



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICELIAR *IN VITRO* DE TRES
CEPAS DE HONGOS POTENCIALMENTE ECTOMICORRIZÓGENOS
DE LA CUENCA DEL RÍO MAGDALENA, D.F.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:
ISSIS YOLOTZIN ALVARADO SÁNCHEZ

TUTORA
M. EN C. GEMA LILIA GALINDO FLORES



2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Esta tesis se realizó en los laboratorios de Ecología de la Facultad de Ciencias de la UNAM y de Micorrizas del CICB de la UAT, bajo la dirección de la M en C Gema Lilia Galindo Flores.

El comité revisor estuvo integrado por:

Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez

Dra. Maria Guadalupe Santiago Martínez

Dr. Arcadio Monroy Ata

Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos

Formó parte del Macroproyecto “Manejo de ecosistemas y desarrollo humano”

Universidad Nacional Autónoma de México SDEI-PTID-02.

AGRADECIMIENTOS:

Con todo mi cariño y agradecimiento a la M en C Gema Galindo Flores, mi asesora, maestra, compañera y confidente a lo largo de este trabajo.

A mi jurado: Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez, Dra. Maria Guadalupe Santiago Martínez, Dr. Arcadio Monroy Ata, Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos, por su tiempo y dedicación en la corrección de éste trabajo.

A la M en C Laura Hernández por su apoyo y compañía en campo.

A la M en C Beatriz Zúñiga Ruíz por su apoyo técnico y la accesibilidad a la infraestructura del Taller de Ecología y Recursos naturales. Además de su gran apoyo personal.

A la Universidad Autónoma de México y en especial a la Facultad de Ciencias por todo lo que me ha enseñado.

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala por su apoyo en mi investigación y estancia en Tlaxcala.

Al Dr. Javier y a todas las personas que colaboran con él en el macroproyecto del Laboratorio de Ecología, UNAM por su ayuda en este trabajo

Y a todas esas personas que de una manera se involucraron en la realización de este trabajo...

Con mucho amor agradezco a mis padres, Ernestina Sánchez Nava y Jesús Alvarado Rogel, porque a su manera cada uno me ha apoyado y amado a lo largo de éste, mi camino...

A mis hermanos Nydia y Esteban de Jesús, por su compañía, risas y por enseñarme visiones distintas de vivir, los quiero mucho...

Con un especial cariño a mi profesor de Biología de la prepa 6: Juan Hernández por acercarme a esta área tan bella: la BIOLOGÍA

A mis amigas que han estado conmigo en momentos muy gratos en esta Universidad: Paty, La Cata y Klaus.

A las niñas del Espacio Infantil por todas las de horas risa que hemos compartido.

Y a todos esos humanos que me he encontrado en el camino, que me han enseñado a crecer y a creer...

Índice

CONTENIDO	PÁGINA
Resumen	
Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Concepto de micorriza	3
1.2 Clasificación de las micorrizas	4
1.3 La ectomicorriza (EM)	5
1.4 Beneficios de la asociación	6
1.5 Importancia de la EM	7
1.6 Importancia del Carbono, nutrientes y pH en el crecimiento de los HEM	8
1.7 Algunos aspectos ecológicos de las ectomicorrizas	8
1.8 Estudios realizados sobre las ecomicorrizas	9
1.9 Estudios sobre el aislamiento y el crecimiento <i>in vitro</i> de HEM en México	10
1.10 Justificación	11
1.11 Objetivo general	12
1.12 Objetivos particulares	12
Capítulo 2: Zona de estudio	14
2.1 Localización geográfica	14
2.2 Características del suelo	14
2.3 Relieve	14
2.4 Clima	15
2.5 Vegetación	15
Capítulo 3: Materiales y métodos	15
3.1 Recolección de material biológico	15
3.2 Aislamiento y cultivo puro de HEM	16
3.3 Pruebas de crecimiento	16
3.4 Caracterización morfológica macro y microscópica de las cepas	17
3.5 Evaluación de variables de crecimiento	19
Capítulo 4: Resultados y discusión	19
4.1 Recolección de material biológico	23
4.2 Aislamiento <i>in vitro</i>	
4.3 Selección de cepas de HEM para realizar las pruebas de crecimiento bajo diferentes condiciones de cultivo	23
4.4 Algunas características de los géneros seleccionados	24
4.5 Caracterización morfológica y evaluación de las variables de crecimiento en <i>Suillus brevipes</i> TLAX62	25
4.5.1 Caracterización morfológica macro y microscópica de <i>S. brevipes</i> TLAX62	25
4.5.2 Evaluación de las variables biomasa, diámetro final, relación biomasa/área y tasa media de crecimiento en <i>S. brevipes</i> TLAX62	
4.6 Caracterización morfológica y evaluación de las variables de crecimiento en <i>Boletus pinophilus</i> TLAX63	42
4.6.1 Caracterización morfológica macro y microscópica de <i>B pinophilus</i>	42

TLAX63.	
4.6.2 Evaluación de las variables biomasa, diámetro final, relación biomasa/área y tasa media de crecimiento en <i>B. pinophilus</i> TLAX63	52
4.7 Caracterización morfológica y evaluación de las variables de crecimiento en <i>I. aff splendens</i> TLAX64	57
4.7.1 Caracterización morfológica macro y microscópica de <i>I. aff splendens</i> TLAX63	57
4.7.2 Evaluación de las variables biomasa, diámetro final, relación biomasa/área y tasa media de crecimiento en <i>Inocybe aff splendens</i> TLAX64	69
4.8 Morfología macro y microscópica de las cepas estudiadas	74
4.9 Pruebas de crecimiento	75
Capitulo 5. Conclusión	80
Literatura citada	86

Índice de cuadros

1. Clasificación de las micorrizas	
2. Comunidades vegetales	
3. Comunidades vegetacionales muestreadas	
4. Número de morfotipos colectados en los bosques de la CRM	
5. Número de recolectas por género	
6. Características macroscópicas <i>S. brevipes</i> TLAX62 Prueba: Glucosa (g/L)	
7. Características microscópicas <i>S. brevipes</i> TLAX62 Prueba: Glucosa (g/L)	
8. Características macroscópicas <i>S. brevipes</i> TLAX62 Prueba: Medios	
9. Características microscópicas <i>S. brevipes</i> TLAX62 Prueba: Medios	
10. Características macroscópicas <i>S. brevipes</i> TLAX62 Prueba: pH	
11. Características microscópicas <i>S. brevipes</i> TLAX62 Prueba: pH	
12. Resultados de las ANOVA para <i>S. brevipes</i> TLAX62	
13. Características macroscópicas <i>B. pinophilus</i> TLAX63 Prueba: Glucosa (g/L)	
14. Características microscópicas <i>B. pinophilus</i> TLAX63 Prueba: Glucosa (g/L)	
15. Características macroscópicas <i>B. pinophilus</i> TLAX63 Prueba: Medios	
16. Características microscópicas <i>B. pinophilus</i> TLAX63 Prueba: Medios	
17. Características macroscópicas <i>B. pinophilus</i> TLAX63 Prueba: pH	
18. Características microscópicas <i>B. pinophilus</i> TLAX63 Prueba: pH	
19. Resultados de las ANOVA para <i>B. pinophilus</i> TLAX63	
20. Características macroscópicas <i>I. aff splendens</i> TLAX64 Prueba: Glucosa (g/L)	
21. Características microscópicas <i>I. aff splendens</i> TLAX64 Prueba: Glucosa (g/L)	
22. Características macroscópicas <i>I. aff splendens</i> TLAX64 Prueba: Medios	
23. Características microscópicas <i>I. aff splendens</i> TLAX64 Prueba: Medios	
24. Características macroscópicas <i>I. aff splendens</i> TLAX64 Prueba: pH	
25. Características microscópicas <i>I. aff splendens</i> TLAX64 Prueba: pH	
26. Resultados de las ANOVA para <i>I. aff splendens</i> TLAX64	

Índice figuras

1. Ectomicorriza
2. Características macroscópicas *Suillus brevipes* TLAX62
3. Características microscópicas *Suillus brevipes* TLAX62
4. Características macroscópicas *Boletus pinophilus* TLAX63
5. Características microscópicas *Boletus pinophilus* TLAX63
6. Características macroscópicas *Inocybe aff splendens* TLAX64
7. Características microscópicas *Inocybe aff splendens* TLAX64

Resumen

La Cuenca del Río Magdalena es una de las principales zonas de vegetación en el Distrito Federal, al cuál provee de bienes y servicios ecosistémicos; además de ser un área de recreación para los habitantes de la ciudad. Ésta zona esta expuesta a distintos factores de deterioro, entre los que destacan: la ganadería, la contaminación y la tala clandestina, lo que hace necesario implementar estrategias que favorezcan la reforestación de éstas áreas boscosas.

Una alternativa es la utilización de hongos potencialmente micorrizógenos nativos en la inoculación de plántulas para su introducción en campo. Sin embargo, previo a esta etapa es necesario conocer las condiciones óptimas de crecimiento *in vitro*, lo cuál aunado al conocimiento de la biología de éstos hongos, las características que presentan en condiciones controladas pueden ser utilizadas como caracteres de importancia taxonómica.

El objetivo del trabajo fue evaluar el crecimiento micelial *in vitro* de tres especies de hongos potencialmente ectomicorrizógenos asociados a los bosques de la Cuenca del Río Magdalena bajo diferentes condiciones de cultivo. Se realizaron salidas durante el 2006, a los bosques de la Cuenca en donde se recolectaron 132 morfotipos de hongos micorrizógenos, a partir de los cuáles se aislaron siete cepas y tres de ellas (*Suillus brevipes*, *Boletus pinophilus* e *Inocybe aff. splendens*) fueron sometidas a pruebas de crecimiento en cuatro concentraciones de glucosa en medio BAF (10, 20 , 30 y 40 g/L), tres medios (BAF, EMA y PDA) y tres pH's en medio BAF (3, 5 y 7) evaluando cuatro variables de crecimiento: biomasa, diámetro, tasa media de crecimiento y relación biomasa/área.

En el caso de *S. brevipes* las condiciones de cultivo que favorecieron su crecimiento fueron: concentraciones altas de glucosa, los medios BAF y PDA, y pH's ácidos; para *B. pinophilus*, las concentraciones bajas de glucosa y los medios BAF y EMA, mientras que para *I. aff. splendens* lo fueron los medios enriquecidos y pH neutros.

La caracterización macro y microscópica del crecimiento colonial mostró que: que *S. brevipes* forma colonias regulares, café de textura aterciopelada, con presencia de pliegues radiales y exudados; hifas amarillentas, septadas de ramificación dicotómica y terminaciones redondeadas, globosas o en forma de gancho, con hifas oleíferas y vesículas intercalares. Las colonias de *B. pinophilus* fueron regulares circulares, con tonalidades amarillentas y textura pruinosa, hifas septadas de pared delgada, de color verde grisáceo, con terminaciones redondeadas o globosas y presencia de hifas oleíferas. Por su parte *I. aff. splendens* presentó colonias regulares de coloraciones grisáceas, textura algodonosa laxa, con micelio aéreo, cordones miceliares y exudados hialinos, hifas sinuosas, septadas, de color verde grisáceo, alto contenido citoplasmático y terminaciones redondeadas, gancho o globosas y presencia de fíbulas, vesículas intercalares e hifas oleíferas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que las tres cepas estudiadas desarrollaron diferentes estrategias de crecimiento de acuerdo a su capacidad de explotación, exploración y optimización del recurso disponible. Este conocimiento de la fisiología de los hongos ectomicorizógenos permitirá seleccionar a aquellas cepas que sean susceptibles de ser utilizadas con fines de producción de inóculo, inoculación de planta de interés forestal y restauración o rehabilitación de bosques y asegurando de ésta manera el éxito de la reforestación.

Capítulo 1. Introducción

Entre los ecosistemas más representativos de México están los bosques templados, los cuales son propios de zonas con clima templado y frío; éstos ocupan vastas extensiones del territorio nacional y se distribuyen desde el nivel del mar hasta las porciones más elevadas del país (Rzedowski, 1988).

Los bosques de climas templados contribuyen a la regulación del ciclo hidrológico, a mantener un microclima propicio para el crecimiento de diversas especies vegetales y animales; desde el punto de vista económico a muchas especies se les ha dado una gran variedad de usos para satisfacer las demandas de la industria mueblera, constructora, papelera y química, y de la explotación de recursos no forestales (Villalobos *et al.* 1983). Además vastas zonas boscosas se han desmontado para la implantación de áreas de cultivo, ganadería y asentamientos humanos (Rzedowski, 1988).

La variedad de usos y la falta de planeación para el manejo y la conservación de los recursos naturales ha ocasionado una progresiva deforestación pues se ha calculado que la tasa anual de deforestación sobrepasa la cantidad de áreas reforestadas, estimadas en 50 000 ha, que constituyen menos del 8% del área deforestada; aunado a esto cerca del 80% del territorio mexicano es afectado por procesos erosivos (Masera *et al.*, 1992).

A nivel mundial la pérdida de los bosques se incrementó en los últimos dos siglos. Actualmente se estima que 3.54 mil millones de ha de la superficie continental está cubierta por bosque, lo que representa el 52.8% de su superficie original. Para Latinoamérica se estima que a finales del siglo XXI sus bosques y selvas podrían quedar reducidas a 366 millones de ha.

En México la superficie de bosque percapita es de 0.5 ha y se estima que debería ser de 0.7 ha y para el 2025 será de 0.3 ha. Aunado a esto se calcula que en los

próximos 30 años habrá una reducción de 5 a 25% de la superficie de bosque (Velásquez *et al*, 2002).

La pérdida de los bosques lleva consigo una disminución en los servicios ambientales que proveen, tales como: la formación y retención del suelo evitando la erosión, la recarga de mantos acuíferos facilitando la infiltración, purificación del agua y la atmósfera, el mantenimiento de la biodiversidad a nivel poblacional, tanto específica como genética. Además proveen bienes de consumo tanto maderables como no maderables y constituyen una importante reserva de carbono, almacenando alrededor de 280 gigatoneladas en la biomasa de los árboles (Velásquez *et al*, 2002)

Una de las principales áreas de vegetación natural importante en el Distrito Federal es la Cuenca del Río Magdalena, la cual se ubica en su límite sur-occidental abarcando parte de las delegaciones Magdalena Contreras, Álvaro Obregón y Cuajimalpa (Ávila-Akeberg, 2002). Conocida comúnmente como “Los Dinamos”, dicha zona se ubica en la Sierra de las Cruces, dentro del Eje Volcánico Transmexicano (Álvarez, 2000) dentro de una altitud que va de los 2570 m a los 3850 m. Los tipos de vegetación existentes están constituidos principalmente por comunidades de *Pinus harwegii*, *Abies religiosa* y bosque mixto de *Quercus* (Álvarez, 2000; Nava y Hernández, 2003).

Es una de las principales áreas de excedente hídrico en el Distrito Federal (Mazari, 2000), donde existe una buena representación de la vegetación templada del país así como una gran diversidad florística (Ávila-Akerberg, 2002). No obstante la gran importancia ecológica de esta área, se ha visto amenazado por diversos factores de deterioro, estimando una pérdida anual de 240 ha de vegetación. Dentro de los principales factores de presión destacan los asentamientos irregulares, el crecimiento de las poblaciones rurales, la tala ilegal, los incendios, la apertura de nuevas zonas de cultivo, la ganadería no controlada y

la contaminación del aire, suelo y agua, lo cual repercute en el deterioro del ecosistema.

Debido a la destrucción acelerada de los bosques de la Cuenca del Río Magdalena, las especies arbóreas se han visto afectadas, por lo que es necesario realizar estudios de los organismos que se asocian con estas coníferas, en particular de aquellos que les proporcionan beneficios, tales como las micorrizas que hacen más eficiente su nutrición y crecimiento.

El presente trabajo se desarrolla como parte del proyecto “Manejo de ecosistemas y desarrollo humano” que tiene como objetivo construir una red de investigación enfocada al manejo sustentable de los ecosistemas con el fin de generar modelos de ordenamiento, conservación uso y restauración de los valores, los recursos y los servicios ambientales. En particular en el conocimiento de los hongos ectomicorrizógenos como elementos estructurales bióticos del ecosistema y su potencial uso en la restauración de esta zona.

1.1 Concepto de micorriza

El término micorriza, utilizado por primera vez por A. B. Frank en 1885 significa hongo-planta y se utiliza para designar la asociación mutualista entre alguna o algunas especies de hongos y las raíces o rizoides de las plantas. Donde cada raíz colonizada es considerada como una micorriza (Honrubia *et al* 1992; Lakhanpal, 2000).

La micorriza es una relación cosmopolita ya que se presenta en la mayoría de los ecosistemas terrestres y generalista porque es muy amplio el número de familias vegetales que son susceptibles de ser micorrizadas (Hernández *et al.*, 2003). No obstante, la formación exitosa de la micorriza no sólo depende del hongo y la planta, sino también de factores ambientales, físicos, químicos y biológicos.

1.2 Clasificación de las micorrizas

De acuerdo con Smith y Read (1992), dependiendo del grado de penetración, las micorrizas se pueden dividir en tres grupos: endomicorrizas, ectendomicorrizas y ectomicorrizas.

Mientras que Harley y Smith (1983) y Harley y Harley (1987) reconocen hasta siete tipos de micorrizas: arbusculares, arbutoides, ericoides, motropoides, orquidáceas, ectendomicorrizas y ectomicorrizas (Cuadro 1)

Cuadro 1: Clasificación de las micorrizas (Harley y Harley, 1987; Honrubia, 1992; Galindo, 2004).

	Tipos de Micorrizas						
	Arbus.	Arbut.	Ericoid.	Monotr.	Orquid.	Ectendo	Ectom.
Hifas septadas	-	+	+	+	+	+	+
Hifas aseptadas	+	-	-	-	-	-	+
Hifas en el interior de las células corticales	+	+	+	+	+	+	-
Presencia de manto fúngico	-	+	-	+	-	+ ó -	+
Red de Hartig	-	+	-	+	-	+	+
Hifas en forma de tirabuzón (coils) en el interior de la célula	+	+	+	+	+	+	-
Haustorios dicotómicos	+	-	-	-	-	-	-
Haustorios no dicotómicos	-	-	-	-	+ ó -	-	-
Vesículas en el interior de la célula	+ ó -	-	-	-	-	-	-
Hongos simbioses	Glomerom.	Basidio.	Asco. Basidio	Basidio.	Basidio.	Basidio. Asco.	Basidio. Asco. Zigo.
Plantas Simbioses	Briofitas Pteridofitas Gimno. Angio.	Ericales	Ericales	Monotropa.	Orchida.	Gimnos Angios.	Gimnos. Angios.

