor cercano a 1.0 y en un sustrato completamente seco la a_w tenderá a 0 (Corry, 1978).

Se ha demostrado que los hongos filamentosos saprobios y levaduras pueden crecer en condiciones de a_w tan bajas como 0.7-0.8, aunque su crecimiento óptimo es a niveles mayores (Tabla 1-2).

Tabla 1-2. Valores de a_w límites para el crecimiento de diversas especies de hongos saprobios (Corry, 1978) en comparación con los de bacterias (Atlas & Bartha, 1998).

	Actividad de agua (a_w)	
	Mínima	Óptima
Especies de hongos		
<i>Aspergillus glaucus</i>	0.71	0.93
<i>A. nidulans</i>	0.78	0.97
<i>A. terreus</i>	0.78	0.97
<i>A. fumigatus</i>	0.82	>0.97
<i>A. flavus</i>	0.78	>0.98
<i>A. niger</i>	0.78	>0.98
<i>A. tamarii</i>	0.78	>0.98
<i>Monascus bisporus</i>	0.61	>0.95
<i>Penicillium islandicum</i>	0.83	>0.97
<i>P. martensii</i>	0.79	>0.98
<i>Xeromyces bisporus</i>	0.55	>0.97
Especies de bacterias		
<i>Caulobacter</i>	0.99	1.00
<i>Lactobacillus</i>	0.90	0.98
<i>Bacillus</i>	0.90	0.98
<i>Staphylococcus</i>	0.85	0.98
<i>Halobacterium</i>	0.75	0.80

Introducción

En general los hongos tienen un margen de adaptación mayor que las bacterias, las que crecen en sustratos con actividad de agua de 0.85-0.99, a excepción de las halófilas que pueden tolerar valores menores (Mildenhall *et al.*, 1981).

Aireación e Intercambio gaseoso: En el CES, directamente relacionado con el control de humedad está el de los gases, principalmente de O₂ cuando se cultivan microorganismos aerobios estrictos. El O₂ es el aceptor final de electrones de la citocromo oxidasa en el catabolismo respiratorio para la obtención de energía. También se requiere en algunas reacciones de mono-oxigenasas para la hidroxilación y síntesis de esteroides y ácidos grasos insaturados (Griffin, 1994).

En el CES la cantidad de oxígeno está directamente relacionado con el flujo de aireación en el sistema y de la velocidad de transporte del oxígeno en el medio (Raimbault & Alazard, 1980). Durante la aireación del sistema no solo hay absorción de O₂ sino que se da también un proceso acoplado de desorción de CO₂, texturas importantes de estudiar en el cultivo sólido así como el conocer como se relacionan con otros factores como el pH y la temperatura.

Temperatura y pH: Como el CES es un sistema heterogéneo y estático, las actividades metabólicas de los microorganismos aerobios están asociadas con la liberación de calor, que generalmente se manifiesta por una elevación de la temperatura al interior del material (Mudgett, 1980). En el compostaje de residuos agroindustriales se alcanzan temperaturas hasta de 70 °C, condiciones que favorecen las actividades hidrolíticas de microorganismos termófilos, pero de gran problema para el cultivo de microorganismos mesófilos (Hesseltine, 1977).

Es frecuente que al iniciarse un cultivo, se ajusta el pH del medio, el cual frecuentemente se modifica e incluso puede causar efectos drásticos en el crecimiento de algunos hongos. Estos cambios se explican por el tipo de metabolismo y los mecanismos de incorporación diferencial de cationes y aniones del medio (Griffin, 1994). En algunos casos, pueden utilizarse sistemas de control del pH con soluciones amortiguadoras, sin embargo su uso es limitado por el estrecho margen de funcionamiento de los mismos (pK ± 0.5) y a efectos inhibitorios que pueden tener en el crecimiento de algunos microorganismos.

Una de las mayores dificultades del CES es el control de pH, debido a la heterogeneidad y bajo contenido de agua del sistema. Tampoco es posible medir el pH interno de la matriz sólida, de tal forma que solo se estima globalmente en una suspensión de la muestra sólida con un volumen de agua diez veces mayor (Oriol, 1987).

1.3.2. Aplicaciones y problemáticas del CES.

En los últimos años, se han reportado un gran número de estudios y aplicaciones de estos cultivos en la obtención de productos de valor comercial (enzimas, vitaminas, aminoácidos) de una gran diversidad de hongos como: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*; en el mejoramiento nutricional de residuos lignocelulósicos (Smits *et al.*, 1998) y en la producción de hongos comestibles como *Pleurotus*.

Estos sistemas de cultivo, tienen notables ventajas con relación al cultivo líquido (Lonsane *et al.*, 1982; Mudgett, 1985; Daubresse *et al.*, 1987) como:

- Medios de cultivo simples que en ocasiones sólo requieren de la adición de minerales y que favorecen las condiciones más cercanas a las del medio natural de crecimiento de los hongos
- Bajo riesgo de contaminación bacteriana por la humedad reducida, así como menores volúmenes de efluentes líquidos.
- Facilidad de recuperación y utilización directa de productos por la producción de metabolitos en mayor concentración por unidad de peso de sustrato.

En el CES también hay dificultades intrínsecas de gran importancia, que deben ser consideradas al trabajar con este tipo de sistemas, los principalmente :

- falta de control del proceso biológico por la dificultad de medir el pH, humedad, temperatura
- dificultades para evaluar el crecimiento micelial
- necesidad de optimizar los inóculos
- problemas de pérdida de humedad en cultivos prolongados.

1.3.3. Descripción del crecimiento fúngico en CES

En los hongos, el cuerpo vegetativo también llamado talo puede ser unicelular como en las levaduras o pluricelular, con un tipo de crecimiento filamentosos, más extensivo en forma de hifas que en conjunto se conoce como micelio. El crecimiento de los hongos filamentosos en medios sólidos es de tipo apical, es decir que aunque los materiales citoplasmáticos son sintetizados a lo largo de las hifas, éstos se movilizan hacia la punta por lo cual la hifa se prolonga linealmente hasta que se ramifica y da lugar a nuevas puntas de crecimiento (Deacon, 1997). De esta manera se observará que posteriormente el crecimiento se limitará al anillo externo de la colonia en forma radial (Trinci, 1974).

1.3.3.3. Crecimiento radial

En cultivos de hongos, es de gran importancia la evaluación del crecimiento micelial como un criterio de evaluación del efecto de los cambios en las condiciones ambientales y nutrimentales del cultivo. El crecimiento de los hongos filamentosos es un proceso de gran complejidad, porque no sólo hay un aumento de componentes celulares o del número de células como en organismos unicelulares, sino que también se manifiesta por la prolongación y ramificación de hifas de diferente tipo (Prosser, 1995).

El crecimiento hifal también llamado apical ha sido ampliamente estudiado por diversos autores (Steele & Trinci, 1975) principalmente en diferentes especies de hongos saprobios como: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Geotrichum*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Picnoporus* aplicando el procesamiento de imágenes. Esta metodología ha permitido caracterizar cuantitativamente la morfología y diferenciación de hongos y actinomicetos en forma microscópica, así como para encontrar la relación entre los parámetros de crecimiento micelial y las condiciones ambientales de cultivo (Colin, 1992).

El crecimiento apical se caracteriza por un flujo unidireccional de vesículas que provienen del aparato de Golgi hacia la parte distal de una hifa primaria (punta de crecimiento). Las vesículas transportan precursores de la pared celular hacia la punta de la hifa donde se fusionan a la cubierta celular. En este sitio, por la presión de turgor intracelular y a la actividad de enzimas autolíticas y sintéticas, la hifa se prolonga en forma lineal (Bartnicki-García, 1973) favoreciendo su capacidad de exploración.

Posteriormente, si en el medio hay suficientes nutrimentos y las condiciones son favorables, gran parte de nutrimentos se dirigirán ahora a la síntesis de la biomasa más que a las puntas hifales y la hifa se ramificará dando lugar a una nueva hifa que a su vez incrementará su longitud a una tasa acelerada hasta un valor constante característico (tasa de crecimiento hifal) igual al de la hifa primaria (Trinci, 1974).

La ramificación posterior de las hifas genera un crecimiento de mayor densidad, que da lugar al desarrollo de las colonias de los hongos. Por lo tanto, el crecimiento radial de la colonia que se observa es el resultado del crecimiento apical de las hifas primarias de exploración y por la ramificación de las mismas que eleva el número de puntas y dan a la colonia su densidad y forma circular que aumenta de diámetro en el tiempo, con una velocidad de crecimiento (V_r) específica (Bartnicki-García, 1973).

En 1974, Trinci propuso el cálculo de la velocidad de crecimiento radial promedio (V_r) para describir el crecimiento superficial de una colonia fúngica, que se obtiene al medir el cambio en el diámetro de la colonia durante cierto periodo de tiempo, expresada de la siguiente forma: $V_r = \frac{R_1 - R_0}{t_1 - t_0}$

donde R_0 y R_1 son los radios de la colonia a los tiempos t_0 y t_1 respectivamente. La V_r sólo se puede determinar en medios sólidos homogéneos como los cultivos en agar ya que en sustratos heterogéneos, las hifas pueden crecer sobre la superficie y/o penetrar el interior de la matriz del sustrato.

1.3.3.4. Cuantificación de la biomasa

La cuantificación de la biomasa producida en un cultivo sólido, es otra de las variables importantes para caracterizar el crecimiento fúngico. Ésta representa la cantidad potencial de biocatalizador en el sistema que a su vez es determinante de la formación de metabolitos diversos (Boudrant, 1994) por lo que se ha considerado como una variable de respuesta que permite conocer el efecto de variaciones en el medio de cultivo y/o el ambiente.

La determinación de biomasa en cultivo sólido puede hacerse en forma directa e indirecta. En el primer caso se hace la cuantificación del peso seco del micelio en cultivos de agar, para lo cual deberá fundirse el agar, pero con la elevación de la temperatura también pueden ocurrir procesos de degradación de la biomasa (Reeslev & Kjoller, 1995).

Introducción

Para evitar estos inconvenientes algunos autores han propuesto la colocación superficial de cubiertas semipermeables de poli carbonato o de celofán pretratado sobre los medios de cultivo solidificados con agar (Mitchell *et al.*, 1989; Robinson, 1978).

La medición del consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono como variables metabólicas es muy recomendada por algunos autores (Carrizales *et al.*, 1981; Mitchell & Lonsanc, 1992) para evaluar la respuesta de la biomasa a condiciones de cultivo durante todo el periodo de crecimiento y por ser una técnica de medición no destructiva (Carrizales *et al.*, 1981, Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994). Aunque tiene el inconveniente de que se requiere conocer las variaciones de estos gases durante las fases de crecimiento y la cantidad de biomasa producida por unidad de gas metabolizado no siempre es constante (Okazaki *et al.*, 1980).

También se sugiere que con a evaluación de enzimas extracelulares como α -amilasa de *Aspergillus oryzae* y lacasas en *Agaricus bisporus* se puede cuantificar la biomasa, considerando que esta actividad es directamente proporcional al crecimiento (Wood, 1979).

1.3.3.5. Dimensión fractal

El término fractal proviene del Latín *fractus* que significa roto o irregular propuesto por Mandelbrot en 1977 para el análisis fractal (D), como una herramienta útil para la descripción de objetos matemáticos irregulares.

Estos objetos tienen dimensiones no enteras y se forman a partir de un generador (ecuación matemática o formas geométricas) que se repite a diferentes escalas dando lugar a figuras auto similares de diferente tipo como: La curva de Koch, polvo de Cantor, carpeta de Sierpinski, etc.

Estos mismos principios de análisis se aplicaron a la descripción de objetos llamados fractales naturales o aleatorios, que son formas fragmentadas de objetos naturalmente comunes como líneas costeras, nubes, minerales (Mandelbrot, 1977). Esta herramienta se ha aplicado para entender la formación y el crecimiento de agregados y redes cristalinas de sistemas inorgánicos, para describir la ramificación de

bronquiolos del pulmón, de estructuras vegetales así como en la determinación de la estructura de proteínas (Helman *et al.*, 1984; Harrison, 1995).

En microbiología, Reichl *et al.* (1990), estudiaron patrones de ramificación de *Streptomyces tendae* con un sistema analizador de imágenes y Obert *et al.* (1990) aplicaron esta metodología para analizar patrones de ramificación del micelio de colonias cultivadas en medio sólido y fragmentos miceliales en medio líquido considerando a una célula como la más pequeña unidad de agregación y la colonia como un agregado. Estos autores encontraron que el crecimiento micelial de *Ashbya gossypii* y *Streptomyces griseus* pueden ser descritos por una dimensión fractal que se incrementa con el crecimiento a medida que se ramifican las hifas en diversos planos, es decir que las hifas presentan patrones de ramificación simples que se repiten y dan lugar a estructuras complejas con valores de $D \approx 2.0$ cuando la distribución es en un plano y a $D \approx 3.0$ cuando es en volumen.

También Prosser (1995), hizo la descripción cuantitativa del comportamiento de las hifas durante los procesos de colonización de superficies sólidas determinando la dimensión fractal de hifas micelio y colonias, notando resultados muy similares. La aplicación de esta metodología puede incrementarse más por el importante desarrollo de sistemas de análisis de imágenes que facilitan cada vez más la observación y estudio de estructuras microscópicas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Fisiología del crecimiento de HEM

La complejidad fisiológica de los microorganismos está relacionada directamente con las condiciones de su hábitat natural y variará en forma inversa con sus necesidades nutrimentales en el laboratorio (Caldwell, 1994). Considerando que los HEM se encuentran en la naturaleza en relación mutualista con las plantas, el desconocimiento de las condiciones y nutrimentos particulares de su estado micorrizico pueden ser factores determinantes en el éxito de su cultivo en el laboratorio.

Como la producción de inoculantes de HEM depende fundamentalmente de la posibilidad de cultivarlos en condiciones controladas de laboratorio; en grandes cantidades y sobre todo con un buen estado fisiológico, de ahí la importancia de hacer un mayor número de investigaciones sobre sus necesidades nutrimentales y ambientales.

2.1.1. Requerimientos nutrimentales

Se conocen las principales sustancias requeridas para el cultivo de diferentes grupos de hongos sobre todo de saprobios, la función de cada una de éstas y la gran variabilidad en la cantidad y calidad de los compuestos carbonados y nitrogenados que pueden utilizar (Caldwell, 1994). Con relación a las especies ectomicorrizicas existen menos información debido a las dificultades de cultivo antes mencionadas pero se acepta que en general tienen las mismas necesidades de macro y micro nutrimentos que las especies saprobias.

2.1.1.1. Carbono

El carbono constituye aproximadamente un 45-50% del peso seco de la célula fúngica y es un elemento esencial para la síntesis de componentes estructurales de la célula y para el funcionamiento de la misma como fuente de energía. Los hongos son heterótrofos y lo obtienen de compuestos orgánicos de diferente complejidad.

A partir de los estudios de Melin en 1921, hubo un creciente interés por conocer la capacidad de los HEM para utilizar diferentes fuentes de carbono orgánico. En medios de cultivo estos hongos utilizan la D-glucosa, manosa y fructuosa principalmente y algunas especies pueden crecer con celobiosa, maltosa, trehalosa y sacarosa, pero pocas especies pueden crecer en trisacáridos o en alcoholes de 3 a 6 carbonos y la mayoría no utiliza ácidos orgánicos (Harley & Smith, 1983).

Estudios sobre la asimilación de azúcares de protoplastos de *Amanita muscaria*, demostraron mecanismos para el control de la transferencia de carbono de la planta al hongo. La glucosa, la 3-O-metilglucosa y la fructosa fueron incorporadas a la célula, con mayor afinidad por la glucosa y una fuerte inhibición en la incorporación de la fructosa por la glucosa (Chen & Hampp, 1993). También se ha demostrado que la sacarosa y el manitol no son incorporados por *A. muscaria* en cultivo puro y se propone que la única forma en que se puede utilizar la sacarosa es en simbiosis, porque se requiere hidrolizar por una invertasa producida por la planta huésped (Smith & Read, 1997).

La mayoría de cepas ectomicorrízicas tienen poca habilidad para crecer en polímeros complejos como celulosa y lignina (Harley & Smith, 1983), aunque en estudios de cuantificación de la actividad de ligninasas, celulasas y pectinasas en medios de cultivo se ha demostrado que sí tienen actividad hidrolítica sobre estos polímeros pero en bajos niveles (Hutchinson, 1990).

La actividad detectada sobre estos polímeros en el laboratorio se relaciona con una capacidad de hidrólisis suave necesaria para el debilitamiento de la pared celular o invasión de la lámina media de las células radiculares y formación de la red de Hartig, más que a la capacidad de utilizar estos compuestos en el suelo.

2.1.1.2. Nitrógeno

Los hongos pueden utilizarlo a partir de formas orgánica (aminoácidos, péptidos) o mineral en forma oxidada (NO_3^-) o reducida (NH_4^+). La utilización de formas orgánicas dependerá de las capacidades proteolíticas que ha sido reportadas en la mayoría de las especies ectomicorrízicas (Abuzinadah *et al.*, 1986).

La utilización de NO_3^- es limitada en algunas especies ectomicorrizicas, parece ser debido a su incapacidad de sintetizar el sistema enzimático de la nitrato reductasa necesaria para reducirlo a nitrato y amonio más que por dificultades en la incorporación a la célula (Griffin, 1994), sin embargo en ocasiones puede ser interesante estudiar su utilización en estos HEM, sobre todo cuando la asimilación de NH_4^+ tiene un efecto acidificante importante, que puede inhibir su crecimiento.

2.1.1.3. Fósforo

El fósforo (P) es uno de los elementos esenciales para el crecimiento de los hongos, que permite mantener la estructura y funcionalidad de las membranas celulares y para la reserva y transferencia de energía. En forma similar a las plantas, los hongos lo absorben como ortofosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) de la solución del suelo y es la forma en que se adiciona a los medios de cultivo. También puede adicionarse como fosfato orgánico debido a la actividad de fosfatasa ampliamente reportada por diversos autores (Calleja & d' Auzac, 1983; Chhonkar & Tarafdar, 1984; Ducamp, 1987), que puede relacionarse con las abundantes formas orgánicas que generalmente se encuentran en el suelo.

2.1.1.4. Factores de crecimiento

Un factor de crecimiento, es un compuesto orgánico que requieren los organismos en pequeñas cantidades, generalmente como precursor en reacciones específicas de biosíntesis de aminoácidos, purinas, pirimidinas y coenzimas.

Como los organismos no pueden sintetizarlo a partir de fuentes de nutrientes más sencillas, generalmente es indispensable incluirlos en los medios de cultivo (Griffin, 1994).

El crecimiento de algunas especies de HEM es estimulado por vitaminas, como tiamina y biotina; la mayoría de especies de *Boletus* son auxótrofas para la tiamina y algunas otras son auxótrofas para inositol, ácido nicotínico y ácido pantotéico (Harley & Smith, 1983).

2.1.2. Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales son determinantes para el cultivo de los microorganismos. Éstas se establecen de acuerdo con el hábitat en que se encuentran y al igual que las condiciones nutrimentales es necesario determinar las condiciones ambientales más adecuadas para el cultivo en el laboratorio de las especies de interés.

2.1.2.1. Temperatura

Se ha reportado que los HEM en cultivos de laboratorio son preferentemente psicrófilos (Cline *et al.*, 1987), con un margen de temperatura de crecimiento variable (mínima de 7 °C, óptima entre 16-18 °C y máxima a 32 °C).

No se ha demostrado una correlación entre el origen geográfico y la temperatura óptima de crecimiento de las cepas *in vitro*; así por ejemplo, cepas de *Hebeloma* obtenidas de climas árticos crecen más lentamente a temperaturas de incubación bajas que las cepas obtenidas de clima templado (Tibbett *et al.*, 1998). La importancia ecológica de estos resultados es ambigua y se considera que puede haber crecimiento a temperaturas más bajas, pero que éste puede ser tan lento, que sería necesario incubar durante tiempos más prolongados (Hacksaylo *et al.*, 1965).

2.1.2.2. Luz

Hay diversos estudios que demuestran importantes efectos de la luz sobre el crecimiento y esporulación de hongos saprobios como *Phycomyces* y quitridiomycetos como *Thraustochytrium* y *Blastocladiella* (Griffin, 1994).

El conocimiento del efecto de las radiaciones en el desarrollo y reproducción de los HEM en general, es escaso. Solo se reporta que en algunas especies la luz es estimulante del crecimiento e inhibitorio en otras, por lo que hasta ahora no ha sido posible explicar un mecanismo por el cual la luz determine los efectos observados y si este efecto es directo o indirecto (Harley & Smith, 1983).

2.1.2.3. pH

El pH óptimo para el crecimiento de los HEM varía con la cepa o especie y el medio ambiente nutricional, con un margen de tolerancia muy amplio; así, el pH mínimo es entre 2.0-3.5, el óptimo entre 3.5-6.0 y el máximo entre 6-7.4 (Hung & Trappe, 1983).

Los resultados de la influencia del pH en el crecimiento *in vitro* deben ser interpretados cuidadosamente debido al efecto de otros factores como son: el tiempo del cultivo, la fuente de nitrógeno utilizada, la adición de sales metálicas antes o después de la esterilización y muchos otros factores que pueden variar el pH de los medios de cultivo (Griffin, 1994).

Al igual que con la temperatura, no se ha encontrado correlación entre el pH del hábitat de origen de las cepas y su pH óptimo de crecimiento *in vitro*, porque se ha determinado que cepas con pH óptimo cercano a 7.0 no provienen de suelos con pH altos (Harley & Smith, 1983).

2.1.2.4. Producción de metabolitos

Como los HEM establecen y mantienen una estrecha relación con las raíces de los árboles, esta situación involucra la producción y liberación de diversas enzimas y metabolitos activos durante las primeras fases del establecimiento de la colonización y en las últimas fases de la formación de la ectomicorriza. Analizando los productos finales del metabolismo de especies ectomicorrizas *in vitro*, se ha demostrado la presencia de auxinas en *Cortinarius* y *Suillus* (Moser, 1958; Ulrich, 1960), de citocininas y giberelinas en *Rhizopogon*, *Suillus* y *Amanita* (Miller, 1971; Gogala, 1991), etileno y otros compuestos volátiles en *Hebeloma crustuliniforme* y *Laccaria laccata* (Graham & Lindermann, 1979) así como compuestos antibióticos contra hongos fitopatógenos en *Pisolithus*, *Cantharellus* y *Suillus* (Garza-Ocañas, 1986). El estudio de estos metabolitos puede ser útil para interpretar el papel que tienen en la ectomicorriza en condiciones naturales e incluso estos hongos pueden ser una fuente comercialmente importante de estos compuestos (Gay & Debaud 1987; Aquihuatl *et al.*, 1994).

2.1.3. Producción de inoculantes de HEM

La inoculación de HEM en plántulas se inició desde principios del siglo XIX en Francia, con trufas asociadas a encinos. Posteriormente, con los estudios de Moser (1958) en Austria; Takacs (1967) en Argentina y Theodorou & Bowen (1973) en Australia, se demostró la importancia de disponer de inoculantes fisiológica y ecológicamente apropiados al sitio de plantación para tener éxito en la micorrización y establecimiento de las plantas.

En Europa se han producido inoculantes miceliales de *Rhizopogon roseolus*, *Laccaria laccata* y *Hebeloma cylindrosporum* (Le-Tacon., 1985) en cultivo sumergido. Sin embargo, debido a la formación de grandes agregados de micelio, se tenían que fragmentar para aplicarlos en forma eficiente, reduciéndose el vigor del micelio de muchas especies y que las hacía menos resistentes a las condiciones adversas del suelo.

Recientemente, la adición de alginato de sodio para incluir los fragmentos de micelio y obtener un inóculo en forma de perlas sólidas ha reducido los problemas causados por la fragmentación micelial. Además de que se pueden aplicar directamente al suelo y que al mismo tiempo protegen al micelio hasta el momento de la micorrización. Este procedimiento, desarrollado en Francia por el Groupement d'Intérêt économique (GIE) Forêt Mycorhizes para la producción de inoculantes de *Descolea*, *Hebeloma*, *Laccaria* y *Pisolithus* ha mejorado en forma importante los resultados de micorrización, con la ventaja adicional de que conserva su viabilidad durante periodos de almacenamiento más largos (Le-Tacon, 1985).

El principio de este sistema es el cultivar el hongo en materiales porosos impregnados con medios de cultivo líquido en condiciones estériles. El micelio se desarrollará en los espacios porosos, al interior de las partículas y se encontrará protegido hasta el momento de ser inoculado en el suelo (Strullu, 1991).

Se han probado diferentes materiales como granos de cereales cocidos, turba, perlita, aserrín, arcillas expandibles como vermiculita, etc. que funcionan como soporte sólido. La vermiculita es una de las más utilizadas por ser una mica de estructura laminar, expandible (aluminosilicato de tipo 2:1), con una gran capacidad de absorción de agua e intercambio catiónico; y que por su estructura porosa favorece

Justificación

la penetración del micelio en los espacios inter e intra laminares, donde se mantiene protegido por largos periodos de tiempo (Mosser, 1958; Takacs, 1967, Theodorou & Bowen, 1973).

La producción de inoculantes de *Pisolithus tinctorius* en Estados Unidos, por la sociedad comercial Mycorr-Tech Incorporated (440 Wn Pitt Way Pittsburgh. PA 15238. USA), se realiza por un proceso desarrollado por Marx *et al.* (1984) utilizando una mezcla de vermiculita-tuba como soporte que se impregnan con un medio de cultivo líquido.

Las experiencias de producción de inoculantes comerciales de HEM en medios de cultivo líquido y sólido; demuestran que cada uno de estos sistemas tiene ventajas y desventajas que deberán considerarse cuando se quiere establecer un programa de micorrización controlada.

El cultivo en medio sólido tiene la ventaja de poder utilizarse mezclas de sustratos impregnados con medios de cultivo que se someten a bajos niveles de aireación y por lo tanto con un menor consumo de energía en comparación con los biorreactores agitados (Smith, 1985) pero también se explicó que hay dificultades para lograr el control y escalamiento de estos sistemas de cultivo.

En el caso particular de las especies ectomicorrízicas, la producción de inoculantes en CES pueden ser de interés por:

- la lentitud del proceso, debido a las bajas tasas de crecimiento de los hongos
- difícil conservación de las condiciones de esterilidad por periodos prolongados de incubación
- el cultivo micelial se ha limitado a un reducido número de especies
- la necesidad de producir cultivos de calidad fisiológica controlada.

Los materiales lignocelulósicos han sido poco utilizados como soporte sólido debido a que en éstos generalmente se favorece el desarrollo de hongos saprobios de rápido crecimiento inhibiéndose el de las especies de menor crecimiento. Una de las posibles causas de estos resultados es que existan cantidades importantes de nutrimentos en los sustratos y que los medios de impregnación utilizados no son selectivos para las especies ectomicorrízicas, es decir no se conocen los componentes y concentraciones adecuadas para favorecer un mejor crecimiento de las especies ectomicorrízicas.

JUSTIFICACIÓN

Aunque las ectomicorrizas se encuentran únicamente en 3-5% de plantas terrestres, son las que predominan en los ecosistemas forestales de las regiones boreales, templadas y mediterráneas, fundamentales para conservar el equilibrio ambiental en la biosfera.

La introducción de HEM en plántulas a nivel de viveros, es una estrategia muy recomendada para asegurar la supervivencia de las plantas que serán introducidas en suelos erosionados, de bajo nivel nutricional o en condiciones adversas.

En México, los problemas de deforestación son muy importantes y han causado que el nivel de erosión de los suelos llegue a grandes proporciones del territorio en los últimos años, por lo que hay una necesidad urgente de implementar actividades de reforestación intensiva.

Los métodos de micorrización más utilizados en México son simples e inespecíficos, que utilizan suelo forestal como fuente de inóculos fúngicos y aunque se han hecho algunos estudios sobre la utilización de inoculantes de *Pisolithus tinctorius* obtenidos con una metodología desarrollada en Estados Unidos, los resultados no han sido suficientes para establecer un programa de inoculación a gran escala.

Los estudios de cultivo en estado sólido de diversas especies fúngicas saprobias con diferentes sustratos lignocelulósicos realizados en diversos países y en México han definido las condiciones y controles necesarios para cultivar las especies fúngicas en este tipo de sustratos o soportes.

La producción de inóculos miceliales de HEM, depende de la posibilidad de cultivar las especies fúngicas en condiciones controladas de laboratorio, para seleccionar las que presenten mejores propiedades de crecimiento y conservación como un requisito de aplicación en grandes escalas, por lo que en este estudio se plantearon los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la fisiología del crecimiento micelial de cepas de HEM incluidas en tres géneros (*Lactarius*, *Suillus*, *Pisolithus*) cultivadas en condiciones ambientales variables (actividad de agua, temperatura, pH, luz) y medios de cultivo con diferente composición química (glucosa y fuentes nitrogenada, factores de crecimiento) solidificados con agar y en soportes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterización morfológica macroscópica de 10 cepas de HEM en dos medios de cultivo (BAF y PDA) y determinar el efecto del medio de cultivo en el diámetro colonial, crecimiento radial, velocidad media de crecimiento, biomasa y densidad fractal de las colonias.
2. Estandarizar un sistema de cultivo sólido con cubierta de celofán para el estudio del crecimiento micelial y biomasa de HEM.
3. Estudiar el efecto de la concentración de glucosa (1-50 g/L) y tres fuentes de nitrógeno (peptona, sulfato de amonio y nitrato de sodio) en medios modificados de BAF agar sobre el crecimiento micelial de HEM.
4. Con un diseño factorial fraccionario de Plackett-Burman conocer el efecto de la concentración de glucosa y tres fuentes de nitrógeno (peptona, sulfato de amonio y nitrato de sodio) de la humedad, pH, luz y temperatura de incubación en el crecimiento micelial de HEM en medios modificados de BAF Agar..
5. Con un diseño factorial fraccionario de Plackett-Burman conocer el efecto de la concentración de glucosa y tres fuentes de nitrógeno (peptona, sulfato de amonio y nitrato de sodio) factores de crecimiento, de la humedad, pH, luz y temperatura de incubación en el crecimiento micelial de HEM en bagazo de caña y vermiculita-turba impregnados con medios modificados de BAF.
6. Estudiar la conservación de cepas de HEM por resiembras periódicas y conservación en agua destilada estéril y seleccionar la que favorece su óptima recuperación..

HIPÓTESIS

1.-El cultivo sólido de diferentes especies de HEM en medios de composición química variable permitirá conocer la relación entre la morfología colonial y el crecimiento radial, la velocidad media de crecimiento (V_r), la cantidad de biomasa de estas especies fúngicas.

2.- La utilización de una cubierta de celofán en la superficie del medio sólido con agar aplicada en el cultivo de HEM facilitará la cuantificación de biomasa, el manejo y la obtención de resultados reproducibles.

3.- Conociendo el efecto de la glucosa y fuentes nitrogenadas en el crecimiento micelial de HEM en medios de cultivo solidificados con agar se podrán mejorar las condiciones de cultivo para la propagación de HEM en sistemas de cultivo en soporte sólido.

4.- El bagazo de caña acondicionado como soporte impregnado con medios de cultivo definidos en su composición química será un sustrato colonizado favorablemente por *Sullus collinitus* en forma similar a la colonización de la vermiculita-turba.

5.- La aplicación de diferentes sistemas de conservación de las cepas de HEM, permitirá identificar las mejores condiciones de conservación para cada especie y el rango de variación que pueden tener cada una.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos

Las diez cepas de hongos ectomicorrízicos (HEM) de estudio se presentan en la Tabla 3-1, que corresponden a seis especies pertenecientes a tres géneros fúngicos, las que fueron proporcionadas por dos instituciones mexicanas: El Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT) y la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN), así como del Institute Nationale de la Recherche Agronomique (INRA) de Montpellier, Francia.

Tabla 3-1: Listado de especies de hongos ectomicorrízicos (HEM) y sitios de procedencia

Especies	Cepa	Origen	Asociado con:
<i>Lactarius deliciosus</i> (L. Fr.) S.F. Gray	D-47 INRA	Francia	ND
<i>Lactarius sanguifluus</i> (Paul. Ex. Fr.)	S-29 INRA	Francia	ND
<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers.) Coker et Couch	F-26 INRA	Francia	ND
<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers.) Coker et Couch	P-3 ENCB	México	<i>Juglans</i> spp.
<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers.) Coker et Couch	P-4 ENCB	USA	ND
<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers.) Coker et Couch	P-5 UAT	México	<i>Juglans</i> spp.
<i>Suillus collinitus</i> (Fr.) O. Kuntze	S-24 INRA	Francia	<i>Pinus</i> spp.
<i>Suillus tomentosus</i> (Kauffm.) Singer, Snell et Dick	S-1009 UAT	México	<i>Pinus</i> spp.
<i>Suillus tomentosus</i> (Kauffm.) Singer, Snell et Dick	S-276 UAT	México	<i>Abies-Pinus</i>
<i>Suillus glandulosipes</i> (Thiers et Smith)	S-1588 UAT	México	<i>Pinus</i> spp.

ND. No determinado

3.2. Medios de cultivo

3.2.1. Medio de Papa Dextrosa Agar (PDA)

Se utilizó el medio comercial de la marca Oxoid con la siguiente composición química en g/L: D-glucosa 20.0, extracto de papa 4.0, agar 15.0; pH 5.6. El medio se preparó pesando 39 g de polvo, de acuerdo con las instrucciones del frasco y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

3.2.2. Medio semisintético BAF

La composición química del medio de cultivo BAF (biotina-aneurina-ácido fólico) se muestra en la Tabla 3-2. Se pesaron cuidadosamente cada uno de los ingredientes y se agregaron en el orden indicado, homogeneizando en un agitador magnético. El pH del medio se ajustó en frío a 5.6 con un potenciómetro y se calentó hasta ebullición durante 1 minuto. Se esterilizó a 121°C durante 15 minutos y cuando se enfría a 40 °C se le adicionó la solución de vitaminas previamente esterilizada por filtración en membrana Millipore de 0.25 µm.

Tabla 3-2: Medio de cultivo BAF (Moser, 1958)

Ingredientes:	g/L
D-Glucosa	30.0
Peptona de caseína	2.0
Extracto de Levadura	0.2
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5
CaCl ₂	0.1
Myo-Inositol	0.05
¹ Sol. de oligoelementos (mL)	1.0
² Sol. de vitaminas (mL)	1.0
Agar	15.0
pH	5.6

¹Solución de oligoelementos: Se preparan 100 mL de una solución de: ZnSO₄·7H₂O 100 mg; MnSO₄ 500 mg; citrato férrico 0.5 g.

² Sol. de vitaminas: Se preparan 100 mL de una solución concentrada de: Aneurina (Tiamina HCl) 50.0 mg; Biotina 10.0 mg; Ácido Fólico 100 mg. Se toma 1 mL de esta solución, se diluye con 9.0 mL de agua destilada y se esteriliza por filtración en membrana Millipore de 0.2 µm.

3.3. Análisis morfológico

Se hizo la descripción macroscópica de las colonias fúngicas, determinando el color, textura, producción de pigmentos, producción de exudados, olor y forma.

La descripción microscópica se hizo por observaciones al microscopio de preparaciones en portaobjetos de fragmentos de micelio teñidos con colorante de azul de lactofenol que se prepara como sigue: disolver cuidadosamente 10 g de fenol (cristales) en 20 mL de agua destilada, agregar 20 g de ácido láctico y 40 g de glicerol. Posteriormente agregar 0.05 g de azul de metilo y mezclar cuidadosamente.

3.4. Análisis morfométrico

Se utilizó un equipo procesador de imágenes con el programa IMAGENIA 2000 (Biocom, Francia) que consta de un microscopio Carl Zeiss, conectado a una cámara de circuito cerrado en blanco y negro, modelo Sentinel EEV PS46510 (G&C, Inglaterra). Este equipo envía la señal a una computadora HP386 equipada con una tarjeta digitalizadora Matrox y un coprocesador matemático 387.

Se calibra la escala del equipo con el objetivo de 10X y una cámara de Neubauer. Las cajas de Petri con los cultivos colocadas en la cámara en forma invertida permiten captar las imágenes a analizar en el monitor. Se hacen mediciones de la longitud y diámetro de al menos 15 puntas de hifas localizadas en la zona más distante al punto de inoculación.

3.5. Análisis estadísticos

Se hicieron diseños experimentales aleatorizados con muestras por triplicado para estudiar el efecto del cambio de condiciones de cultivo como la composición química del medio de cultivo, la utilización de cubiertas de celofán, concentración de glucosa, tipo de fuente nitrogenada en el crecimiento micelial y producción de biomas de diferentes cepas de HEM. El efecto estadístico de estos factores se determinó con pruebas de varianza y de t-Student para comparación de dos medias y en análisis de varianza (ANDEVA) para comparación de cepas y más de dos tratamiento en un programa de análisis estadístico SPSS versión 8.0.

En los casos en que las pruebas de ANDEVA demostraron efectos significativos ($p < 0.05$) de los tratamientos, se hicieron pruebas de intervalo múltiple de Tukey o de Duncan. Debido a que en un experimento, las respuestas evaluadas generalmente puede estar influenciadas por diversos factores y que el efecto que tiene cada uno de ellos puede variar en función de otros factores puede ser que en estudios

donde se fija la mayoría de variables y se evalúa el cambio de una sola variable no sea suficientemente precisa y sobre todo debido a la velocidades de crecimiento reducidas que se observan en los HEM también se hizo un diseño factorial fraccionario de Plackett-Burman para estudiar el efecto simultáneo de diversos factores de manera eficiente y con un menor número de experimentos. El análisis estadístico de estos diseños factoriales se realizaron en el programa Statgraphics Plus versión 5.0.

3.6. Evaluación del crecimiento micelial

3.6.1. Crecimiento radial

Se hicieron 4-5 mediciones del diámetro de las colonias con una regla graduada a intervalos de 48 h durante 21 días. En el caso de colonias no circulares, se tomó el promedio del diámetro mayor y el del menor. Al diámetro promedio se le restó el diámetro del inóculo inicial y se dividió entre dos. El crecimiento radial se expresó en mm.

3.6.2. Velocidad media de crecimiento radial (V_r).

Se calculó, como la pendiente de la regresión lineal de una gráfica de radio de la colonia y tiempo en la región de crecimiento lineal, expresándose en unidades de mm/día.

3.6.3. Dimensión fractal

La dimensión fractal (D) de las colonias se determinó calculando el valor de la pendiente de una regresión lineal de las gráficas de log biomasa y log radio de la colonia durante la etapa de crecimiento lineal, de acuerdo con el método propuesto por Ritz & Crawford, (1990).

3.7. Métodos de cuantificación de la biomasa

3.7.1. Por licuefacción del agar y filtración

La biomasa se cuantificó en las placas de Petri con agar por una modificación a la técnica de Chapman *et al.* (1990). El contenido de las caja de Petri se vació en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 90 mL de agua y se calentó en horno de microondas durante 5 minutos a 600 watts.

Posteriormente el micelio se lavó con agua caliente para eliminar completamente el medio de cultivo y se filtró sobre papel filtro previamente secado y puesto a peso constante. La biomasa se secó en estufa a 60 °C durante 24-48 horas y se pesó.

3.7.2. En cubiertas de celofán

Diversos autores (Robinson, 1978; Mitchell *et al.*, 1989; Ritz & Crawford, 1990) han sugerido la utilización de cubiertas semipermeables colocadas en la superficie sólida de medios de cultivo que posteriormente se separan para cuantificar la biomasa y metabolitos en forma más precisa. Se hicieron pruebas de utilización de fragmentos de celofán como cubierta semipermeable para definir un sistema de cultivo de HEM en cajas de Petri que permitiera determinar la biomasa micelial en forma más sencilla y práctica.

Se estudió el efecto de: a) la cubierta de celofán, b) el sitio de toma del inóculo, c) el tamaño del inóculo, d) el tamaño de las cajas de cultivo y e) la densidad de inoculación en el crecimiento micelial, procesando las muestras de acuerdo con el esquema de la Figura 3-1.

Las cubiertas de celofán se obtuvieron de hojas de celofán comercial (marca francesa "Ancel") que se cortaron con un sacadiscos de forma circular de 45 mm de diámetro. Posteriormente se colocaron en frascos de vidrio de 200 mL con tapón de baquelita y se lavaron tres veces con agua destilada. Con el agua del último lavado se esterilizaron a 121 °C durante 20 min.

Una vez esterilizadas, las cubiertas de celofán se colocaron sobre el medio de cultivo de las cajas de Petri, utilizando pinzas estériles y evitando la formación de burbujas. Para verificar la esterilidad de los medios de cultivo, las cajas de Petri se incubaron nuevamente a 25 °C durante 24 horas.

Las cajas de Petri se inocularon con discos de micelio obtenidos con un sacabocados de 4 mm de la periferia de colonias cultivadas en PDA durante 14 días de incubación. El inóculo se colocó en el centro de las cajas, poniendo el micelio en contacto con la cubierta, después las cajas se rodearon de parafilm y se incubaron en forma invertida a 25 °C.

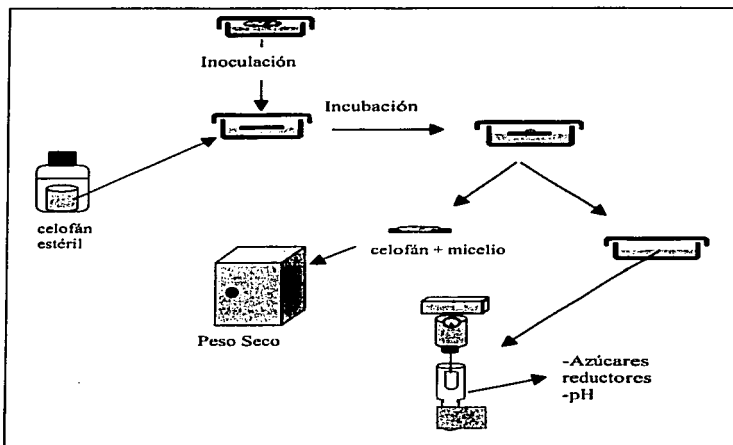


Figura 3-1: Técnica de cultivo y análisis de HEM en cajas de Petri con medios de cultivo solidificados con agar cubiertas con cubierta de celofán.

Después de 5 días de incubación se quitó el parafilm de las cajas de Petri y se incubaron nuevamente envueltas en bolsas estériles con tapón de algodón para favorecer el intercambio de gases y disminuir las pérdidas de humedad. Al final de la incubación, las cubiertas se separaron de las cajas de Petri y se colocaron en cajas de aluminio puestas a peso constante. Se colocan en estufa a 60 °C durante 24 horas y se pesaron nuevamente.

También se cuantificó el peso seco promedio de las cubiertas, colocando 10 cubiertas estériles en cajas de aluminio. Por diferencia de pesos de las cubiertas con micelio y las cubiertas sin micelio se determinó el peso de la biomasa micelial.

3.8. Estandarización del sistema de cultivo sólido con cubiertas de celofán

3.8.1. Tratamiento y análisis de muestras

En la Figura 5-1 se presenta la técnica de cultivo de HEM en cajas de Petri con cubierta de celofán que se aplicó para hacer la cuantificación de biomasa y análisis de metabolitos. Para analizar los metabolitos, el agar que queda en la caja después de quitar la cubierta de celofán se vació en un tubo de vidrio con 20 mL de agua que se homogenizó en equipo Turmix durante 3 minutos a 3000 rps y se completó el volumen a 100 mL con agua destilada.

3.8.1.1. Determinación del pH

La medición del pH se hizo en un potenciómetro digital con electrodo combinado previa calibración del mismo con soluciones buffer de pH 7.0 y 4.0 a 25 °C.

3.8.1.2. Cuantificación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se midieron por el método de Miller (1959), que determina grupos carbonilo libres (C=O), por la oxidación del grupo funcional aldehído de la glucosa. Al mismo tiempo el ácido 3,5 dinitrosalicílico es reducido a 3-amino, 5 nitrosalicílico en condiciones alcalinas dando lugar a una coloración amarillo-café que tiene un máximo de absorción a 575-580 nm.

En tubos de ensaye de 13 x100 se midieron alícuotas de 0- 0.5 mL de una solución estándar (1.0 g/L glucosa) y se completaron a 0.5 mL con agua destilada. En otros tubos se pusieron 0.25 mL de muestra problema con 0.25 mL de agua en los tiempos iniciales y con 0.5 mL de la muestra problema al final de la misma. A todos los tubos se les agregó 0.5 mL de reactivo de DNS (1%), se mezclaron rápidamente en vórtex y se colocaron en baño hirviente durante 5 min. Después, se pasaron a un baño de hielo y se les agregó 4 mL de agua destilada, mezclando cuidadosamente. Finalmente se hicieron las lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro UV-visible a 580 nm.

3.8.2. Efecto de la cubierta de celofán

Para cada cepa se prepararon 12 cajas de Petri de 90 mm con 25 al de medio PDA, en 6 cajas se colocó una cubierta de celofán. Las cajas se inocularon con un disco micelial de 4 mm de diámetro de cada una de las cepas cultivadas previamente en PDA durante 14 días y se incubaron a 25 °C durante 30 días haciendo cinco muestreos periódicos por triplicado.

Se analizó la concentración de glucosa con reactivo de DNS, la cantidad de biomasa y el pH del medio en cultivos de *Suillus collinitus* S-24 y *Pisolithus tinctorius* F-26.

3.8.3. Efecto del sitio de obtención del inóculo micelial

Se inocularon tres series de 12 cajas con medio PDA y cubierta de celofán, con cultivos de *Suillus collinitus* S-24 y *Pisolithus tinctorius* F-26. Cada serie de 12 cajas se inoculó por triplicado con micelio proveniente de tres sitios distintos de la colonia, de la periferia (Pe) de la parte media (Me) y de la zona central (Ce). Las cajas se incubaron durante 20 días a 25 °C.

3.8.4. Efecto del tamaño de inóculo

En esta parte experimental se inocularon tres series de 12 cajas de Petri con medio PDA y cubiertas de celofán. Cada serie de cajas se inoculó con bocados de diferente tamaño, se probaron tres tamaños: 3.5, 5.0 y 6.5 mm de diámetro. Las cajas se incubaron durante 20 días a 25 °C.

3.8.5. Efecto de la densidad de inoculación

Para optimizar el espacio y medios de cultivo, debido a que los tiempos de incubación que se requieren para cultivar estos hongos son muy prolongados, se estudió el efecto de la cantidad de discos de inoculación que se pueden colocar en cajas de Petri. Se inocularon discos de micelio de 4 mm de *Suillus collinitus* cultivado sobre cubiertas de celofán en tres series de 15 cajas de Petri de 60 mm y series de cajas de 90 mm con 10 y 25 mL de medio PDA respectivamente.

En las cajas grandes se hicieron dos series, en una se inocularon 3 bocados de 5.0 mm de diámetro y en la otra serie se inoculó solamente un bocado, igual que en las cajas de 60 mm. Se analizaron la producción de biomasa, el diámetro de la colonia y el consumo de azúcares.

3.9. Fisiología del crecimiento micelial en agar

En esta parte experimental se estudió el efecto de variables nutrimentales y ambientales sobre el crecimiento micelial de HEM en medios de cultivo.

El efecto de la concentración de glucosa y de la fuente nitrogenada así como la actividad de agua se hicieron en experimentos con diseños al azar, en los que se hizo la descripción morfológica de los cultivos, la medición periódica del diámetro de la colonia (mm) y biomasa así como el cálculo de la velocidad de crecimiento radial (V_r) y la dimensión fractal (D) de las colonias.

También se hicieron experimentos por diseños factoriales fraccionarios para evaluar simultáneamente el efecto de la glucosa, fuente de nitrógeno, extracto de malta y L-asparagina así como el efecto de la luz, pH y temperatura de incubación.

3.9.1. Efecto de la concentración de glucosa

Se inocularon siete cepas de HEM: *Pisolithus* (F-26, P-3, P-5) y *Suillus* (S-24, S-1009, S-1588, S-276) por triplicado en series de cajas con las siguientes concentraciones de glucosa: 0, 1, 10, 20, 30, 40 y 50 g/L en medio de cultivo BAF como medio de base en cajas de 90 mm con 25 mL de medio de cultivo cubierto con celofán. Las cajas se inocularon por triplicado en el centro con discos de 5 mm de un cultivo micelial obtenido en BAF agar y se incubaron durante 30 días a 25°C.

Se hizo por la descripción morfológica de los cultivos, la medición periódica del diámetro de la colonia (mm) y biomasa así como por el cálculo de la velocidad de crecimiento radial (V_r) y la dimensión fractal (D) del micelio.

3.9.2. Efecto de la fuente de nitrógeno

Se prepararon tres series medios de cultivo de BAF, con tres concentraciones de glucosa (1, 10 y 30 g/L) en los que se probaron concentraciones iguales de nitrógeno (0.32 g/L de N) a partir de tres fuentes de nitrógeno: 2.0 g/L peptona, 1.5 g/L de sulfato de amonio y 2.3 g/L de nitrato de calcio, considerando que 16% de la peptona corresponde a nitrógeno. Se inocularon las cepas de *Lactarius deliciosus* D-47 y *L. sanguifluus* S-29, *Pisolithus tinctorius* P-5 y F-26, *Suillus collinitus* S-24 y *S. tomentosus* S-1009 y S-276.

Las cajas de 90 mm con 25 mL de medio de cultivo y cubierta de celofán se inocularon por triplicado en el centro con discos de 5 mm de un cultivo micelial obtenido en BAF agar y se incubaron durante 30 días a 25°C.

Se hizo por la descripción morfológica de los cultivos, la medición periódica del diámetro de la colonia (mm) y se determinó la biomasa y la velocidad de crecimiento radial (V_r).

3.9.3. Efecto de la actividad de agua (a_w)

Los medios de cultivo con base al medio BAF, se ajustaron a dos niveles de a_w : 0.98 y 0.96 con cuatro sustancias depresoras de la a_w (Tabla 3-3). Estas cantidades se determinaron probando diferentes cantidades de las sustancias y midiendo el valor de a_w esperado en un equipo AQUALab mod. CX2T (Decagon Devices) que mide la humedad relativa del aire en equilibrio con la de la muestra. El equipo se calibró previamente con soluciones estándar de NaCl y agua destilada.

Tabla 3-3: Concentración de sustancias depresoras de a_w , para ajustar los medios de cultivo a dos valores

Sustancia	Actividad de agua (a_w)	
	0.98	0.96
NaCl (g/100 mL)	4.0	6.0
Glicerol (mL/100 mL)	12.0	20.0
Etilenglicol (mL/100 mL)	5.57	11.14
Sacarosa (g/100mL)	20.0	50.0

Materiales y Métodos

Las cepas de *S. tomentosus* (S-1009 y S-276), *S. collinitus* (S.24) y *P. tinctorius* (P-5) se inocularon por triplicado en series de cajas de Petri de 60 mm con 10 mL medio BAF ajustados a valores de a_w variable. Cada cepa, se inoculó en el centro con un disco micelial de 5 mm del margen de la colonia de un cultivo previo en BAF agar y se incubaron a 25°C.

Después de 10, 15 y 20 días de incubación se hicieron los muestreos de tres cajas de cultivo a las que se determinó crecimiento radial y se calculó la Vr. También al final del periodo de incubación se hicieron mediciones morfométricas del micelio en un equipo procesador de imágenes. Los parámetros que se midieron en la imagen del monitor fueron: la longitud y el diámetro de las hifas individuales del margen de las colonias en cajas de Petri.

3.10. Diseño factorial fraccionario para determinar el efecto de factores ambientales y nutrimentales

Una vez que se hicieron algunos estudios de la fisiología del crecimiento de las especies ectomicorrízicas en medios nutritivos con agar en función de la concentración de glucosa, de nitrógeno y actividad de agua por separado y tomado en cuenta los tiempos de incubación prolongados que se requieren para hacer los estudios, se decidió hacer un diseño experimental fraccionario con dos niveles, para conocer el efecto combinado de diversos factores con un menor número de experimentos (Lawson *et al.*, 1992).

En los diseños factoriales fraccionarios se selecciona un subconjunto o fracción del total de experimentos de un factorial completo 2^k , tal como $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, etc. donde el denominador es una potencia de 2. Los diseños de Plackett-Burman son muy útiles en el diagnóstico de factores de importancia en procesos diversos sobre todo en la industria y generalmente se construyen con múltiplos de cuatro experimentos, con tratamientos definidos en tablas para analizar diferente número de factores (Montgomery, 1991).

Con la reducción en el número de experimentos no se pueden estimar los efectos de las interacciones por lo que al emplear este tipo de diseños los efectos de las interacciones se consideran insignificantes, pero los resultados de efectos principales pueden estar confundidas (estructura alias).

La importancia relativa de los efectos de los factores se obtiene analizando el valor absoluto de sus magnitudes y con el calculo del valor estadístico t a partir del error estándar, procedimientos que son realizados de manera sencilla en programas estadísticos como el Statgraphics plus versión 5.0.

Los factores seleccionados para este estudio fueron: A= luz, B=temperatura, C=pH, D=glucosa, E=la fuente de nitrógeno (peptona, sulfato de amonio y nitrato de sodio), F=extracto de malta y G= L-asparagina. (Tabla 3-4).

Los medios de cultivo se prepararon en base al medio BAF modificando su composición de acuerdo con la matriz (De Meo *et al.*, 1985) de siete factores y 8 experimentos probando tres fuentes nitrogenadas se realizaron tres planes experimentales de 8 experimentos, dando un total de 24 experimentos (Tabla 3-5).

Las condiciones de iluminación se establecieron colocando una lámpara de luz blanca de 16 watts en las incubadoras a 25°C y 30°C. Para las condiciones de oscuridad las cajas de Petri se cubrieron con papel aluminio. Las pruebas experimentales se realizaron en cajas de Petri de 90 mm con medios de cultivo solidificados con agar y cubiertos con cubiertas de celofán.

Tabla 3-4: Matriz de Hadamard de 7 factores con 8 experimentos (De Meo *et al.*, 1985).

Nº de Experimento	k = 7						
	A=luz	B=temp	C=pH	D=gluc	E=nitrog	F=ext. m	G=asper
1	+	+	+	-	+	-	-
2	+	+	-	+	-	-	+
3	+	-	+	-	-	+	+
4	-	+	-	-	+	+	+
5	+	-	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	+	-	+
7	-	+	+	+	-	+	-
8	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3-5: Tratamientos y combinación de factores en tres diseños factoriales fraccionarios

Fuente de nitrógeno	Factores e interacciones confundidas (alias)	Nivel	
		+1	-1
Peptona	A:Luz+BD+CE+FG	Si	No
	B:Temperatura+AD+CF+EG	30°C	25°C
	C:pH+AE+BF+DG	7.0	9
	D:Glucosa+AB+CG+EF	10 g/L	5.0 g/L
	E:Peptona+AC+BG+DF	3.0 g/L	1.0 g/L
	F:Extracto de malta+AG+BC+DE	3.0 g/L	0.5 g/L
	G:L-asparagina+AF+BE+CD	0.5 g/L	0.0 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	A:Luz+BD+CE+FG	Si	No
	B:Temperatura+AD+CF+EG	30°C	25°C
	C:pH+AE+BF+DG	7.0	9
	D:Glucosa+AB+CG+EF	10 g/L	5.0 g/L
	E:Peptona+AC+BG+DF	3.0 g/L	1.0 g/L
	F:Extracto de malta+AG+BC+DE	3.0 g/L	0.5 g/L
	G:L-asparagina+AF+BE+CD	0.5 g/L	0.0 g/L
CaNO ₃	A:Luz+BD+CE+FG	Si	No
	B:Temperatura+AD+CF+EG	30°C	25°C
	C:pH+AE+BF+DG	7.0	9
	D:Glucosa+AB+CG+EF	10 g/L	5.0 g/L
	E:Peptona+AC+BG+DF	3.0 g/L	1.0 g/L
	F:Extracto de malta+AG+BC+DE	3.0 g/L	0.5 g/L
	G:L-asparagina+AF+BE+CD	0.5 g/L	0.0 g/L

Las cajas se inocularon aleatoriamente colocando 4 discos miceliales de 4 mm de diámetro de un cultivo previo de *S. collinitus* S-24 en zonas equidistantes de la misma, se roderaron las cajas con parafilm y se incubaron durante 15 días en condiciones de temperatura y luz definidas de acuerdo con la matriz de tratamientos.

Se evaluó el crecimiento radial después de 14 días de incubación y se cuantificó la biomasa micelial, separando la cubierta de celofán. Con los resultados (y) de crecimiento radial y biomasa fúngica (Tabla 4-6) se calculó el valor promedio de respuestas (b_s), los coeficientes de correlación, los efectos estimados y análisis de varianza para demostrar la significancia de cada factor en el programa estadístico para Windows Statgraphics plus ver. 5.0.

3.11. Fisiología del crecimiento micelial en soporte sólido

Se hicieron pruebas con vermiculita-turba como soporte control de acuerdo con el método de Marx *et al.* (1984) y en bagazo de caña como soporte alternativo.

En pruebas de acondicionamiento de los soportes, se determinó la capacidad de retención de agua y densidad de los mismos para calcular la cantidad de soporte, agua y nutrimentos necesarios por caja de Petri, que fue utilizada como sistema de estudio.

Se aplicó el mismo diseño experimental fraccionario aplicado en los estudios en agar, para comparar los resultados del efecto de los siete factores con 8 experimentos, en los dos soportes sólidos.

3.12. Descripción y acondicionamiento de los soportes sólidos

3.12.1. Origen de los soportes

El bagazo de caña se obtuvo del Ingenio Emiliano Zapata de Zacatepec, localizado en el estado de Morelos, México. La vermiculita y la turba (*sphagnum peat*) fueron de marca comercial.