Arbus.: arbuscular, Arbut.: arbutoide, Ericoid.: ericoide, Monotr.: monotropoide, Orquidac.: orquidáceas, Ectendo.:ectendomicorriza, Ectom.: ectomicorriza, Glomerom.: glomeromicetos, Gimno.: gimnospermas, Angio.: angiospermas, Basiodio.: basidiomicetos, Asco.: ascomicetos, Monotropa.: monotropaceae, Zigo: zigomicetos

1.3 La ectomicorriza (EM)

Las ectomicorrizas se desarrollan prioritariamente en climas templados-fríos, característicos de bosques de coníferas y bosque mesófilo de montaña (Kong-Luz, 2003). Se encuentran asociadas con árboles y arbustos, y pocas veces con herbáceas (Kaul, 2002). Se caracterizan por una cubierta compacta bien desarrollada de micelio fúngico que rodea la raíz de las plantas llamado manto. Estas hifas tienen la capacidad de secretar enzimas, involucradas en la mineralización de la materia orgánica al suelo para liberar los nutrientes (Nava y Hernández, 2003). El manto actúa como barrera de protección frente a patógenos y como estructura de almacenamiento de sustancias de reserva y minerales.

El manto puede variar en grosor y su superficie puede observarse lisa algodonosa, aterciopelada o hasta granular. Las hifas pueden o no estar ramificadas y/o septadas y son de color variable (hialinas, negras en distintas tonalidades, naranjas, rojas, etc.) (Moore-Landecker, 1990; Lankhanpal, 2000).

Las hifas del manto penetran entre las células corticales o epidérmicas de la raíz de gimnospermas y angiospermas, formando la Red de Hartig, cuya principal función es el intercambio de nutrientes. En este tipo de micorriza no existe penetración a la célula hospedera (Moore-Landecker, 1990; Lankhanpal, 2000; Kaul, 2002).

Las raíces micorrizadas carecen de pelos radicales y a diferencia de las endomicorrizas modifican la morfología de la raíz (Fig. 1).

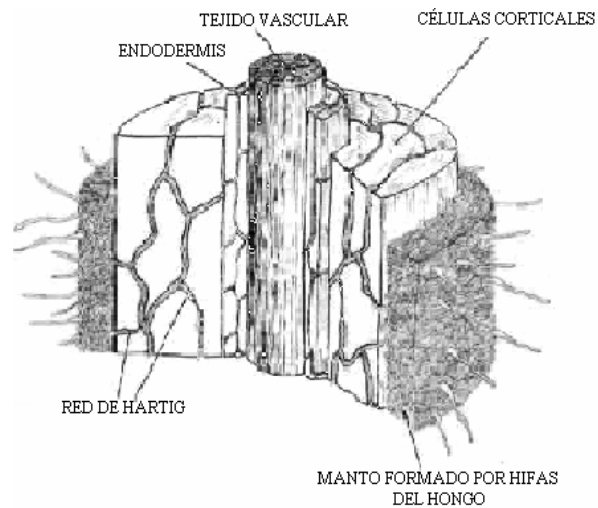


Fig.1. Estructura de la ectomicorriza
(Tomado de Jackson y Manson, 1983)

Los hongos que participan en este tipo de asociación pertenecen a las clases de Zygomycetes, Hyphomycetes, Ascomycetes y Basidiomycetes, en donde ésta última es la mejor representada con el mayor número de familias y géneros (Brundett *et al.*, 1994).

Las familias de plantas participantes son: Pinaceae, Gnetaceae, Cupressaceae, Betulaceae, Cistaceae, Dipterocarpaceae, Fagaceae, Salicaceae, Tiliaceae, (Brundett *et al.*, 1994; Lankhanpal, 2000; Kaul, 2002).

1.4 Beneficios de la asociación

1.4.1 Beneficios para la planta

Esta relación favorece la captación de agua y nutrimentos minerales debido al sistema enzimático de los hongos, la distribución geométrica del micelio y el incremento de la superficie de absorción, lo que hace a la micorriza más efectiva

en la captación y absorción con respecto a las raíces no micorrizadas (Moore-Landecker, 1990; Kaul, 2002).

Se ha mencionado que el intercambio de fuentes de carbono de la planta al hongo es de entre el 4 y el 20%; mientras que el hongo puede proveer a la planta hasta el 80% y 25% de los requerimientos de P y N, respectivamente. Aunque también se ha confirmado intercambio de elementos como K, Ca, S, Zn, Cu, Sr, etc. (Francis y Read, 1994; Sylvia, 1999, Hernández *et al.*, 2003). La mejora nutricional e hídrica aunada a la producción de fitohormonas por parte del hongo se ve reflejada en un óptimo crecimiento vegetal. Además la micorriza provee resistencia a la planta frente a condiciones adversas y protección contra el ataque de organismos patógenos actuando como barrera física o produciendo antibióticos (Moore-Landecker, 1990; Honrubia, 1992; Nava y Hernández, 2003).

1.4.2 Beneficios para el hongo

En la asociación micorrízica la planta provee al hongo de compuestos orgánicos incluyendo una importante fuente de carbono; diversos autores establecen que alrededor del 30% de la tasa fotosintética neta puede ser utilizada por el hongo (Harley, 1973; Söderström y Read, 1987; Smith y Read, 1992).

La asociación micorrízica es una de las adaptaciones que desarrollaron las plantas para competir por nutrimentos y se ha propuesto que fue un factor determinante en la colonización exitosa de las plantas al medio terrestre al resolver dos grandes problemas: la desecación y la captación de nutrimentos en sustratos deficientes de éstos, tal afirmación se basa en la existencia de registros fósiles de endomicorrizas y ectomicorrizas (LePage *et al.*, 1997; Nava y Hernández, 2003).

1.5 Importancia de EM

La importancia del estudio de las ectomicorrizas radica en que el conocimiento generado es útil para optimizar la producción de plántula destinada a programas de reforestación, puesto que el crecimiento de las coníferas no es el óptimo sin la formación de la micorriza, debido a que ésta aumenta la superficie de absorción y hace eficiente el transporte, el almacenamiento y la translocación de componentes inorgánicos al hospedero. En estudios realizados se ha observado que los compuestos de carbono en forma de aminoácidos y carbohidratos pueden ser transportados entre plantas mediante las hifas (Amarantus y Perry, 1994). Asimismo, se ha registrado la producción de sustancias antagonistas a los patógenos vegetales (Harley y Smith, 1983).

Además algunos de los géneros de hongos que participan en la formación en esta asociación producen esporocarpos con importancia alimenticia y económica, como es el caso de *Laccaria*, *Lactarius*, *Buletus* y *Amanita*.

1.6 Importancia del carbono, nutrimentos y pH en el crecimiento de los hongos ectomicorrizógenos (HEM).

La formación de la micorriza no solo depende de la presencia del hongo y la planta, sino también están involucradas ciertas condiciones macro y micro ambientales que favorecen esta asociación. Se pueden considerar factores químicos, biológicos y físicos como la temperatura, pH, nutrimentos y agua, (Francis y Read, 1994).

La interacción C/N juega un papel determinante en la interacción micorrizógena, ya que la formación de la micorriza se ve perjudicada a altas concentraciones de nitrógeno debido a que esta condición limita la disponibilidad de las fuentes de

carbono y los fotosintatos son utilizados directamente en la planta. Mientras que bajo condiciones altas de CO₂ se incrementa la actividad de las hojas y por lo tanto los productos fotosintéticos son utilizados en la formación y mantenimiento de la micorriza (Buscot *et al.*, 2000).

El pH tiene un efecto directo en la disponibilidad de compuestos como el nitrógeno, fósforo, calcio y magnesio. La capacidad que tienen los hongos de tolerar diferentes pH puede influir en la colonización y establecimiento de las micorrizas (Hormilla *et al.*, 1994, tomado de Galindo y Santiago-Martínez, 2003), por lo que es necesario determinar el valor óptimo para su crecimiento. Según datos bibliográficos, los valores óptimos para su crecimiento oscilan, generalmente, entre 4.5 y 5.5 Esta capacidad puede utilizarse como uno de los criterios de la selección de HEM.

1.7 Algunos aspectos ecológicos de las ectomicorrizas

Molina y Trape (1982) mencionaron que los hongos difieren en la habilidad para formar micorrizas y las agruparon en tres categorías:

1. Hongos con amplio potencial ectomicorrízico, baja especificidad y esporocarpos asociados con diferentes hospederos en el campo.
2. Hongos con potencial ectomicorrízico intermedio que se asocian con un grupo limitado de hospederos.
3. Hongos con potencial ectomicorrízico estrecho, los cuales solo pueden formar la asociación con una especie o género de hospedero.

Los autores relacionan esta capacidad con factores de reconocimiento común entre los hongos ectomicorrízicos y los hospederos.

1.8 Estudios realizados sobre las ectomicorrizas

En otros países existen numerosos estudios sobre la ecología de estos hongos: el proceso de formación y la descripción de las ectomicorrizas en especies particulares (Won *et al.*, 1989 citado por Bledsoe, 1992). Descripciones de la

composición de las especies de hongos (Villeneuve *et al.*, 1988; Arnolds, 1991), los cambios en la diversidad, riqueza y abundancia (O'dell *et al.*, 1999) y la estructura de la comunidad de hongos (Mason *et al.*, 1982). También existen trabajos enfocados a las etapas sucesionales de los HEM como es el caso de los trabajos de Mason y colaboradores (1982 y 1983), Dighton y Manson (1985), Last *et al.* (1987), Gibson y Deacon (1988) y Newton (1992). No obstante, estos trabajos se han enfocado básicamente al estudio de los carpóforos (Read, 1992 citado por Estrada-Torres, 2003; Burnett, 2003).

Desde el punto de vista ecofisiológico se han realizado estudios para determinar la capacidad que tienen diferentes especies de hongos para absorber y translocar nutrimentos como fósforo y nitrógeno del suelo hacia la raíz de la planta hospedera (Bledsoe, 1992; Miller y Allen, 1992; Olsson, 1995); se ha evaluado también la capacidad que presentan ciertos HEM a crecer en pHs extremos (Yamanaka, 2003), bajo temperaturas extremas, o utilizando distintas concentraciones y fuentes de carbono (Björkman, 1942; Palmer y HacsKaylo, 1970; Inechen y Wiemken, 1992; citados por Galindo, 2004; Daza *et al.*, 2006); se ha estudiado la actividad enzimática de géneros particulares (Dighton, 1983; Mousain, 1988; Ho, 1989; citados en Cairney, 1998), así como el papel que juegan compuestos como el nitrógeno, el carbono y algunos azúcares en la formación de la micorriza (Buscot *et al.*, 2000).

Otros trabajos han hecho hincapié en las caracterizaciones macroscópicas de los micelios de algunos HEM (Hutchison, 1991; Sánchez *et al.*, 2000; Agerer, 2006) o estrategias de crecimiento que presentan los HEM *in vitro* (Sánchez *et al.*, 2000; Agerer, 2001).

1.9 Estudios sobre el aislamiento y el crecimiento *in vitro* de HEM en México

Para el caso de México, los trabajos que encontramos son principalmente listados de especies ectomicorrizógenas que se encuentran asociadas a diferentes tipos

de vegetación, tal es el caso de los estudios realizados por León y Guzmán (1980), Quintos *et al.* (1984) y Garza *et al.* (1985) que aportan listados de hongos ectomicorrizógenos en el sur de Veracruz, Durango y la parte central de Nuevo León, respectivamente. Otros autores especifican la especie del hospedero con la que se asocia cada especie de hongo (León y Guzmán, 1980; Garza-Ocañas, 1986; Villarreal y Pérez-Moreno, 1989, Kong-Luz, 1998; Kong-Luz *et al.*, 2002).

Se han realizado estudios sobre el aislamiento y caracterización de cepas de HEM ya sea a partir de la micorriza ya formada (Peña-Cabriales y Valdés, 1974; Delgado, 2004 o a partir de los cuerpos fructíferos, analizando: caracterización del micelio (Ávila, 1988; Cruz-Ulloa, 1990 y 1991; Pérez-Moreno y Ferrera-Cerrato, 1991, Santiago-Martínez, 1992) y optimización del crecimiento de los hongos en diferentes medios nutritivos (Cuaxilo, 1991; Santiago-Martínez *et al.*, 1995 y 2003; Aquiahuatl *et al.*, 2000), pruebas fisiológicas (Vázquez-Marrufo *et al.*, 1998), efecto de la glucosa (Aquiahuatl *et al.*, 1998; Galindo, 2004), crecimiento en distintos pH (Vázquez-García *et al.*, 2002) y el efecto fungicidas en el crecimiento de las cepas (Santiago-Martínez *et al.*, 1997 y 2002).

1.10 Justificación

Debido a la importancia de los bosques que se distribuyen en la Cuenca del Río Magdalena (CRM) en cuanto a los bienes y servicios ambientales que proveen, es necesaria su conservación y reforestación frente a la gran pérdida de cobertura forestal que se ha observado en las últimas décadas.

Una herramienta para optimizar la reforestación es la utilización de los hongos ectomicorrizógenos (HEM), ya que ayudan al crecimiento de las plantas debido al incremento de la superficie de absorción, aumento en la captación de agua y nutrimentos, además de proteger a las raíces de organismos patógenos.

Para esto se deben considerar HEM nativos de esta zona con potencial para la micorrización de plántula, por lo que se deben realizar pruebas fisiológicas del

micelio *in vitro* con el fin de conocer las condiciones óptimas de su crecimiento y seleccionar así los hongos más apropiados para la producción de inóculo e inoculación de planta, favoreciendo con ello su crecimiento en condiciones de vivero para su posterior trasplante y establecimiento en campo.

Debido a que el tipo y la cantidad de la fuente de carbono, los nutrimentos y el pH son factores determinantes en la sobrevivencia y crecimiento de los HEM, es de gran importancia aproximarse a los valores que optimizan el desarrollo de diferentes cepas de HEM de la CRM.

La importancia de la caracterización macro y microscópica radica en que los atributos específicos que se presentan bajo condiciones *in vitro*, pueden ser utilizados como un aporte de datos adicionales a los caracteres taxonómicos de los carpóforos. De ahí la necesidad de definir criterios de clasificación de los HEM con respecto a rasgos ecológicos importantes. Además de que sus características de crecimiento nos pueden brindar información sobre su comportamiento en la rizosfera.

1.11 Objetivo general

Evaluar el crecimiento micelial *in vitro* de las cepas de tres especies de hongos potencialmente ectomicorrizógenos asociados a los bosques de la Cuenca del Río Magdalena bajo diferentes condiciones de cultivo.

1.12 Objetivos particulares

Recolectar de carpóforos de hongos potencialmente ectomicorrizógenos (HEM) asociados a los bosques de *Pinus hartewii* y *Abies religiosa* de la Cuenca del Río Magdalena y aislar el micelio de aquellos que correspondan a etapas tempranas de desarrollo.

Caracterizar la morfología macro y microscópica de algunas cepas de HEM aisladas en diferentes condiciones de cultivo: cuatro concentraciones de glucosa, tres medios de cultivo y tres pHs.

Evaluar el efecto de las diferentes condiciones de cultivo a las que serán sometidas algunas cepas de HEM sobre su producción de biomasa, diámetro final, relación biomasa/área y velocidad media de crecimiento.

Capítulo 2. Zona de estudio

2.1 Localización geográfica

La Cuenca del Río Magdalena (CRM) conocida también como “La Cañada de Contreras”, “Los Dinamos” o “Zona de protección Forestal Cañada de Contreras”, se ubica dentro del Eje Neovolcánico Transmexicano, dentro de la Cuenca de México en la vertiente occidental de la Sierra de las Cruces, en la zona contigua a la Sierra del Chichinautzin, siendo un parteaguas entre ésta y la Cuenca del Balsas (Ávila-Akeberg, 2002). Colinda al sureste con la Cuenca del Río Eslava, al noroeste con las cabeceras de las Cuencas de los Ríos Hondo, Mixcoac, Barranca de Guadalupe y San Miguel, que se unen al Río Magdalena formando el río Churubusco donde son entubados (Jujnovsky, 2003). Se localiza a $19^{\circ} 15' 00''$ N y $99^{\circ} 17' 30''$ W, con una superficie aproximada a las 3000 ha. La cuenca pasa por las delegaciones Magdalena Contreras (60%), Álvaro Obregón (30%) y Cuajimalpa (10%).

2.2 Características del suelo

La Cuenca del Río Magdalena es una formación de material ígneo extrusivo (Terciario y Cuaternario) donde predominan las andesitas y dacitas. Los suelos son en su mayoría de tipo Andosol Húmico, también encontramos Andosoles Mólico y Ócrino y mezclas con Litosoles. La profundidad varía de 5 a 50 cm. El pH es ácido con valores desde 3 hasta 6.1 y el contenido de materia orgánica varía entre el 11 y el 47% dependiendo de la zona (Jujnovsky, 2003).

2.3 Relieve

Los bosques de la Cuenca de Río Magdalena se desarrollan en un relieve montañoso. Las altitudes van de 2570 m snm en el noroeste, incrementando en dirección NE a SO y a ambos lados de la cuenca, hasta 3850 m snm en el

extremo SW. El extremo noreste es el la parte más baja de la cuenca, con pendientes inclinadas que forman un desnivel de 400 m (Jujnovsky, 2003).

2.4 Clima

Por el gradiente altitudinal se forman dos tipos de clima: templado subhúmedo C (w2) (w) b (i'') hasta los 3050 m snm y el semifrío C (b') (w) b i, desde los 3100 hasta los 3800 m snm (García, 1978). Las lluvias son en el verano, con menos del 5% en invierno.

La Cuenca del Río Magdalena se encuentra en la zona templada subhúmeda (Toledo y Ordoñez, 1998), la cuál corresponde al tipo de vegetación de bosque de pino y encino.

2.5 Vegetación

Se distinguen tres tipos de comunidades vegetales y ocho asociaciones (Cuadro 2; Figuras 2, 3, 4).

Cuadro 2. Comunidades vegetales

Comunidad vegetal	Asociación Vegetal
Bosque de <i>Pinus hartwegii</i> (3420-3800 m snm)	<i>Muhlenbergia quadridentata-Pinus hartwegii</i> <i>Festuca tolucensis-Pinus hartwegii</i>
Bosque de <i>Abies religiosa</i> (2750-3500 m snm)	<i>Acaena elongata-Abies religiosa</i> <i>Senecio angulifolius-Abies religiosa</i> <i>Abies religiosa-Senecio cinerarioides</i>
Bosque mixto (2600-3370 m snm)	<i>Abies religiosa-Quercus laurina</i> <i>Quercus laurina-Quercus rugosa</i> <i>Pinus patula-Cupressus lusitanica</i>

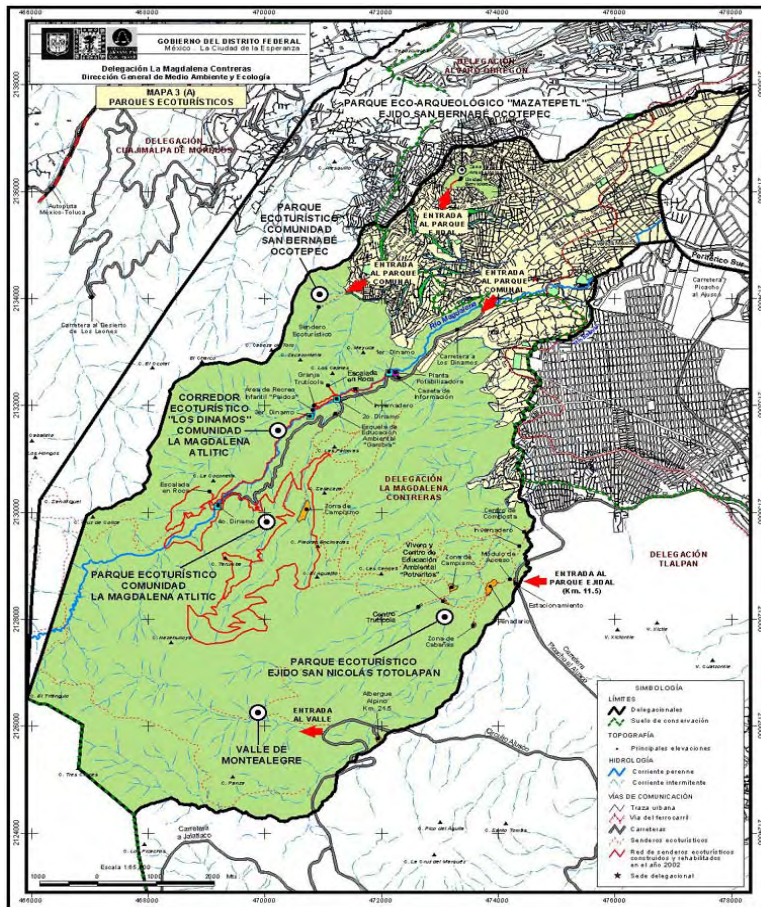


Figura 2. Mapa del bosque de la CRM



Figura 3. Bosque de *Abies*



Figura 4. Bosque de *Pinus*

Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1 Recolección de material biológico

Durante Agosto y Septiembre del 2006 se realizaron salidas quincenales a los bosques de la Cuenca del Río Magdalena y se visitaron tres comunidades vegetacionales: bosque de *Pinus hartwegii*, bosque de *Abies religiosa* y bosque de *Quercus* spp.

En cada comunidad se realizó un muestreo dirigido a la recolección de carpóforos de hongos ectomicorrizógenos en buen estado y de etapas tempranas, preferentemente, aunque no exclusivamente.

Los carpóforos se envolvieron en papel encerado y se colocaron en una canasta para su transporte al laboratorio donde se continuó con la caracterización macroscópica considerando elementos de importancia taxonómica (Delgado, 2005; Franco-Molano *et al.* 2005).

3.2 Aislamiento y cultivo puro de HEM

Para el aislamiento se seleccionaron, preferentemente, los carpóforos inmaduros y/o en buenas condiciones, sin daño mecánico evidente.

Se procedió al aislamiento bajo condiciones axénicas, según el procedimiento de Molina y Palmer (1982). Se tomaron tres muestras de aproximadamente 4X4 mm de tejido fúngico, del contexto del píleo o del estípote, y se colocaron en cajas de Petri de 100x20 mm con medio nutritivo de papa-dextrosa-agar (PDA). Se incubaron a 25° C en condiciones de oscuridad, con al menos tres repeticiones por especie. Las cepas que se lograron aislar fueron revisadas periódicamente con el fin de detectar contaminación. Antes de ser sometidas a las pruebas de crecimiento las cepas fueron revisadas microscópicamente con el fin de descartar

la presencia de estructuras de reproducción asexual que indicaran contaminación por algún otro tipo de hongo.

Para su mantenimiento se resembraron mensualmente en medio fresco.

Las cepas se encuentran depositadas en el Cepario de Hongos Ectomicorizógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

3.3 Pruebas de crecimiento

De las cepas aisladas se seleccionaron tres correspondientes a los géneros *Suillus*, *Boletus* e *Inocybe*.

Se sometieron a tres condiciones de cultivo:

1. Concentraciones de glucosa: tomando como base el medio Biotina aneurina ácido fólico (BAF) se modificó la cantidad de glucosa presente en éste. Las variables fueron: 10, 20, 30 y 40 gramos de glucosa por L.
2. Medios nutritivos: con tres variables, Biotina aneurina ácido fólico (BAF), extracto de malta agar (EMA) y papa dextrosa agar (PDA)
3. pH: tomando base el medio BAF con tres variables, pH 3, 5 y 7 el cual se ajustó agregando HCl o NaOH dependiendo del caso.

Las cepas fueron resembradas en medio BAF fresco, el micelio obtenido después de un mes de crecimiento se cortó en cuadritos de aproximadamente 4 mm por lado y fué sembrado en cajas Petri de 100x20 mm adicionadas con 30 ml de medio con alguna de las concentraciones de glucosa, medios nutritivos o pH. Se sembraron como mínimo tres repeticiones por cepa en cada prueba. Las cajas se mantuvieron a 25°C en oscuridad por 30 días, periodo en el cuál se evaluaron algunas variables de crecimiento. Al término se procedió a la caracterización macro y microscópica de las cepas.

La selección de los medios y las concentraciones se hizo en base a trabajos ya realizados donde se reportan las condiciones en las cuales se optimiza el crecimiento Cuaxilo, 1991; Santiago-Martínez *et al.*, 1995 y 2003; Aquiahuatl *et al.*, 2000). La utilización del medio BAF en la prueba de glucosa se basa en que este es un medio enriquecido para ectomicorrizas. Se seleccionaron estos pH debido a que se encuentran en el rango registrado en la Cuenca del río Magdalena (Ávila-Akeberg, 2002)

Las cepas fueron seleccionadas considerando los criterios propuestos por Molina y Trappe (1984) entre las que destacan:

- Buen crecimiento *in vitro*
- Adaptaciones ecológicas especiales, tales como: tolerancia a pH extremos y altas temperaturas
- Efectividad en la formación de ectomicorrizas
- Amplia gama de hospederos

3.4 Caracterización morfológica macro y microscópica de las cepas

Se realizó la caracterización morfológica de las cepas para cada una de las condiciones de cultivo (concentraciones de glucosa, medios y pH), con base en los criterios de Pantidou (1961), Nobles (1965) y Pantidou y Groves (1966).

En la caracterización macroscópica se consideraron las siguientes características: color y textura del micelio, forma y margen de la colonia, presencia de exudados, cambio en la coloración del medio, y coloración del reverso de la colonia (Agerer, 1986).

La caracterización microscópica consistió en la observación de muestras de micelio tomadas a lo largo del radio de la colonia en microscopía de campo claro y de contraste interferencial de Nomarski. Se describieron las siguientes características de las hifas: diámetro, color, morfología, tipo de ramificación, terminaciones y unión, presencia de vesículas intercalares, fíbulas, y cristales.

Los colores se caracterizaron mediante la comparación del micelio y el medio con las tablas de colores de Munsell (1975) y Methuen (Kornerup y Wanscher, 1984). Posteriormente se hará referencia a ellas con una nomenclatura alfanumérica: número-letra-número (#L #) para Munsell y número-letra-numero/número para Mathuen (#L #/#).

3.5 Evaluación de variables de crecimiento

Se consideraron cuatro variables en la evaluación del crecimiento de las cepas:

1. La biomasa (mg): consistió en evaluar el peso seco de la colonia a los treinta días de crecimiento, para lo cual se eliminó el agar del micelio y éste se mantuvo en una estufa a 60°C hasta que se obtuvo peso constante.
2. Diámetro final (mm): se determinó mediante la medición del diámetro de la colonia con un Vernier a los treinta días de crecimiento
3. La relación biomasa/área (mg/mm²): se obtuvo del cociente de la biomasa entre el área de la colonia.
4. La tasa media de crecimiento (mm/día): se realizaron mediciones del diámetro de la colonia cada tercer día por treinta días, obteniendo un total de 15 mediciones. Los datos se graficaron y ajustaron a un modelo de regresión lineal a partir del cual se obtuvo el valor de la pendiente, que fue considerada como la tasa media de crecimiento. Las mediciones se realizaron entre las 9 y las 11 de la mañana bajo luz fría artificial.

Se analizó cada variable mediante un Análisis de Varianza de una vía, para conocer si existe alguna diferencia de crecimiento entre los tratamientos de las distintas pruebas. Se aplicó un análisis de comparación múltiple de Tukey para conocer los tratamientos que fueron estadísticamente diferentes. Se utilizó el programa SPSS para analizar los datos con un nivel de significancia del 95% (Zar, 1984; SPSS 13, 2002).

Capítulo 4. Resultados y discusión

4.1 Recolección y aislamiento del material biológico

Se realizaron en total cinco salidas para la recolección de carpóforos de hongos potencialmente ectomicorrizógenos (Cuadro 3),

Comunidad vegetal	Altura (m snm)
Bosque de <i>Pinus</i>	3287
Bosque de <i>Quercus</i>	2620
Bosque de <i>Abies</i>	3268
Bosque de <i>Abies</i>	3245
Bosque de <i>Abies</i>	3234

Cuadro 3. Comunidades vegetales muestreadas

Se recolectaron un total de 131 morfotipos, 96 en bosque de *Abies*, 31 en bosque de *Pinus* y cuatro en *Quercus*. Los morfotipos se agruparon en 14 géneros (Cuadro 4).

El género más abundante fue *Inocybe*, seguido de géneros como *Boletus*, *Laccaria* y *Amanita*.

Clasificación	<i>Pinus</i>	<i>Abies</i>	<i>Quercus</i>	TOTAL
Reino: Fungi				
Phylla: Basidiomycota				
Clase: Holobasidiomycetes				
Subclase: Hymenomycetidae				
Orden: Russulales				
Familia: Russulaceae				
Género: <i>Russula</i>		6		5
Género: <i>Lactarius</i>		5		6
Orden: Cortinariales				
Familia: Cortinariaceae				
Género: <i>Inocybe</i>	12	58	4	74
Orden: Boletales				
Familia: Boletaceae				
Género: <i>Suillus</i>	1	3		4
Género: <i>Boletus</i>	3	7		10
Orden: Agaricales				
Familia:				
Tricholomataceae	6	4		10
Género: <i>Laccaria</i>				
Familia: Amanitaceae				
Género: <i>Amanita</i>	7	4		11
Otros	2	9		11
TOTAL	31	96	4	131

Cuadro 4. Morfotipos recolectados en cada bosque por género.

Para la Cuenca del Río Magdalena, Delgado (2004) reportó 41 especies de hongos potencialmente ectomicorrízicas; 14 especies de *Inocybe*, 12 de *Amanita*, cinco de *Russula*, tres de *Lactarius*, dos de *Suillus* y una de cada uno de los géneros de *Cantharellus*, *Laccaria*, *Helbeloma*, *Boletus* y *Scleroderma*. Asimismo Villarruel y Cifuentes (2006) reportaron 74 especies de hongos recolectados en los tres tipos de vegetación de la cuenca, de los cuales 59 corresponden a especies saprobias y 15 son ectomicorrizógenas, de éstas últimas 14 corresponden a HEM de etapas tardías y 1 de etapas tempranas (seis del género *Amanita*, dos de cada

género *Boletus* y *Russula* y una a cada uno de los géneros de *Cantharellus*, *Lactarius*, *Lepista*, *Tuber* y *Tylopilus*).

Estos autores registraron 9 especies ectomicorrizógenas en bosque de *Pinus* y 7 para cada uno de los bosques mixto y *Abies*. Tres especies se comparten en las comunidades de *Abies* y bosque mixto, una en el bosque de *Pinus* y bosque mixto y dos especies se comparten en las tres comunidades vegetacionales.

Los géneros reportados en este trabajo ya habían sido reportados por Delgado (2004) y Villarruel y Cifuentes (2006), pero cabe señalar que los tres HEM identificados a nivel de especie que se utilizaron en las pruebas de crecimiento constituyen nuevos registros para la zona.

Considerando los datos anteriores se puede observar que el grupo de los hongos ectomicorrizógenos está bien representado y la diferencia entre la riqueza de especies de las diferentes comunidades puede estar relacionada con el grado de perturbación que presentan (Villeneuve *et al.* 1988)

A diferencia de los dos trabajos señalados anteriormente, para este trabajo en particular se encontró una menor riqueza en bosque de *Quercus*, fenómeno que puede estar relacionado con la mayor exposición a la actividad antropogénica, ya que la parte baja de la cuenca es utilizada como área de turismo, recreación y asentamientos irregulares.

El bosque de *Abies* al igual que el de *Pinus* no son tan afectados por esta actividad debido a la altitud en la que se encuentran. Pero se ven afectadas por otras actividades como lo es la ganadería. Cabe mencionar que el bosque de *Abies* se podría considerar la comunidad menos perturbada de las tres, lo cual se puede ver reflejado en la riqueza de géneros de HEM encontrada.

La riqueza encontrada puede explicarse de acuerdo con lo reportado por Villeneuve *et al.* (1988) quienes registran que en bosques cerrados, con poco grado de perturbación, las especies dominantes son ectomicorrizógenas; este hecho se ve reflejado en la CRM, en donde se presentan bosques perturbados y su riqueza de especies es baja, lo cual puede ser reflejo de la competencia existente por nutrimentos. Asimismo, señalan que la riqueza de especies de HEM varía en función del porcentaje en la cobertura vegetal, gradientes ecológicos y climáticos, el microclima, la fertilidad del suelo y las condiciones extremas. Además de que la estabilidad de un bosque se ve reflejada en la abundancia, la equidad y el tipo de especies que encontramos en él, es decir la presencia y proporción de especies HEM de etapas tempranas o tardías, generalistas o específicas y ectomicorrizógenos obligados o facultativos.

Según Bowen (1994) los hongos ectomicorrizógenos pueden ser considerados de etapas tempranas cuando la germinación de sus esporas es estimulada por las raíces de las plantas, estos hongos se asocian en las primeras etapas de vida de las plántulas y conforme las plantas alcanzan su madurez son remplazadas por especies de etapas tardías. Especies de los géneros *Inocybe*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Suillus* y *Thelephora* son consideradas de etapas tempranas, mientras que *Lactarius*, *Russula*, *Leccinum*, *Boletus* y *Cortinarius* lo son de etapas tardías (Mason *et al.* 1982, Dighton y Mason, 1985).

Los términos generalista y especialista se refieren a la especificidad de hospedero que presentan los HEM. Los hongos generalistas pueden formar asociaciones micorrízicas con una gran variedad de géneros y familias de plantas. Mientras que los especialistas son más selectivos, asociándose sólo con alguna familia de plantas y en algunos casos sólo con algunas especies. Tal es el caso de *Suillus* que se asocia sólo con miembros de la familia Pinaceae (Duddridge, 1987 tomado de Estrada-Torres, 2003). Esto coincide con lo observado en la Cuenca del Río Magdalena, donde el género *Suillus* se encontró asociado a individuos del género *Pinus*, ya sea en bosque exclusivo de dicha especie o en algunas zonas de

bosque de *Abies* en donde se observó introducción de plántulas de *Pinus* como estrategia de reforestación.

Por otro lado, algunos HEM son micorrizógenos obligados, para los cuales es indispensable la asociación micorrizógena para completar su desarrollo, o micorrizógenos facultativos los cuales pueden desarrollarse sin la presencia de la planta.

La riqueza de géneros que se encontraron en esta zona puede ser el reflejo de la edad del bosque, puesto que la mayor cantidad de géneros encontrados fueron de hongos que se asocian a plantas maduras, tal es el caso de *Amanita*, *Lactarius*, *Russula* y *Boletus*. La presencia de pocos géneros de etapas tempranas como *Inocybe*, *Suillus* y *Laccaria*; es indicativo de una baja regeneración del bosque, ya que son pocas las plántulas que están creciendo y con las que éstos se pueden asociar.

Por lo que se pudo observar en campo, la regeneración de estos bosques se lleva a cabo de manera artificial mediante la reforestación con plantas no nativas de la zona.

4.2 Aislamiento *in vitro*

En cuanto al aislamiento de cepas de hongos potencialmente ectomicorrizógenos, se realizaron 54 aislamientos, pero debido a que algunos hongos son ectomicorrizógenos obligados ó de etapas tardías su sobrevivencia en condiciones *in vitro* se dificultó. Se lograron aislar y mantener siete cepas: dos de los géneros *Inocybe* (GF2242 y GF2248) y *Boletus* (GF2162 y GF 2160), una de cada uno de los géneros de *Suillus* (GF2161), *Amanita* (GF2211) y *Laccaria* (GF2264).

Las cepas de *Inocybe*, *Amanita* y *Laccaria* fueron aisladas de hongos procedentes del bosque de *Abies*, mientras que las cepas de *Boletus* y *Suillus* son de hongos de bosque de *Pinus*.

4.3 Selección de Cepas de HEM para realizar las pruebas de crecimiento bajo diferentes condiciones de cultivo.

De las cepas aisladas se seleccionaron tres para someterlas a las pruebas de crecimiento, identificadas taxonómicamente como *Suillus brevipes* (GF2161), *Boletus pinophilus* (GF2162) e *Inocybe aff. splendens* (GF2242). Las cepas fueron depositadas en el Cepario de hongos ectomicorrizógenos del Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT) y a cada una se les asignó un número de registro: TLAX62, TLAX63 y TLAX64, respectivamente.

La selección de las cepas se basó en la facilidad de aislar aquellos hongos que se asocian con las plantas en las primeras etapas de su vida y al grado de interdependencia entre ambos simbioses, ya que es más exitoso el aislamiento y mantenimiento de las cepas de HEM facultativos o de etapas tempranas que de obligados y de etapas tardías.

Se seleccionaron las cepas pertenecientes a los géneros de *Suillus*, *Inocybe* y *Boletus* considerando que ya existen algunos trabajos acerca del aislamiento y pruebas fisiológicas.

Particularmente, el género *Suillus* es de los más estudiados y ha sido frecuentemente utilizado en estudios sobre fisiología, síntesis *in vitro* y de poblaciones (Klironomos y Kendrick, 1993; Dahlberg y Finlay, 1999).

4.4 Algunas características de los géneros seleccionados.

Suillus es un género que forma basidiomas epígeos con himenóforos tubulares; contribuyen con la mayor producción de esporocarpos en los bosques de coníferas. Son de fácil aislamiento y frecuentemente utilizado en estudios de fisiología. Las especies de este género son HEM exclusivos de la familia Pinaceae. En especial *Suillus brevipes* se encuentra en bosques jóvenes y asociado en etapas tempranas con las coníferas. (Cruz-Ulloa ,1990; Bowen, 1994; Pantidou y Groves, 1966; Dahlberg y Finlay, 1999; Sánchez *et al* 2000; Santiago-Martinez 1992 y 2002; Vázquez-García *et al.*, 2002; Aquiahuatl, 2003; y Galindo, 2004).