3.12.2. Tamizado y lavado del bagazo de caña

Se separaron dos fracciones del bagazo de caña, con tamices metálicos: una fracción de tamaño menor de 0.3 mm (F₁) y otra fracción entre 0.3-0.8 mm (F₂) para utilizarse como soportes del cultivo sólido. Las fracciones separadas se pusieron en bolsas de plástico, se lavaron cinco veces con agua desmineralizada para eliminar azúcares y minerales solubles. Después de su esterilización a 121° C durante 30 min., los soportes se secaron en estufa a 60°C durante 24-48 horas y posteriormente se almacenaron en recipientes limpios y secos.

3.12.3. Determinación de la densidad de los soportes

Se determinó el peso de una probeta de 10 mL, se llenó con el soporte seco a un volumen de 10 mL. La unidad se pesó y se le restó el peso de la probeta vacía; al dividir el valor entre 10 el peso resultante se obtuvo el valor de la densidad en g/mL.

3.12.4. Ajuste de la humedad del bagazo de caña e impregnación con el medio

La cantidad de bagazo de caña seco por caja de Petri fue de 2.0 g. El soporte se ajustó a 90% de humedad en peso agregando 18 mL de medio de cultivo por caja. Con el fin de hacer comparativos los resultados del estudio en medio de cultivo solidificado con agar y los de soportes sólidos, se ajustó el contenido de nutrimentos por caja al equivalente en una caja de Petri con 25 mL de medio de cultivo BAF agar. Se calculó que para ajustar el sistema a una concentración de 5.0 g/L de glucosa corresponde a 0.125 g/caja, mientras que para el nivel de 10 g/L se deberá agregar 0.25 g de glucosa/caja. De la misma forma se calculó la concentración de las fuentes de nitrógeno adicionadas a los diferentes medios de cultivo.

3.12.5. Selección del tamaño de partícula de bagazo de caña y ajuste de humedad

Se hizo la selección de la fracción de bagazo de caña que se utilizaría, haciendo un estudio de cultivo de la cepa de *S. collinitus* S-24 en cajas de Petri de 60 mm, con las dos fracciones de bagazo de caña que se impregnaron con medio líquido de BAF preparado diez veces más concentrado para ajustar la concentración de nutrimentos en cantidades equivalentes a una caja con 10 mL de medio de cultivo BAF con agar. Los tres niveles de humedad (70, 80 y 90%) se ajustaron con agua destilada (Tabla 3-5).

Tabla 3-5: Formulación de sustratos con dos fracciones de bagazo de caña impregnado con medio líquido BAF y ajustadas a tres niveles de humedad (70, 80 y 90%) con agua destilada.

Tamaño de partícula	% Humedad	Bagazo de caña (g)	Medio líquido* BAF (mL)	Agua (mL)
Fracción 1 (<0.3 mm) δ=0.07 g/mL	70	0.7	1.0	0.63
	80	0.7	1.0	1.45
	90	0.7	1.0	5.3
Fracción 2 (0.3-0.8 mm) δ=0.05 g/mL	70	0.5	1.0	0.16
	80	0.5	1.0	1.0
	90	0.5	1.0	3.5

*se preparó diez veces más concentrado y después de agregó el agua necesaria a cada caja para ajustar el nivel de humedad.

3.12.6. Diseño factorial fraccionario para determinar el efecto de factores ambientales y nutrimentales

Se aplicó el mismo diseño experimental con siete factores y 8 experimentos que se presenta en la Tabla 3-5 en la sección anterior. Se analizó el crecimiento radial de las colonias y debido a la dificultad de determinar biomasa en los soportes sólidos no se determinó, únicamente se hicieron evaluaciones cualitativas de la densidad de crecimiento y de la profundidad de colonización del soporte.

Las pruebas experimentales se realizaron en cajas de Petri de 90 mm por triplicado y en dos sistemas de cultivo uno con bagazo de caña y el otro con vermiculita-turba. La cantidad de nutrimentos por caja de Petri que se adicionó fue la equivalente al contenido en una caja de Petri con 25 mL de medio de cultivo BAF.

Para cada plan de experimentación se prepararon 24 cajas de Petri con vermiculita-turba y 24 cajas de Petri con bagazo de caña acondicionadas con medio de cultivo. Cada caja se inoculó con 43 discos miceliales de 4 mm de micelio colocados en puntos equidistantes sobre la superficie del soporte.

A los 15 días de incubación se hizo el estudio morfológico, la medición del diámetro de la colonia así como una evaluación cualitativa de la densidad del cultivo y penetración de las hifas en el soporte por observación microscópica de muestras.

3.12.7. Preparación de la mezcla de vermiculita-turba

Se mezcló la vermiculita con la turba en relación 3:1 en peso, que por la diferencia de densidades de estos materiales fue equivalente a 20% de turba y 80% de vermiculita en volumen.

3.12.8. Ajuste de la humedad de la vermiculita-turba e impregnación con el medio de cultivo

La cantidad de mezcla de vermiculita-turba utilizada por caja fue de 4.0 g. El soporte se ajustó a 80% de humedad en peso agregando 16 mL de medio de cultivo por caja. El soporte se impregnó con la misma cantidad de nutrimentos por caja de Petri, utilizadas para preparar cajas con bagazo de caña.

Las cajas se incubaron en estufa acondicionada con charolas de agua para conservar los niveles de humedad durante el experimento.

3.12.9. Esterilización de los soportes

La mezcla de vermiculita-turba y el bagazo de caña impregnados con el medio de cultivo se esterilizaron en frascos de cultivo con tapón de baquelita a 121 °C durante 30 minutos y una vez fríos se vaciaron los soportes cuidadosamente en las cajas de Petri en condiciones estériles.

3.13. Métodos de conservación de cepas

Se hicieron estudios de conservación de las cepas ectomicorrízicas aplicando dos metodologías:

- a) por resiembras periódicas en medios de cultivo y
- b) conservación del micelio en agua destilada estéril.

Se pretende conocer cual de estas metodologías favorece una mejor conservación y recuperación de las cepas en diferentes tiempos, evaluando sus propiedades morfológicas y de crecimiento en PDA como medio de cultivo estándar.

Se probaron dos técnicas de conservación, la de resiembra en medios PDA y PDA ¼ en cajas de Petri y frascos de cultivo almacenados en refrigeración, y la de conservación en agua estéril en frascos almacenados en refrigeración y a temperatura ambiente.

3.13.1. Resiembras en frascos de cultivo

Para cada cepa se prepararon 5 frascos de 15 mL con 6.0 mL de medio PDA y otros 5 frascos con PDA ¼ que se dejaron solidificar en forma inclinada. Los frascos se inocularon en el centro con un disco de 4 mm de un cultivo micelial, se incubaron a 25 °C durante 14 días. Posteriormente, los frascos de cultivo se sellaron con parafilm y se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Este procedimiento se repitió cada tres meses.

3.13.2. Resiembras periódicas en cajas de Petri

Para cada cepa se prepararon 5 cajas de Petri de 90 mm con 25 mL de medio PDA y 5 cajas con PDA ¼. Las cajas se inocularon en el centro con un disco de 4 mm de un cultivo micelial previo, se

incubaron a 25 °C durante 21 días y se rodearon de una tira de parafilm. Posteriormente se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Después de tres meses se repitió el mismo procedimiento.

3.13.3. En agua destilada estéril

Se prepararon cultivos en cajas de Petri de 90 mm con 25 mL de medio PDA ¼., como e indica en el inciso anterior. Se colocaron 5-10 discos de 4 mm de estos cultivos en frascos de 5mL con 3mL de agua destilada estéril y ajustada a pH neutro. Después, los frascos con tapón de baquelita se cerraron, se sellaron con papel parafilm y se almacenaron en una alacena a temperatura ambiente.

4. RESULTADOS

4.1. Descripción morfológica de HEM.

La morfología colonial y micelial de las cepas ectomicorrízicas cultivadas en dos medios de cultivo se presentan en la Tabla 4-1. Las características morfológicas más notables que distinguieron el crecimiento de las cepas de estudio fueron la textura y color del micelio.

El color del micelio de todas las de *P. tinctorius* fue café claro a café oscuro pero con textura algodonosa y micelio aéreo variable; las cepas P-3, P-4 y P-5 fueron más algodonosas y con abundante micelio aéreo mientras que la F-26 fue menos algodonoso y con micelio aéreo escaso.

Entre las cepas de *Suillus* no se observaron cambios en el color del micelio, pero si hubo cambios en la textura del micelio. En *S. collinitus* S-24 fue muy algodonoso y con abundante micelio aéreo, en las de *S. tomentosus* S-276 y S-1009 fue menos algodonoso y con micelio aéreo reducido y en *S. glandulosipes* (S-1588) aterciopelado. Las colonias de las dos cepas de *Lactarius* fueron de textura fibriloso, con micelio aéreo escaso y pegado al medio.

Entre los dos medios de cultivo se observaron algunas diferencias, el diámetro colonial promedio de *Suillus* y *Pisolithus* fue mayor en PDA y con una mayor densidad micelial, así como una abundante pigmentación del medio de cultivo y producción de exudados café oscuro sobre las colonias.

En *Suillus collinitus* S-24 también hubo cambios en el aroma y color de los exudados dependiendo del medio de cultivo, en PDA presentó abundantes exudados claros de aroma dulce, mientras que en BAF los exudados fueron color café oscuro de aroma *sui generis* de hongo tal como se observa en la Figura 4-1.

Las colonias de *Pisolithus* se caracterizaron por presentar de dos a tres zonas de diferente textura y color del centro al borde de la colonia, mientras que las de *Suillus* fueron más homogéneas, solo se distinguió una zona en el centro menos algodonosa y en el borde una línea delgada de micelio blanco.

Tabla 4-1: Morfología colonial y micelial de HEM en medio dos medios de cultivo: semisintético de BAF Agar y complejo PDA.

Cepa	Medio de cultivo	¹ Color del micelio	² Textura	³ Borde	⁴ Exudados	⁵ Color del medio
<i>L. deliciosus</i> D-47	BAF	Ca	F	I	(-)	(Ac)
	PDA	Ca	F	I	(±)	(-)
<i>L. sanguifluus</i> S-29	BAF	Ca	F	I	(-)	(Ac)
	PDA	Ca	F	I	(±)	(-)
<i>P. tinctorius</i> F-26	BAF	Cc	A (++)	I	Co (++)	Ac
	PDA	Co	A (++)	R	Co (++)	Co
<i>P. tinctorius</i> P-3	BAF	Cc	A (++)	R	Co (++)	Ac
	PDA	Cc	A (++)	R	Co (++)	Ac
<i>P. tinctorius</i> P-4	BAF	Co	A (++)	R	Cc (++)	Ac
	PDA	Co	A (++)	R	Cc (++)	Cc
<i>P. tinctorius</i> P-5	BAF	Co	A (+++)	R	Co (+++)	Co
	PDA	Co	A (++)	R	Co (+++)	Co
<i>S. collinitus</i> S-24	BAF	C	A (+++)	R	Cc (+++)	Ac
	PDA	C	A (+++)	R	Cc (+++)	Ac
<i>S. tomentosus</i> S-1009	BAF	C	AD (++)	R	Cc (++)	Ac
	PDA	C	A (++)	R	Cc (+++)	An
<i>S. tomentosus</i> S-276	BAF	C	AD(++)	I	(-)	Cc
	PDA	C	A (++)	I	Cc(+)	Co
<i>S. glandulosipes</i> S-1588	BAF	Nc	At	I	(-)	Ac
	PDA	Co	At	I	Cc(+)	Cc

Notas:

¹Color de micelio en la zona central

C=Crema anaranjado

Nc= Naranja café

Co= Café oscuro

Cc= Café claro

C= Crema

²Borde

I=Irregular

R=Regular

³Textura

A=algodonoso

AD=algodonoso y denso

F=fibriloso, pegado al medio

At= ateciopelada

⁴Color de exudados

Cc=Café claro

Co=Café oscuro

Ac=amarillo claro

Cn= Café-naranja

⁵Color del medio

(-) Sin cambio

Co=café oscuro

Cc. café claro

An=amarillo naranja

Ac. amarillo claro

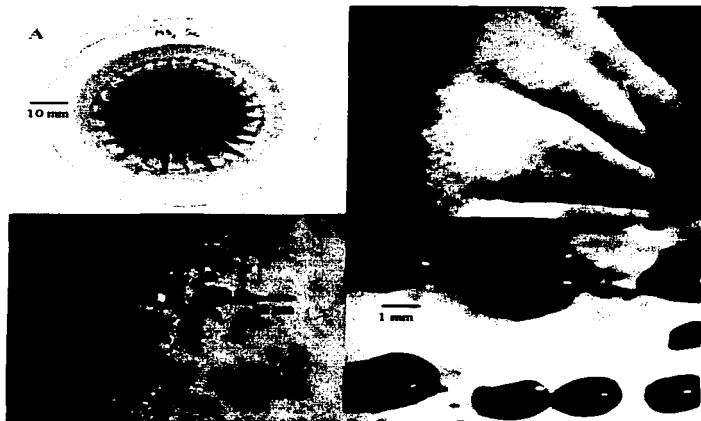


Figura 4-1: Morfología colonial y micelial de HEM en diferentes medios de cultivo. A. Colonia de *Suillus collinitus* en PDA B. Borde de la colonia de *S. collinitus* en PDA C. Micelio de *S. collinitus* en el margen de la colonia en BAF D. Exudados de color café sobre el micelio de *S. collinitus* en medio BAF.

4.2. Caracterización del crecimiento micelial

En la Figura 4-2 se observan las etapas de crecimiento radial de las cepas ectomicorrízicas. Se observa una fase inicial de adaptación (lag) y una posterior etapa de crecimiento lineal, sin llegar a presentarse una etapa estacionaria durante el periodo de incubación. El crecimiento lineal se inició alrededor del sexto día de incubación en PDA, pero en medio BAF las cepas *S. tomentosus* S-1009 y *P. tinctorius* P-3, P-5 y *S. collinitus* S-24 y *S. granulatus* S-1009 fue en 5 días.

Posteriormente el crecimiento fue de forma lineal y al final de la incubación el diámetro de las colonias en los dos medios fue muy similar, pero en medio BAF la variación fue más amplia.

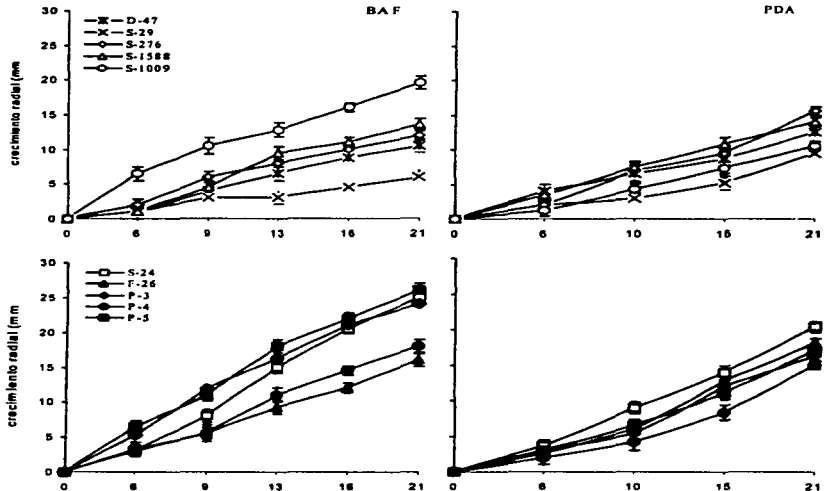


Figura 4-2 Cinéticas de crecimiento radial (mm) de especies ectomicorrizas cultivados durante 21 días en cajas de Petri de 90 mm con 25 mL de medio BAF agar y PDA. Las cepas de *Lactarius* se identifican con símbolos cruzados, las de *Suillus* con símbolos vacíos y las de *Pisolithus* con símbolos llenos.

Aunque en esta gráfica se observa que la mayoría de las cepas presentó un mejor crecimiento en el medio BAF, el análisis estadísticos con pruebas de t-Student ($p < 0.05$) para cada cepa, demostraron resultados de significancia variable entre las mismas.

Las dos cepas de *Lactarius* y *S. tomentosus* S-276 crecieron significativamente mejor en medio de PDA; en las de *P. tinctorius* F-26 y P-4 y *S. glandulosipes* S-1588 no hubo diferencias significativas entre los dos medios de cultivo y en las de *Pisolithus* P-3, P-5, *Suillus collininus* S-24 y *S. tomentosus* S-1009 el crecimiento radial fue significativamente mejor en medio BAF.

Posteriormente por el cálculo de la pendiente en la fase lineal de crecimiento en las curvas de crecimiento radial de cada una de las cepas, se determinó el valor de la velocidad de crecimiento radial (V_r) que se expresa en mm/día (Figura 4-3). Se observó que en las cepas de *Lactarius* (D-47, S-29), *S. tomentosus* S-1009 y *S. glandulosipes* S-1588 no hubo efecto del medio de cultivo, lo que se comprobó en pruebas de t-Student ($P < 0.05$). En las cepas de *S. tomentosus* S-276 y *P. tinctorius* F-26 la V_r fue mayor en PDA y para *P. tinctorius* P-3, P-4, P-5 y *S. collinitus* S-24 fue significativamente ($p < 0.05$) mejor en BAF.

En esta gráfica comparativa de la V_r y crecimiento radial de cada cepa al final del periodo de incubación, se observa una correlación directa entre el crecimiento radial y la V_r , sobre todo en el medio BAF, en el que se obtuvo un mayor crecimiento radial y V_r , sin embargo el aumento en crecimiento radial no es proporcional al aumento de la V_r , es decir en este medio algunas cepas como *P. tinctorius* P-3, P-5 y *S. tomentosus* S-1009 alcanzaron un crecimiento radial mayor pero con una V_r menor

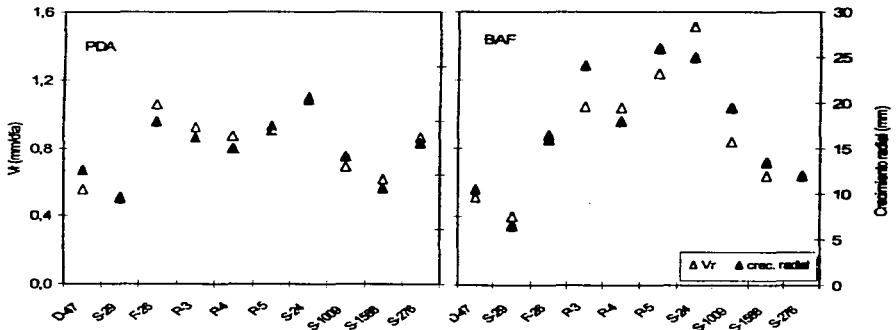


Figura 4-3: Relación del crecimiento radial (mm) de las colonias y la velocidad radial (V_r) de 10 cepas de HEM cultivados durante 21 días en dos medios de cultivo.

4.3. Producción de biomasa

En la Figura 4-4 se presentan los resultados de biomasa de colonias en los dos medios de cultivo por cada una de las cepas, donde se observa que en la mayoría de cepas no hubo diferencia significativa del medio de cultivo en la producción de biomasa, a excepción de *S. collinitus* S-24 y *P. tinctorius* P-5 que tuvieron mayor producción de biomasa en BAF y *S. glandulosipes* S-1588 con mayor producción de biomasa en PDA.

Si hacemos una gráfica comparativa de la biomasa y crecimiento radial de cada cepa al final del periodo de incubación (Figura 4-5), se observa que el medio de cultivo afecta la relación de biomasa y el crecimiento radial en forma característica en cada una de las cepas.

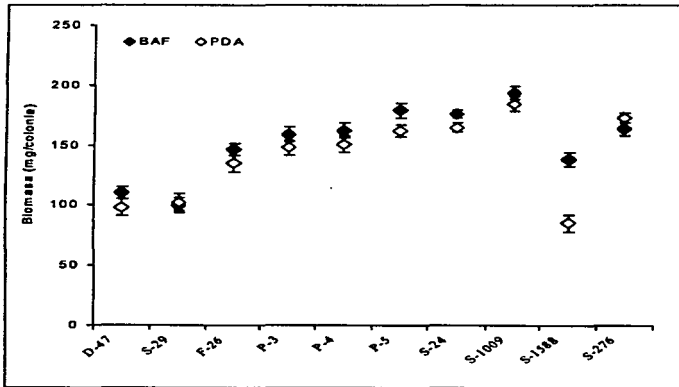


Figura 4-4: Evaluación de biomasa colonial de HEM cultivados durante 21 días en cajas de Petri de 90 mm con 25 mL de medio de cultivo PDA y BAF.

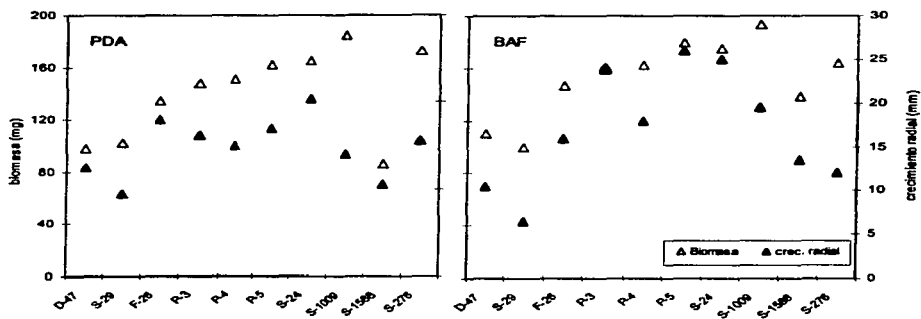


Figura 4-5: Relación entre la biomasa y el crecimiento radial de colonias de HEM cultivados durante 21 días en dos medios de cultivo.

Hubo una relación directa entre los dos parámetros en los dos medios de cultivo únicamente en *S. collinitus* S-24; en cepas como *Lactarius* y *P. tinctorius* F-26 hubo mayor cantidad de biomasa y menor crecimiento radial en BAF pero no en PDA y en *P. tinctorius* P-5 y *S. tomentosus* S-1009 tuvieron mayor producción de biomasa en PDA pero con colonias de crecimiento radial menor y finalmente las colonias de *S. glandulosipes* S-1588 fueron de crecimiento radial bajo con biomasa únicamente en el medio PDA. Para observar mejor este efecto se calculó el cociente de estos dos parámetros para determinar la relación de mg de biomasa /mm de las colonias.

En la Figura 4-6 se puede observar el efecto del medio de cultivo en la relación biomasa/crecimiento radial de cada una de las cepas, notándose que en el medio PDA se obtuvieron mayores relaciones sobre todo en las cepas de *Pisolithus* (P-3, P-4 y P-5) y *Suillus* (S-24 y S-1009) que se caracterizaron por su textura algodónosa (Tabla 4-1)

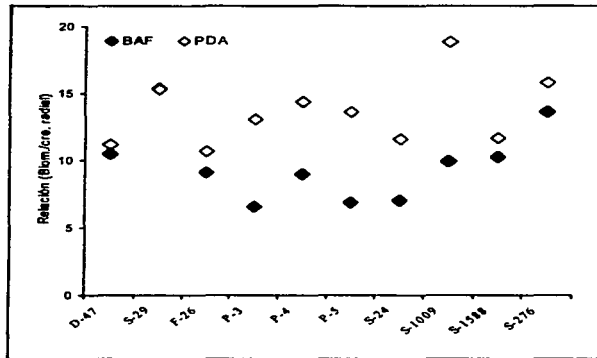


Figura 4-6: Relación biomasa/crecimiento radial de cepas de HEM cultivados durante 21 días en dos medios de cultivo.

4.4. Dimensión fractal

La dimensión fractal es una característica de crecimiento de hongos y bacterias filamentosas que se ha aplicado para estudiar los patrones de ramificación y crecimiento de estos organismos en distintos planos y de esta manera definir sus estrategias de colonización de diferentes medios de cultivo. De acuerdo con Ritz & Crawford (1990), la dimensión fractal se calculó con los resultados de crecimiento radial y biomasa.

En la Figura 4-7 se observa que hubo diferencias significativas del medio de cultivo en la dimensión fractal de las colonias en la mayoría de las cepas a excepción de las dos de *Lactarius*, *P. tinctorius* P-4 y *S. collinitus* S-24, aunque de acuerdo con el valor de la dimensión fractal por cada cepa, y a los criterios de Obert *et al.* (1990) y Prosser (1995) las diferencias más importantes son en relación con las estrategias de colonización que se distinguen entre las que tienen valores menores y mayores de 2.0

Resultados

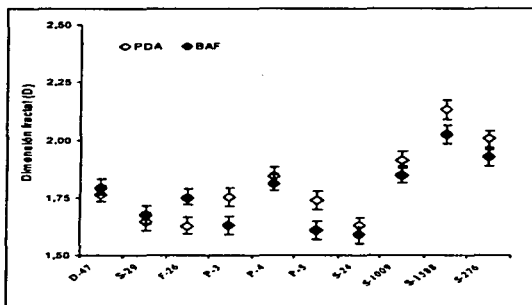


Figura 4-7: Valores de dimensión fractal (D) de cepas de HEM cultivados durante 21 días en dos medios de cultivo.

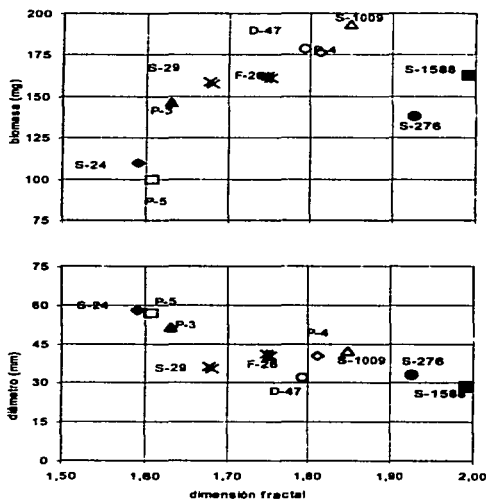


Figura 4-8: Relación entre la dimensión fractal (D), el diámetro de las colonias (mm) y la biomasa (mg) de las colonias de HEM en medio BAF.

Resultados

En la Figura 4-8 se presenta la relación entre la dimensión fractal, diámetro de las colonias y la biomasa de las colonias, donde se observa que en el grupo de cepas que alcanzaron los mayores diámetros coloniales corresponden a los valores menores de dimensión fractal a diferencia de las cepas de menor diámetro que tienen un valor de D cercanos a 2.0.

Con relación a la biomasa y la dimensión fractal, las colonias de mayor densidad tuvieron los valores de D mayores.

4.5. Estandarización de un sistema de cultivo sólido con cubierta de celofán

4.5.1. Efecto de la cubierta de celofán en el crecimiento y la morfología colonial

En los cultivos con celofán se observó un incremento en la duración de la etapa de adaptación (lag) de algunas de las cepas de HEM, principalmente en las de *Pisolithus* donde después de 8 días se inició el crecimiento lineal, sin embargo posteriormente se alcanzaron diámetros similares al de los cultivos sin celofán. Los resultados de biomasa y diámetro final de colonias de HEM cultivados durante 30 días en cajas de Petri con PDA sin celofán y con celofán se presentan en la Figura 4-9.

En pruebas de t-Student se encontró que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en el diámetro colonial ni en la Vr de la mayoría de cepas a excepción de *P. tinctorius* P-5. Sin embargo, en general se obtuvo mayor cantidad de biomasa en los cultivos con celofán, a excepción de las de *Lactarius* en las que no se observó efecto significativo del celofán.

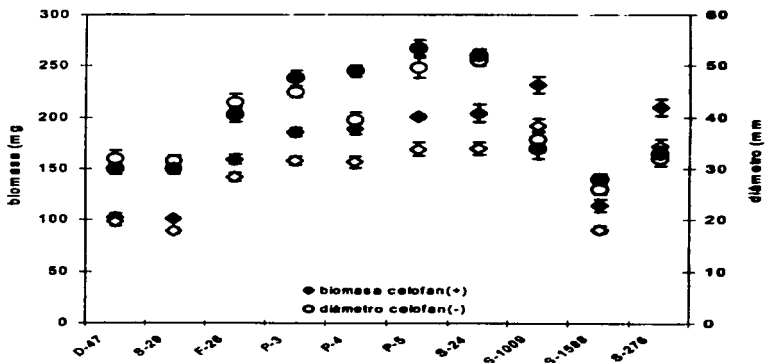


Figura 4-9 Efecto de la utilización de una cubierta de celofán en los medio de cultivo sólido sobre la biomasa y diámetro colonial de 10 cepas de HEM cultivadas durante 30 días.

En algunas cepas se observaron cambios morfológicos importantes en los cultivos con el celofán (Figura 4-10), en *S. collinitus* S-24, *S. glandulosipes* S-1588 y *S. tomentosus* S-1009 las colonias fueron menos algodonosas, con bordes irregulares y elevaciones del micelio a partir del sitio de inoculación formando radiaciones hacia el borde, incluso las colonias de *S. glandulosipes* se pudieron desprender completamente de la cubierta.