Inocybe pertenece a la familia Cortinariace; este género presenta láminas adheridas al estípote donde microscópicamente pueden observarse diversos tipos de cistidios. En los carpóforos maduros el velo interno se transforma en una cortina, cuyos restos quedan como fibrillas en el borde del píleo (Herrera y Ulloa, 1990). Este género ha sido reportado como HEM de etapas tempranas (Bowen, 1994). El comportamiento *in vitro* de este género es prácticamente desconocido, salvo por el trabajo realizado por Cruz Ulloa (1990). La mayor parte de la información encontrada se restringe básicamente a listados, descripciones de especies y descripción macro y microscópica de las micorrizas encontradas en campo (Hutchinson, 1991, Delgado, 2004 y Agerer, 2006,).

El género *Boletus* comprende numerosas especies con carpóforos relativamente grandes y carnosos. *B. pinophilus* presenta un contexto blanco o amarillento y no registra cambio de coloración al maltrato. Las superficie del píleo presenta coloraciones café rojizo con partes decoloradas. De estípote ancho y reticulado blanco y en ocasiones amarillento (Herrera y Ulloa, 1990). Ha sido reportado como de etapas tardías (Bowen, 1994). Semejante al caso anterior el conocimiento que se tiene es escaso, salvo algunos listados donde se reportan especies de este género y algunas descripciones de las micorrizas (Agerer, 2006; López 2000),

aunque si se encuentra algunos trabajos de cultivo puro de éste género (Hutchinson 1991 y Sánchez *et al.*, 2000).

4.5 Caracterización morfológica y evaluación de las variables de crecimiento en *S. brevipes* (TLAX 62)

4.5.1 Caracterización morfológica macro y microscópica de *S. brevipes* TLAX62

De forma general, se observó que en las tres pruebas esta cepa presentó coloraciones que van de amarillo pálido a café oscuro o café amarillento. La forma de la colonia varió de regular circular u ovalada a ligeramente irregular con lóbulos poco marcados, con un margen liso y algunas veces finamente fimbriado. De textura aterciopelada, micelio algodonoso compacto y en ocasiones con presencia de micelio aéreo laxo; sólo en PDA el micelio fue laxo. Se observaron círculos concéntricos de distintas coloraciones y grados de compactación del micelio; además de pliegues radiales. Hubo presencia de exudados desde hialinos hasta tonalidades café fuerte y café amarillento. También se registró un cambio en la coloración del medio a tonos amarillos, café oscuro rojizo y café amarillento (Figura 5).

Microscópicamente presentó hifas septadas de pared delgada y rugosa, coloraciones amarillentas y diámetro de 1.554- 3.470 μm . Con ramificación dicotómica y en la prueba de concentración de glucosa rara vez tricotómica. Las terminaciones de las hifas fueron redondeadas y ocasionalmente globosas o en forma de gancho. Presencia de hifas oleíferas de color amarillo oliva en la prueba de concentración glucosa. Además se encontraron vesículas intercalares en las pruebas de concentración de glucosa, medios y en pH 5 (Figura 6).

Las características macro y microscópicas coincidieron con las reportadas por Pantidou y Groves (1966) y Cruz-Ulloa (1990) que describió las características de tres cepas *Suillus granulatus*, una de cada una de las especies de *S. luteus* S.

punctatus y *S. tormentosus*. Sánchez *et al.*, (2000) reportaron las características de tres cepas pertenecientes a las especies: *S. collinitus*, *S. variegatus*, *S. granulatus*, *S. luteus* en medio MMN y BAF. Dichas cepas presentaron colonias aterciopeladas de color café y con presencia de micelio aéreo blanco, margen regular algo lobulado, cambio en la coloración del medio y presencia de exudados amarillo-café. Hifas de diámetro similares, hialinas y en ocasiones café amarillentas y ramificaciones dicotómicas, con vesículas intercalares.

Coincidiendo también con las descripciones reportadas por Aquiahuatl (2003) quien señala que *S. tormentosus*, en concentraciones bajas de glucosa (1-30 g/L), presentó micelio algodonoso y aéreo, mientras que en concentraciones altas observó micelio aterciopelado, colonias irregulares y radiadas. No obstante, para *S. granulatus* estas características se presentaron de manera inversa a las señaladas anteriormente en las mismas concentraciones de glucosa.

A su vez Galindo (2004) trabajó con ocho cepas de *Suillus* creciéndolas en concentraciones de 5, 10, 20, 30 y 40 g/L de glucosa, pertenecientes a las especies *S. gluandulosipes*, *S. lakeii*, *S. pseudogranulatus*, *S. subareus* y tres más que maneja como *Suillus sp.* Dicha autora reportó colonias café amarillentas a amarillas pálidas, zonaciones concéntricas, pliegues radiales y textura de aterciopelada laxa a algodonosa compacta. Microscópicamente las hifas son septadas, de pared gruesa, ramificaciones, vesículas y gúttulas.

Hutchinson (1991) reportó las características *in vitro* de 14 cepas de *Suillus* una de ellas correspondiente a la especie *S. brevipes*. En BAF esta cepa presentó colonias de tonos color café en el centro y amarillo pálido a la orilla con textura algodonosa, circulares y ocasionalmente ligeramente irregulares. Con presencia de exudados color café a amarillo pálido. El reverso de la colonia presentó coloraciones café oscuro a café violeta, con algunas coloraciones café-naranja. Se registraron cambios en la coloración en el medio a café-naranja. En PDA las colonias fueron circulares rara vez irregulares, de textura aterciopelada

algodonosa y con presencia de exudados negros. La colonia presentó anillos de diferentes tonalidades, café en el centro amarillo pálido a la orilla; reverso café oscuro, con centro naranja a naranja rojizo al margen. Cambio en la coloración del medio a café oscuro – café naranja. Microscópicamente reportó hifas hialinas de (1.3) 2-3.9 (4.5) μm de diámetro, sin fíbulas, con terminaciones globosas y redondeadas. Y ocasionalmente presencia de hifas oleíferas.

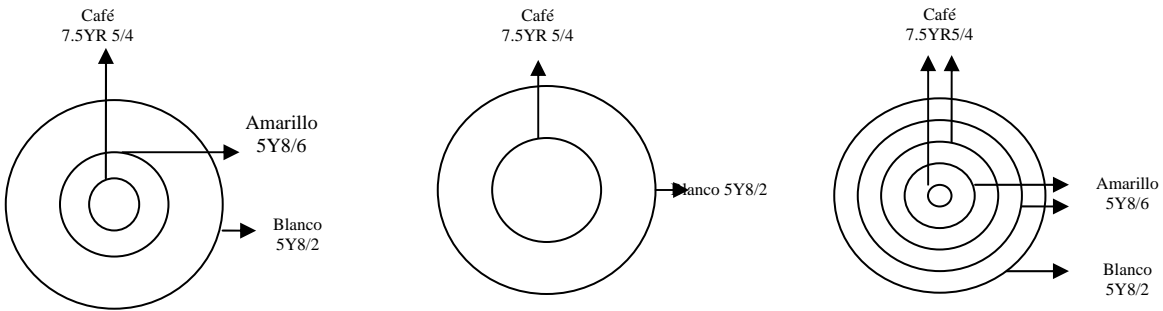
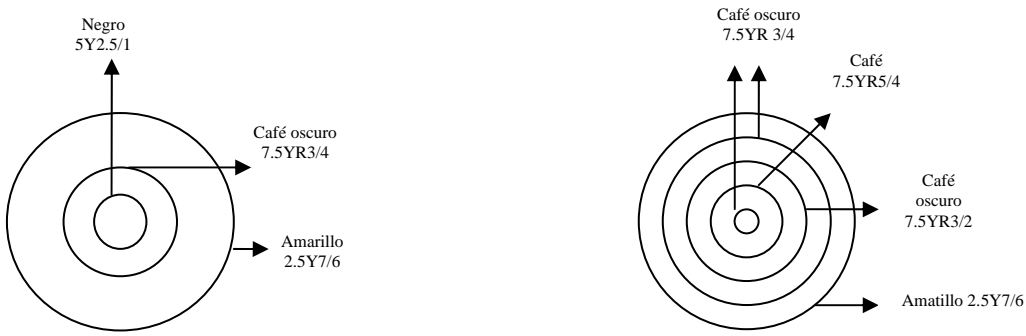
Las características reportadas por los autores anteriores coinciden de manera general con las reportadas para la cepa de *Suillus brevipes* estudiada en este trabajo, se puede observar que las coloraciones son café en todos los casos con tonalidades amarillentas, la textura de las colonias es aterciopelada y existe la presencia de exudados, además de un cambio en la coloración del medio. La compactación del micelio varía dependiendo de las condiciones de crecimiento.

En cuadros cinco al diez se resumen las características macro y microscópicas de la cepa.


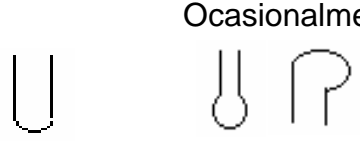
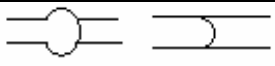
Los círculos concéntricos en las características color de micelio y reverso de la colonia, indican los diferentes patrones de coloración observados en cada prueba. Se realizó una ilustración del patrón general de coloración y se señala como “ocasionalmente” aquellos patrones que no fueron tan frecuentes. En el caso en que bajo algunas variables de crecimiento se presentaron patrones únicos de coloración se menciona en letras negritas en el extremo inferior derecho la concentración de glucosa, el medio o el pH en el que se presentó.

Cada círculo concéntrico representa la zona de la colonia que presentó cierta coloración, cabe aclarar que los círculos no están a escala..De esta misma forma se describirán las características tanto de *B. pinophilus* como de *I aff splendens*.







Cuadro 5. Características macroscópicas de *S. brevipes* (TLAX62) **Prueba: Concentraciones de Glucosa (g/L)**




Características macroscópicas	Descripción
Color del micelio	
Textura del micelio	<p>Aterciopelado con presencia de micelio aéreo ligeramente algodónoso en el margen. Presencia de micelio aéreo laxo en el centro de la colonia en 10, 20 y 30 g/l. Escaso en 10 g/L</p>
Forma y margen de la colonia	<p>De regular circular a ligeramente irregular con lóbulos poco marcados. Margen liso.</p>
Presencia de exudados	<p>En 20 hialinos y café oscuro (7.5YR 4/2). En 10g/l café oscuro (7.5YR 3/2) y café fuerte (7.5YR 4/6)</p>
Cambio en la coloración del medio	<p>Café oscuro amarillento 10YR4/4 cerca de la colonia y amarillo brillante (4A5) hacia la orilla de la caja.</p>
Reverso de la colonia	
Otros	<p>Presencia de pliegues radiales</p>



Cuadro 6. Características microscópicas *S. brevipes* (TLAX62) **Condición de cultivo: Concentraciones de glucosa (g/L)**

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	1.554-2.996 μm
Color	Amarillo olivo (2.5Y6/8)
Morfología	Compactas, sinuosas, poco septadas y de pared delgada ligeramente rugosa. En algunas hifas se observan ensanchamientos.
Ramificación	Ocasionalmente: 
Terminaciones	Ocasionalmente: 
Tipos de uniones	
Vesículas intercalares	Sí
Fíbulas	No
Cristales	No
Otros	Presencia de hifas oleíferas amarillo olivo (2.5Y6/8).

SIMBOLOGÍA

Ramificación: Dicotómica: en “Y”: , “Y” globosa: , “T”: , “H”: , “H” con septo . Tricotómica globosa: 


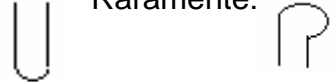
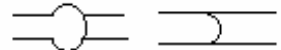
Terminaciones: Redondeada , globosa , gancho .

Tipos de uniones: Redondeada , globosa .





Cuadro 7. Características macroscópicas *S. brevipes* (TLAX62) **Condición de crecimiento: Medios nutritivos**



Característica macroscópica	Descripción
Color del micelio	
Textura del micelio	Aterciopelado con presencia de micelio aéreo ligeramente algodonoso en el centro y margen. En PDA algodonosa aterciopelada. Se forman círculos concéntricos de distintas coloraciones y compactación del micelio.
Forma y margen de la colonia	De regular ovalada a ligeramente irregular con lóbulos muy poco marcados. En PDA regular circular. Margen liso, ocasionalmente muy finamente fimbriado ó irregular.
Presencia de exudados	PDA de café amarillento (10YR5/8) a café oscuro (7.5 YR4/5)
Cambio en la coloración del medio	De café oscuro amarillento (10YR4/4) cerca de la colonia a amarillo brillante (4A4 - 4A5) hacia la orilla.
Reverso de la colonia	
Otros	Presencia de pliegues radiales



Cuadro 8. Características microscópicas *S. brevipes* (TLAX62) **Condición de crecimiento: Medios nutritivos**

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	1.618-3.470 µm
Color	Amarillo olivo (2.5Y6/8)
Morfología	Compactas, sinuosas, poco septadas de pared delgada y rugosa. En BAF se observan hifas de mayor grosor.
Ramificación	Ocasionalmente: 
Terminaciones	Raramente: 
Tipos de uniones	
Vesículas intercalares	Sí
Fíbulas	No
Cristales	No

SIMBOLOGÍA

Ramificación: Dicotómica: en “Y”: , “Y” con septo , “Y” globosa: , “H”: .

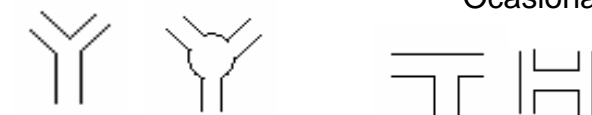
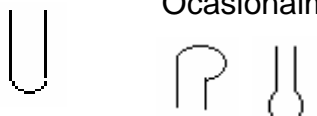
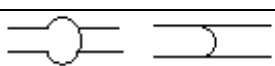
Terminaciones: Redondeada , gancho .

Tipos de uniones: Redondeada , globosa .





Cuadro 9. Características macroscópicas *S. brevipes* (TLAX62) **Condición de cultivo: pH**

Características macroscópicas	Descripción
Color del micelio	<p>Ocasionalmente:</p> <p>Café oscuro amarillento 10YR4/4</p> <p>Amarillo brillante 10YR4/4</p> <p>Café oscuro amarillento 10YR4/4</p> <p>Amarillo brillante 10YR4/4</p> <p>Blanco 1 A1</p> <p>pH5 pH3</p> <p>Blanco amarillento 2 A6</p> <p>pH3</p> <p>Café oscuro 7.5YR3/4</p> <p>Naranja 5 A6</p>
Textura del micelio	Aterciopelado. En pH 5 con presencia de micelio aéreo ligeramente algodonoso en el margen. pH 3 algodonosa laxa en el centro.
Forma y margen de la colonia	De regular ovalada a irregular ligeramente lobulada de margen liso.
Presencia de exudados	No.
Cambio en la coloración del medio	Café oscuro rojizo (5YR3/3) junto a la colonia y se desvanece hasta amarillo brillante (4A4). En pH 7 rara vez de café oscuro rojizo (5YR3/3) a café oscuro amarillento (10YR4/6). En pH 3 cambió a amarillo (2A7) y ocasionalmente amarillo (3A7) junto a la colonia desvaneciéndose hasta amarillo pálido (2A3).
Reverso de la colonia	<p>Café muy oscuro 10YR2/2</p> <p>Café muy oscuro 10YR2/2</p> <p>Café oscuro amarillento 10YR4/6</p> <p>Café oscuro amarillento 10YR4/6</p> <p>Amarillo pálido 4 A2</p> <p>Ocasionalmente:</p> <p>Café oscuro 10YR2/2</p> <p>pH5</p> <p>Café amarillento 10YR4/6</p>
Otros	Presencia de pliegues radiales en pH 5 y 7, apenas visibles en pH 3


Cuadro 10. Características microscópicas *S. brevipes* (TLAX62) **Condición de cultivo: pH**

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	1.689-2.937 μm
Color	Amarillo olivo (2.5Y6/8)
Morfología	Compactas, sinuosas, poco septadas de pared delgada y rugosa.
Ramificación	Ocasionalmente: 
Terminaciones	Ocasionalmente: 
Tipos de uniones	
Vesículas intercalares	En pH 5, poco abundantes
Fíbulas	No
Cristales	No

SIMBOLOGÍA

Ramificación: Dicotómica: en “Y”: , “Y”: globosa , “T”: , “H”: .

Terminaciones: Redondeada , globosa , gancho .

Tipos de uniones: Redondeada , globosa .

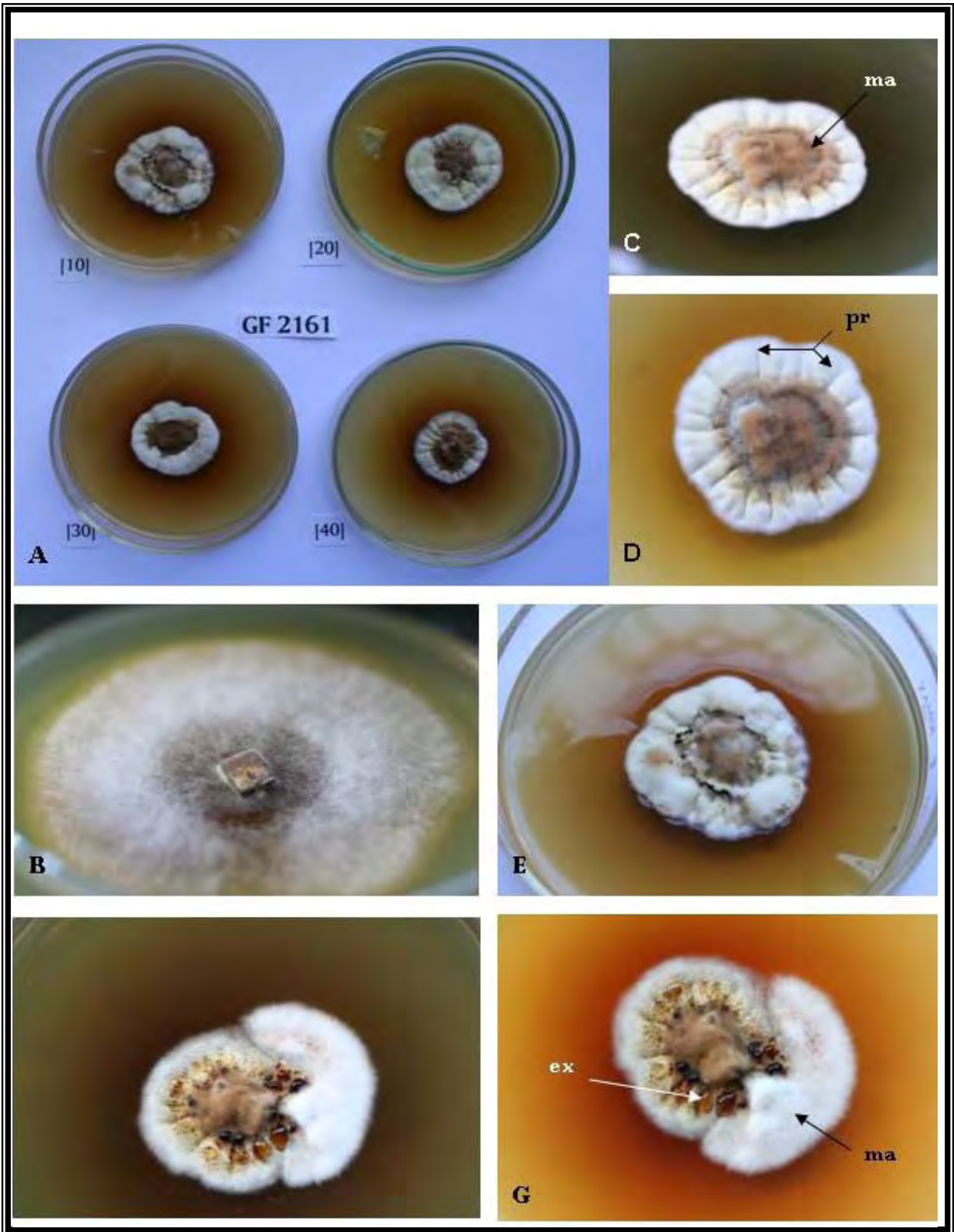


Figura 5. Características macroscópicas de *Suillus brevipes*. A. Características en concentración de glucosa. B. Micelio laxo en PDA. C y D. Textura algodonosa (pr. pliegues radiales y ma. micelio aéreo). E. Cambio de coloración en el medio. F y G. Presencia de exudados (ex).

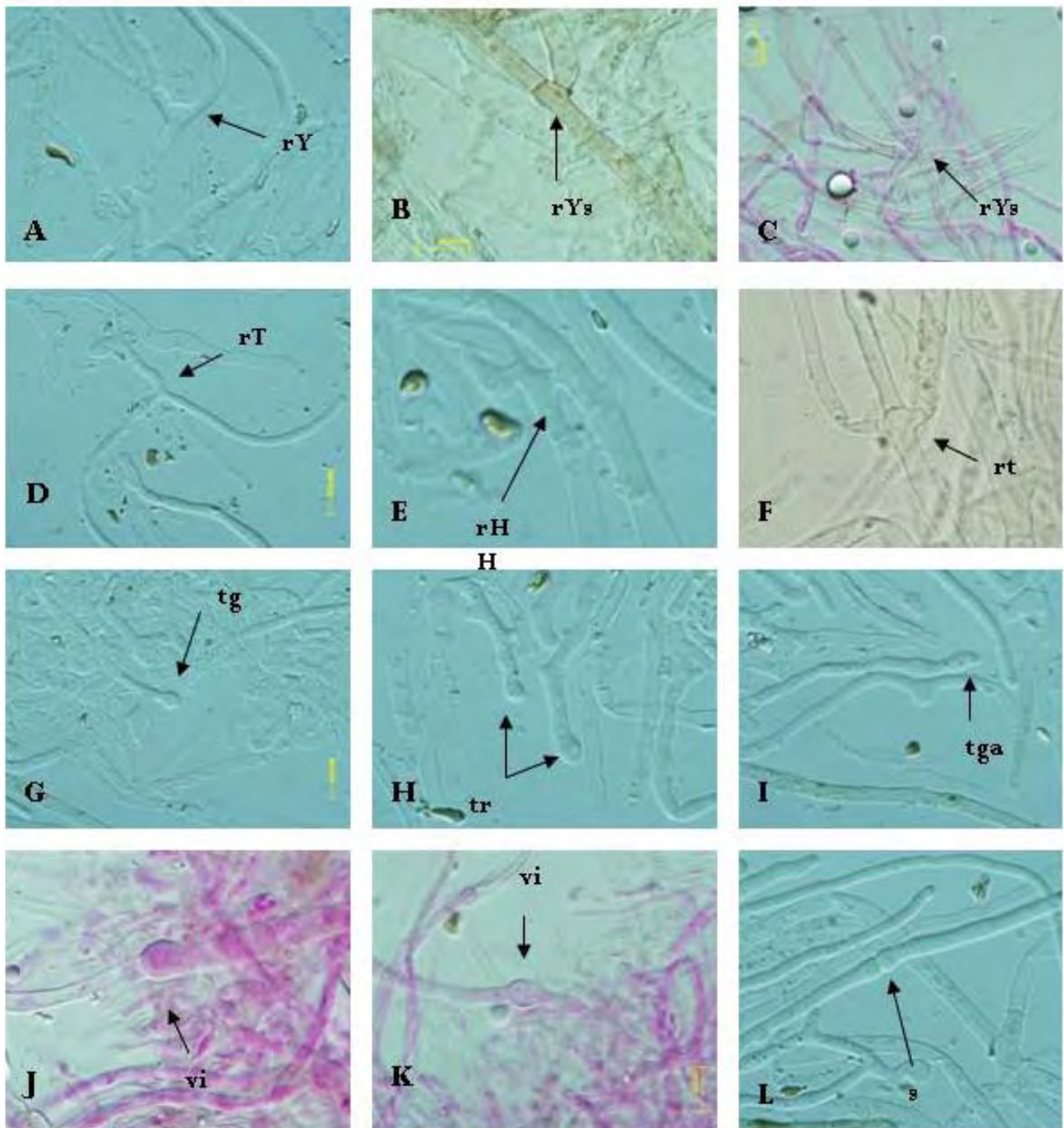


Figura 6. Características microscópicas de *S. brevipes* (100X) A-F. Ramificaciones (rY: en forma de “Y”, rYs: en forma de “Y” con septo, rT: en forma de “T”, rH: en forma de “H”, rt: tricotómica), G-I. Terminaciones (tg: terminación globosa, tr: terminación redondeada, tga: terminación en gancho), J y K. Vesículas intercalares (vi), L. Septo (s).

4.5.2 Evaluación de las variables biomasa, diámetro final, tasa media de crecimiento y relación biomasa/área en *S. brevipes* TLAX62

En el Cuadro 11 se resumen los resultados obtenidos en el ANOVA de cada una de las variables de crecimiento por prueba para *S. brevipes* (TLAX62).

En las gráficas 1 a la 4 se ilustran las medias con los errores estándar para cada de las prueba en cada una de las variables; además de los grupos que se forman a partir de las comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 1).

Cuadro 11. Resultados de las ANOVA para *S. brevipes* (TLAX62).

Variable de crecimiento	Condiciones de crecimiento	F	Significancia (<0.05)
Biomasa (mg)	[] Glucosa	24.51	0.0001
	Medios	15.95	0.0001
	pH	10.68	0.004
Diámetro final (mm)	[] Glucosa	7.47	0.002
	Medios	69.88	0.0001
	pH	12.71	0.002
Relación biomasa/área (mg/mm ²)	[] Glucosa	11.069	0.001
	Medios	51.05	0.0001
	pH	1.575	0.254
Velocidad media de crecimiento (mm/día)	[] Glucosa	11.669	0.0001
	Medios	74.77	0.0001
	pH	9.53	0.005

4.5.2.1 Biomasa (Grafica 1)

Glucosa:

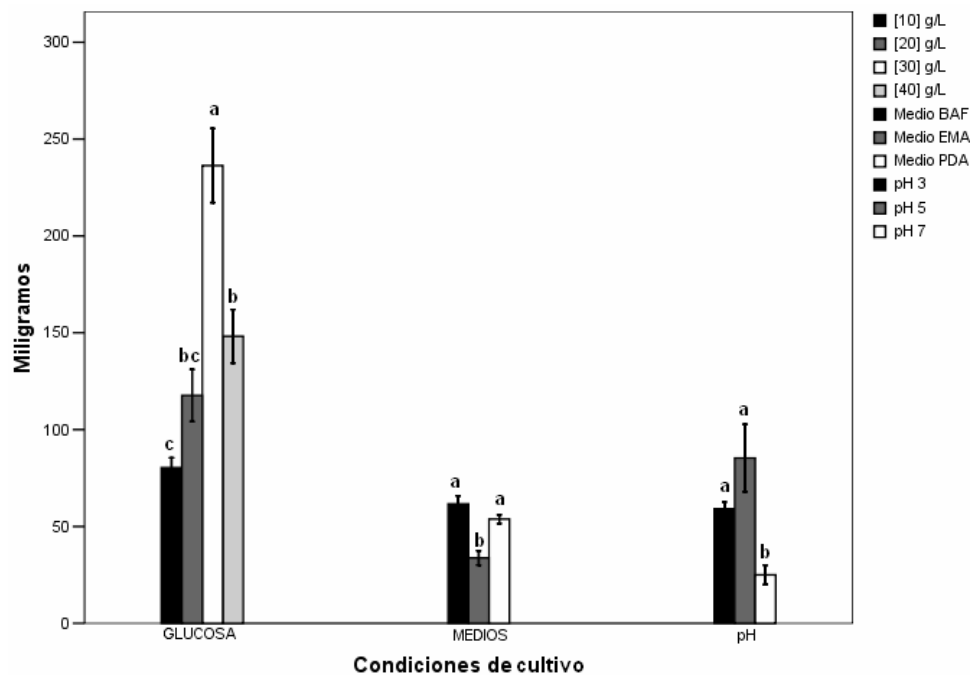
En la prueba de glucosa la media más alta de biomasa se obtuvo en la concentración de 30 g/L, que fue estadísticamente distinta a las demás concentraciones, seguida de 40 g/L que difiere de 10 g/L, donde se presentó la media más baja, aunque ninguna de las dos últimas fueron distintas de 20 g/L que es un valor intermedio.

Medios:

En el medio BAF se obtuvo el valor de biomasa más alto, sin presentar diferencias estadísticas con PDA. Ambos fueron significativamente distintos de EMA que fue el medio en el que la media de la biomasa fue menor.

pH:

El valor más alto se encontró en pH 5 seguido de pH 3, entre ellos no hubo diferencias significativas, pero ambos fueron estadísticamente diferente pH 7, que presento el valor medio de biomasa más bajo.



Grafica 1. Biomasa promedio (\pm EE) de las colonias de *S. brevipes* (TLAX62) en tres condiciones de cultivo

Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.5.2.2 Diámetro final (Gráfica 2)

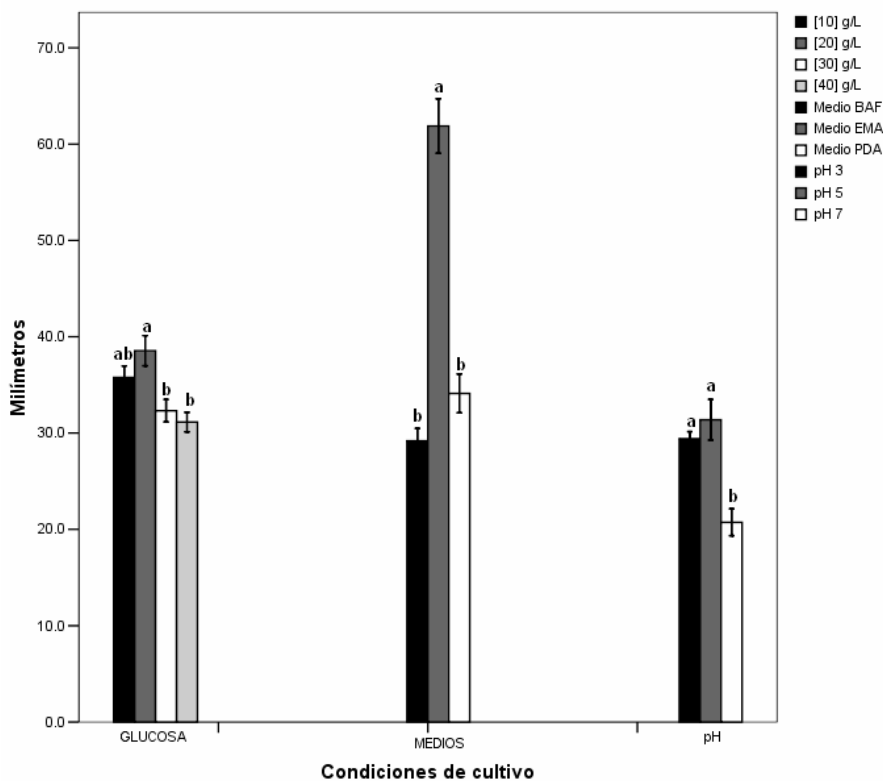
Glucosa:

A partir de la comparación múltiple de Tukey se encontró que la concentración de 20 gramos de glucosa por litro fue estadísticamente distinto de las concentraciones 40 y 30 g/L, donde se registraron los valores menores. La concentración de 10 g/L fue un valor intermedio que no presentó diferencias con ninguna de las concentraciones.

Medios:

La media del diámetro más alta se obtuvo en EMA que fue estadísticamente distinto de los medios BAF y PDA. BAF presentó la media más pequeña pero sin diferencias significativas con PDA.

pH: En esta prueba las medias más altas se registraron en los pH 3 y 5, ambos estadísticamente distintos de pH 7.



Gráfica 2. Diámetro promedio (\pm EE) de las colonias de *S. brevipes* (TLAX62) en tres condiciones de cultivo

Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.5.2.3 Relación biomasa/área (Gráfica 3).

Glucosa:

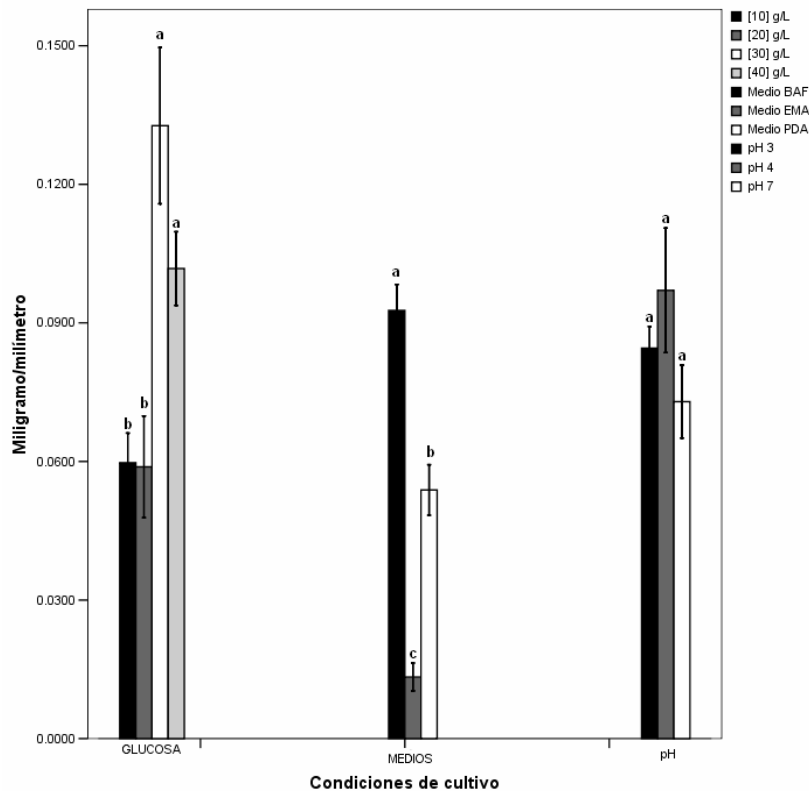
Los valores mayores se registraron en las concentraciones de 30 y 40 g/L; mientras que las medias más bajas se registraron en 10 y 20 g/L. Estos dos grupos fueron estadísticamente diferentes entre sí.

Medios:

Al evaluar el efecto de los medios sobre la relación biomasa/área se encontró diferencias estadísticas entre los tres. BAF presentó la media más alta, seguido de PDA y por último EMA que registró la relación media menor.

pH:

Los valores de la relación biomasa/área no presentaron diferencias significativas entre ellos. La media más alta, en esta prueba, se registró en pH 5.



Gráfica 3. Relación biomasa/área promedio (\pm EE) de las colonias de *S. brevipes* (TLAX62) en tres condiciones de cultivo

Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.5.2.4 Tasa media de crecimiento (Gráfica 4)

Glucosa:

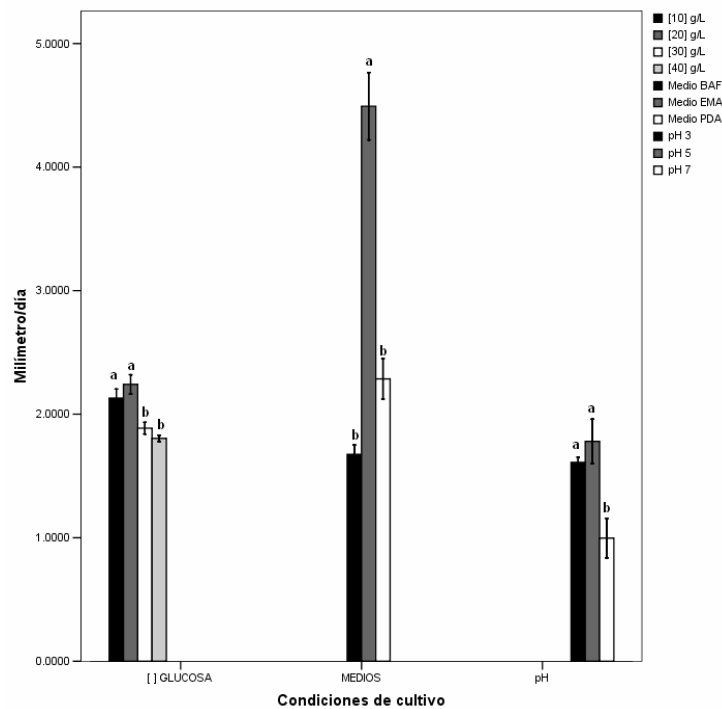
En este caso, se observó que las concentraciones de 10 y 20 g/L, donde se observaron las medias más altas, fueron estadísticamente distintas a las de 30 y 40 g/L que presentaron las media más bajas.

Medios:

Analizando estadísticamente el efecto de los medios sobre la velocidad de crecimiento encontramos que EMA presentó la velocidad de crecimiento significativamente más alta con respecto a BAF y PDA. Éstos últimos no presentaron diferencias significativas.

pH:

En esta variable la media más alta se registró en el pH 5, la cuál no fue estadísticamente distinto de pH 3. Ambos difieren significativamente de pH 7 donde se registró la velocidad media más baja.



Gráfica 4. Velocidad media de crecimiento (\pm EE) de las cepas de *S. brevipes* (TLAX62) en tres condiciones de cultivo

Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.6 Caracterización morfológica y evaluación de las variables de crecimiento en *Boletus pinophilus* (TLAX63).

4.6.1 Caracterización morfológica macro y microscópica de *B. pinophilus*

Las características macroscópicas de *B. pinophilus* (Cuadros 12, 14 y 16) fueron: colonias de coloraciones amarillo blanco a amarillo verdoso y olivo pálido. Y en BAF una con tonalidades naranjas. De textura pruinoso y con formación de anillos concéntricos debido a la distinta compactación del micelio. La forma de las colonias fue regular circular de margen finamente fimbriado. Hubo cambio de coloración en el medio hacia amarillo pálido solo en la prueba de pH (Figura 7).