Por otro lado *P. tinctorius* F-26 formó colonias con bordes más irregulares y sin radiaciones detrás de la colonia, mientras que las dos cepas de *Lactarius* y *P. tinctorius* P-5 no presentaron cambios importantes en su morfología colonial.

La producción de pigmentos que se difunden en el medio fue menor en las cepas de *P. tinctorius* P-5 y *Suillus collinitus* S-24 en comparación a los cultivos sin celofán.

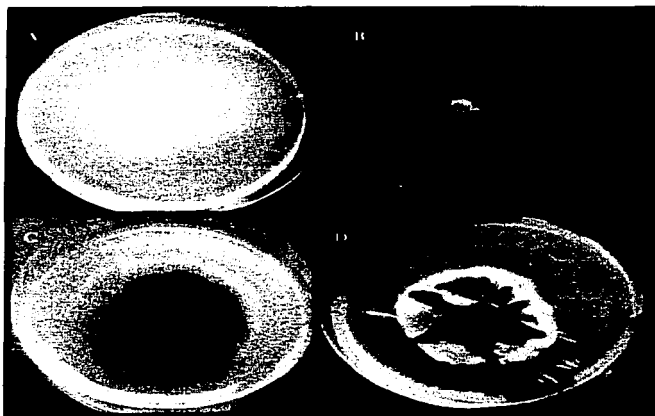


Figura 4-10: Morfología colonial y micelial de HEM en PDA con celofán. A. *Lactarius deliciosus* D-47 B. *Pisolithus tinctorius* F-26 C. *Pisolithus tinctorius* P-5 D. *Suillus collinitus* S-24.

Resultados

4.5.2. Efecto de la cubierta de celofán en el consumo de azúcares

En cultivos de *S. collinitus* S-24 y *P. tinctorius* F-26 de cajas de Petri de 60 mm con 10 mL de PDA sin celofán y con celofán se hizo la cuantificación de glucosa en el medio de cultivo libre de micelio y de cubierta de celofán con micelio respectivamente. Los resultados de % de glucosa consumida y de biomasa en cinco muestreos durante un periodo total de 30 días se presentan en la Figura 4-11.

Se observa que las curvas de consumo de azúcares y producción de biomasa fueron muy similares hasta los veinte días en los cultivos con y sin celofán y al final del periodo de incubación, se observó que las dos cepas consumieron aproximadamente 85% de la glucosa inicial sin cambios significativos ($p < 0.05$) por el celofán, sin embargo si hubo diferencias significativas en la producción de biomasa de las dos cepas.

Los cambios en el pH de los medios de cultivo con celofán y sin celofán fueron muy similares, notándose su acidificación hasta valores de 3.5 aproximadamente.

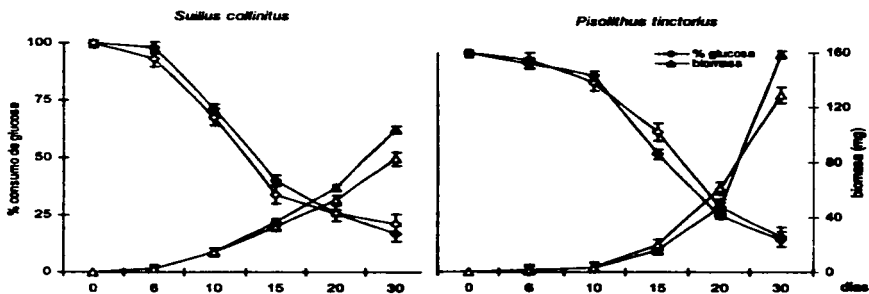


Figura 4-11: Efecto de la cubierta de celofán en las cinéticas de producción de biomasa y consumo de glucosa de *Suillus collinitus* S-24 y *Pisolithus tinctorius* F-26, cultivadas en cajas de Petri con PDA. Los resultados de los cultivos sin celofán se presentan con símbolos vacíos.

4.5.3. Efecto del sitio de obtención del inóculo micelial

En este estudio se inocularon tres series de cajas de Petri con medio PDA con celofán. Los inóculos fueron obtenidos de colonias de 30 días de cultivo en PDA a partir de tres sitios diferentes: del margen de la colonia o periferia, de la zona media y de la zona central. La inoculación de las cajas se hizo en forma aleatorizada.

Los resultados de biomasa y crecimiento radial de las colonias se presentan en la Figura 4-12. Por observación de la gráfica y por pruebas de ANDEVA ($p < 0.05$) de una sola vía se comprobó que no hubo diferencias significativas del sitio de toma del inóculo en el crecimiento radial de las dos cepas, pero si hubo diferencias en la cantidad de biomasa.

Las colonias de cajas inoculadas con micelio obtenido de la zona central tuvieron los valores menores de biomasa y no hubo diferencias significativas en la biomasa de colonias inoculadas con micelio de la zona periférica y media, pero si entre estos dos sitios y la zona central.

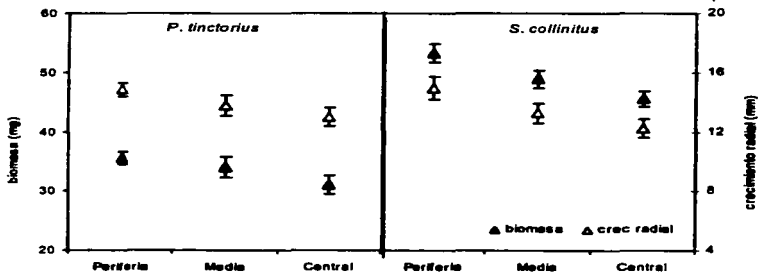


Figura 4-12: Resultados de biomasa (mg) y crecimiento radial (mm) de colonias de *P. tinctorius* F-26 y *S. collinitus* S-24 cultivadas durante 20 días en cajas de Petri de 60 mm con 10 mL de medio PDA, que se inocularon con micelio obtenido de la periferia, zona media y zona central de colonias previamente cultivadas en PDA. Los resultados son valores promedio de tres réplicas.

Calculando los valores de V_r y dimensión fractal de las colonias (Figura 4-13) se observó que no hubo efecto significativo del sitio de toma de inóculo en la dimensión fractal de las colonias de las dos cepas y en la V_r de *P. tinctorius*, sin embargo en *S. collinitus* la V_r es significativamente mayor cuando el inóculo es tomado de la zona periférica, lo cual se comprobó con pruebas de ANDEVA ($p < 0.05$) de una vía para cada cepa.

En las cinéticas de crecimiento y consumo de glucosa de *S. collinitus* S-24 y *P. tinctorius* F-26 en cada serie con inóculos de diferente origen, se observó que hubo diferencias significativas entre las dos cepas y entre los sitios de origen (Figura 4-14).

A los 20 días de cultivo ambas cepas consumieron el 80% de glucosa inicial en las cajas inoculadas con micelio obtenido de la zona de la periferia, a diferencia de las cajas con los inóculos de la zona central y media en las que se determinó un 25% menos de consumo de la glucosa. En la producción de biomasa al final de la incubación no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en *P. tinctorius* pero sí en *S. collinitus*.

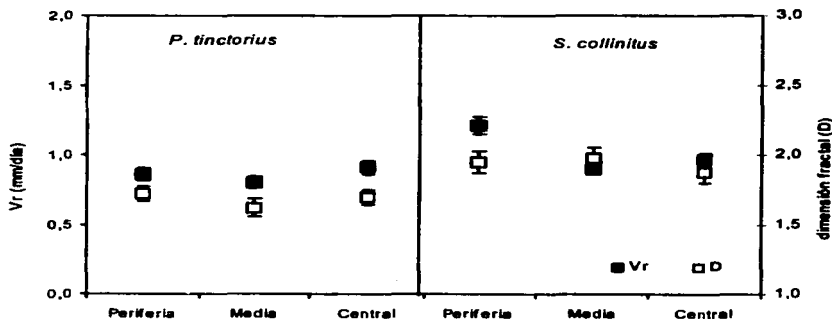


Figura 4-13: Efecto del sitio de toma de inóculo en la V_r y dimensión fractal de colonias de *P. tinctorius* y *S. collinitus* cultivadas en cajas de Petri con PDA.

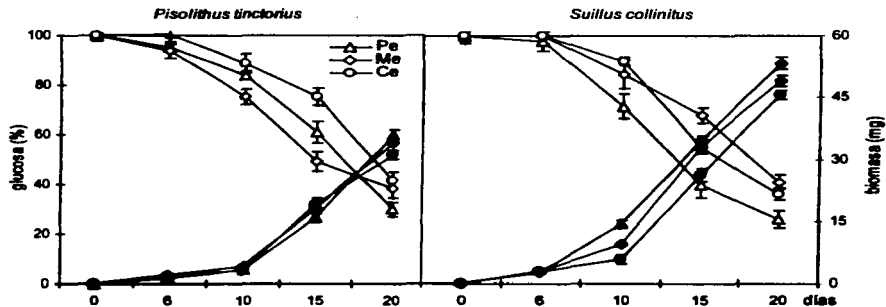


Figura 4-14: Efecto del sitio de origen del inóculo micelial de *P. tinctorius* y *S. collinitus* en la producción de biomasa (símbolos llenos) y consumo de glucosa (símbolos vacíos). Los inóculos en forma de bocados de 4 mm se tomaron de la zona periférica (Pe), media (Me) y central (Ce).

4.5.4. Efecto del tamaño de inóculo

Los resultados del crecimiento radial y biomasa de las colonias se presentan en la Figura 4-15, en la que se observa que el crecimiento radial de *P. tinctorius* se reduce significativamente cuando el inóculo es de 3.5 mm y de 6.5 mm, mientras que la biomasa es significativamente mayor en el de 6.5 mm.

En *S. collinitus* no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en el crecimiento radial y biomasa de las colonias obtenidas con inóculos de 3.5 y 5.0 mm, pero si fueron significativamente mayores cuando el tamaño de inóculo fue de 6.5 mm. Analizando los resultados de Vr y dimensión fractal de las colonias, en pruebas de ANDEVA de una vía se encontró que si hubo efecto significativo ($p < 0.05$) del tamaño de inóculo en la Vr con valores mayores con inóculo de 5.0 mm para las dos cepas. En la dimensión fractal no hubo efecto significativo ($p < 0.05$) del tamaño del inóculo para las dos cepas tal como se observa en la Figura 4-16.

Resultados

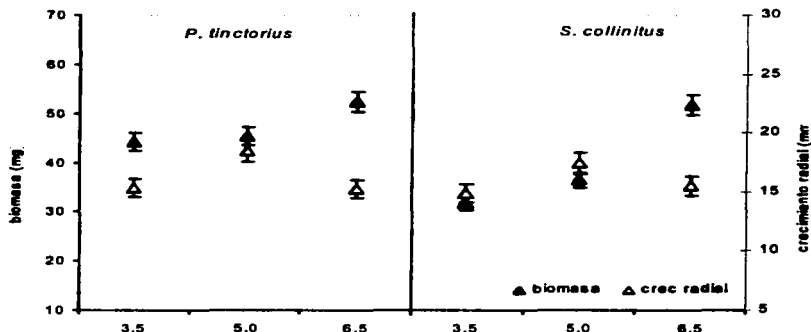


Figura 4-15: Resultados de biomasa (mg) y crecimiento radial (mm) de colonias de *P. tinctorius* F-26 y *S. collinitus* S-24 cultivadas durante 20 días en cajas de Petri de 60 mm con 10 mL de medio PDA inoculadas con inóculos miceliales de tres tamaños (3.5, 5.0 y 6.5 mm).

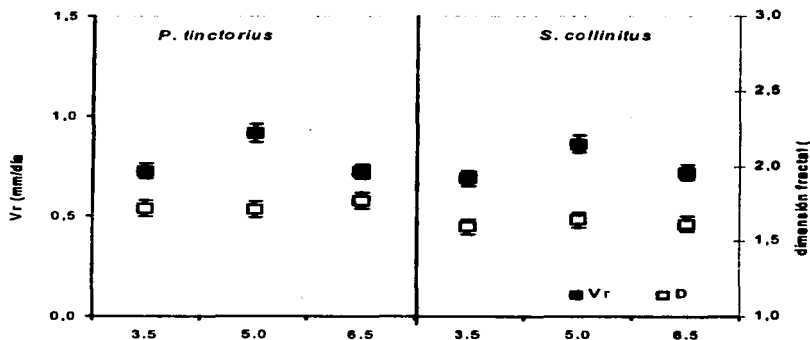


Figura 4-16: Efecto del tamaño del inóculo micelial en la Vr y dimensión fractal de colonias de *P. tinctorius* y *S. collinitus* cultivadas en cajas de Petri con PDA.

Resultados

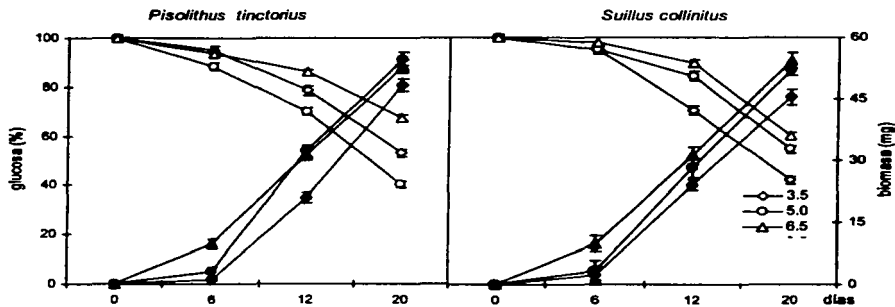


Figura 4-17: Efecto del tamaño del inóculo: 3.5, 5.0 y 6.5 mm en la producción de biomasa (símbolos llenos) y consumo de glucosa (símbolos vacíos) de *P. tinctorius* F-26 y *S. collinitus* S-24. Los resultados son valores promedio de tres réplicas.

Con relación al consumo de glucosa, se observó que después de 12 días y hasta el final del periodo de incubación si hubo efecto significativo de los inóculos en las dos cepas notándose un consumo significativamente mayor ($p < 0.05$) en los cultivos inoculados con discos miceliales de 3.5 y 6.5 mm, tal como se observa en las cinéticas de producción de biomasa y consumo de glucosa de la Figura 4-17.

4.5.5. Efecto de la densidad de inoculación

En la Tabla 4-2 se observan los resultados de crecimiento de las colonias de *S. collinitus* S-24 obtenidas al inocular cajas de Petri de dos tamaños (60 y 90 mm) con 1 o 3 inóculos de 5 mm. Por pruebas de ANDEVA y pruebas de intervalo múltiple de Duncan, se encontró que si hubo efecto significativo ($p < 0.05$) del tamaño de la caja y número de inoculantes sobre la cantidad de biomasa, glucosa consumida, diámetro colonial y rendimiento de *S. collinitus*.

Tabla 4-2: Crecimiento de *Suillus collinitus* S-24 en cajas de Petri de 60 y 90 mm con 10 mL y 25 mL de medio PDA inoculadas con 1 y 3 discos miceliales de 5 mm.

Tratamientos	Diámetro colonial (mm)	Consumo Glucosa (%)	Biomasa		pH final
			mg/colonia	(g/L de medio)	
Caja 90-1	43,0 ^a	15,32 ^a	59,14 ^b	2,90 ^a	4,8
Caja 90-3	33,5 ^b	32,76 ^b	62,71 ^b	9,45 ^c	3,5
Caja 60-1	33,0 ^b	41,21 ^c	53,19 ^a	5,32 ^b	3,8

Las cajas de 90 mm con tres inóculos en comparación con las cajas (de 60 y 90 mm) inoculadas con una sola colonia presentaron una reducción significativa ($p < 0.05$) en el diámetro de las colonias.

Hubo un mayor consumo de glucosa (41.2%) en los cultivos de cajas pequeñas que en los de las cajas grandes (15.32%), notándose además en las primeras una gran producción de exudados sobre el micelio. Analizando la producción de biomasa de *S. collinitus* se observó que en los cultivos de cajas de 90 mm inoculadas con 1 o 3 inoculantes no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) pero sí hubo con relación a la biomasa obtenida en las cajas pequeñas. Se puede observar que el sistema más eficiente en producción de biomasa es el de cajas de 90 mm con tres inóculos.

También se observaron cambios en la morfología de las colonias, ya que las inoculadas en un solo sitio fueron más algodonosas, con un crecimiento aéreo mayor y de bordes regulares, mientras que en las que se inocularon con tres tuvieron bordes más irregulares y fueron menos algodonosas.

4.6. Fisiología del crecimiento micelial en agar

4.6.1. Efecto de la concentración de glucosa

En los cultivos de siete cepas inoculadas en medio de base BAF con diferentes concentraciones de glucosa (0, 1, 10, 20, 30 y 50 g/L) durante 30 días se observó que todas las cepas tuvieron un crecimiento radial y biomasa en los medios sin glucosa, y que las de *Pisolithus* alcanzaron mayor diámetro y biomasa que las de *Suillus*. En las cepas de *Pisolithus* se observó una mayor respuesta significativa en el crecimiento radial y la biomasa al agregarse 1.0 g/L de glucosa en el medio de cultivo y a concentraciones mayores la respuesta entre las cepas fue variable, como se presenta en la Figura 4-18.

En pruebas de ANDEVA de una vía ($p < 0.05$) y de rango múltiple de Tukey, se encontró que hubo diferencias significativas entre las cepas cultivadas con diferentes concentraciones de glucosa. En las cepas de *Pisolithus* P-3 y P-5 no hubo diferencias significativas en el crecimiento radial en 10-50 g/L de glucosa, pero si hubo diferencias en la biomasa, principalmente a concentraciones de 30-50 g/L.

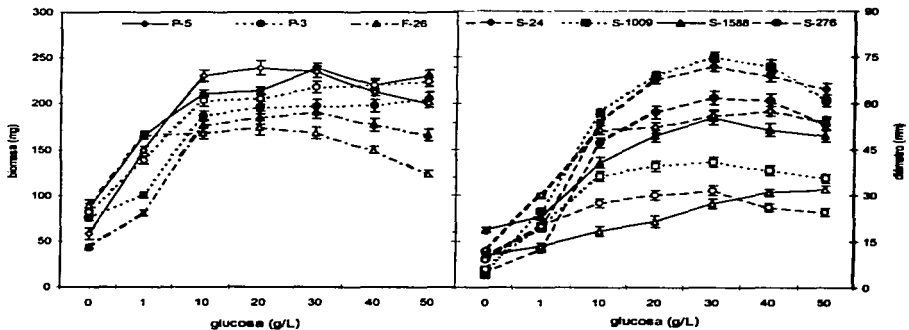


Figura 4-18: Efecto de la concentración de glucosa del medio de cultivo BAF en la producción de biomasa y diámetro de las colonias de *Pisolithus* (P-5, P-3 y F-26) y *Suillus* (S-24, S-1009, S-1588 y S-276). Los símbolos vacíos representan el diámetro colonial y los llenos la biomasa.

En la cepa de *P. tinctorius* F-26 se observó un efecto significativamente ($p < 0.05$) negativo de las concentraciones mayores de 30 g/L tanto en el crecimiento radial como en la biomasa.

En las cepas de *S. tomentosus* S-276 y S-1009 y *S. collinitus* S-24 no hubo efecto significativo en el crecimiento radial de las colonias a concentraciones mayores de 10 g/L, mientras que en *S. glandulosipes* S-1588 hubo un crecimiento significativamente ($p < 0.05$) mayor a concentraciones mayores de 20 g/L. En la biomasa de estas cepas, se observó un aumento significativo en un intervalo de 20-40 g/L y se disminuyó considerablemente en medios con 50 g/L.

En la Figura 4-19 observa que la concentración de glucosa en el medio de cultivo también modifica en forma importante la Vr de crecimiento de las cepas. En las cepas de *Pisolithus* P-3 y P-5 se incrementó significativamente ($p < 0.05$) al aumentarse el contenido de glucosa de 1.0 a 10 g/L sin manifestarse cambios importantes a concentraciones mayores. Sin embargo en las cepas F-26 también se redujo significativamente su Vr a concentraciones mayores de 30 g/L.

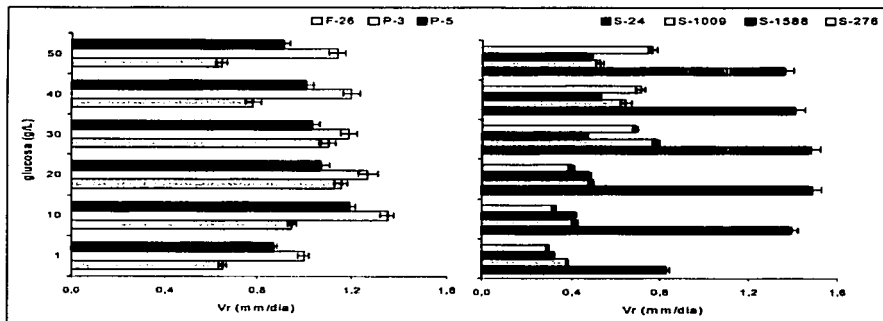


Figura 4-19: Efecto de la concentración de glucosa del medio de cultivo sobre la velocidad de crecimiento radial (Vr) micelial de *Pisolithus* (F-26, P-3, P-5) y *Suillus* (S-24, S-1009, S-1588, S-276).

En las cepas de *S. tomentosus* S-1009 y S-276 se observó la mayor Vr con 30 g/L de glucosa por esta disminuyó significativamente en la primera al aumentarse la concentración de glucosa. En *S. collinitus* S-24 y *S. glandulosipes* S-1588 no hubo efecto significativo en la Vr a concentraciones mayores de 20 g/L.

En la Figura 4-20 se presenta el efecto de la glucosa en la dimensión fractal de las colonias en la que se observa que al aumentarse la concentración de 1 g/L a 10 g/L hay un aumento significativo de la densidad fractal de las colonias de todas las cepas y que el efecto posterior es variable notándose tres tipos de efectos al incrementarse la concentración de glucosa: cepas en las que se incrementa la densidad fractal como en *S. collinitus* S-24 y en *P. tinctorius* F-26; en las que disminuye como en las de *P. tinctorius* P-5 y *S. tomentosus* S-276 las que no hay cambios significativos sobre todo a concentraciones mayores de 30 g/L como *P. tinctorius* P-3, *S. tomentosus* S-1009 y *S. glandulosipes* S-1588.

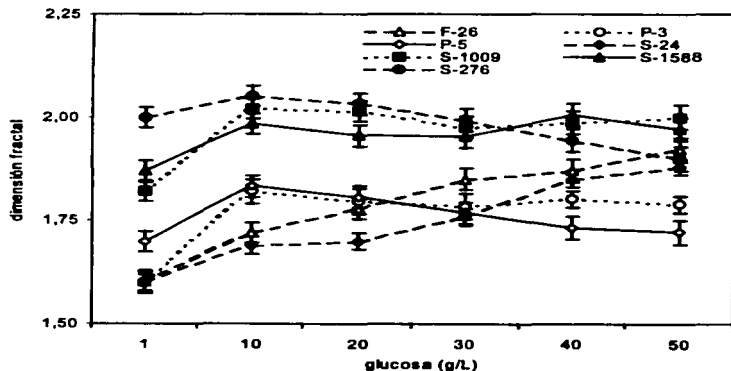


Figura 4-20: Efecto de la concentración de glucosa en medio BAF sobre la dimensión fractal de las colonias de *Suillus* (S-24, S-1009, S-1588, S-276) y *Pisolithus* (F-26, P-3, P-5).

También se observaron cambios morfológicos variables en las colonias de las especies ectomicorrízicas al modificarse la concentración de glucosa en el medio de cultivo, así por ejemplo en las colonias de *S. collinitus* S-24 se modificó la densidad del micelio siendo más algodonoso en las concentraciones de 10-20 g/L de glucosa como se observa en la Figura 4-21.

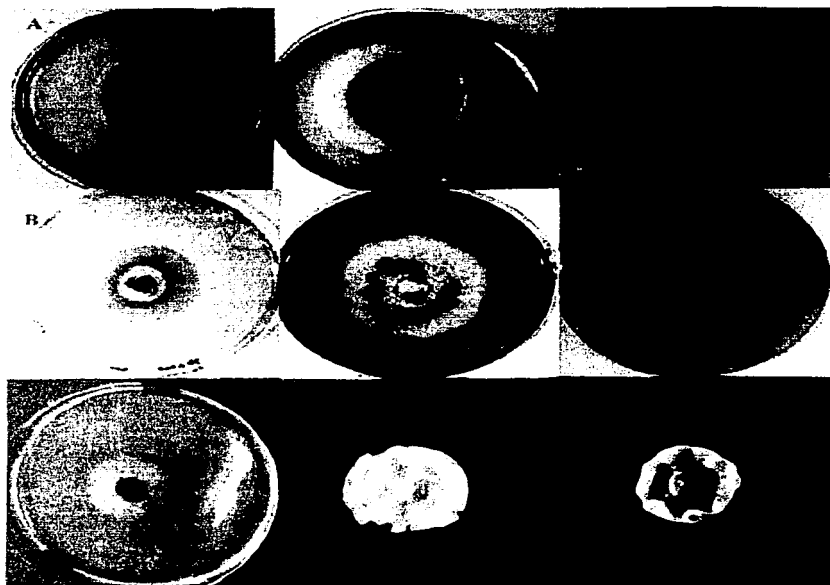


Figura 4-21: Morfología colonial de HEM en medio de cultivo BAF con tres concentraciones de glucosa (1.0, 10 y 30 g/L). A. *Suillus collinitus* B. *Suillus tomentosus* S-1009; C. *Suillus tomentosus* S-276.

Resultados

En la cepas de *S. tomentosus* S-276y S-1009 las colonias fueron muy algodonosas en concentraciones de 1-20 g/L de glucosa, pero a niveles mayores el micelio fue más aterciopelado, con micelio aéreo reducido y con mayor cantidad de pigmentos a 10 g/L de glucosa, para disminuir a concentraciones mayores de 20 g/L y también las colonia presentaron bordes más irregulares y de forma radiada en concentraciones altas de glucosa

También la cepa de *S. glandulosipes* S-1588, con micelio aterciopelado presentó cambios en la elevación de las colonias notándose un fácil desprendimiento del celofán en las concentraciones mayores de glucosa.

En la Figura 4-22, se observa que las colonias de *P. tinctorius* P-5, también fueron más algodonosa en medios con 10-20 g/L de glucosa; notándose una mayor cantidad de hifas aéreas a mayores concentraciones de glucosa así como una mayor cantidad de exudados de color café con pigmentación de las colonias y del medio de cultivo. Finalmente en *P. tinctorius* F-26 el micelio fue muy algodonosa a concentraciones menores de 10 g/L y en concentraciones mayores fue de crecimiento aéreo muy reducido, con una gran producción de pigmento amarillo claro.

En el caso de las dos cepas de *Lactarius* el micelio laxo pegado al medio fue muy similar en los diferentes medios, aunque a concentraciones menores de 30 g/L las colonias fueron radiadas con bordes irregulares en la cepa D-47.

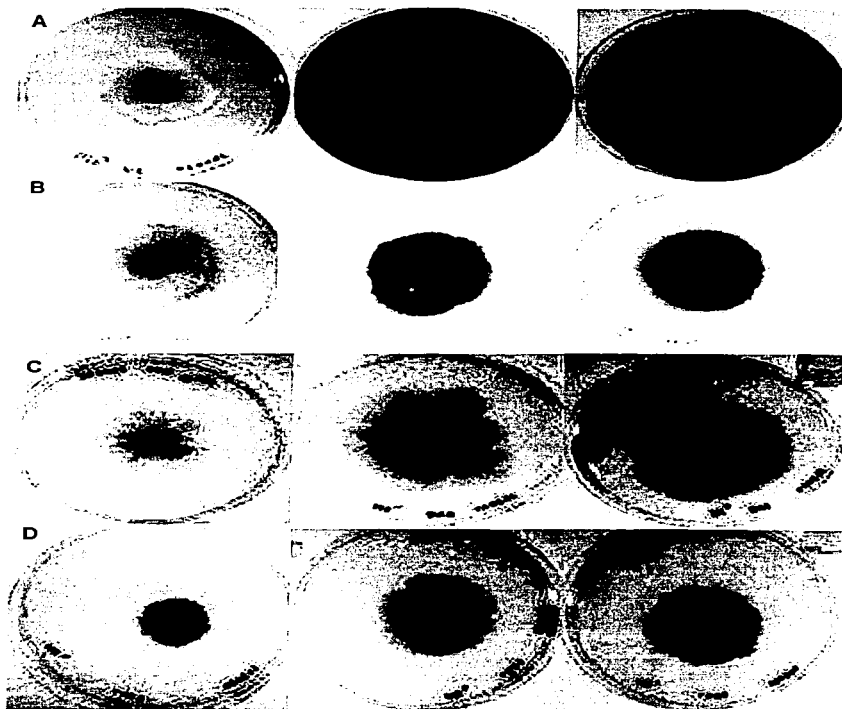


Figura 4-22: Morfología colonial de HEM en medio de cultivo BAF con tres concentraciones de glucosa (1.0, 10 y 30 g/L). A. *Pisolithus tinctorius* P-5 B. *Pisolithus tinctorius* F-26; C. *Lactarius deliciosus* D-47 D... *Lactarius sanguifluus* S-29.