Microscópicamente (Cuadros 13,15 y 17) se observaron hifas de diámetro 1-3.836 μm , de color verde grisáceo, poco septadas, de pared delgada y lisa; algunas con ensanchamientos. De ramificación dicotómica y la terminación de las hifas podría ser redondeada ó globosa. Con presencia de hifas oleíferas color amarillo verdoso (Figura 8).

Debido a la ausencia de estudios *in vitro* con esta especie, la comparación de esta cepa se hizo a nivel de género y con descripciones de la micorriza que forma.

Hutchinson (1991) hace la descripción de dos cepas de *Boletus*, *B. edulis* en medio BAF presentó colonias circulares, algodonosas y blanquecinas. El reverso se observó con tonalidades grisáceas cambiando a naranja grisáceo y con margen blanco amarillento. En PDA las colonias fueron de circulares a elipsoidales, de textura algodonosa y de color blanco. Microscópicamente reportó hifas hialinas con un diámetro (1.3)2-3.9 (4.5) μm y sin fíbulas. Para *B. ornatipes* creciendo en BAF sus colonias fueron circular-irregulares, de textura algodonosa color amarillo pálido. Reverso café oscuro en el centro cambiando a naranja grisáceo y blanco en el margen. En PDA las características fueron similares. Microscópicamente las hifas se observaron hialinas sin fíbulas y con diámetros de (1.0) 1.6-3.2 (3.9) μm y con presencia de hifas oleíferas.

Sánchez *et al* (2000) reportaron que *Boletus satanas* en medio BAF presenta coloraciones cafés micelio aéreo abundante café grisácea en el centro y blanco en el margen. Reverso color café. Exudados en el centro con tonos color café y cambio en la coloración del medio a color café-ocre. Microscópicamente esta cepa presentó hifas hialinas ligeramente pigmentadas de pared delgada y ramificaciones simples. Tasa de crecimiento lenta (2 cm en 4 semanas).





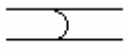
Agerer (2001) realiza la descripción general de las micorrizas de *Boletus* y señala que el micelio es algodonoso sin fíbulas y con ramificación abierta.

De manera general la forma de la colonia coincide con la reportada en los trabajos mencionados anteriormente, aunque consideren a otras especies. Las coloraciones se semejan a las de las colonias de las dos especies reportadas por Hutchinson (1991). Microscópicamente coincide con todas las cepas señaladas, en cuanto a color, ausencia de fíbulas. Con respecto a *B. ornatipes*, coincide con el tamaño del diámetro de las hifas y con la presencia de hifas oleíferas.



Cuadro 12. Características macroscópicas *B. pinophilus* (TLAX63) **Condición de crecimiento: Concentraciones de glucosa (g/L)**



Características macroscópicas	Descripción
Color del micelio	<p>Ocasionalmente:</p>
Textura	<p>Pruinosa compacta, ligeramente laxo al margen. Se observan anillos concéntricos pruinosos, debido al distinto grado de compactación del micelio.</p>
Forma y margen de la colonia	<p>Regular circular con margen finamente fimbriado</p>
Presencia de exudados	<p>No</p>
Cambio en la coloración del medio	<p>No</p>
Reverso de la colonia	<p>Ocasionalmente:</p>


Cuadro 13. Características microscópicas *B. pinophilus* (TLAX63) **Condición de crecimiento: Concentraciones de glucosa (g/L)**

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	1-3.711 μm
Color	Verde grisáceo (1C5)
Morfología	Septadas, de pared delgada y lisa Hifas de tamaño homogéneo, algunas presentan ensanchamientos. En la concentración 20 g/L en la región central encontramos hifas más gruesas.
Ramificación	Ocasionalmente en [20]:  
Terminaciones:	En 20 g/L ocasionalmen  
Tipo de uniones:	
Vesículas intercalares	No
Fíbulas	No
Cristales	No
Otras	Hifas oleíferas color amarillo verdoso (1A8-1B8) que disminuyen en cantidad del centro a la orilla.

SIMBOLOGÍA

Ramificación: Dicotómica: en “Y”  , “Y” con septo .


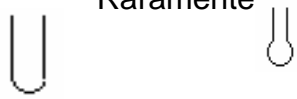
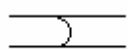
Terminaciones: Redondeada  , globosa .

Tipos de uniones: Redondeada .



Cuadro 14. Características macroscópicas *B. pinophilus* (TLAX63) **Condición de crecimiento: Medios nutritivos**



Característica microscópica	Descripción
Color del micelio	<p>Ocasionalmente:</p> <p>Blanco amarillento 1 A2</p> <p>Amarillo pálido 4 A4</p> <p>Blanco amarillento 1 A2</p> <p>Naranja brillante 5 A5</p> <p>Amarillo pálido 4 A4</p> <p>Blanco amarillento 1 A2</p> <p>EMA</p> <p>Amarillo pálido 1 A3</p> <p>Blanco amarillento 1 A2</p> <p>PDA</p> <p>BAF</p>
Textura del micelio	Pruinosa compacta al centro, ligeramente laxo hacia el margen.
Forma y margen de la colonia	Forma regular circular con margen muy finamente fimbriado.
Presencia de exudados	No
Cambio en la coloración del medio	No
Reverso de la colonia	<p>Ocasionalmente:</p> <p>Amarillo brillante 2 A4</p> <p>Amarillo pálido 2 A2</p> <p>Amarillo verdoso 1 A7</p> <p>Amarillo pálido 2 A2</p> <p>Blanco amarillento 1 A2</p> <p>Blanco 1 A1</p> <p>BAF</p> <p>EMA</p>


Cuadro 15. Características microscópicas *B. pinophilus* (TLAX63) **Condición de crecimiento: Medios nutritivo**

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	1.34-3.52 μm
Color	Verde grisáceo (1C5)
Morfología	Filamentosas, tortuosa, raramente septadas de pared delgada y lisa. Poco ramificada. En PDA Y BAF más gruesas al centro que a la periferia
Ramificación	Raramente: 
Terminaciones	Raramente: 
Tipo de uniones	
Vesículas intercalares	No
Fíbulas	No
Cristales	No

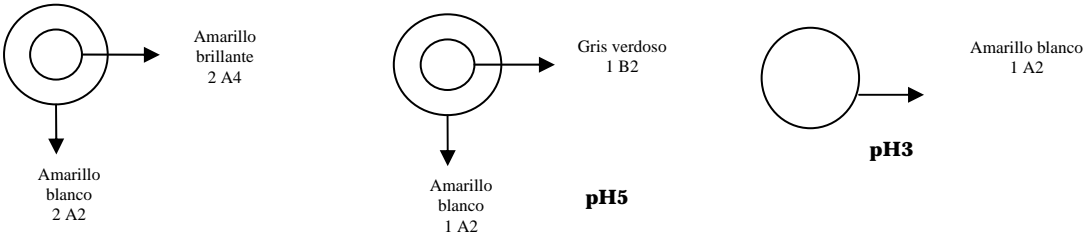
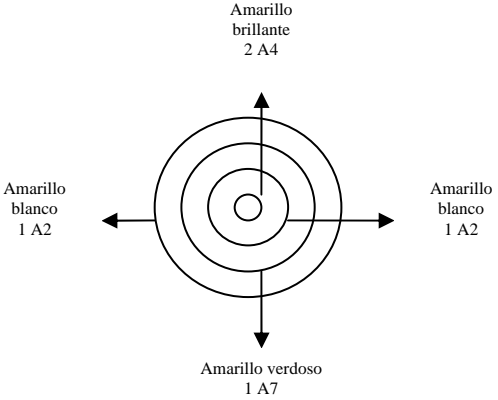
SIMBOLOGÍA

Ramificación: Dicotómica: en “Y” con septo , “Y” globosa después de la ramificación .



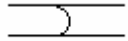
Terminaciones: Redondeada , globosa .

Tipos de uniones: Redondeada .



Cuadro 16. Características macroscópicas *B. pinophilus* (TLAX63) **Condición de crecimiento: pH**



Característica microscópica	Descripción
Color del micelio	<p>Ocasionalmente:</p> 
Textura del micelio	Pruinosa compacta al centro y ligeramente laxo al margen. Se observó un anillo concéntrico marcado por la distinta compactación del micelio del margen.
Forma y margen de la colonia	Regular circular con margen finamente fimbriado
Presencia de exudados	No
Cambio en la coloración del medio	En pH 3 y 7 amarillo pálido 3 A3.
Reverso de la colonia	


Cuadro 17. Características microscópicas *B. pinophilus* (TLAX63) **Condición de crecimiento: pH**

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	1.249-3.836 μm
Color	Verde grisáceo (1C5)
Morfología	Filamentosas, tortuosa, raramente septadas de pared delgada y lisa. Poco ramificada.
Ramificación:	Rara vez en pH 7: 
Terminaciones	 Raramente:
Tipos de uniones	
Vesículas intercalares	No
Fíbulas	No
Cristales	No

SIMBOLOGÍA

Ramificación: Dicotómica: en “Y” , “Y” con septo .

Terminaciones: Redondeada , globosa .

Tipos de uniones: Redondeada .

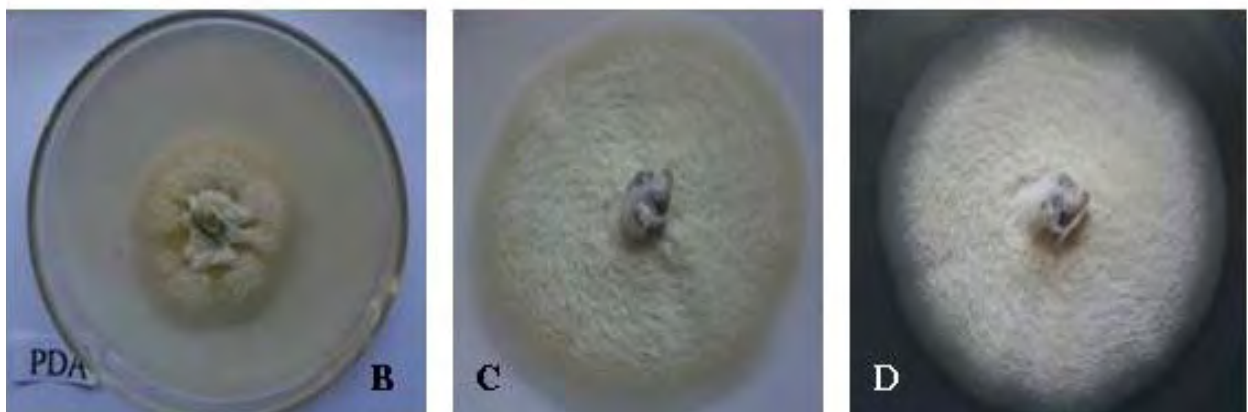
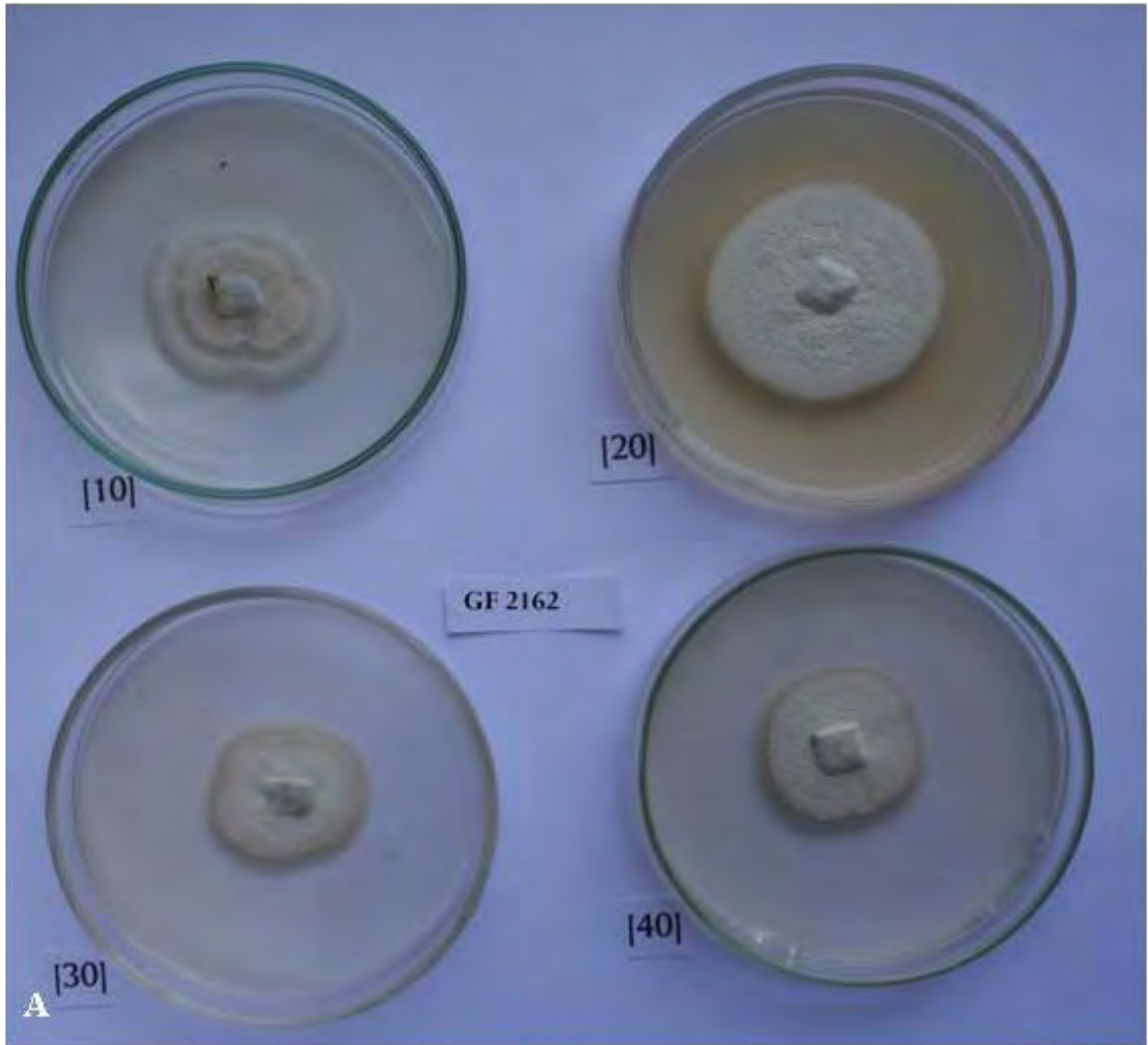


Figura 7: Características macroscópicas de *Boletus pinophilus*. A. En glucosa. B. En PDA. C y D. Textura pruinosa del micelio

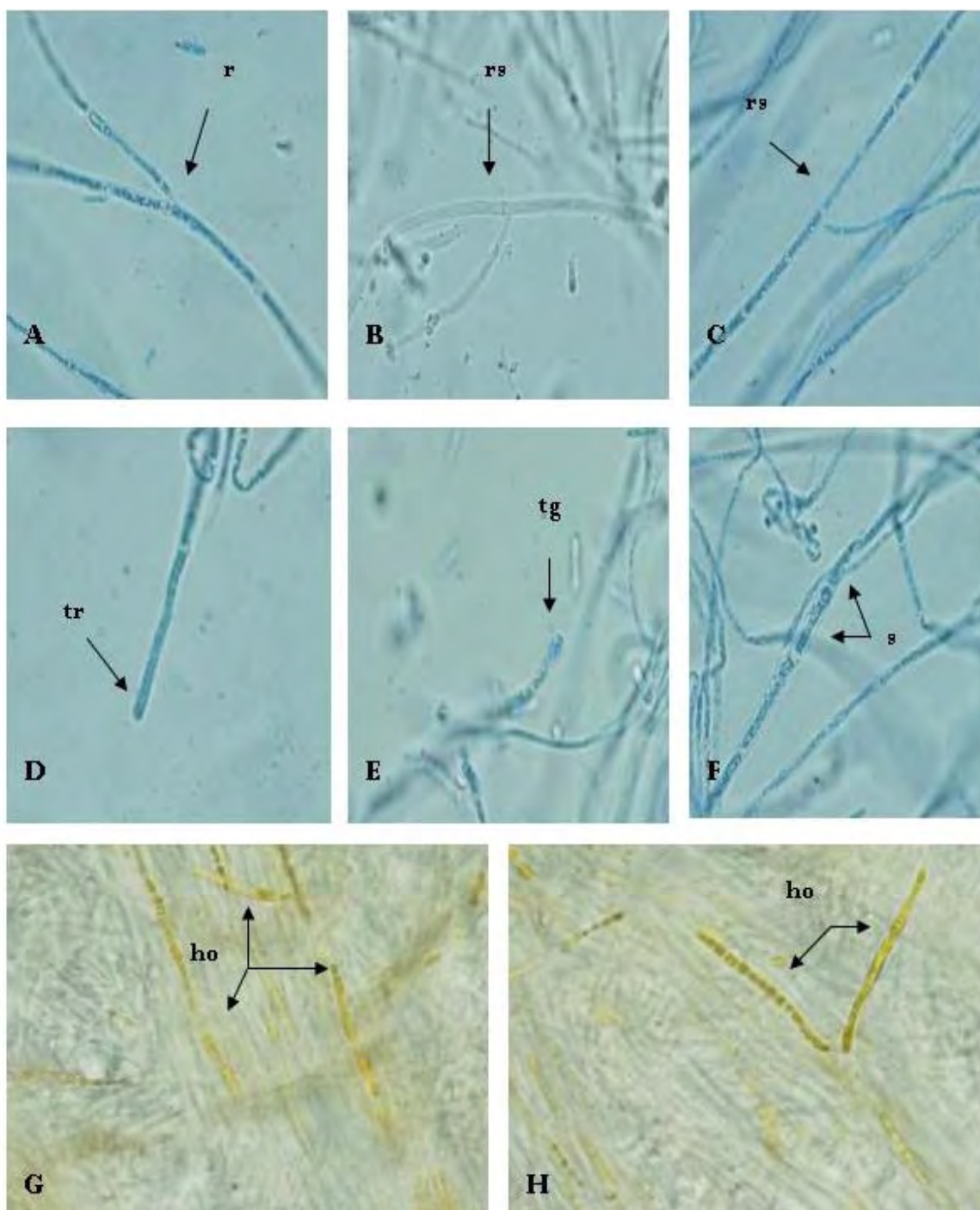


Figura 8. Características microscópicas de *B. pinophilus*. A-C. Ramificación (r: ramificación, rs: ramificación con septo), D y E. Terminaciones (tr: terminación redondeada, tg: terminación globosa), F. Septo (s), G-H: hifas oleicas (ho).

4.6.2 Evaluación de las variables biomasa, diámetro final, relación biomasa/área y tasa media de crecimiento en *Boletus pinophilus* (TLAX63)

En el Cuadro 19 se muestran los resultados estadísticos de las variables evaluadas en las pruebas de glucosa, medios y pH para *B. pinophilus* (TLAX63).

Cuadro 19. Resultado de las ANOVA de *B. pinophilus* (TLAX63)

Variable de crecimiento	Prueba	F	Significancia<0.05
Biomasa (mg)	[] Glucosa	17.58	0.0001
	Medios	62.59	0.0001
	pH	6.24	0.007
Diámetro final (mm)	[] Glucosa	2.25	0.103
	Medios	4.37	0.021
	pH	1.56	0.230
Relación biomasa/área (mg/mm ²)	[] Glucosa	9.74	0.0001
	Medios	6.03	0.006
	pH	1.59	0.223
Velocidad media de crecimiento (mm/día)	[] Glucosa	5.52	0.005
	Medios	4.45	0.021
	pH	1.21	0.318

4.6.2.1 Biomasa (Gráfica 5)

Glucosa:

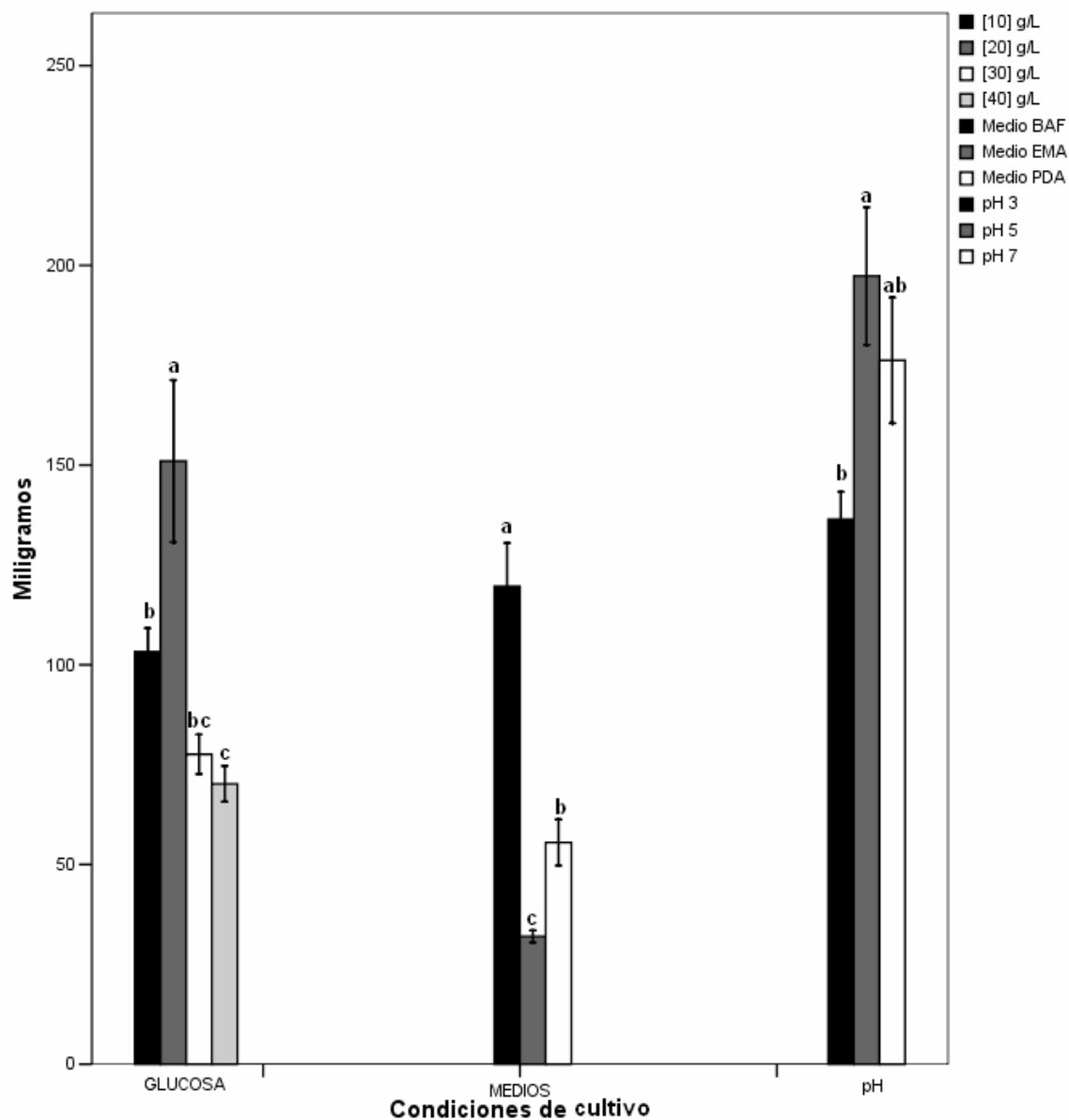
La media más alta se registró en la concentración de 20 g/L la cuál difiere significativamente de las demás concentraciones. El valor promedio obtenido en [10] g/L fue estadísticamente distinto de 40g/L, concentración en la cuál se registró la media más baja. En [30] g/L se obtuvo un valor intermedio a éstas dos últimas concentraciones y no presentó diferencias significativas con ellas.

Medios:

Los valores promedio en los tres medios difieren estadísticamente entre ellos, la media mayor se registró en BAF, el valor intermedio en PDA y el bajo en EMA.

pH:

Mientras que en la prueba de pH el valor más bajos se obtuvo en pH 3 y fue estadísticamente diferente a pH 5. El valor de pH 7 no fue estadísticamente distinto a los anteriores.



Gráfica 5: Biomasa promedio (\pm EE) de las colonias de *B. pinophilus* (TLAX63) en tres condiciones de cultivo

Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.6.2.2 Diámetro final (Gráfica 6)

Glucosa:

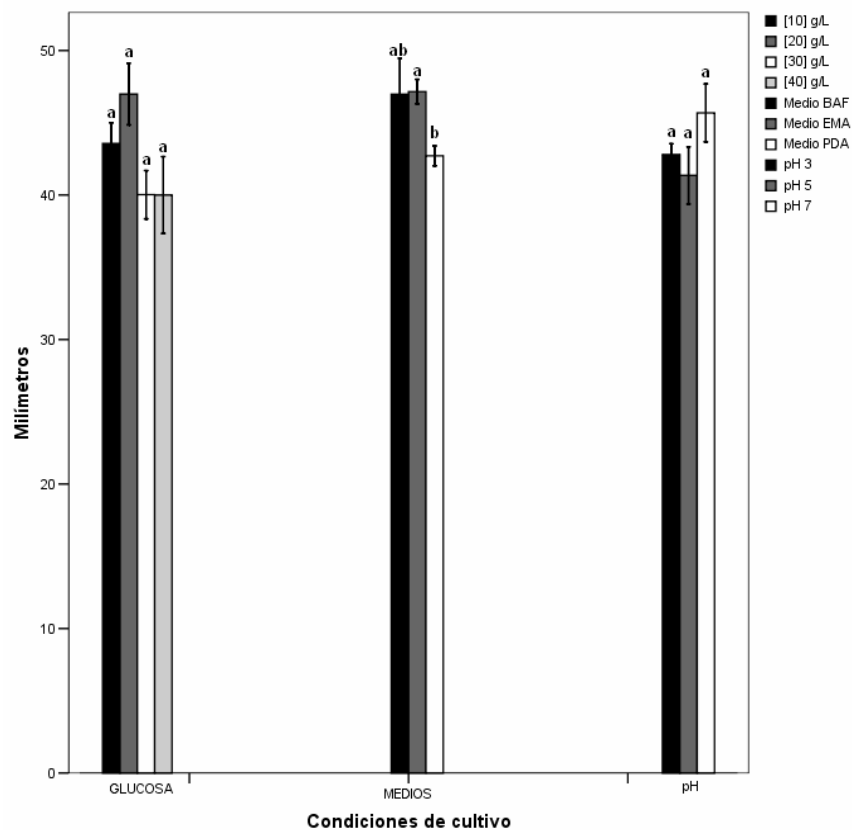
No se encontraron diferencias significativas en los diámetros finales de las cuatro concentraciones.

Medios:

EMA, presentó la media más alta, difiere estadísticamente de los medios PDA. La media en BAF fue un valor intermedio que no presento diferencias significativas a los primeros dos

pH:

No se encontraron diferencias estadísticas en el diámetro final de las colonias en los distintos pH.



Gráfica 6. Diámetro promedio (\pm EE) de las colonias de *B. pinophilus* (TLAX63) en tres condiciones de cultivo

Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.6.2.3 Relación biomasa/área (Gráfica 7)

Glucosa:

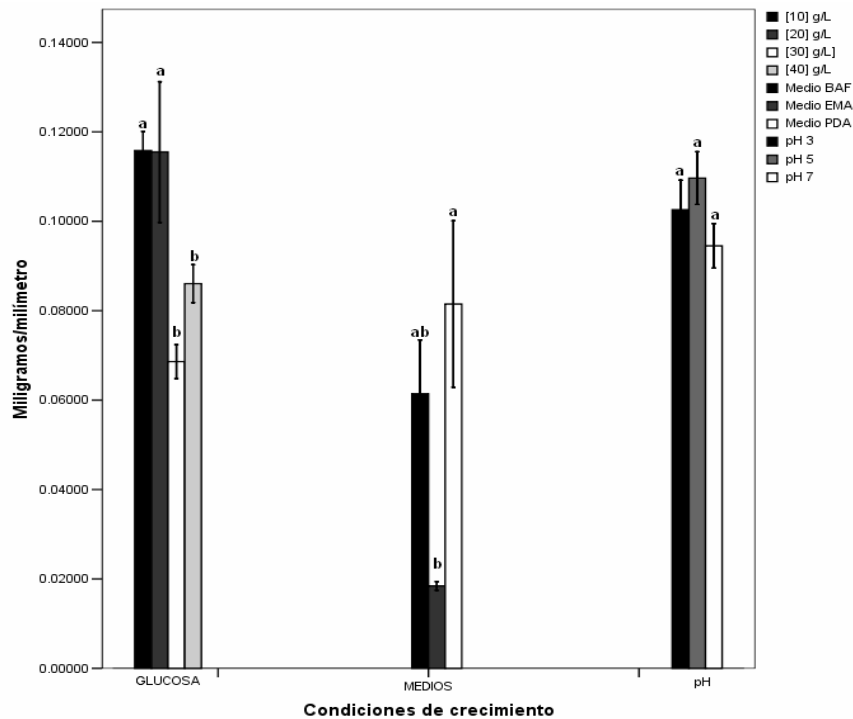
Para esta variable se formaron dos grupos estadísticamente distintos. En el primero se encontraron las medias más altas, constituido por las concentraciones 10 y 20 g/L; el segundo comprende a [30] y [40] g/L que son el grupo con medias más pequeñas.

Medios:

En el medio PDA se presentó la relación biomasa/área más grande, y fué estadísticamente distintos de EMA. BAF presentó un valor intermedio sin diferencias significativas con los anteriores.

pH:

En ésta prueba no se presentaron diferencias estadísticas entre las relaciones biomasa/área obtenidas en ninguno de los pH.



Gráfica 7. Relación biomasa/área promedio (\pm EE) de las colonias de *B. pinophilus* (TLAX63) en tres condiciones de cultivo

Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.6.2.4 Tasa media de crecimiento (Gráfica 8)

Glucosa:

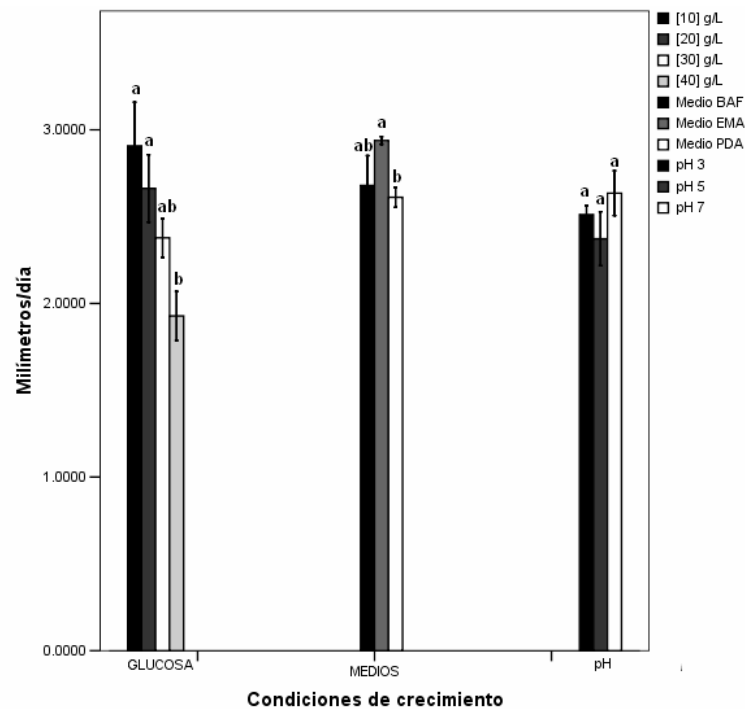
Las concentraciones 10 y 20 g/L fueron estadísticamente distintas a la concentración de 40, donde se registró la media más bajas. La concentración de 30 g/L fue un valor intermedio y no registró diferencias significativas con las otras concentraciones.

Medios:

En cuanto a esta prueba se obtuvo que EMA fue significativamente distinto al medio PDA. BAF presentó un valor intermedio sin diferencias significativas con los otros dos medios.

pH:

En ésta prueba, no se encontraron diferencias significativas al comparar la velocidad de crecimiento en ninguno de los pH.



Gráfica 8. Tasa media de crecimiento promedio (\pm EE) de las colonias de *B. pinophilus* (TLAX63) en tres condiciones de cultivo
Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.7 Caracterización morfológica y evaluación de las variables de crecimiento en *Inocybe aff. splendens* TLAX64.

4.7.1 Caracterización morfológica macro y microscópica de *I. aff. splendens* TLAX64

La cepas de *I. aff. splendens* presentaron coloraciones que van desde el amarillo grisáceo a gris oscuro ó color café grisáceo muy oscuro. En una réplica se presentaron coloraciones amarillo brillante y naranja. De textura algodonosa laxa, presencia de red aérea y cordones miceliars. La forma de la colonia fue regular circular. Presencia de exudados hialinos. Cambio de coloración al medio a gris muy pálido y blanco grisáceo. (Cuadros 19, 21 y 23, Figura 9)

Microscópicamente las hifas de *Inocybe* fueron de 1.22 a 3.76 μm de diámetro, de color verde grisáceo, con alto contenido citoplasmático, sinuosas, septadas y de pared delgada y lisa. Con presencia de algunos ensanchamientos. Ramificación dicotómica. Terminaciones redondeadas y ocasionalmente en gancho ó globosas. Presencia de fíbulas, vesículas intercalares y cordones miceliars color oliva. Presencia de hifas oleíferas en la prueba de pH exclusivamente. (Cuadros 20, 22 y 24. Figura 10)

El estudio del crecimiento *in vitro* de éste género es casi nulo, por lo que la comparación de la morfología se realizó con el trabajo realizado por Cruz Ulloa (1990) quién reportó las características, en cultivo puro de tres especies del género *Inocybe*, *I. bresadolae*, *I. geophilla* var. *lilacina* e *I. grammata*. Además se comparo con descripciones de las micorriza que forma este género (Delgado, 2004 y Agerer, 2006) y descripciones para la identificación taxonómica de diferentes especies del mismo género

I. bresadolae en los medios MMN y PDA presentó colonias blancas regulares circulares con micelio aéreo de aspecto algodonoso, textura aterciopelada, algodonosa, con un margen ligeramente fimbriado. El reverso de la colonia presentó coloraciones amarillo ó naranja rojizo. Registró cambio en la coloración

del medio a amarillo claro y presencia de exudados hialinos. Hifas con citoplasma granular con un diámetro de 1.7-3.4 μm , septadas, ramificadas y con vesículas intercalares y gúttulas. Terminaciones redondeadas y globosas. Sin presencia de fíbulas.

I. geophilla var. *lilacina* en EMA y MMN presentó colonias de coloraciones blancas con el centro amarillo, forma irregular y margen fimbriado. El micelio fue abundante de textura algodonosa-grumosa y con presencia de micelio aéreo. En PDA el crecimiento fue más lento, el micelio presentó textura laxa algodonosa y exudados hialinos, el reverso de la colonia se observó amarillo. Microscópicamente en EMA las hifas fueron sinuosas de 3.4 μm de diámetro, de pared gruesa, septadas y ramificadas, terminaciones redondeadas y globosas y citoplasma granular. Presencia de fíbulas después de 4 meses de cultivo. También se encontraron vesículas intercalares, hifas entrelazadas (semejantes a cordones miceliares)

I. grammata en EMA y MMN la colonias fueron color blanco con la orilla amarillo claro de forma irregular, textura algodonosa y margen fimbriado. En ocasiones se presentó poco micelio aéreo. Reverso amarillo claro y en PDA verde claro. Microscópicamente las hifas fueron sinuosas de 3.4-3.7 μm de diámetro, pared gruesa, septadas, ramificadas y con presencia de vesículas intercalares. Se observaron también hifas filamentosas septadas de 2 μm con citoplasma granular y ensanchamiento en la zona de ramificación. Las terminaciones fueron globosas y redondeadas. Sin fíbulas

Delgado (2004) realizó la descripción de las micorrizas de *I. geophilla* var. *lilacina* e *I. maculata* ambas asociadas a *Abies religiosa*. Donde reporta hifas de (1.8)2.7-4.5 (6.3) μm y 1.8-3.6 (4.5) μm de diámetro respectivamente, con fíbulas escasas.

Agerer en el 2006 publicó las características generales de la micorriza formada por *Inocybe*, menciona características como: hifas septadas, de ramificación abierta y fíbulas delgadas con un orificio central.

Kobayashi (2002, 2003 y 2005) reportó en la caracterización de varias especies de *Inocybe* de Japón, hifas hialinas septadas y con fíbulas, los diámetros fueron variables en las distintas especies.


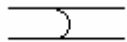
La cepa *I. aff. splendens* estudiada en el presente trabajo presentó coincidencias con las características reportadas por Cruz Ulloa (1990) en cuanto a la forma de la colonia, el color, margen, presencia de exudados y micelio aéreo. Y en ambos casos hubo un cambio de coloración del medio, aunque los colores no coinciden. Microscópicamente los diámetros fueron similares a *I. bresadolae*, *I. geophilla*, y las otras características como vesículas intercalares, citoplasma granular, ramificación, septos y forma de terminaciones de las hifas también coinciden.

De manera general, las características microscópicas de *I. splendens* coinciden con las descripciones reportadas por Delgado (2004), Agerer (2006) y Kobayashi (2002, 2003, 2005) en cuanto a que son hifas septadas, de ramificación abierta y con presencia de fíbulas con un orificio central, aunque estas fueron escasas a diferencia de los trabajos señalados. Los diámetros de crecimiento micelial fueron similares en algunos casos.