4.6.2. Efecto de la fuente de nitrógeno

En esta parte experimental se hizo un estudio de crecimiento comparativo de siete cepas de HEM en medio BAF con tres niveles de glucosa (1, 10 y 30 g/L) y dos tipos de fuente nitrogenada: Orgánica (peptona) e Inorgánicas (sulfato de amonio y nitrato de calcio).

Las características coloniales de las cepas cultivadas en medios con peptona y sulfato de amonio fueron morfológicamente muy similares a diferencia de las obtenidas con nitrato de calcio. En las Figuras 4-23y 4-24, se muestran las características coloniales de algunas cepas de *Suillus*, *Pisolithus* y *Lactarius*. Es importante el efecto de la glucosa en la textura del micelio en *S. collinitus* S-24, donde el carácter algodonoso y color crema de las colonias obtenido en medios con peptona y sulfato de amonio se pierde y el micelio es hace pegado al medio y de color café con nitrato de calcio; en esta cepa también se hubo cambios en la producción de aromas y pigmentos, siendo claros y de aroma dulce en medios con peptona a color café oscuro y de aroma *sui generis* a hongo en medios con nitrato de calcio.

En *P. tinctorius* P-5 y F-26 y *S. tomentosus* S-276 también hubo efectos en la producción de pigmentos en el medio y de exudados en el centro de las colonias al aumentarse las concentraciones de glucosa en el medio de cultivo.

En las cepas de *S. tomentosus* S-24 y S-1009 las colonias mostraron un crecimiento micelial heterogéneo desde el centro de la colonia a la periferia, observándose zonas de color y textura diferente del micelio, siendo más algodonosas en el centro y de color más claro en la S-1009 o más oscuras en la S-276. Inclusive en la cepa S-276 se observaba diferente tipo de micelio con carácter algodonoso distinto dentro de la misma zona de la colonia.

En *Lactarius* no hubo cambios en la textura del micelio por efecto de la concentración de glucosa y de la fuente nitrogenada, pero si hubo cambios en los pigmentos amarillos que se concentraban en el centro de las colonias al incrementarse la concentración de glucosa, independientemente de la fuente nitrogenada.

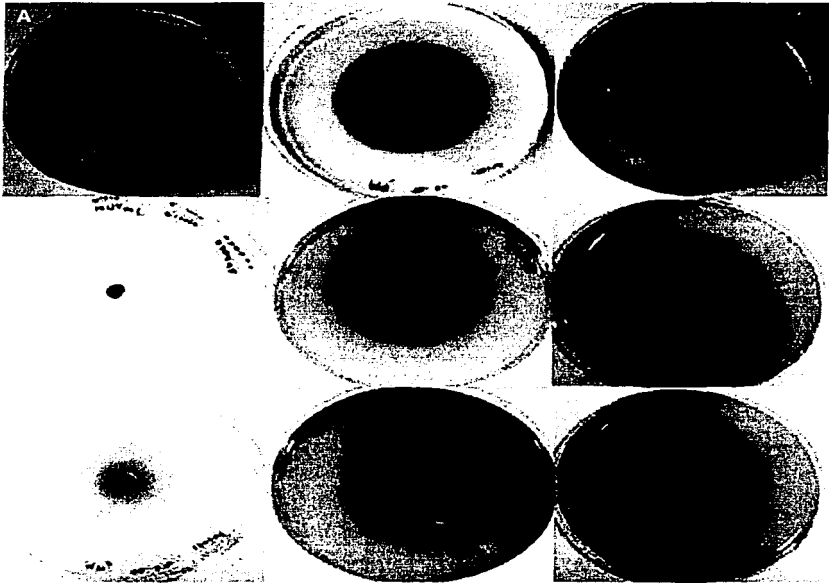


Figura 4-23: Morfología colonial de HEM en medios de cultivo BAF con tres concentraciones de glucosa (1, 10 y 30 g/L) y nitrato de calcio (2.0 g/L). A. *Suillus collinitus* S-24 B. *Suillus tomentosus* S-1009 C. *Suillus tomentosus* S-276.

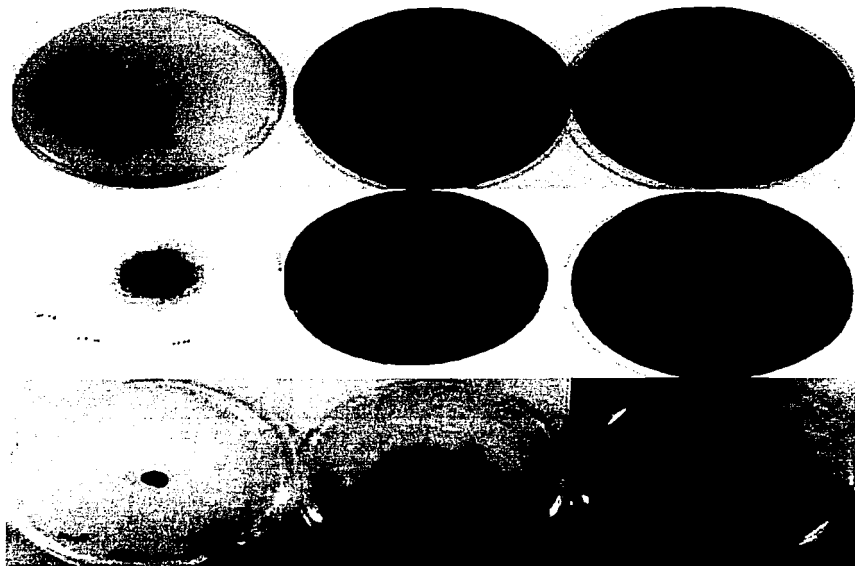


Figura 4-24: Morfología colonial de HEM en medios de cultivo BAF con tres concentraciones de glucosa (1, 10 y 30 g/L) y nitrato de calcio A. *Pisolithus tinctorius* P-5 B. *Pisolithus tinctorius* F-26; C. *Lactarius sanguifluus* S-29.

En la Figura 4-25 se presentan los resultados de diámetro colonial y biomasa obtenidos al final del periodo de incubación en los medios con 30 g/L de glucosa y las tres fuentes de nitrógeno. En la gráfica se observa que con peptona se incrementó significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento radial y la biomasa de *S. tomentosus* S-1009, *S. collinitus* S-24 y *L. sanguifluus* S-29 con relación al sulfato de amonio y nitrato de calcio en el medio.

En *P. tinctorius* P-5 y *S. tomentosus* S-276 no hubo efecto significativo entre la peptona y sulfato de amonio sobre el crecimiento radial pero si en la biomasa. Finalmente en *L. deliciosus* D-47 y *P. tinctorius* F-26 el nitrato de calcio y el sulfato de amonio favorecieron significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento radial de estas, aunque no se observó lo mismo en la biomasa.

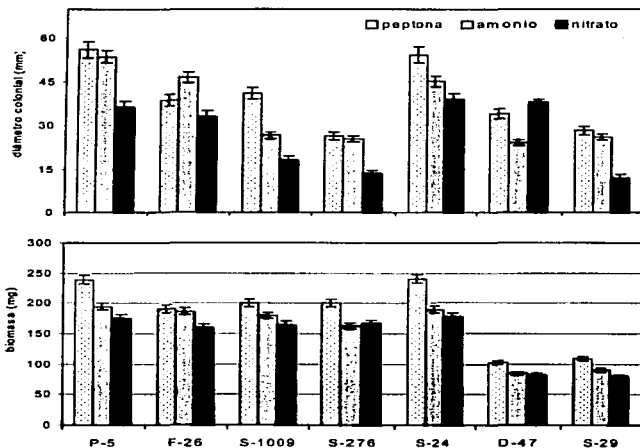


Figura 4-25: Diámetro y biomasa de colonias de: *Lactarius* (D-47 y S-29) *Pisolithus* (P-5 y F-26) y *Suillus* (S-24, S-1009 y S-276) en cajas de Petri de 90 mm con 25 mL de medio BAF con tres fuentes de nitrógeno (peptona, sulfato de amonio y nitrato de calcio).

Entre las especie de *Pisolithus* la fuente de nitrógeno también tuvo un efecto significativo en el crecimiento, siendo la peptona y 10 g/L de glucosa las condiciones que favorecieron su crecimiento. Las concentraciones mayores de glucosa no tuvieron efecto significativo en el crecimiento de las cepas con peptona y sulfato de amonio pero si hubo disminución significativa en medios con nitrato.

En pruebas de ANDEVA de dos vías se encontró que hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) de la fuente de nitrógeno y concentración de glucosa de los medios en el crecimiento micelial y biomasa, no hubo efecto significativo ($p < 0.05$) al aumentarse la concentración de 10 a 30 g/L en *S. collinitus* y *S. tomentosus* S-276 pero si hubo un menor crecimiento en la de *S. tomentosus* S-1009 a concentraciones mayores de glucosa independientemente de la fuente de nitrógeno.

4.6.3. Efecto de la actividad de agua (a_w)

Se inocularon cepas de *P. tinctorius* P-5, *S. collinitus* S-24 y *S. tomentosus* 1009 y 276 en medios de cultivo BAF con a_w (0.98 y 0.96) ajustados con: NaCl, glicerol, sacarosa y etilenglicol.

Los cultivos se hicieron en cajas de Petri de 60 mm con 10 mL de medio, en los que se midió el crecimiento radial en forma periódica, haciendo al mismo tiempo observaciones de la zona periférica de las colonias en microscopio óptico acoplado a un monitor de computadora.

Se demostró que el cloruro de sodio y la sacarosa tuvieron un fuerte efecto inhibitorio del crecimiento de todas las cepas. Aunque el glicerol tuvo un menor efecto inhibitorio en *S. collinitus* S-24, *S. tomentosus* S-1009, y *P. tinctorius* F-26, éste fue totalmente inhibitorio del crecimiento de *S. tomentosus* S-276.

El etilenglicol como depresor de la a_w no tuvo efectos inhibitorios en el crecimiento de las cepas, lo que permitió estudiar el efecto de la actividad de agua reducida en los medios de cultivo. El crecimiento radial de las cuatro cepas fue reducido significativamente ($p < 0.05$), de 58 a 48 y 30 mm el diámetro de *P. tinctorius* y *S. collinitus* en BAF, (BAF 0.98) y (BAF 0.96) respectivamente, mientras que en las de *S. tomentosus* el diámetro de las colonias disminuyó de 30 mm en BAF a 25 y 20 mm en los medios de a_w menores.

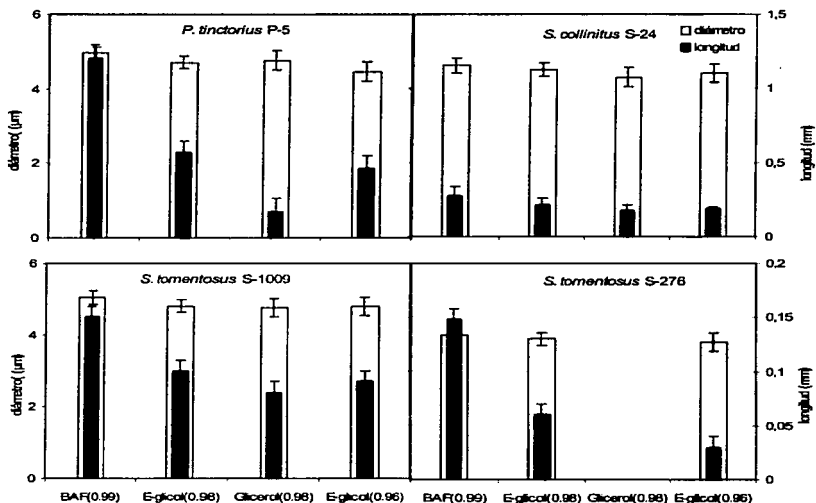


Figura 4-26: Efecto de la actividad de agua (a_w) del medio de cultivo BAF ajustado a dos valores (0.96 y 0.98) con Etilenglicol y Glicerol en comparación con cultivos BAF ($a_w = 0.99$). Se evaluaron, el diámetro y la longitud de hifas individuales de la zona periférica de colonias de cuatro cepas de HEM.

Se encontró por pruebas de ANDEVA que también hubo efecto significativo ($p < 0.05$) de los medios de a_w variable en la longitud promedio de las hifas de *P. tinctorius* y *S. tomentosus* pero no en las de *S. collinitus* S-24. En el diámetro de las hifas no se determinó efecto significativo de la a_w tal como se observa en la Figura 4-26. En estas gráficas se observa que las hifas de *P. tinctorius* P-5 fueron mayores de 1.0 mm de longitud, en *S. collinitus* midieron 300 µm y en *S. tomentosus* S-1009 y S-276 fue de 150 µm. En las cepas de *Pisolithus tinctorius* y *Suillus collinitus* también se observó una mayor ramificación del micelio en la zona periférica de las colonias.

4.6.4. Diseño factorial fraccionario para determinar el efecto de factores ambientales y nutrimentales.

En la Tabla 4-3 se observa que los resultados promedio de crecimiento radial (mm) y biomasa (mg) de las colonias de *S. collinitus* S-24 fueron mayores en el medio BAF con peptona que con sulfato de amonio o nitrato de calcio. En la Tabla 4-4, los factores de regresión promedio (b_0) demuestran que se obtuvieron valores mayores con peptona y sulfato de amonio sin diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las dos, pero con nitrato de calcio sí fueron significativamente ($p < 0.05$) diferentes.

Tabla 4-3: Análisis descriptivo de los resultados Crecimiento radial (mm) y Biomasa (mg) de *Sullus collinitus* S-24 en cajas de Petri de 90 mm con 25 mL de medio BAF agar durante 14 días.

Fuente de nitrógeno	No. de experimento	Crecimiento radial (mm)				Biomasa (mg)			
		Media	Desv. Est.	Error Est.	L.C: 95%	Media	Desv. Est.	Error Est.	L.C: 95%
Peptona	1	6,67	0,41	0,11	6,55-6,78	11,77	0,93	0,36	11,40-12,13
	2	5,67	0,52	0,14	5,52-5,81	20,30	1,01	0,40	19,90-20,70
	3	7,67	0,41	0,11	7,55-7,78	22,73	1,97	0,77	21,97-23,50
	4	9,17	0,68	0,19	8,98-9,35	36,90	2,19	0,85	36,05-37,75
	5	14,92	0,38	0,10	14,81-15,02	75,43	1,85	0,72	74,71-76,15
	6	20,58	0,80	0,22	20,36-20,80	96,93	1,12	0,43	96,50-97,37
	7	2,92	0,20	0,06	2,86-2,97	13,33	2,80	1,09	12,24-14,42
	8	13,50	0,55	0,15	13,35-13,65	12,60	1,14	0,44	12,16-13,04
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	14,67	0,52	0,14	14,52-14,81	9,87	1,16	0,45	9,42-10,32
	2	5,67	0,52	0,14	5,52-5,81	20,30	1,01	0,40	19,90-20,70
	3	7,67	0,41	0,11	7,55-7,78	22,73	1,97	0,77	21,97-23,50
	4	7,25	0,27	0,08	7,17-7,33	31,97	1,11	0,43	31,54-32,40
	5	18,33	0,75	0,21	18,13-18,54	80,27	2,02	0,79	79,48-81,05
	6	9,83	0,41	0,11	9,72-9,95	46,30	3,02	1,18	45,12-47,48
	7	2,92	0,20	0,06	2,86-2,97	13,33	2,80	1,09	12,24-14,42
	8	12,17	0,26	0,07	12,10-12,24	3,73	1,18	0,46	3,27-4,19
CaNO ₃	1	7,67	0,52	0,14	7,52-7,81	9,47	0,86	0,34	9,13-9,80
	2	4,58	0,38	0,10	4,48-4,69	20,30	1,01	0,40	19,9-20,70
	3	6,67	0,41	0,11	6,55-6,78	22,73	1,97	0,77	21,97-23,50
	4	6,08	0,20	0,06	6,03-6,14	25,03	0,58	0,22	24,81-25,26
	5	10,17	0,26	0,07	10,10-10,24	37,97	2,32	0,90	37,06-38,87
	6	4,17	0,26	0,07	4,10-4,24	12,17	1,50	0,58	11,58-12,75
	7	2,92	0,20	0,06	2,86-2,97	3,33	2,80	1,09	2,24-4,42
	8	7,17	0,26	0,07	7,10-7,24	2,47	0,57	0,22	2,25-2,69

Tabla 4-4: Coeficientes de regresión y efectos estimados para cada factor probado en tres planes de experimentación con tres fuentes de nitrógeno. Se evaluaron el crecimiento radial (mm) y la biomasa (mg) por colonia de *Sullius collinitus* S-24 obtenidas en cajas de Petri de 90 mm con 25 mL medio BAF modificado después de 15 días de incubación.

Fuente de nitrógeno	Factores	Crecimiento radial (mm)		Biomasa (mg)	
		Coeficientes de regresión	Efectos estimados	Coeficientes de regresión	Efectos estimados
Peptona	A:Luz	-1,52083	-3,04167	-3,69167	-7,38333
	B:Temperatura	-4,02083	-8,04167	-15,675	-31,35
	C:pH	-0,729167	-1,45833	-0,0583333	-0,11666
	D:Glucosa	0,895833	1,79167	15,25	30,5
	E:Peptona	2,6875	5,375	19,0083	38,0167
	F:Extracto de malta	-1,47917	-2,95833	0,85	1,7
	G:L-asparagina	0,8125	1,625	7,96667	15,9333
	b_{0-} Error estándar	10,31 ±0,097	±0,195434	±0,356171	±0,712342
(NH ₄) ₂ SO ₄	A:Luz	1,79167	3,58333	4,725	9,45
	B:Temperatura	-2,20833	-4,41667	-9,7	-19,4
	C:pH	-1,125	-2,25	-5,508	-11,0167
	D:Glucosa	-0,666667	-1,33333	11,483	22,9667
	E:Peptona	2,79167	5,58333	13,5333	27,0667
	F:Extracto de malta	-0,666667	-1,33333	8,50833	17,0167
	G:L-asparagina	-2,33333	-4,66667	1,75833	3,51667
	b_{0-} Error estándar	9,75 ±0,0806872	±0,161374	±0,394295	±0,788591
CaNO ₃	A:Luz	1,14583	2,29167	5,88833	11,6167
	B:Temperatura	-0,8125	-1,625	-2,025	-4,05
	C:pH	-0,854167	-1,70833	-4,63333	-9,26667
	D:Glucosa	-0,729167	-1,45833	1,88333	3,76667
	E:Peptona	0,9375	1,875	4,35	8,7
	F:Extracto de malta	0,229167	0,458333	5,70833	11,4167
	G:L-asparagina	-0,854167	-1,70833	3,25	6,5
	b_{0-} Error estándar	6,22917 0,0625	0,125	16,8083 0,291041	0,582082

*El error estándar se calculó con el error total y 16 g.l.

En la Tabla 4-4 se muestran los factores de regresión y los efectos estimados para cada factor calculados en el programa Statgraphics plus versión 5.0. Se observa que los factores probados tuvieron efectos positivos o negativos sobre el crecimiento radial y biomasa de *S. collinitus* en forma diferencial dependiendo de la fuente nitrogenada.

En los cultivos con peptona casi todos los factores probados (excepto el extracto de malta) tuvieron efectos semejantes en el crecimiento radial y en la producción de biomasa; siendo los factores ambientales (luz, temperatura y pH) los que tuvieron mayores efectos significativamente ($p < 0.05$) negativos. Hubo una respuesta positiva a los factores nutrimentales sobre todo por la L-asparagina. El extracto de malta afectó el crecimiento radial pero no tuvo importancia en la producción de biomasa.

Con sulfato de amonio, se observó un efecto significativamente ($p < 0.05$) inhibitorio del crecimiento radial y producción de biomasa en los cultivos incubados a 30 °C y pH de 7.0. Sin embargo, hubo diferencias en la respuestas por la glucosa, extracto de malta y L-asparagina, en los que se observó un cambio en la producción de biomasa pero una reducción en el crecimiento radial, es decir se modificó la densidad del micelio.

En los medios con nitrato de calcio y sulfato de amonio se observaron efectos significativamente ($p < 0.05$) positivos de la luz a diferencia de los cultivos con peptona en los este factor tuvo efectos negativos. En las Figuras 4-27 y 4-28 se presentan gráficas de los efectos principales obtenidos en el Programa Statgraphics plus versión 5.0, en las que los valores de crecimiento radial y biomasa fueron estimados como una función de cada factor, comparando cada uno en su mayor valor en el nivel (-) y (+) considerando los demás factores como constantes en su valor central.

En estas gráficas se observa que los efectos de cada factor se representan por líneas de diferente magnitud y pendiente, que demuestran el nivel de importancia y el efecto (+) o (-) de cada factor. También se puede observar que la mayoría de los factores tuvieron efectos significativos en el crecimiento radial y la biomasa de *Suillus collinitus* a excepción del extracto de malta y pH que solamente mostraron efectos significativos en el crecimiento radial pero no en la biomasa.

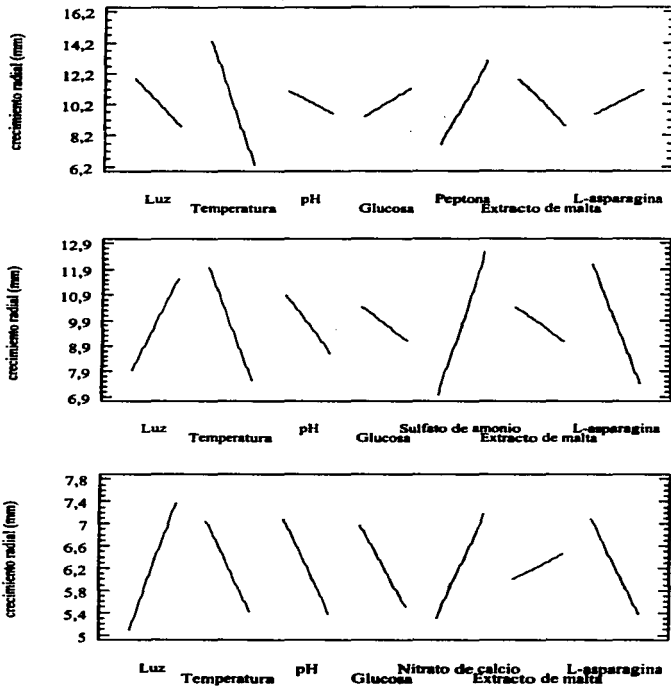


Figura 4-27: Efecto combinado de factores ambientales y nutrimentales en el crecimiento radial de colonias de *S. collinitus* S-24 cultivadas en medio BAF modificado con tres fuentes de nitrógeno. La pendiente de la línea representa si el efecto es + o - en cada factor.

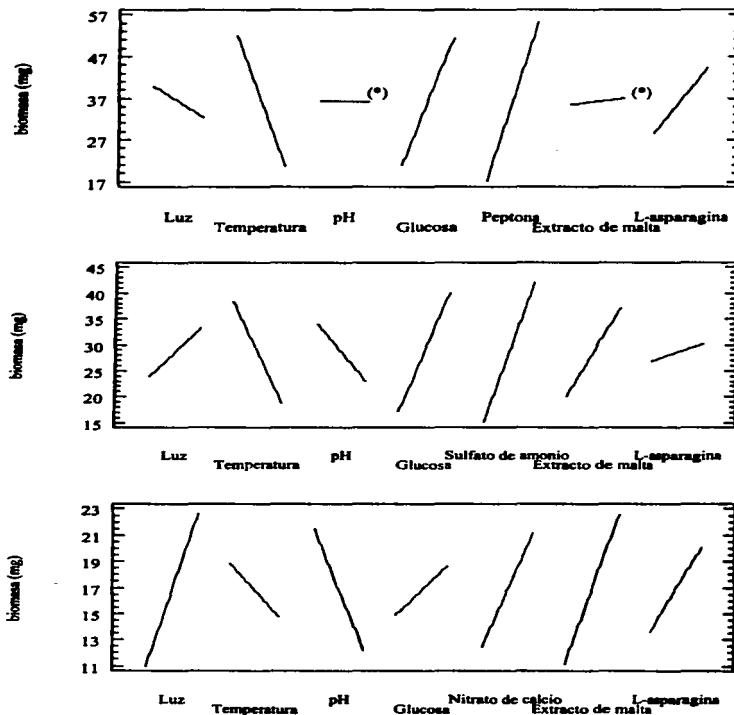


Figura 4-28: Efecto combinado de factores ambientales y nutrimentales en la biomasa de colonias de *S. collinitus* S-24 cultivadas en medio BAF modificado con tres fuentes de nitrógeno. La pendiente de la línea se expresa el efecto + o - de cada factor. (*) Son factores que no tuvieron efecto significativo en el crecimiento radial con 95% de confiabilidad.

4.7. Fisiología del crecimiento micelial en soporte sólido

4.7.1. Selección del tamaño de partícula de bagazo de caña y ajuste de humedad

Los cultivos de *Sullius collinitus* en las dos fracciones de bagazo de caña presentaron un crecimiento radial superficial menor a los obtenidos en medios con agar, sobre todo con la fracción menor (<0.3 mm), sin embargo se observó un crecimiento micelial aéreo muy importante y una limitada penetración del soporte.

Con bagazo de caña de mayor tamaño (0.3-0.8 mm), el diámetro de las colonias fue mayor, sin alcanzar los valores en agar. También se observó una importante penetración del micelio al interior del mismo sobre todo en condiciones de 90% de humedad del soporte. En niveles más bajos de humedad el crecimiento se redujo drásticamente.

4.7.2. Diseño factorial fraccionario para determinar el efecto de factores ambientales y nutrimentales

En la Tabla 4-5 se observa que los resultados promedio de crecimiento radial (mm) de las colonias de *S. collinitus* S-24 fueron mayores en vermiculita turba que en bagazo de caña. El diámetro colonial de las colonias en vermiculita-turba fue muy similar al obtenido en agar, mientras que en el bagazo de caña el diámetro correspondió a un 40% aproximadamente del de colonias en la vermiculita-turba.

En la Tabla 4-6, los factores de regresión promedio (b_0) demuestran que se obtuvieron valores significativamente ($p < 0.05$) mayores con peptona y sulfato de amonio que con nitrato de calcio. Se observa que los factores probados tuvieron efectos positivos o negativos sobre el crecimiento radial de *S. collinitus* en forma diferencial dependiendo de la fuente nitrogenada.

En los cultivos con peptona casi todos los factores probados (excepto la peptona y temperatura) tuvieron efectos semejantes en bagazo de caña y en vermiculita-turba; la glucosa, el pH y la asparagina tuvieron los efectos positivos significativamente ($p < 0.05$) mayores mientras que con la luz y el extracto de malta fueron negativos. La peptona en los cultivos con vermiculita-turba no tuvo efecto significativo en el crecimiento.

Tabla 4-5: Análisis descriptivo de los resultados del crecimiento radial (mm) de colonias de *S. collinitus* cultivadas en cajas de Petri con bagazo de caña y vermiculita-turba como soportes impregnados.

Fuente de nitrógeno	No. de experimento	Bagazo de caña				Vermiculita-turba			
		Media	Desv. Est.	Error Est.	L.C: 95%	Media	Desv. Est.	Error Est.	L.C: 95%
Peptone	1	3,50	0,55	0,15	3,35-3,65	4,17	0,41	0,11	4,05-4,28
	2	2,83	0,41	0,11	2,72-2,95	7,25	0,27	0,08	7,17-7,33
	3	2,50	0,55	0,15	2,35-2,65	2,33	0,52	0,14	2,19-2,48
	4	3,83	0,41	0,11	3,72-3,95	2,50	0,55	0,15	2,35-2,65
	5	5,50	0,55	0,15	5,35-5,65	3,50	0,55	0,15	3,35-3,65
	6	9,75	0,42	0,12	9,63-9,87	9,58	0,38	0,10	9,48-9,69
	7	4,33	0,52	0,14	4,19-4,48	8,25	0,42	0,12	8,13-8,37
	8	2,50	0,55	0,15	2,35-2,65	2,92	0,20	0,06	2,86-2,97
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	2,83	0,26	0,07	2,76-2,90	11,75	0,88	0,24	11,51-11,99
	2	2,83	0,41	0,11	2,72-2,95	7,25	0,27	0,08	7,17-7,33
	3	2,50	0,55	0,15	2,35-2,65	2,33	0,52	0,14	2,19-2,48
	4	2,67	0,52	0,14	2,52-2,81	6,17	0,26	0,07	6,10-6,24
	5	3,33	0,52	0,14	3,19-3,48	11,67	0,93	0,26	11,41-11,92
	6	7,58	0,66	0,18	7,40-7,77	12,25	0,27	0,08	12,17-12,33
	7	4,33	0,52	0,14	4,19-4,48	8,25	0,42	0,12	8,13-8,37
	8	2,50	0,55	0,15	2,35-2,65	2,92	0,20	0,06	2,86-2,97
CaNO ₃	1	2,17	0,26	0,07	2,10-2,24	4,50	0,55	0,15	4,35-4,65
	2	2,83	0,41	0,11	2,72-2,95	2,83	0,41	0,11	2,72-2,95
	3	2,50	0,55	0,15	2,35-2,65	2,50	0,55	0,15	2,35-2,65
	4	1,83	0,26	0,07	1,76-1,90	2,33	0,52	0,14	2,19-2,48
	5	2,67	0,41	0,11	2,55-2,78	12,17	0,26	0,07	12,10-12,24
	6	2,33	0,52	0,14	2,19-2,48	5,75	0,42	0,12	5,63-5,87
	7	4,33	0,52	0,14	4,19-4,48	4,33	0,52	0,14	4,19-4,87
	8	2,50	0,55	0,15	2,35-2,65	2,50	0,55	0,15	2,35-2,65

Con sulfato de amonio, se observó un efecto significativamente ($p < 0.05$) positivo de esta fuente nitrogenada en el crecimiento radial de *S. collinitus*. Con respecto a los factores ambientales, el pH de 7.0 tuvo efectos positivos similares en los dos soportes pero hubo un efecto opuesto de la temperatura y la luz, en el bagazo de caña el crecimiento fue mejor en los cultivos incubados a temperatura baja y sin luz, mientras que en vermiculita-turba el mejor crecimiento radial se observó con las condiciones opuestas.

En los medios con nitrato de calcio se observó el efecto significativamente ($p < 0.05$) positivo del extracto de malta, que en todos los sistemas descritos hasta ahora siempre se observó con efectos negativos.

Tabla 4-6: Coeficientes de regresión y efectos estimados para cada factor probado en tres planes de experimentación con tres fuentes de nitrógeno. Se evaluó el crecimiento radial (mm) de las colonias de *Suillus collinitus* S-24 cultivadas en cajas de Petri de 90 mm con bagazo de caña y vermiculita-turba impregnados con medio BAF modificado.

Fuente de nitrógeno	Factores	Bagazo de caña		Vermiculita-turba	
		Coeficientes de regresión	Efectos estimados	Coeficientes de regresión	Efectos estimados
Peptona	A:Luz	-0,760417	-1,52083	-0,75	-1,5
	B:Temperatura	-0,71875	-1,4375	0,479167	0,958333
	C:pH	0,677083	1,35417	1,02083	2,04167
	D:Glucosa	1,26042	2,52083	2,08333	4,16667
	E:Peptona	1,30208	2,60417	-0,125	-0,25
	F:Extracto de malta	-0,302083	-0,604167	-0,916667	-1,83333
	G:L-asparagina	0,385417	0,770833	0,354167	0,708333
	b_0	4,3437563		5,0625	
	*Error estándar	± 0,07171	± 0,195434	± 0,0618017	± 0,123603
(NH ₄) ₂ SO ₄	A:Luz	-0,697917	-1,39583	0,427083	0,854167
	B:Temperatura	-0,40625	-0,8125	0,53125	1,0625
	C:pH	0,739583	1,47917	0,822917	1,64583
	D:Glucosa	0,947917	1,89583	2,03125	4,0625
	E:Peptona	0,53125	1,0625	2,63542	5,27083
	F:Extracto de malta	-0,364583	-0,729167	-0,71875	-1,4375
	G:L-asparagina	0,322917	0,645833	-0,822917	-1,64583
	b_0	3,572925		7,82292	
	Error estándar	± 0,073509	± 0,147019	± 0,0780903	± 0,156181
CaNO ₃	A:Luz	-0,104167	-0,208333	0,885417	1,77083
	B:Temperatura	0,145833	0,291667	-1,11458	-2,22917
	C:pH	0,1875	0,375	-0,34375	-0,6875
	D:Glucosa	0,395833	0,791667	1,65625	3,3125
	E:Peptona	-0,395833	-0,791667	1,57292	3,14583
	F:Extracto de malta	0,1875	0,375	0,71875	1,4375
	G:L-asparagina	-0,270833	-0,541667	-1,26042	-2,52083
	b_0	2,64583		4,61458	
	Error estándar	± 0,0645497	± 0,129099	± 0,0692532	± 0,138506

*El error estándar se calculó con el error total y 40 g.l.

En las Figuras 4-29 y 4-30 se presentan gráficas de los efectos principales obtenidos en el Programa Statgraphics plus versión 5.0, en las que los valores de crecimiento radial se estimaron como una función de cada factor, comparando cada uno en su mayor valor en el nivel (-) y (+) con los demás factores como constantes en su valor central.

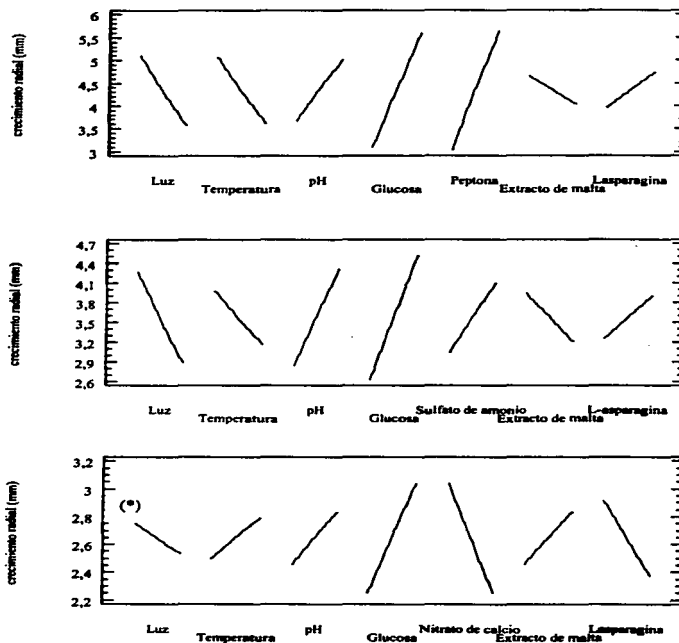


Figura 4-29: Efecto combinado de factores ambientales y nutrimentales en el crecimiento radial de colonias de *S. collinitus* S-24 cultivadas en bagazo de caña como soporte sólido impregnado con medio BAF modificado con tres fuentes de nitrógeno. La pendiente de las líneas representa si el efecto es + o - en cada factor.

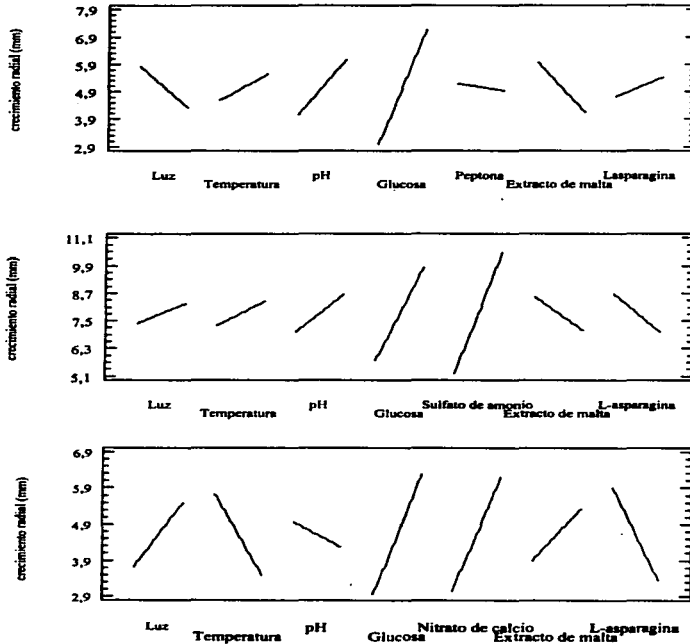


Figura 4-30: Efecto combinado de factores ambientales y nutrimentales en el crecimiento radial de colonias de *S. collinitus* S-24 cultivadas en vermiculita-turba como soporte sólido impregnado con medio BAF modificado con tres fuentes de nitrógeno. La pendiente de la línea representa si el efecto es + o - en cada factor.

En estas gráficas se observa que los efectos de cada factor se representan por líneas de diferente magnitud y pendiente, que demuestran el nivel de importancia y el efecto (+) o (-) de cada factor. También se puede observar que la mayoría de los factores tuvieron efectos significativos en el crecimiento radial y la biomasa de *Suillus collinitus* a excepción del extracto de malta y pH que solamente mostraron efectos significativos en el crecimiento radial pero no en la biomasa.

En las Figuras 4-31 y 4-32 se observan las colonias de *S. collinitus* S-24 en las cajas de Petri con los dos soportes sólidos así como la observación microscópica del micelio en los soportes. Se observaron diferencias en la morfología de las colonias en ambos soportes y penetración del soporte por el micelio en forma variable.



Figura 4-31: Cultivos de *Suillus collinitus* en dos soportes sólidos impregnados con medio de cultivo BAF. A: bagazo de caña B: vermiculita-turba.

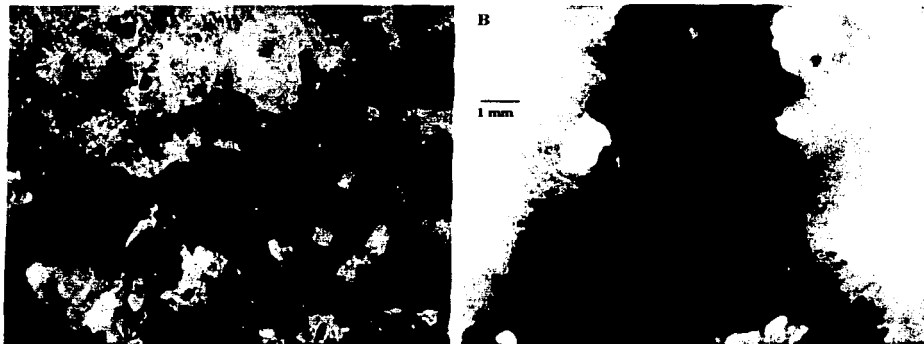


Figura 4-32: Observación microscópica del crecimiento micelial *Suillus collinitus* entre los espacios intra partículas del bagazo de caña (A) y vermiculita-turba (B).

En el bagazo de caña, el hongo colonizó en forma de micelio blanco, poco algodonoso y de baja densidad, mientras que en vermiculita-turba el micelio blanco fue muy algodonoso y con un crecimiento aéreo importante. En colonias del mismo diámetro en el bagazo de caña y vermiculita-turba, se observaron diferencias de densidad notables, con una penetración del micelio que alcanzó el fondo de las cajas de cultivo.

4.8. Conservación de las cepas

4.8.1. Resiembras periódicas en agar

La recuperación de las cepas de HEM por resiembras en medio de cultivo PDA cada tres meses fue variable entre las cepas dependiendo del medio de cultivo de conservación y del sistema de cultivo de las cepas, ya sea de frasco de cultivo inclinado o de cajas de Petri.

Entre los criterios de evaluación de los sistemas de conservación, se incluyeron: La descripción morfológica de las colonias, el crecimiento radial del micelio y la velocidad media de crecimiento (V_r) en mm/día. En general se obtuvieron mejores resultados de recuperación de la mayoría de las cepas obtenidas de cultivos en cajas de Petri que de las de frascos de cultivo inclinado. También se observó que el tiempo de inicio de la fase lineal de crecimiento de las cepas se incrementó en promedio de 6 a 8-10 días en los cultivos con mayor tiempo de conservación.

Las cepas que presentaron mayores dificultades de conservación y recuperación en estas condiciones fueron las dos de *Lactarius* D-47 y S-29 y *Suillus* S-1588, en las que después de seis meses de conservación en frascos ya no se pudieron recuperar y solamente en cajas de Petri se conservaron hasta por un año, como se observa en la Figura 4-33.

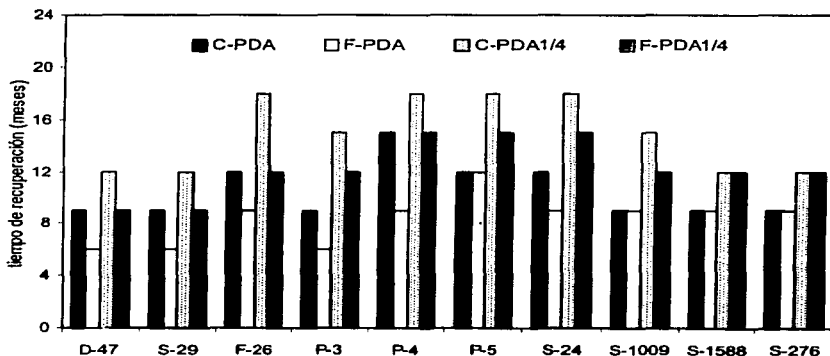


Figura 4-33: Efecto de las resiembras periódicas de cepas de HEM (*P. tinctorius* P-5, P-3, P-4 y F-26, *S. collinitus* S-24, *S. tomentosus* S-1009 y S-276 y *S. glandulosipes* S-1588) en cajas de Petri con medio PDA y PDA ¼ y en Frascos de cultivo inclinado con PDA y PDA ¼ en el tiempo de recuperación eficiente de las cepas.

Resultados

Las cepas de *Pisolithus* y *Suillus* cultivadas en PDA a concentración normal generalmente crecieron con abundante micelio y gran producción de exudados color café o pardo rojizo acumulados sobre el micelio.

En cuanto a los medios de cultivo, la recuperación fue mejor del medio PDA diluido a la cuarta parte (PDA ¼.), en los que se observó una baja densidad micelial y que no hubo cambios de color ni producción de exudados en el medio ni en el micelio.

Se observaron cambios en la morfología de las colonias de *S. tomentosus* y *S. glandulosipes* a medida que se incrementó el tiempo de conservación tanto en cajas y en frascos con medio PDA completo, siendo la colonia de bordes cada vez más irregulares, de textura más seca y ondulada.

4.8.2. En agua destilada estéril

La conservación de las cepas de HEM en agua destilada estéril, permitió la recuperación de todas las especies sin dificultad al menos por 24 meses, siendo las *P. tinctorius* F-26, P-5, *S. tomentosus* S-276 y S-1009 y *S. collinitus* S-24 las que se mantuvieron en buenas condiciones hasta después de 36 meses. En tiempo de conservación prolongados (>24 meses) al igual que en el sistema anterior se pudo observar un aumento en la duración de la fase de adaptación, es decir la fase lineal se inició después de 6 días de incubación del micelio, y posteriormente creció sin cambios en su morfología.

5. DISCUSIÓN

5.1. Descripción morfológica de HEM.

Los estudios de cultivo de hongos filamentosos sobre todo de Ascomicetos y Deuteromicetes en medio sólido han demostrado que la morfología colonial es característica de las especies, generalmente determinada por el grado de organización y diferenciación hifal (Robinson, 1978). En algunos Basidiomicetos y particularmente en HEM que se caracterizan por la ausencia de estructuras conidiales, en los que la clasificación depende tradicionalmente de los caracteres taxonómicos de los carpóforos, la caracterización morfológica no ha sido considerada como criterio taxonómico, pero sobre todo porque solo se ha estudiado en un limitado número de especies (Hutchinson, 1991).

Las cepas de estudio, pertenecientes a tres géneros (*Lactarius*, *Suillus* y *Pisolithus*), con solamente seis especies y que a su vez algunos se obtuvieron de regiones distintas, pueden explicar parcialmente la variabilidad morfológica intra e interespecífica que se observó, sobre todo entre las cepas de *Pisolithus tinctorius* obtenidas de tres países, mientras que entre las de *Suillus*, se pudieron determinar patrones de crecimiento característicos en las cepas aisladas de México similares a los reportados por Santiago-Martínez *et al.*, 1994.

Es muy importante realizar estos estudios en mayor número de especies de origen distinto tal como lo sugieren Sánchez *et al.*, 2000 para saber si hay comportamientos reproducibles en estas respuestas y de que manera pueden ser afectadas por factores ambientales, nutricionales y genéticos que se han reportado en especies saprobias (Robinson, 1978).

Entre las cepas de los géneros *Suillus* se observó mayor variabilidad en la textura micelial, sin embargo debido al limitado número de cepas pertenecientes a una misma especie disponibles sería conveniente realizar mayores estudios con un número mayor de cepas de una misma especie para poder hacer mejores aportaciones.

La producción de exudados y aromas distintos en los medios de cultivo pueden ser áreas de interés en el metabolismo de este tipo de hongos debido a que los exudados acumulados en forma de gotas en el centro de las colonias de hongos filamentosos saprobios, generalmente son considerados como subproductos del metabolismo secundario, como una reserva de nutrimentos, o como productos del rompimiento de macromoléculas cuya liberación controla una acumulación de intermediarios tóxicos del metabolismo primario en condiciones de crecimiento desbalanceado (Griffin, 1994).

Sin embargo estos metabolitos secundarios en HEM también pueden funcionar como mensajeros químicos en procesos de desarrollo y diferenciación de especies vegetales, lo que se ha estudiado en callos embrionarios de orquídeas expuestos a exudados de *Pisolithus* y *Rhizopogon* en medios de cultivo (Aquiuhatl *et al.*, 1994), o como agentes de control biológico de especies fitopatógenas de hongos (Marx, 1969; Kope & Fortin, 1990) bacterias (Cook, 1993) y nemátodos (Bloomberg & Sutherland, 1971).

5.2. Caracterización del crecimiento micelial

Los HEM en cultivos de laboratorio se propagaron a partir de fragmentos de hifas, que colonizaron el medio formando colonias generalmente circulares de morfología característica. También se observaron diferencias intra e inter específicas importantes en el proceso de colonización de los medios de cultivo como son: La duración de la fase de adaptación (fase lag), su crecimiento radial (mm) y la V_r o velocidad media de crecimiento radial (mm/día).

El parámetro más común de evaluación del crecimiento de HEM ha sido el de medir el diámetro de las colonias que corresponde al doble del radio de la colonia, si consideramos que a partir del punto de inoculación las hifas crecen en forma apical hacia la periferia de la misma. En diversos trabajos de investigación se reporta indistintamente el valor del diámetro como el crecimiento radial, situación que no afectará la interpretación de los resultados al hacer comparaciones del tamaño de las colonias unicamente, sin embargo, al considerarse el valor del diámetro o el radio de la colonia en el cálculo de los valores de la V_r si se obtendrán resultados erróneos al interpretarlos y compararlos con otros estudios.

En la Figura 4-3 se observó que el 40 % de las cepas la Vr fue significativamente ($p < 0.05$) mayor en medio BAF, en 40% no hubo efecto significativo y solamente en un 20 % la Vr fue mejor en PDA, lo que permite sugerir que la Vr de los medios de cultivo puede ser un criterio de caracterización de las cepas de HEM.

Esta variable de crecimiento representa la habilidad de colonización diferencial independientemente del tamaño que alcance la colonia debido a que es un parámetro que se determina en la fase de crecimiento lineal, es decir después de la fase de adaptación, que como observamos en el capítulo anterior también fue un factor variable entre las cepas.

Es importante mencionar que en algunos estudios (Oort, 1981; Santiago-Martínez *et al.*, 1993) la Vr también se ha reportado como la pendiente de la curva de crecimiento desde el tiempo de la inoculación, lo cual dará lugar a errores en la determinación de este parámetro por no considerarse el tiempo en que se inició el crecimiento lineal.

Por lo anterior es explicable que una misma cepa como *P. tinctorius* P-3 y F-26 tengan una Vr muy semejante en los dos medios pero con un crecimiento radial casi 40% mayor en BAF en la primera y 20% menor en la segunda (Figura 4-3).

En la mayoría de las cepas si hubo una correlación directa entre la Vr y el crecimiento radial; las cepas del primer tipo fueron de crecimiento aéreo variable entre los medios y en las del segundo tipo fueron muy algodonosas de crecimiento aéreo abundante como *S. collinitus* S-24 y *P. tinctorius* P-5 o en las que es escaso o totalmente fibroso como las de *Lactarius* y *S. glandulosipes* S-1588.

En términos generales se puede sugerir que estas diferencias en el crecimiento radial y Vr son demostrativos de las diferencias en la habilidad de adaptación y colonización de los medios de cultivo, que se complementan con las observaciones morfológicas de cada especie, que incluso podrían relacionarse con cambios en la frecuencia de ramificación y en la dirección de la puntas de crecimiento tal como se ha reportado en especies saprobas de hongos filamentosos (Molin *et al.*, 1992; Prosser, 1995).

5.3. Producción de biomasa y dimensión fractal

En la producción de biomasa de los HEM en los medios BAF y PDA se observaron diferencias entre las cepas y aunque en la mayoría de éstas no fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), fue notoria la relación que hubo entre la producción de biomasa y su crecimiento radial (Figuras 4-4 y 4-5). Las cepas de *Pisolithus* P-3, P-4, P-5; *S. collinitus* S-24 y *S. tomentosus* S-1009 presentaron una relación significativamente mayor ($p < 0.05$) en PDA que en BAF. Los valores de mayor relación biomasa/crec. radial se observaron en *Lactarius* S-29 y *S. tomentosus* S-1009 en PDA y los de menor valor se obtuvieron para *Pisolithus* P-3, P-4 y *S. collinitus* S-24 en BAF. Estas diferencias entre las cepas de estudio demuestran que hubo modificaciones en la densidad micelial muy relacionadas con la textura del micelio. Así las colonias de textura más algodonosa tuvieron densidades menores mientras que los de textura aterciopelada o pegada al medio fueron de mayor densidad.

Con la determinación de biomasa de los HEM complementaria a los otros parámetros de crecimiento (crecimiento radial, la V_r y las características morfológicas) de cada una de las cepas se puede sugerir que en el proceso de colonización de los medios de cultivo de estas especies fúngicas el micelio puede ser modificado por la composición del medio de cultivo y que ésta puede ser el resultado de la expresión de las habilidades de explorar (crecimiento radial y V_r) el medio y de explotar (síntesis de biomasa) los recursos del mismo, tal como lo han reportado Obert *et al.*, 1990 y Prosser, 1995, para especies de hongos filamentosos saprobios.

Estos mismos autores junto con Reichl *et al.*, 1990 y Ritz & Crawford, 1990 han propuesto la determinación de la dimensión fractal (D) de colonias fúngicas como parámetro útil para caracterizar la capacidad del micelio de colonizar los sustratos sólidos. Esta D característica se ha relacionado con la capacidad del micelio de colonizar o de llenar los espacios disponibles en o sobre los sustratos sólidos, por la habilidad de las hifas de explorar (hifas exploradoras) para buscar nuevas fuentes de nutrientes o con la capacidad de sintetizar la biomasa a partir de la utilización de recursos disponibles (hifas explotadoras).

Discusión

Las pruebas de t-Student ($p < 0.05$) de los valores de D, entre los medios que demostraron que en la mayoría de cepas hubo efecto del medio, a excepción de las de *Lactarius* y *S. collinitus* S-24. Al relacionar la dimensión fractal con el diámetro y la biomasa de las colonias se observó que las cepas con menor producción de biomasa y diámetro mayor como *S. collinitus* S-24 y las de *P. tictorius* P-3 y P-5 les correspondieron valores de D menores, es decir fueron de estrategia de colonización exploradora a diferencia de las que se caracterizaron por una mayor producción de biomasa en colonias de menor diámetro como en las de *S. tomentosus* S-276 y *S. glandulosipes* S-1588.

Es importante recordar que la cepa de *Suillus collinitus* S-24 se caracterizó por su micelio muy algodonoso, con abundante crecimiento aéreo, mayor crecimiento radial y Vr a diferencia de la de S-1588 que tiene micelio aterciopelado con escaso micelio aéreo, menor crecimiento radial y Vr pero con mayor producción de biomasa.

En la naturaleza, una de las funciones más importantes del micelio es la de explorar áreas de suelo que incrementen la disponibilidad de elementos esenciales para el crecimiento de la planta huésped (Trappe, 1977; Harley & Smith, 1983) de tal manera que el conocimiento de la forma en que el micelio se distribuye en el espacio y coloniza los sustratos en el laboratorio, podría ser indicativo de las estrategias de crecimiento que se manifestarán en el proceso de micorrización al introducir estas especies en el suelo, sin embargo es un área que requiere de mayores investigaciones y seguramente se favorecería una micorrización más controlada.

5.4. Sistema de cultivo en cajas de Petri con agar cubierto de celofán

En los resultados de crecimiento de los cultivos con cubierta de celofán se observó que hubo un retardo en el inicio del crecimiento lineal, que en los cultivos sin celofán es de 6 días o menos, mientras que con cubierta el crecimiento lineal se inició después de 6 días, sin embargo posteriormente se el crecimiento se normalizó y se alcanzó un diámetro y V_r similar o mayor que en los cultivos sin celofán (Figura 4-9). El retraso en la fase de adaptación del micelio de las cepas estudiadas fue por la difusión limitada de nutrimentos a través de la cubierta, y la mayor V_r en cultivos con celofán se favoreció por la limitada penetración del micelio en el medio de cultivo.

Con la cubierta de celofán se facilitó en gran medida las evaluaciones de biomasa observándose que en la mayoría de cepas fue significativamente ($p < 0.05$) mayor que la cuantificada en cultivos sin celofán y además se facilitó también el análisis de pH final y consumo de glucosa. No hubo efecto de la membrana en las cinéticas de consumo de glucosa de los dos medios de cultivo, pero sí en la biomasa. Un inconveniente del sistema con celofán es el que al separar la membrana, ésta se puso a peso constante directamente, sin hacer lavados del micelio, por lo que los exudados que también se incluyen en el peso.

La caracterización morfológica de las cepas en cultivos con celofán demostraron importantes cambios en la mayoría de las cepas a excepción de las dos de *Lactarius*, sobre todo por cambios de textura y reducción del crecimiento aéreo (Figura 4-10).

El origen y tamaño del inóculo influyó en forma significativa en la producción de biomasa pero no en el crecimiento radial de *S. collinitus*, notándose que es mejor inocular con discos miceliales de tamaño mayor a 5.0 mm obtenidos preferentemente de las zonas periférica y media de las colonias para favorecer una mayor producción de biomasa (Figura 4-15).

En las colonias de los HEM fue común observar el desarrollo de zonas diferentes en aspecto y color del micelio a partir del centro a la periferia, por lo que es posible que se establezcan zonas de diferenciación micelial con estados fisiológicamente distintos (Robinson, 1978 y Deacon, 1997).

Discusión

Con relación al tamaño del inóculo, Trinci, 1974 ha propuesto para diversas especies de hongos saprobios que hay un límite de corte en las hifas que permite conservar su viabilidad. Esta situación es particularmente interesante en los HEM, en las que frecuentemente se observa que al hacer el corte de micelio en ocasiones ocurre su desgarramiento sobre todo cuando el instrumento de corte no es adecuado causando pérdida de viabilidad importante.

Además es conveniente mencionar que con relación al tamaño del inóculo, al tomar un fragmento micelial generalmente éste contiene micelio y medio de cultivo, por lo se acostumbra colocar el micelio en contacto con el nuevo medio, sin embargo también se observó que el micelio colonizaba primero la parte superior del medio antiguo y posteriormente el nuevo, por lo que es posible que el efecto del tamaño esté confundido con este factor.

La densidad de inóculo también tuvo efectos significativos ($p < 0.05$) en el diámetro de las colonias, siendo de aproximadamente 10 mm la diferencia entre las cajas de 90 mm inoculadas con 1 o 3 colonias. La glucosa consumida, fue mayor en cajas pequeñas (41.2%) que en cajas grandes (15.32%), además en la caja de 60 mm se observó gran cantidad de exudados, lo que puede explicar esta diferencia de consumo de glucosa y el menor rendimiento. No hubo diferencia significativa en la biomasa de *S. collintus* cuando se inocularon 1 o 3 inoculantes en cajas de 90 mm pero sí en la cantidad de glucosa consumida y el diámetro de colonia. Esto puede relacionarse con cambios en la morfología de las colonias, ya que las inoculadas en un solo sitio fueron más algodonosas, con un crecimiento aéreo mayor y de bordes regulares, mientras que en las que se inocularon con tres tuvieron bordes más irregulares y fueron menos algodonosas.

El tamaño, origen y densidad de inoculación en cajas de cultivo sólido modificaron los resultados de crecimiento de los HEM, de forma variable, de aquí la importancia de normalizar previamente estas condiciones del inoculante para reducir las variaciones debidas a estos factores.



5.5. *Fisiología del crecimiento micelial en agar*

5.5.1. Efecto de la concentración de glucosa

El crecimiento de todas las cepas de HEM en el medio de cultivo sin glucosa puede explicarse por su capacidad de obtener nutrimentos carbonados a partir de otros componentes del medio como la peptona o el extracto de levadura, por la capacidad de estos hongos de utilizar aminoácidos y péptidos como fuentes de carbono y energía (Keller, 1996). Sin embargo el crecimiento fue limitado por carbono disponible, lo que se comprueba al observar el efecto de 1.0 g/L de glucosa en el medio sobre el crecimiento radial y la biomasa de los HEM, principalmente en las cepas de *Pisolithus* (Figura 4-18).

Las observaciones de que en los medios con 10-30 g/L de glucosa la mayoría de las cepas presentaron un mayor diámetro y biomasa colonial, permiten sugerir que los requerimientos de glucosa de estos HEM pueden ser menores a los que normalmente se encuentran en la mayoría de los medios recomendados y que niveles mayores pueden causar incluso una inhibición del crecimiento, lo que adquiere una gran importancia cuando se quieren aislar o propagar en grandes cantidades estos HEM.

Las observaciones de que en *P. tinctorius* F-26, P-5 y *S. tomentosus* S-1009 y S-276 no solo presentaron una V_r menor sino un incremento en la producción de subproductos del metabolismo como son los exudados y pigmentos sugieren también cambios metabólicos en algunas de las especies, no así en *S. collinitus* S-24 y *P. tinctorius* P-3 y P-4 en las que hubo una gran producción de exudados al aumentar la glucosa sin manifestar cambios significativos ($p < 0.05$) en la V_r (Figura 4-19).

Considerando que la disponibilidad de nutrimentos carbonados en el ambiente pueden aumentar o reducir el crecimiento apical y los patrones de ramificación y dirección de las hifas en el espacio (Griffin, 1994, Griffith, Deacon y Trinci), formandose micelio de comportamiento explorador (con $D < 2.0$) o explotador ($D > 2.0$), en los resultados de dimensión fractal de las cepa se observaron respuestas variables al modificarse la glucosa en el medio de cultivo.

En pruebas de ANDEVA y de intervalo múltiple de Tukey ($P < 0.05$) se determinaron tres grupos de cepas por la forma en que la glucosa en concentraciones mayores de 10 g/L influyó sobre la D:

a) *S. tomentosus* S-1009, S-276 y *S. glandulosipes* S-1588 con $D > 1.9$ y crecimiento radial bajo, de textura poco algodonosa, muy densa, que al aumentarse la concentración de glucosa formaron colonias en forma de costras muy compactas. En S-1588 la D se incrementó significativamente ($p < 0.05$) por efecto de la glucosa a diferencia de las dos restantes en las que no hubo efecto.

b) *P. tinctorius* P-3 y P-5 con $D < 1.9$, presentaron micelio muy algodonoso con tendencia a hacerse más aéreo al aumentar la cantidad de glucosa y con una disminución significativa de la D en P-5.

c) *P. tinctorius* F-26 y *S. collinitus* S-24, con $D < 1.9$ caracterizadas por micelio algodonoso que incrementa su densidad y la D a mayores concentraciones de glucosa en forma significativa.

El conocimiento de la forma en que estos HEM modifican sus características de crecimiento y su morfología colonial en respuesta a la concertación de glucosa puede ser valioso en la definición de condiciones óptimas para que se favorezca su crecimiento micelial y/o la producción de biomasa.

Hutchinson, 1990 ha sugerido que los HEM tienen sistemas de adaptación a condiciones de carencia y exceso de azúcares, debido a que estos hongos pueden encontrarse en forma libre en el suelo durante periodos variables.

Uno de los mecanismos de adaptación a tales condiciones es un adecuado control de la incorporación de los azúcares por sistemas enzimáticos susceptibles de saturación (Strullu, 1991) y la reducción en la modificación de su tasa de crecimiento hifal, disminución de la longitud de hifas así como en el equilibrio entre los procesos de exploración/explotación de los sustratos (Griffin, 1994) tal como se observó en estos estudios.

5.5.2. Efecto de la fuente de nitrógeno

Los efectos más importantes de la utilización de diferentes fuentes nitrogenadas fue la modificación morfológica de las colonias y los cambios del pH en los medios de cultivo. El micelio de las colonias cultivadas en el medio con nitratos fue muy diferente en textura, color y pigmentación a las colonias en peptona y sulfato de amonio, lo que puede explicarse por cambios metabólicos y en la actividad enzimática (se requiere la síntesis de nitrato reductasas) o como un mecanismo de adaptación que incrementa el área superficial del micelio para mejorar la captación de nutrientes, como en *Trichoderma* (Wainwright, 1988).

Estos aspectos que han sido muy poco estudiados en los cultivos de HEM (Oort, 1981; Keller, 1996; Baar *et al.*, 1997) y los que han sido reportados generalmente son en la asociación micorrizica (Gibson & Deacon, 1990) o considerando solamente los aspectos del crecimiento radial (Smith, 1982) y en algunos casos de biomasa (Anderson *et al.*, 1999), pero que también han sido muy valiosos como criterios taxonómicos en la identificación de especies ectomicorrizicas (Hutchinson, 1990; 1990a).

Los medios de cultivo con sulfato de amonio se acidificaron más que con peptona y nitratos, siendo de alrededor de 3.5 el pH final en los primeros, mientras que con peptona y nitrato de calcio el pH mínimo fue de 4.5 y 5.0 respectivamente. La importancia de estos estudios radica en que las respuestas de las cepas de HEM en cultivo axénico en el laboratorio fue muy variable (Figura 4-25), y representan las necesidades específicas de los hongos, lo cual quiere decir que no se puede utilizar un solo medio de cultivo para todas las especies, tal como lo sugieren Santiago *et al.*, 1994.

El crecimiento radial y la biomasa en peptona fueron mejores con peptona en la mayoría de las cepas, lo que se relaciona con la habilidad de estos HEM de utilizar en forma eficiente las fuentes de nitrógeno orgánica.

Hay propuestas de que esta capacidad determinada en el laboratorio puede relacionarse con su capacidad de movilizar grandes cantidades de nitrógeno hacia las plantas huésped en bosques templados, los que generalmente se caracterizan por tener grandes cantidad de nitrógeno orgánico (El-Badaoui & Botton, 1989; Abuzinadah *et al.* 1986; Wallander & Arnebrant, 1999).

Los HEM de los géneros *Pisolithus* utilizaron mejor el amonio que los nitratos en los medios de cultivo, a diferencia de las especies de *Suillus*, que utilizaron los nitratos en forma eficiente, lo que se puede relacionar con las características del hábitat y funcionalidad los HEM en los procesos de sucesión (Finlay *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1999). Keller, 1996, sugiere que la incapacidad de utilización de los nitratos se justifica porque en los bosques templados, hábitat de diversos HEM son de abundante contenido orgánico, condición que limita la nitrificación.

Yamanaca, 1999 y Keller, 1996, han propuesto que las diferencias en la utilización de fuentes nitrogenadas determinadas en laboratorio con cultivos puros de HEM pueden ser importantes marcadores ecofisiológicos de estos hongos y que estas capacidades pueden relacionarse con eventos de sucesión de poblaciones de hongos en el bosque. Así, los HEM de colonización temprana (*Laccaria*, *Hebeloma*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*) se caracterizan por la utilización preferencial de amonio sobre nitrato, mientras que en el caso de hongos de colonización tardía (*Lactarius*, *Suillus*, *Amanita*, *Cortinarius*, *Russula*) se observó el efecto contrario.

Nuevamente se observó el efecto limitante de la fuente carbonada en el crecimiento de los HEM, en los medios con 1 g/L de glucosa se puede explicar por una limitación de fuente carbonada necesaria para la asimilación del amonio en los medios con sulfato de amonio ya que se ha reportado que la actividad proteolítica y capacidad de utilización de amonio por especies ectomicorrízicas, se ve afectada por la cantidad de sustrato carbonado disponible (Abuzinadah *et al.*, 1986; Anderson *et al.*, 1999) debido a que se requieren moléculas de α ceto glutarato formados en el ciclo de Krebs para su asimilación.

También, las necesidades diferenciales de fuente carbonada de las especies de HEM en medios de cultivo se han relacionado con su participación en la colonización y micorrización, es decir si son de colonización tardía (*Lactarius*, *Amanita*, *Tricholoma*) hay una alta dependencia por las fuentes carbonadas (en el rango de 0-10 g/L de glucosa), mientras que en las de colonización temprana (*Laccaria*, *Hebeloma*) no dependen tanto de la disponibilidad de glucosa (Gibson & Deacon, 1990).

También los hongos de colonización temprana inician la colonización de la raíz generalmente por la germinación de esporas, a diferencia de las de colonización tardía que se caracterizan por la colonización a partir de redes de hifas enlazadas a una base nutritiva (Gibson & Deacon, 1990) lo que puede explicar estas diferencias de respuesta de las especies fúngicas estudiadas.

En los niveles de concentración de glucosa probados y la combinación de fuentes de nitrógeno, se comprobó que las necesidades de carbono y nitrógeno son reducidas de acuerdo con los resultados de Santiago *et al.*, 1995 en relación con la de hongos saprobios, lo que puede ser una gran ventaja sobre otros hongos, en etapas previas a la colonización micorrízica.

Sin embargo también es importante conocer las necesidades particulares de los HEM para cultivarlas en las condiciones que favorezcan su crecimiento micelial, producción de biomasa y/o conservación de sus características morfológicas, evitando el uso de medios de uso general que contengan exceso de nutrientes carbonados y nitrogenados, lo que normalmente son causa de la contaminación por especies de hongos saprobios.

5.5.3. Efecto de la actividad de agua (a_w)

Los HEM de estudio fueron sensibles a la a_w reducida en los medios de cultivo, ajustados con depresores de humedad asimilables como la sacarosa, el cloruro de sodio y el glicerol. La resistencia a niveles de a_w baja de los HEM dependió del tipo de depresor de agua utilizado, ya que el glicerol tuvo un efecto mayor en la disminución de la V_r de crecimiento en niveles de $a_w=0.98$ que el efecto observado en valores de $a_w=0.96$ ajustado con etilenglicol.

El menor efecto inhibitorio de etilenglicol coincide con los resultados de Mexal y Reid (1973) demostrando que este tipo de sustancias no presentan toxicidad para *Telephora terrestris*, *Cenococcum graniforme* y *Suillus luteus*, en condiciones de estrés de agua impuestas por la adición de sustancias que disminuyen el agua disponible.

En estudios realizados por Dixon *et al.*, 1993, se reportó que algunas especies de *Pisolithus* y *Suillus* pueden ser tolerantes al cloruro de sodio en los medios de cultivo debido a fenómenos de osmorregulación citoplásmica y compartimentalización de la acumulación de sales en vacuolas y paredes celulares.

En este estudio el cloruro de sodio tuvo un efecto altamente inhibitorio del crecimiento de *Pisolithus* y *Suillus* probablemente debido a las concentraciones que se utilizaron (4.0 y 6.0 g/L) necesarias para disminuir la a_w del medio de cultivo, pero que fue casi el doble (1.0-3.0 g/L) de las concentraciones reportadas por estos autores.

La importancia de estudiar el efecto de la actividad de agua en HEM radica en que no hay estudios suficientes que permitan definir las posibilidades de respuestas fisiológicas frente a condiciones de estrés de agua, y que tal conocimiento podría ser útil para la selección de especies de HEM específicas para micorrización de plántulas que se establecerán en condiciones áridas.

Debido a que su forma de crecimiento al igual que otras especies de hongos son las hifas, que son estructuras filamentosas, de paredes delgadas y con capacidad limitada de conservación del agua, por lo que el crecimiento vegetativo de la mayoría de los hongos requiere de condiciones de humedad adecuadas (Bartnicki-García., 1973) pero que también se han adaptado a condiciones limitadas de agua, como son las zonas semi-áridas (Mexal & Reid, 1973; Dudridge *et al.*, 1980), dándole beneficios de captación de agua a las plantas huésped.

En el sistema procesador de imágenes utilizado para evaluar el efecto de la a_w se observaron estructuras semejantes a los rizomorfos fúngicos, que son estructuras especializada del micelio para absorber y facilitar el transporte de agua a distancias ecológicamente significativas (Molin *et al.*, 1992).

El aumento en el número de ramificaciones y disminución de la longitud hifal del micelio pueden explicarse por la reorganización del material protoplásmico a lo largo de la hifa, debido a la disminución en la presión de turgencia, como uno de los mecanismos de adaptación de las hifas a condiciones reducidas de a_w tal como lo sugieren Bartnicki-García., 1973 para diferentes hongos saprobios.

Los cambios a nivel de las hifas se relacionaron directamente con la disminución en la V_r de los HEM y con modificaciones morfológicas de las colonias, que fueron más compactas y con micelio aéreo muy reducido, tal como lo reporta Caldwell, 1994, y estas características fisiológicas de los HEM pueden ser de gran importancia en su relación con la funcionalidad micorrízica (Lambhamedi *et al.*, 1992).

5.5.4. Diseño factorial fraccionario para determinar el efecto de factores ambientales y nutrimentales

Los factores estudiados afectaron de manera distinta el crecimiento radial y la producción de biomasa de *S. collinitus*. Las concentraciones mayores de glucosa y de las tres fuentes de nitrógeno favorecieron significativamente ($p < 0.05$) el crecimiento y biomasa de las colonias, hubo diferencias en las respuestas a los otros factores dependiendo de la fuente nitrogenada.

En los cultivos con peptona casi todos los factores probados (excepto el extracto de malta) tuvieron efectos semejantes en el crecimiento radial y en la producción de biomasa; siendo los factores ambientales (luz, temperatura y pH) los que tuvieron mayores efectos significativamente ($p < 0.05$) negativos. Hubo una respuesta positiva a los factores nutrimentales sobre todo por la asparagina. El extracto de malta afectó el crecimiento radial pero no tuvo importancia en la producción de biomasa.

Con sulfato de amonio, se observó un efecto significativamente ($p < 0.05$) inhibitorio del crecimiento radial y producción de biomasa en los cultivos incubados a 30 °C y pH de 7.0. Sin embargo, hubo diferencias en las respuestas por la glucosa, extracto de malta y L-asparagina, en los que se observó un cambio en la producción de biomasa pero una reducción en el crecimiento radial, es decir se modificó la densidad del micelio. Con nitrato de calcio además del efecto negativo del pH y la temperatura se observó un efecto positivo de la luz tuvo igual que con sulfato de amonio, y un notable efecto favorable de los factores nutrimentales.

Estos resultados muestran una relación directa con las observaciones realizadas en el estudio fisiológico anterior, donde se comprueba la necesidad de una cantidad suficiente de glucosa para asimilar el nitrógeno proveniente de los aminoácidos de la peptona.

Como el crecimiento micelial no se mejoró al agregar sustratos más complejos como el extracto de malta, ésto puede ser indicativo de la incapacidad de asimilar los sustratos carbonados que contiene o debido a que su demanda de nitrógeno o vitaminas fue cubierta con los componentes del medio.

Estos resultados coinciden con los de Abuzinadah *et al.* (1986), quienes reportaron una gran capacidad de especies ectomicorrízicas como *Suillus bovinus*, *Amanita muscaria* y *Hebeloma crustuliniforme* para asimilar aminoácidos en medios de cultivo, donde el ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, alanina y serina incrementaban la biomasa en forma similar a las sales de amonio.

El efecto negativo del pH alto fue mayor (40-45 %) con nitrato de calcio y con sulfato de amonio (20%) que en peptona (10%). Esto puede deberse a diferentes cambios metabólicos del micelio, se ha reportado que en los cultivos con fuente de nitrógeno orgánica, pueden producirse sustancias como ácidos orgánicos que neutralizan el pH alto y de esta manera pueden ajustar el sistema a las mejores condiciones de crecimiento (Griffin, 1994).

También se ha reportado que en el proceso de asimilación de amonio en las raíces, se excreta un protón (H^+) al medio externo por cada molécula asimilada, por lo que se ha propuesto que en los HEM la utilización del amonio origina problemas de acidificación que puede inhibir su crecimiento (Hung & Trappe, 1983), sin embargo en la especie de *Suillus* estudiada no se observó este efecto, ya que utilizó mejor el amonio en pH ácido que en pH alto, lo cual demuestra la necesidad de conocer mejor el comportamiento de los HEM en cultivo axénico, que no es necesariamente similar a lo que ocurre en la relación micorrízica.

El efecto positivo de la glucosa fue importante debido a la necesidad de una cantidad suficiente de glucosa para asimilar el nitrógeno proveniente de los aminoácidos de la peptona, amonio o nitrato y que el crecimiento no se mejora al aumentar sustratos más complejos como el extracto de malta, seguramente debido a la incapacidad de asimilar los sustratos carbonados que contiene, a diferencia de la L-asparagina que si mejoró la densidad pero no el crecimiento micelial.

El efecto negativo de la temperatura mayor de 25 °C tanto en el crecimiento radial como en la biomasa, independientemente de la fuente nitrogenada de los medios de cultivo, coincide con los resultados Hutchinson, (1990*), quien en estudios de caracterización taxonómica de diferentes especies ectomicorrízicas sugiere que los HEM son más tolerantes a temperaturas menores que a altas, independientemente de las zonas de origen de las especies estudiadas.

Otra observación importante fue el efecto que tuvo la luz, un factor que no ha sido estudiado en HEM con la gran atención que se ha dado en las especies saprobias, sobre todo en la relación de este factor con los procesos de diferenciación micelial y reproducción como *Pilobolus* y *Phycomyces* en los que se conocen mecanismos fototácticos que influyen en la liberación de esporas de reproducción o en los que la luz se asocia a cambios en la extensión diferencial de la pared celular detrás de la punta de crecimiento, porque la luz puede modificar la actividad de enzimas líticas de la pared celular que contienen pigmentos de tipo flavinas (Dusembery, 1996).

Es importante mencionar que debido a que con el diseño factorial fraccionario de dos niveles utilizado se pudo estudiar el efecto de numerosos factores con gran economía y eficiencia en la experimentación, solamente se pudieron conocer los efectos principales y que no hay que olvidar que estos efectos pueden estar confundidos con algunos efectos de interacción indicados en la Tabla 3-5.

Sin embargo aunque en este tipo de diseños los efectos de las interacciones se consideran insignificantes, dicha suposición no será limitativa si se seleccionan adecuadamente los factores de estudio y además se planean experimentos de seguimiento. En los experimentos posteriores se incluirán generalmente los factores más importantes, responsables de las interacciones.

En los estudios con HEM, que se caracterizan por su lento crecimiento y la preferencia por temperaturas bajas de incubación estos diseños pueden ser de gran utilidad a diferencia de los diseños tradicionales probando uno por uno cada uno de los factores de interés.

5.6. **Fisiología del crecimiento micelial en soporte sólido**

Considerando que el cultivo micelial de HEM en medio sólido puede ser el mejor sistema de estudio de la fisiología de crecimiento, debido a que es más cercano a las condiciones naturales de crecimiento el estudio en soportes demostró que es posible definir condiciones para favorecer el crecimiento micelial con característica morfológicas y de densidad variable.

Sin embargo resultaría interesante poder conocer las características de viabilidad y eficiencia micorrízica de estos cultivos a fin de evaluar su potencial de utilización como inoculantes, de acuerdo con las propuestas de autores como Lapeyrie & Bruchet (1985) y Roussos *et al.* (1997).

En este estudio con factores combinados, se demostró nuevamente que estos HEM fueron capaces de utilizar el amonio y el nitrato, notándose que con éstos se favoreció el crecimiento radial, mientras que con peptona se incrementó mayormente la densidad del micelio.

El bagazo de caña es un material que resultó adecuado para el crecimiento de *S. collinitus* pero no para *Pisolithus tinctorius*, aunque fue notablemente menor que en vermiculita-turba debido su baja retención de humedad, ya que al final del experimento el bagazo fue notoriamente más seco.

Es recomendable hacer mayores estudios para mejorar sus características de retención de humedad y sobre todo su capacidad amortiguadora, ya que en estos cultivos el pH ácido fue significativamente ($p < 0.05$) negativo en el crecimiento lo que puede relacionarse con un efecto inhibitorio mayor de los metabolitos ácidos generalmente incrementados cuando la fuente de nitrógeno es el sulfato de amonio a diferencia de lo que se observó en vermiculita-turba donde el pH final significativamente mayor ($pH=5.2$), en comparación con el bagazo de caña. ($pH=3.8-4.0$).

Como en los sistemas naturales como el suelo, los efectos del pH ácido pueden atenuarse por la presencia de arcillas y sustancias húmicas que contribuyen a mantener el equilibrio iónico (Kéller, 1996) se podrían adicionar al bagazo mateiales que contengan este tipo de sustancias para mejorar su utilización como soporte.

Sobre todo porque en México, el bagazo de caña ocupa un lugar importante por la cantidad que se produce (hasta 14 millones de toneladas) y su utilización para la producción de inoculantes de HEM podría ser una alternativa interesante y de bajo costo en relación al método común de preparación de estos inoculantes en mezclas de vermiculita-turba propuesto por Marx, 1984.

También fue notoria la respuesta negativa que tuvo la luz en cultivo sólido con bagazo de caña, situación que no es posible explicar a decuadamente, debido a la limitada importancia que se ha dado a este tipo de estudios en las especies ectomicorrízicas.

El uso de vermiculita-turba como soporte en el crecimiento micelial de *S. collinitus* demostró ser muy adecuado, sin embargo mediante la optimización de la composición química de los medios de cultivo y el estudio de otros factores ambientales podrían mejorarse y sobre todo para aplicarse en el cultivo en un mayor número de especies ectomicorrízicas.

En los soportes sólidos probablemente hubo una mayor interacción entre los componentes del medio y el soporte, debido en primer lugar a la penetración del micelio en los espacios inter e intrapartícula que se observó (Figura 4-32), en respuesta a gradientes de condiciones nutrimentales o ambientales, a pesar de las importantes pérdidas de humedad que se observaron sobre todo en el bagazo de caña y a la imposibilidad de analizar otras variables del crecimiento micelial como la biomasa.

Sería importante realizar el análisis de la dimensión fractal del micelio con otros sistemas más precisos mediante analizadores de imágenes (Tucker *et al.*, 1992; Baar *et al.*, 1997; Ritz & Crawford, 1990), para conocer mejor las estrategias de colonización de los soportes.

Los cultivos de HEM en fermentadores con corrientes de gases controlados, como las columnas desarrolladas por Raimbault & Alazard (1980) demostraron su preferencia microaerofílica (tasa de aireación=7 ml/min) en comparación con hongos saprobios (Roussos & Hannibal, 1997), por lo que es necesario desarrollar también sistemas de cultivo sólido específicos para estas condiciones, lo que hace ver la importancia de cotinuar y ampliar cada vez más el conocimiento sobre este tipo de hongos.

5.7. Conservación de las cepas

La conservación por resiembras periódicas en medios de cultivo, es la técnica que generalmente se aplica en trabajos experimentales con HEM debido a que es relativamente sencilla y económica, aunque es muy laboriosa al incrementarse el número de cepas (Hill, 1981; Oort, 1981). También se ha reportado que el micelio de estos hongos es muy sensible a los procesos de liofilización y conservación en nitrógeno líquido (Marx & Daniel, 1976) que son las metodologías más efectivas en la conservación de la mayoría de especies de hongos saprobios (Fennell, 1960).

Los resultados de recuperación de las cepas de HEM fueron variables (Figura 4-33); se observó que en general fue mejor a partir de los cultivos conservados en cajas de Petri que en los frascos de cultivo. Esto puede explicarse porque al tomar los inoculantes de los frascos se hizo mayor manipulación del micelio, y hubo una mayor acumulación de pigmentos y exudados que pueden actuar como inhibidores del crecimiento (Robson *et al.*, 1987) y en los frascos hubo una mayor limitación de aire lo que pudo favorecer la acumulación de CO₂ (Marx & Daniel, 1976).

En cuanto a los medios de cultivo utilizados; la recuperación se mejoró notablemente en los cultivos conservados en medio de PDA ¼. En el PDA completo se observó la producción de abundantes exudados de color café o pardo rojizo que se acumulaban sobre el micelio de las cepas de *Pisolithus* y *Suillus*. La presencia de estos pigmentos y exudados posiblemente tuvieron efectos inhibitorios para el crecimiento de estos hongos al momento de resembrarlos tal como se ha reportado para otras especies fúngicas (Robson *et al.*, 1987). También se observaron algunos cambios en la morfología de las colonias de *Suillus* que presentaron bordes más irregulares y de textura más seca y onduladas.

Hubo mayores dificultades para la recuperación de las cepas de *Lactarius* y *Suillus* S-1588, lo que probablemente se debe a la periodicidad con la que se hicieron las resiembras, ya que autores como Takaacs (1967) y Moser (1958) recomendaron resiembras más frecuentes que la de tres meses realizada.

Sin embargo actualmente también se ha demostrado que la resiembra frecuente de las cepas pueden causar cambios en la viabilidad y tasas de crecimiento e incluso la pérdida de la capacidad

micorrízica que es la textura de mayor importancia en estos hongos, y que sería recomendable realizar en próximos estudios (Marx & Daniel, 1976).

También hubo diferencias en la resistencia a la manipulación del micelio que se realizó durante las pruebas de crecimiento. Las cepas de *Lactarius* y *Suillus* S-1588 se caracterizaron por tener micelio muy laxo, que se desgarraba con facilidad al tratar de separarlo del medio lo que también pudo ser un factor determinante en la recuperación de estas cepas, de aquí la importancia de hacer cortes finos del micelio con un sacabocados o bisturí perfectamente afilados para disminuir este problema de desgarramiento y pérdida de viabilidad del micelio.

Los trabajos en el laboratorio con cepas microbianas normalmente requieren de su conservación en forma de cultivos puros, que conserven su viabilidad y sus características morfológicas y fisiológicas. Los métodos de conservación de hongos son variables de acuerdo con las necesidades en tiempo de conservación y a sus propiedades biológicas, es decir, no hay una metodología de conservación óptima para todos los tipos de hongos (Smith & Onions, 1983).

Es importante mencionar que la conservación de las cepas ectomicorrízicas por la técnica de resiembra periódicas en medios de cultivo es una metodología que se puede aplicar durante periodos de tiempo variable, dependiendo de las cepas, debido a cambios en las propiedades de crecimiento de las mismas. Una estrategia que mejora los resultados de conservación por resiembra periódicas, es la utilización de cajas de Petri y la utilización de medios de cultivo con bajo contenido de nutrientes.

Desde que Castellani (1963) reportó la conservación en agua destilada estéril de especies de hongos patógenos, ascomicetos y levaduras como una técnica de recuperación exitosa de las cepas después de más de 5 años, otros autores (Johnson & Martin, 1992; Volz & Parent, 1998) la han aplicado con éxito para la conservación y recuperación de diferentes tipos de hongos hasta por 20 años.

En general, esta forma de conservación de las cepas no causó cambios en la morfología de los cultivos, pero se observaron aumentos en el tiempos de adaptación de las cepa de 6 a 7 o incluso 10 días.

No hubo diferencias importantes entre los resultados de crecimiento obtenidos entre las muestras conservadas a +4°C y las de temperatura ambiente tal como lo reportaron Johnson & Martin, (1992)

cuando hicieron estudios de conservación de cultivos miceliales de diferentes especies de deuteromicetos en agua a 20°C lograron hasta un 90-92% de recuperación de sus cultivos después de 10 años de conservación en estas condiciones.

En el caso de los HEM, que son especies de micelio vegetativo generalmente sensible a la manipulación y condiciones ambientales en comparación con especies de hongos esporulados, la técnica de conservación en agua estéril tiene gran perspectiva de aplicación debido a la facilidad de manejo, bajo costo y a la eficiencia de conservación demostrada.

Otros estudios como los de Helvi (1989) y Marx & Daniel (1976) también han demostrado que con esta metodología se logró una recuperación exitosa del micelio de especies ectomicorrizas y la conservación de la capacidad de infectar plántulas de pino hasta por 3 años a 5 °C.

6. CONCLUSIONES

- Las características morfológicas de las cepas de HEM en medios de cultivo de diferente composición química como el BAF y PDA fueron variable entre las cepas y entre las especies de un mismo género, y fueron muy relacionadas con variables de crecimiento como el diámetro colonial, crecimiento radial, la V_r , biomasa y dimensión fractal de las colonias de manera característica.
- La estandarización de un sistema de cultivo sólido con cubierta de celofán fue posible y se demostró la importancia de conocer el efecto del manejo de los inóculos miceliales obtenidos de sitios y de tamaño determinados.
- La concentración de glucosa elevada en los medios de cultivo modificó las características coloniales de la mayoría de las especies de HEM, redujo su crecimiento micelial y favoreció la producción de exudados y pigmentos por lo que la selección del medio de cultivo es un aspecto de gran importancia en este tipo de hongos.
- Los medios con peptona favorecieron en general tanto el crecimiento radial como la biomasa de las cepas de *Suillus* y *Pisolithus* a diferencia del sulfato de amonio que incrementó su crecimiento radial pero no la biomasa.
- El nitrato de calcio en los medios limitaron tanto el crecimiento radial como la biomasa en la mayoría de las cepas.
- Los diseños factoriales fraccionarios de Plackett-Burman aplicados para estudiar el efecto combinado de factores nutrimentales y ambientales demostraron la importancia relativa de cada uno de los factores y permitieron ampliar el conocimiento sobre cada uno y de sus posibles interacciones.

- Los factores ambientales y nutrimentales con efectos más importantes fueron muy similares en medios con agar y en soportes sólidos, con una variación mayor en los efectos de menor importancia sobre todo ambientales.
- El bagazo de caña es un material que puede ser utilizado para el cultivo sólido de especies ectomicorrízicas, siempre que se mejoren sus propiedades de retención de humedad y amortiguadoras para aplicarse como alternativa de soporte a la vermiculita-turba en la producción de inoculantes.
- El sistema de conservación por resiembras periódicas de las especies de HEM en el laboratorio puede ser de utilidad variable entre las cepas, considerando la resistencia a la manipulación de cada una y utilizando medios diluidos para evitar problemas de inhibición por metabolitos diversos.
- La conservación de las cepas de HEM en agua destilada estéril es muy recomendable por la reducción en las características de crecimiento y facilidad de manejo.

7. LITERATURA CITADA

- Abuzinadah, R.A., Finlay, R.D., Read, D.J. 1986. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants. II. Utilization of protein by mycorrhizal plants of *Pinus contorta*. *New Phytol.* **103**: 495-506.
- Agerer, R. 1988. *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. 2nd ed. Schwabisch Gmud, Germany Einhorn-Verlag.
- Ainsworth, A.M. 1995. Technical Information Sheet No. 11: Isolation techniques for basidiomycetes. *World J. Microb. Biot.* **11**: 364-366.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Anderson, I.C., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G. 1999. Intra- and interspecific variation in patterns of organic and inorganic nitrogen utilization by three Australian *Pisolithus* species. *Mycol. Res.* **103**(12): 1579-1587.
- Aquiuaatl, M.A., Morán, E., Rodríguez, W. 1994. Producción de biomasa y actividad reguladora del crecimiento vegetal de *Rhizopogon roseolus*. Resúmenes de XVII Reunión Latinoamericana de Rizobiología. La Habana, Cuba. 17-21 de octubre.
- Baar, J. B., Comini, M., Oude E., Kuyper, W. 1997. Performance of four ectomycorrhizal fungi on organic and inorganic nitrogen sources. *Mycol. Res.* **101**(5): 523-529.
- Bartnicki-García, S. 1973. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. *Symp Soc Gen Microbiol.* **23**: 245-267.
- Bloomberg, W.J., Sutherland, J.R. 1971. Phenology and fungus nematode relations of corky root disease of Douglas-fir. *Ann. Appl. Biol.* **69**: 265-276.
- Box, G.E., Hunter, W. G, Hunter, J.S. 1989. *Estadística para Investigadores*. Ed. Reverté. Barcelona, España.
- Boyd, R., Furbank, R.T., Read, D.J. 1986. Ectomycorrhiza and the water relations of trees. In: *Mycorrhiza-structure, function, molecular biology and biotechnology*. Ed. A. Varma and B. Hock. Springer-Verlag, Berlin, pp 325-363.
- Brown, A.D. 1990. *Microbial water stress physiology: principles and perspectives*. London. John Wiley and Sons.
- Brundrett, Mark. 1996. Pure culture isolation of fungi and the production of inoculum. In: *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture* (Eds. Neale Bougher, Bernie Dell, Tim Grove and Nick Malajczuk). Australian Centre for International Agricultural Research.
- Budi, S., Caussanel, J., Trouvelot, A., Gianinazzi, S. 1998. The biotechnology of mycorrhizas. In : *Microbial interactions in agriculture and forestry* Subba Rao N.S., Dommergues Y.R. (Eds.), Science Publishers, Inc., New Delhi, Calcutta, Vol., 1, 149-162.
- Caldwell, D.R. 1994. *Microbial Physiology & Metabolism*. Wm. C. Brown Publishers. USA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Calleja M., d'Auzac, J. 1983. Activités phosphatases et carence phosphatée chez des champignons supérieurs. *Can. J. Bot.* **61**: 79-86.
- Cantino, E.C. 1966. Morphogenesis in aquatic fungi. In: The fungi Vol. (2). G.C. Ainsworth and A.S. Sussman. (Eds.) Academic Press, New York, pp 283-337.
- Carlsen, M., Spohr, A., Nielsen, J. Villadsen, J. 1996. Morphology and physiology of an alpha-amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* **49**:266-276.
- Carrizales, V., Rodríguez, H., Sardina, I. 1981. Determination of the specific growth rate of molds on semi-solid cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **23**: 321-333.
- Coleman, M.D., Bledsone, C.S., Lopushinsky, W. 1989. Pure culture response of ectomycorrhizal fungi to imposed water stress. *Can. J. Bot.* **67**:29-39.
- Colin, R. T. 1992. Image analysis: putting filamentous microorganisms in the picture. *Tibtech* **10**:343-348.
- Colpaert, J.V., Van Assche, J.A. 1992. Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*. *Plant and Soil.* **143**(2) 201-211.
- Cook, R. J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**: 53-80.
- Corry, J. E. 1978. Relationships of water activity to fungal growth. In: Food and Beverage Mycology, AVI Publishing Co. Inc., pp 45-82.
- Cumming, J.R., Weinstein, L.H. 1990. Aluminum-mycorrhizal interactions in the physiology of pitch pine seedlings. *Plant and Soil* **125**(1): 7-18.
- Chapman, W.K., Berch, S.M., Ballard, T.M. 1990. *In vitro* growth of ectomycorrhizal fungi on dilute agar. *Mycologia* **82**(4): 526-527.
- Chhonkar, P.K., Tarafdar, J.C. 1984. Accumulation of phosphatases in soils. *J Indian Soc Soil Sci.* **32**: 266-272.
- Chilvers, G.A., Pryor, L.D. 1965. The structure of eucalypt mycorrhizas. *Aust. J. Bot.* **13**: 245-259.
- Chen, X.Y., Hampp, R. 1993. Sugar uptake by protoplasts of the ectomycorrhizal fungus, *Amanita muscaria* (L. ex. Fr.) Hooker. *New Phytol.* **125**(3): 601-608.
- Cline, M.L., France, R.C., Reid, C.P. 1987. Intraspecific and interspecific growth variation of ectomycorrhizal fungi at different temperatures. *Can. J. Bot.* **65**: 869-875.
- Daubresse, P., Ntibashirwa, S., Gheysen, A., Meyer, J.A. 1987. A process for the protein enrichment of cassava by solid substrate fermentation in rural conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **29**: 962-968.
- Deacon, J.W. 1997. Modern Mycology. Third Edition. Blackwell Science, Oxford.
- De Meo, M., Laget, M., Phan-Tan-Luu, R., Mathieu, D., Durnénil, G. 1985. Application des plans d'expériences à l'optimisation des milieux et des conditions de culture en fermentation. *Bio-Sciences* **4**(4): 99-102.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, M. 1991. Biomass estimation in solid state fermentation I. Manual biochemical methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 200-205.
- Dixon, R.K., Rao, M.V., Garg, V.K. 1993. Salt stress affects *in vitro* growth and *in situ* symbioses of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 3: 63-68.
- Ducamp, M. 1987. Contributions à l'étude d'un champignon ectomycorhizien: *Suillus granulatus* Fr. ex L. Thèse pour le Doctorat de 3ème cycle de Biologie et Physiologie Végétale. Institut National de la Recherche Agronomique Bordeaux.
- Duchesne, L.C., Ellis, B.E., Peterson, R.L. 1989. Disease suppression by the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* contribution of oxalic acid. *Can. J. Bot.* 67: 2726-2730.
- Duddridge, J.A., Malibari, A., Read, D.J. 1980. Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287: 834-836.
- El-Badaoui, K., Botton, B. 1989. Production and characterization of exocellular proteases in ectomycorrhizal fungi. *Ann. Sci. For.* 46: 728-730.
- Estrada, A., Valdés, M. 1986. El crecimiento y la micorrización de plántulas de pino inoculadas con *Pisolithus tinctorius* en el semillero o en el envase de transplante. *Biotica* 11: 137-142.
- Fargin, E., Sergent, M., Mathieu, D., Phan-Tan-Luu, R. 1985. Approche méthodologique de la recherche expérimentale. *Bio-Sciences*. 4 (4): 77-82.
- Fennell, D.I. 1960. Conservation of fungus culture. *Bot. Rev.* 26: 80-141.
- Finlay, R.D., Ek, H., Odham, G., Soderstrom, B. 1988. Mycelial uptake, translocation and assimilation of nitrogen from ¹⁵N-labelled ammonium by *Pinus sylvestris* plants infected with different ectomycorrhizal fungi. *New Phytol.* 110: 59-66.
- France, R.C., Reid, C.P. 1983. Interactions of nitrogen and carbon in the physiology of ectomycorrhizae. *Can. J. Bot.* 61: 964-984.
- Frank, A.B. 1885. Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze (On root-symbiosis depending nutrition through hypogeous fungi of certain trees). *Ber. Deut. Bot. Gesell.* 3: 128-145 (traducido por J.M. Trappe, Proc. 6th N. Amer. Conf. Myc. del 25-29 junio 1984, Oregon pp. 18-25).
- Garraway, M.O., Evans, R.C. 1981. Fungal Nutrition and Physiology. John Wiley and Sons, New York.
- Garbaye, J. 1988. Les plantations forestières tropicales. *Revue Bois et Forêts des Tropiques*. No. 216: 23-33.
- Garbaye, J., Eltrop, L., George, E., Guel, J.M., Vetterlein, D., Waringer, A., Sun Y.P., Unestam, T. 1993. Drought stress and ectomycorrhizas. II. Plant water relations. 9th Conference nord-américaine sur les mycorhizes, Guelph (Ontario, Canada).
- Garbaye, J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 128: 197-210.
- Garbaye, J. 2000. The role of ectomycorrhizal symbiosis in the resistance of forests to water stress. *Outlook Agr.* 29(1): 63-69.

- Garza-Ocañas, F. 1986. Hongos ectomicorrizicos en el Estado de Nuevo León. *Rev. Mex. Micol.* 2: 197-206.
- Gay, G., Debaud, J.C. 1987. Genetic study on indole-3-acetic acid production by ectomycorrhizal *Hebeloma* species; inter-and intraspecific variability in homo-and dikaryotic mycelia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 141-146.
- Gervais, P., Molin, P., Grajek, W., Bensoussan, M. 1988. Influence of water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnol. Bioeng.* 31: 454-463.
- Gianinazzi, S., Gianninazi-Pearson, V., Trouvelot, A. 1994. Potentialities and procedures for the use of endomycorrhizas with special emphasis on high value crops. In *Biotechnology of Fungi for improving plant growth*. (Eds. J.M. Whipps & R.D. Lumsden), Cambridge Univ. Press, Chippingham, pp. 41-54.
- Gibson, F., Deacon, J.W. 1990. Establishment of ectomycorrhizas in aseptic culture: effects of glucose, nitrogen and phosphorus in relation to successions. *Mycol. Res.* 94(2): 166-172.
- Gogała, N. 1991. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia* 47:331-340.
- Griffin, D.H. 1994. *Fungal Physiology*. 2nd; Ed. John Wiley and Sons, New York.
- Guzmán, D.L., Soto, C., Martínez, D. 1987. El bagazo de caña de azúcar como sustrato para la producción de *Pleurotus* en Jalisco. *Rev. Mex. Mic.* 3: 79-82.
- Hacsckaylo, E. 1953. Pure culture synthesis of pine mycorrhizae in terra-lite. *Mycologia* 45: 971-975.
- Hacsckaylo, E., Palmer, J.G., Vosso, J.A. 1965. Effects of temperature on growth and respiration of ectotrophic mycorrhizal fungi. *Mycologia* 57: 748-756.
- Harley, J.L. 1969. *The Biology of Mycorrhiza*. Leonard Hill, 2nd ed. London.
- Harley, J.L., Smith, S.E. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis*. Acad. Press, N.Y.
- Harrison, A. 1995. *Fractals in Chemistry*. Oxford Science Publications. Great Britain.
- Harvey, L.M., Smith, J.E., Vristiensen, B., Neill, J., Senior, E. 1994. The cultivation of ectomycorrhizal fungi. In: *Biotechnology of Fungi for improving plant growth*. (Eds. J.M. Whipps & R.D. Lumsden), Cambridge Univ. Press, Chippingham. pp. 27-39.
- Hawker, L.E. 1966. Environmental influences on reproduction. In: *The Fungi*. G.C. Ainsworth and A.S: Sussman. Eds. Academic Press, New York. Vol. 2, pp 435-469.
- Hawksworth, D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95:641-655.
- Helman, J. S., Coniglio, A., Tsallis, C. 1984. Fractons and the fractal structure of proteins. *Phys. Rev. Lett.* 53: 1195-1197.
- Helvi, H.T. 1989. Maintenance Methods for Ectomycorrhizal Fungi. *Agric. Ecosys. Environ.* 28: 171-174.
- Herrera, T., Ulloa, M. 1990. *El Reino de los Hongos. Micología Básica y Aplicada*. Fondo de Cultura Económica, UNAM. México.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

- Hesseltine, C.W. 1977. Solid state-fermentation. Part I. *Process Biochem.* **12**(6): 24-27.
- Hill, L.R. 1981. Preservation of Microorganisms. *In: Essays in Applied Microbiology.* John Wiley & Sons Ltd.
- Horan, D.P., Chilvers, G.A. 1990. Chemotropism-the key to ectomycorrhizal formation?. *New Phytol.* **116**: 297-301.
- Hung L., Trappe, J.M. 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro.* *Mycologia* **75**(2): 234-241.
- Hutchison, L.J. 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* **42**: 387-504.
- Hutchinson, L.J. 1990. Studies on the systematic of ectomycorrhizal fungi in axenic culture: II. The enzymatic degradation of selected carbon and nitrogen compounds. *Can. J. Bot.* **68**(7):1552-1530.
- Hutchinson, L.J. 1990a. Studies on the systematic of ectomycorrhizal fungi in axenic culture: V. Linear growth response to standard extreme temperatures used as a taxonomic character. *Can. J. Bot.* **68**(10): 2179-2184.
- Jackson, R.M., Mason, P.A. 1984. Mycorrhiza. Studies in Biology No. 159. Edward Arnold Ltd. London.
- Johnson G. C., Martin A.K. 1992. Survival of wood-inhabiting fungi stored for 10 years in water and under oil. *Can. J. Microbiol.* **38**: 861-864.
- Jongbloed, R.H., Borst-Pauwels, G.W. 1990. Effects of ammonium and pH on growth of some ectomycorrhizal fungi *in vitro.* *Acta Bot. Neerl.* **39**: 349-358.
- 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.
- Ko, W.H., Lockwood, J.L. 1967. Soil fungistasis; in relation to fungal spore nutrition. *Phytopathology.* **57**: 894-901.
- Kope, H.H., Fortin, J.A. 1990. Antifungal activity in culture filtrates of ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius.* *Can. J. Bot.* **68**(6): 1254-1259.
- Kropp, B.R., Langlois, C.G. 1990. Ectomycorrhizae in reforestation. *Can. J. Forest Res.* **20**(4): 438-451.
- Lamhamedi, M.S., Bernier, P.Y., Fortin, J.A. 1992. Hydraulic conductance and soil water potential at the soil-root interface of *Pinus pinaster* seedlings inoculated with different dicaryons of *Pisolithus* sp. *Tree Physiol.* **10**: 231-244.
- Lapeyric, F., Bruchet, G. 1985. Some factors influencing viability of ectomycorrhizal fungal inoculum. *New Phytol.* **100**: 585-593.
- Lawson, J.L., Madrigal, J., Erjavec. 1992. Estrategias experimentales para el mejoramiento de la calidad en la industria. Grupo Editorial Iberoamérica, México, D.F.
- Le-Tacon, F.G. 1985. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced en a fermentor and entrapped in polymeric gels. *Can. J. Bot.* **63**: 1664-1668.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

- Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P. Murthy, V.S. 1982. Solid state fermentation processes and their challenges. In: Technical Brochuer Symp. Fermented Foods, Food contamination, Biofertilizers and Bioenergy. Assoc. Microbiologists, India, pp. 12-18.
- Malloch, D.W., Pirozynski, K.A., Raven, P.H. 1980. Ecological and evolutionary significance of mycorrhizal symbioses in vascular plants (A Review). *P Natl Acad Sci USA* 77: 2113-2118.
- Mandelbrot, B.B. 1977. Fractals: Form, chance and dimension. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Marks, O.C., Koslowsky, T. 1973. Ectomycorrhizae, their Ecology and Physiology. Academic Press, New York.
- Martínez-Carrera, D. 2000. Perspectivas de la producción de hongos comestibles en México para el siglo XXI. En: Memorias del I Simposio Latinoamericano de cultivo de hongos comestibles (Resúmenes). Xalapa, Ver.
- Marx, D.H. 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. 1972. Ectomycorrhizae as biological deterrents to pathogenic root infections. *Annu. Rev. Phytopathol.* 10: 429-454.
- Marx, D.H., Daniel, W.J. 1976. Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Can. J. Microbiol.* 22: 338-341.
- Marx, D.H., Cordell, C.E., Kenney, P.S., Mexal, J.G., Artman, J.D., Rittle, J.W., Molina, R.J. 1984. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhiza on bar root tree seedlings. *For. Sci. Monogr.* 75: 1-10.
- Marx, D.H., Cordell, C.E. 1994. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. In: J.M. Whipps & R.D. Lumsden (Eds). Biotechnology of fungi for improving plant growth. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 1-25.
- Marzluf, G.A. 1981. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Rev.* 45: 437-461.
- Matcham, S.E., Jordan, B.R., Wood, B.J.B. 1985. Estimation of fungal biomass by three independent methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: 108-112.
- Mayer, A.M. 1989. Plant-fungal interactions: A plant physiologist's viewpoint. *Phytochemistry* 28 (2): 317.
- Melin, E. 1921. Über die Mykorrhizen pilze von *Pinus sylvestris* (L.) und *Picea abies* (L.) Karst. *Svensk. Bot. Tidskr.* 15: 192-203.
- Melin, E. 1953. Physiology of mycorrhizal relations in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 4: 325-346.
- Mexal, J., Reid, C. 1973. The growth of selected mycorrhizal fungi in response to induced water stress. *Can. J. Bot.* 51: 1579-1588.
- Mikola, P. 1973. Mycorrhizal symbiosis in forestry practice, In: Ectomycorrhizae: Their ecology and physiology, G.C. Marks & T.T. Kozlowski (eds.) Academic Press. New York, pp. 348-411.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Mildenhall, J.P., Prior, B.A., Trollope, L.A. 1981. Water relations of *Erwinia chrysanthemi*: Growth and extracellular pectic acid lyase production. *J. Gen. Microbiol.* **127**: 27-34.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Miller, C.O. 1971. Cytokinin production by mycorrhizal fungi. In: *Ectomycorrhizae* (Ed. by E. Hacskeylo), pp. 168-174. Proceedings of the 1st North American Conference on *Mycorrhizae*, U.S. Department of Agriculture, Washington.
- Mitchell, D.A., Doelle, H.W., Greenfield, P.F. 1989. Suppression of penetrative hyphae of *Rhizopus oligosporus* by membrane filters in a model Solid.State Fermentation system. *Biotechnol. Tech.* **3**(1): 45-50.
- Mitchell, D.A., Lonsane B.K. 1992. Definition, characteristics and potential. In: Solid substrate cultivation. Ed. Doelle, H.W., Mitchell, D.A., Rolz, C.E. Elsevier Applied Science. New York, pp116.
- Molin, P., Gervais, P., Lemiére, J.P., Davet, T. 1992. Direction of hyphal growth: a relevant parameter in the development of filamentous fungi. *Res. Microbiol.* **143**: 777-784.
- Montgomery, D.C. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Ed. Iberoamérica.
- Mosse, B., Hayman, D.S., Arnold, D.J. 1973. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. V. Phosphate uptake by three plant species from P-deficient soils labelled with ³²P. *New Phytol.* **72**: 809-815.
- Moser, M. 1958. Die künstliche Mykorrhizaimpfung von Forst pflanzen. II. Die Torfstreukultur von Mykorrhizapilzen. *Forsw. Cbl.*, **77**: 257-320.
- Mousain, D. 1989. Etude de la nutrition phosphatée de symbiotes ectomycorhiziens. Thèse de Doctorat d'Etat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.
- Mudgett, R.E., 1980. Controlled gas environments in industrial fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* **3**:273-280.
- Mudgett, R.E., 1985. Solid-state fermentations. In: "Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology", American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 66-83.
- Obert, M., Pfeifer, P., Sernetz, M. 1990. Microbial growth patterns described by fractal geometry. *J. Bacteriol.* **172**(3): 1180-1185.
- Okazaki, N., Sugama, S., Tanaka, T. 1980. Mathematical model of surface culture of koji mold. *J. Ferment. Technol* **58**: 471-476.
- Oort, A.J.P. 1981. Nutritional Requirements of *Lactarius* species, and Cultural Characters in relation to Taxonomy. North-Holland Publishing Company. Amsterdam, Oxford, New York.
- Oriol, E. 1987. Croissance de *Aspergillus niger* sur milieu solide: Importance de l'eau. Thèse de doctorat nouveau régime. Microbiologie. INSA de Toulouse
- Paul, E.A., Clark, F.E. 1989. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, Inc. San Diego, Cal. USA.

- Plassard, C., Chalot, M., Botton, B., Martin, F. 1997. Le rôle des ectomycorhizes dans la nutrition azotée des arbres forestiers. In: Champignons et mycorhizes en forêt. *Rev. For. Fr.* **49**: 82-98.
- Pérez-Moreno, J., Ferrera-Cerrato, R. 1997. Mycorrhizal interactions with plants and soil organisms in sustainable agroecosystems. In: Soil, Ecology in Sustainable Agricultural Systems. Edited by Lijbert Brussard and Ronald Ferrera-Cerrato, CRC Press LLC. Pages 91-112.
- Pirozynski, K.A., Malloch, D.W. 1975. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* **6**: 153-164.
- Prabhu, V., Wilcox, H.E. Boyer, G.L. 1996. Regulation of nitrate reductase in the mycorrhizal ascomycete *Wilcoxina micolae* var. *micolae*. *Mycol. Res.* **100**: 333-336.
- Prosser, J.I. 1995. Kinetics of filamentous growth and branching. In: The growing fungus. Eds. Neil A.R. Gow and Geoffrey M. Gadd. Chapman & Hall.
- Raimbault, M., Alazard, D. 1980. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 199-209.
- Reichl, U., Buschulte, T.K., Gilles, E.D. 1990. Study of the early growth and branching of *Streptomyces tendae* by means of an image processing system. *J. Microsc. (Paris)* **158**:55-62.
- Reeslev, M., Kjoller, A. 1995. Comparison of biomass dry weights and radial growth rates of fungal colonies on media solidified with different gelling compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:4236-4239.
- Ritz, K., Crawford, J. 1990. Quantification of the fractal nature of colonies of *Trichoderma viride*. *Mycol. Res.* **94**(8): 1138-1152.
- Robinson, P. 1978. Practical Fungal Physiology. Ed. John Wiley & Sons.
- Rousseau, J.V.D., Sylvia, D.M., Fox, A.J. 1994. Contribution of ectomycorrhiza to the potential nutrient-absorbing surface of pine. *New Phytol.* **128**: 639-644
- Roussos, S., Bresson, E., Saucedo, G., Martínez, P., Guinberteau, J., Olivier, J.C. 1997. Production of mycelium de *Pleurotus opuntiae* sur support naturel en fermentation en milieu solide. In: Advances in Solid State Fermentation. S. Roussos, B.K., Lonsane, M., Raimbault, Viniagra, G. (Eds.) Proc. of 2nd International Symposium on Solid State Fermentation. Montpellier, France. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, pp. 484-500.
- Roussos, S., Hannibal, L. 1997. Physiologie de la croissance mycélienne de champignons ectomycorrhiziens cultivés en fermentation solide sur support solide en vue de la production d' inoculum. In: Mycomed, Rapport. Centre ORSTOM de Montpellier. France.
- Ruhling, A., Soderstrom, B. 1990. Changes in fruit body production of mycorrhizal and litter decomposing macrofungi in heavy metal polluted coniferous forest in North Sweden. *Water Air Soil Poll* **49**: 375-387.
- Sánchez F., Honrubia, M., Torres, P. 2000. Características culturales de algunos hongos ectomicorrizicos en cultivo puro. *Rev. Iberoam. Micol.* **17**: 127-134
- Santiago-Martínez, G., Varela, L., Estrada-Torres, A. 1993. Síntesis *in vitro* de la micorriza de *Pisolithus tinctorius* y *Pinus montezumae*. *Rev. Mex. Mic.* **9**:77-84.

- Santiago-Martínez, G., Varela, L., Estrada-Torres, A. 1994. Pruebas de crecimiento de once cepas de *Suillus* en diferentes medios nutritivos. V. Congreso Nacional de Micología. 27-30 de noviembre. Guanajuato, Gto. México.
- Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernández, M.R., Lonsane, B.K., Navarro, J.M., Roussos, S., Dufour, D. & Raimbault, M. 1994. On line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Proc. Biochem.* 29: 13-24.
- Schenck, N.C. 1982. Methods and principles of mycorrhizal research. American Phytopathological Society, St. Paul, USA.
- Scheromun, P., Plassard, C., Salsac, L. 1990. Regulation of nitrate reductase in the ectomycorrhizal basidiomycete, *Hebeloma cylindrosporum* Romagn. cultured on nitrate or ammonium. *New Phytol.* 114(3): 441-448.
- Smits, J.P., Van Sonsbeek, H.M., Rinzema, A., Tramper, J., Knol, W. 1998. Solid-State Fermentation (a mini Review). *Agro Food Ind Hi-tec.* Vol 9.
- Smith, D., Onions A.H. 1983. A comparison of some preservation techniques for fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 81(3): 535-540.
- Smith, J.E. 1985. Fermentation technology. In: Biotechnology Principles, ed. J.E. Smith, Van Nostrand Reinhold, London, pp. 39-74.
- Smith, S.E., Read, D.J. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd ed. Academic Press, London.
- Steele, G.C., Trinci, A.P. 1975. The extension zone of mycelial hyphae. *New Phytol.* 75: 583-587.
- Strullu, D.G. 1989. Mycorrhizes et culture *in vitro*. In: La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Ed. Technique & Documentation Lavoisier. Paris.
- Strullu, D. G. 1991. Les mycorrhizes des arbres et plantes cultivées. Ed. Technique & Documentation Lavoisier. Paris.
- Takacs, E.A. 1967. Producción de cultivos puros de hongos micorrizógenos en el Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Castelar, India, Suppl. *For.*, 4: 83-87.
- Theodorou, C., Bowen, G.D. 1973. Inoculation of seeds and soil with basidiospores of mycorrhizal fungi. *Soll Biol. Biochem.* 5:765-771.
- Tibbett, M., Sanders, F.E., Cairney, J.W. 1998. The effect of temperature and inorganic phosphorus supply on growth and acid phosphatase production in arctic and temperate strains of ectomycorrhizal *Hebeloma* spp. in axenic culture. *Mycol. Res.* 102(2): 129-135.
- Trappe, J.M. 1977. Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annu. Rev. Phytopathol.* 15: 203-222.
- Trinci, A.P. 1974. A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelia. *J. Gen. Microbiol.* 81: 225-236.
- Tucker, K.G., Kelly, T., Delgrazia, P., Thomas, C.R. 1992. Fully-automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. *Biotechnol Prog* 8: 353-359.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Ulrich, J.M. 1960. Auxin production by mycorrhizal fungi. *Physiol. Planta*. 13: 429-443.
- Varela, L., Estrada-Torres, A. 1995. Mycology in Sustainable Development: Expanding Concepts and Vanishing Borders, Proceedings of an International Workshop, San Diego, California, Edited by Ignacio H. Chapela and Mary E. Palm.
- Villarreal, L., Pérez-Moreno, J. 1989. Aprovechamiento y conservación del "Matsutake Americano" (*Tricholoma magnivelare*) en los bosques de México. *Micol. Neotrop. Appl.* 2: 131-144.
- Vogt, K.A., Grier, C.C., Meier, C.E., Edmonds, R.L. 1982. Mycorrhizal role in net primary production and nutrient cycling in *Abies amabilis* ecosystem in western Washington. *Ecology* 63: 370-380.
- Volz, P.A., Parent, S.L. 1998. Space flight micro-fungi after 27 years storage in water and in continuous culture. *Microbios* 96(384): 111-25.
- Wainwright, M. 1988. Metabolic diversity of fungi in relation to growth and mineral cycling in soil (Review). *T. Brit. Mycol. Soc.* 90(2): 159-170.
- Wallander, H., Arnebrant, K., 1999. Relationships between fungal uptake of ammonium, fungal growth and nitrogen availability in ectomycorrhizal *Pinus sylvestris* seedlings. *Mycorrhiza* 8: 215-223.
- Wilkins, D.A. 1991. The influence of sheathing (ecto) mycorrhizas of trees on the uptake and toxicity of metals. *Agric. Ecosys. Environ.* 35: 245-260.
- Williams, S.T. 1985. Oligotrophy in soil; fact or fiction. In: Bacteria in their natural Environment. Ed. M. Fletcher & G.D: Floodgate. London, Academic Press, pp 81-110.
- Wood, D.A. 1979. A new method for estimating biomass of *Agaricus bisporus* in a solid substrate, composted wheat straw. *Biotechnology Letters* 1: 255-260.