Cuadro 19. Características macroscópicas *I. aff. splendens* (TLAX 64) **Condición de crecimiento: Concentraciones de glucosa (g/L)**



Características macroscópicas	Descripción
Color del micelio	<p>Ocasionalmente:</p> <p>Blanco con tonos gris 5YR 8/1</p> <p>Gris oscuro 5YR 4/1</p> <p>Café grisáceo oscuro 5YR 4/1-3</p> <p>Gris oscuro 5YR 4/1</p> <p>Micelio aéreo gris pálido 5YR 7/1</p> <p>Blanco con tonos gris 5YR 8/1</p> <p>Gris amarillo muy pálido 2.5 YR 7/4</p> <p>Gris 5YR 6/1</p> <p>Amarillo brillante 4 A4</p> <p>Naranja oscuro 5 A8</p>
Textura del micelio	Micelio aéreo de textura laxa algodonosa y se agrega formando una red aérea.
Forma y margen de la colonia	Forma regular circular de margen fimbriado
Presencia de exudados	Hialinos, escasos.
Cambio en la coloración del medio	Cambio de coloración a gris muy pálido (5C1)
Reverso de la colonia	<p>Ocasionalmente:</p> <p>Gris muy oscuro 5YR3/1</p> <p>Blanco grisáceo 10YR 8/1</p> <p>Café amarillento 10YR7/6</p> <p>Gris muy oscuro 5YR3/1</p> <p>Blanco grisáceo 10YR 4/2</p> <p>Café amarillento 10YR7/6</p> <p>Café amarillento 10YR7/6</p> <p>Gris muy oscuro 5YR3/1</p> <p>Gris oscuro 5YR 4/1</p> <p>Blanco grisáceo 5YR 8/1</p>
Otros	Cordones miceliares oliva (5Y4/4)


Cuadro 20. Características microscópicas *I. aff. splendens* Condición de crecimiento: Concentraciones de glucosa (g/L)

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	1.306-3747 μm
Color	Verde grisáceo (1C5)
Morfología	Sinuosas, de pared delgada, sin ornamentación y raramente septadas (frecuentemente más septadas en [30]). Presentan continuamente ensanchamientos. Hifas de grosor heterogéneo.
Ramificación	Raramente dicotómica en "Y"
Terminaciones	
Tipos de uniones	
Vesículas intercalares	Escasas
Fíbulas	Si
Cristales	No
Otros	Presencia de cordones miceliarios color oliva (5Y4/4)

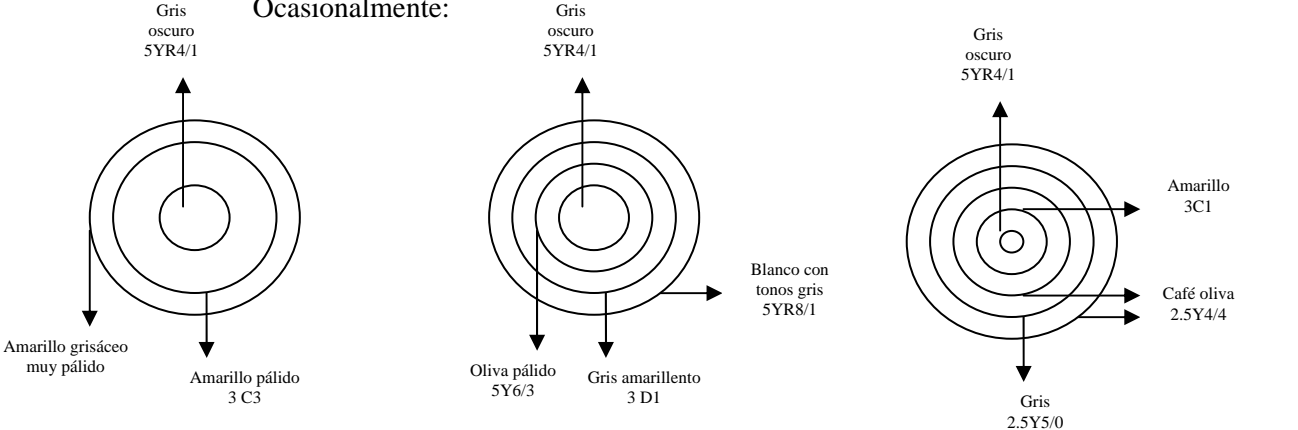
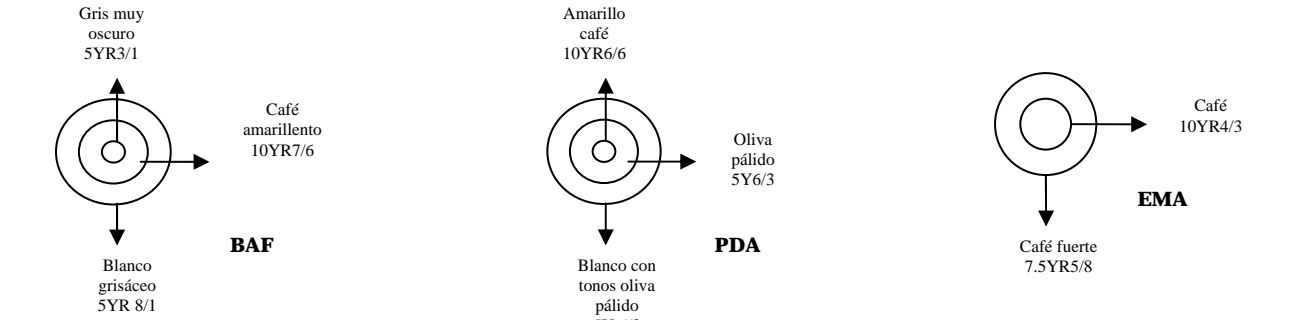
SIMBOLOGÍA

Ramificación: Dicotómica: en "Y" , "Y" con septo .


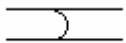
Terminaciones: Redondeada , gancho 

Tipos de uniones: Redondeada .

Cuadro 21. Características macroscópicas *Inocybe aff. splendens* Condición de crecimiento: Medios nutritivos


Características macroscópicas	Descripción
Color del micelio	<p>Ocasionalmente:</p> 
Textura del micelio	Micelio aéreo de textura algodonosa y laxa. Se agrega formando una red aérea.
Forma y margen de la colonia	Forma regular circular de margen fimbriado.
Presencia de exudados	Únicamente en EMA hialinos y algunas veces café oscuro (7.5YR 3/4)
Cambio en la coloración del medio	Ocasionalmente cambio a blanco grisáceo (4A2)
Reverso de la colonia	
Otros	Cordones miceliares oliva (5Y4/4)

Cuadro 22. Características microscópicas *I. aff. splendens* **Condición de crecimiento: Medios nutritivos**

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	1.618-3.470 μm
Color	Verde grisáceo (1C5)
Morfología	Sinuosas, de pared delgada, raramente septadas y sin ornamentación. Presentan ensanchamientos ocasionalmente. Hifas de mayor grosor y alto contenido citoplasmático. El micelio aéreo es más delgado que el resto.
Ramificación	Raramente dicotómica en "Y"
Terminaciones	
Tipos de uniones	
Vesículas intercalares	No
Fíbulas	No
Cristales	No
Otros	Cordones miceliares color oliva (5Y4/4)

SIMBOLOGÍA



Terminaciones: Redondeada 

Tipos de uniones: Redondeada 


Cuadro 23. Características macroscópicas *I. aff. splendens* Prueba: pH




Característica macroscópica	Descripción
Color del micelio	<p>Ocasionalmente:</p> <p>Blanco con tonos gris 5YR 8/1</p> <p>Gris oscuro 5YR 4/1</p> <p>Micelio aéreo gris pálido 5YR 7/1</p> <p>Café grisáceo oscuro 5YR 4/1-3/1</p> <p>Gris oscuro 5YR 4/1</p> <p>Blanco 1 A1</p> <p>Amarillo brillante 4 A4</p> <p>Amarillo rojizo 4 A6</p> <p>Olivá pálido 5Y 6/3</p> <p>Café olivá brillante 2.5Y 5/4</p> <p>pH--</p> <p>pH3</p> <p>pH3</p>
Textura del micelio	Micelio aéreo de textura laxa algodonosa; se agrega formando una red aérea. En pH3 la textura es algodonosa compacta, sin presencia de micelio o red aérea.
Forma y margen de la colonia	Forma regular circular de margen fimbriado. Presentándose ocasionalmente en pH3 una forma ligeramente irregular ondulada.
Presencia de exudados	Hialinos, frecuentemente.
Cambio en la coloración del medio	Cambio a blanco grisáceo (4A2)
Reverso de la colonia	<p>Ocasionalmente:</p> <p>Gris muy oscuro 5YR3/1</p> <p>Café amarillento 10YR 7/6</p> <p>Blanco grisáceo 5YR 8/1</p> <p>Gris oscuro 5YR 4/1</p> <p>Blanco grisáceo 5YR 8/1</p> <p>Blanco 1 A1</p> <p>Café oscuro 7.5YR 3/4</p> <p>Gris olivá oscuro 5Y3/2</p> <p>pH7</p> <p>pH7</p> <p>pH3</p>

Cuadro 24. Características microscópicas *I. aff. splendens* Prueba: pH

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	1.249-3763 μm
Color	Verde grisáceo (1C5)
Morfología	Sinuosas, de pared delgada, raramente septadas y sin ornamentación. Hifas de mayor grosor con alto contenido citoplasmático y con presencia de ensanchamientos.
Ramificación	Raramente dicotómica "Y"
Terminaciones	
Tipos de uniones	
Vesículas intercalares	Altamente presentes solo en la región central de la colonia.
Fíbulas	Si
Cristales	No
Otros	Hifas oleíferas abundantes en la región intermedia de la colonia. Presencia de condones miceliares oliva 5Y4/4. De menor tamaño en pH5 y en pH7 ausencia

SIMBOLOGÍA:

Terminaciones: Redondeada 

Tipos de uniones: Redondeada , globosa , globosa doble 

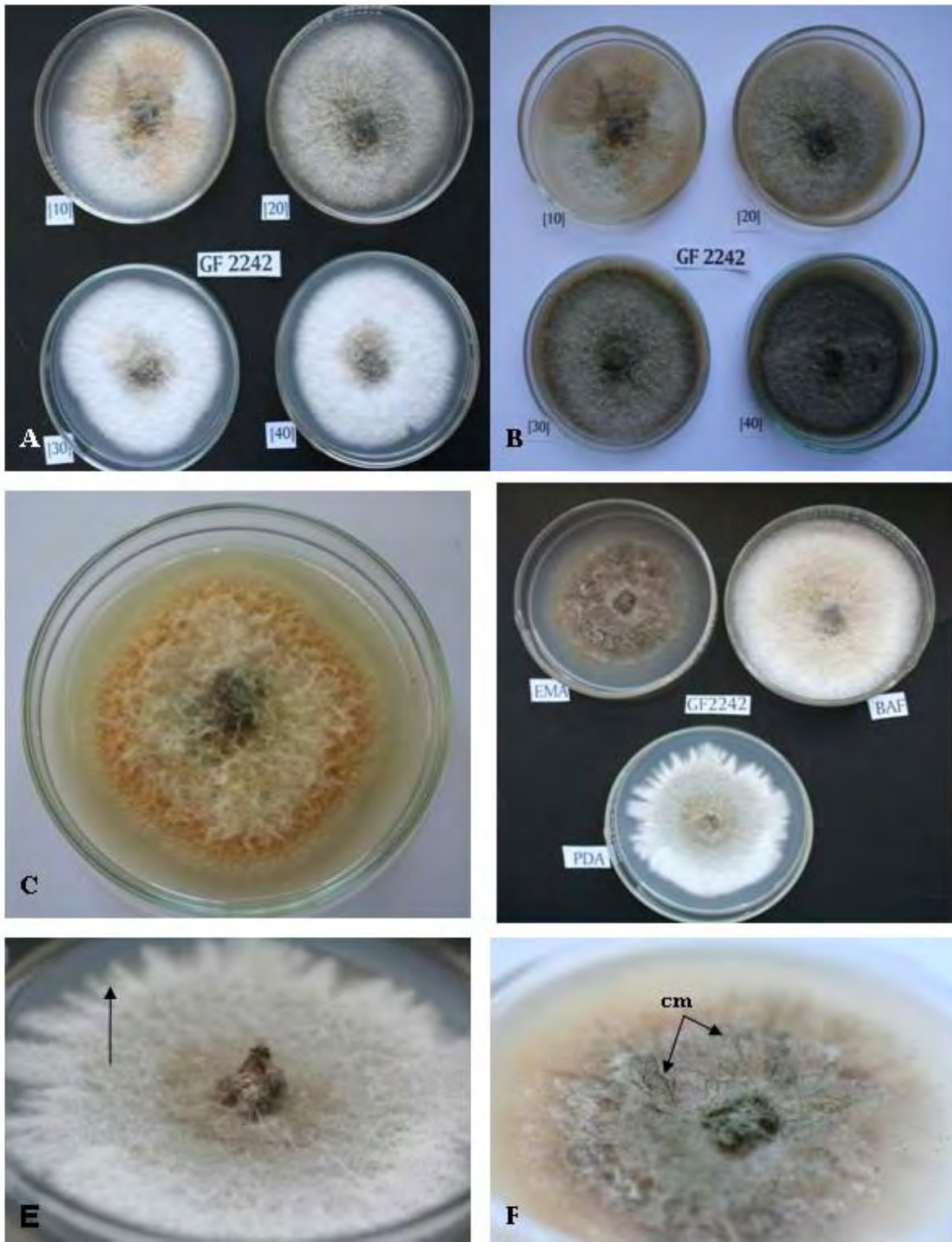


Figura 9. Características macroscópicas de *Inocybe* aff. *splendens*. A y B. En glucosa. C. Coloración. D. Coloración única en [10] de glucosa. E. En medios. F. Margen irregular en PDA. G. Cordones miceliarios (cm).

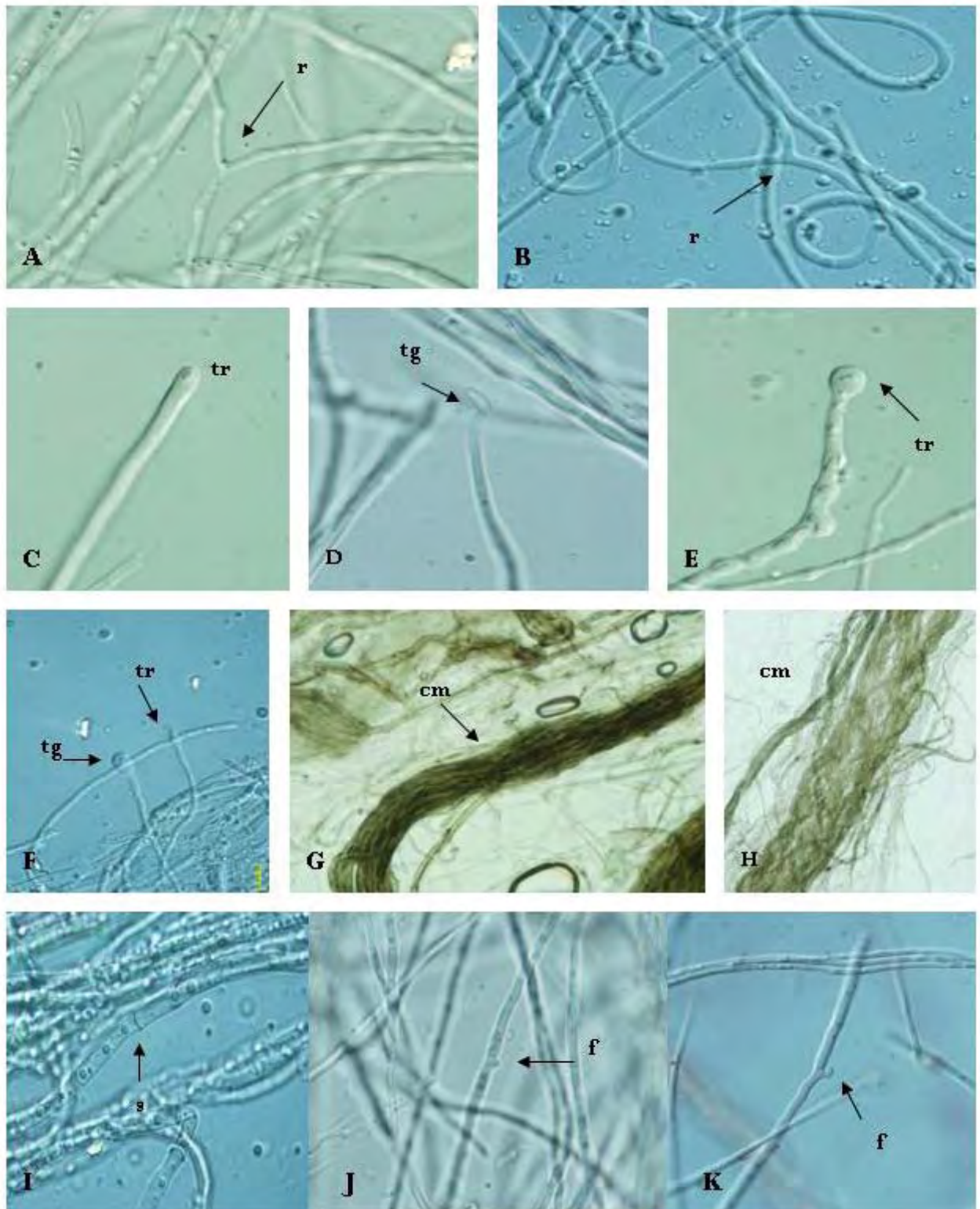


Figura 10. Características microscópicas de *I. aff. splendens*. A y B. Ramificaciones (r), C-F. Terminaciones (tr: terminación redondeada, tg: terminación en gancho, tg: terminación globosa), G y H. Cordones miceliars (cm), I. Septo (s), J-K. Fibrulas (f).

4.7.2 Evaluación de las variables biomasa, diámetro final, tasa media de crecimiento y relación biomasa/área en *Inocybe aff. splendens* (TLAX64)

En el Cuadro 26 se muestran los resultados de los ANOVA para *Inocybe aff. splendens* (TLAX 64, Anexo 3)

Cuadro 26. Resultados de las ANOVA para *I. aff. splendens* (TLAX64)

Variable de crecimiento	Prueba	F	Significancia
Biomasa (mg)	[] Glucosa	1.5	0.260
	Medios	109.79	0.0001
	pH	11.12	0.003
Diámetro final (mm)	[] Glucosa	2.005	0.163
	Medios	64.68	0.0001
	pH	25.69	0.0001
Relación biomasa/área (mg/mm ²)	[] Glucosa	2.29	0.114
	Medios	28.8	0.0001
	pH	14.36	0.001
Velocidad media de crecimiento (mm/día)	[] Glucosa	5.62	0.014
	Medios	21.14	0.0001
	pH	18.602	0.001

4.7.2.1 Biomasa (Gráfica 9)

Glucosa:

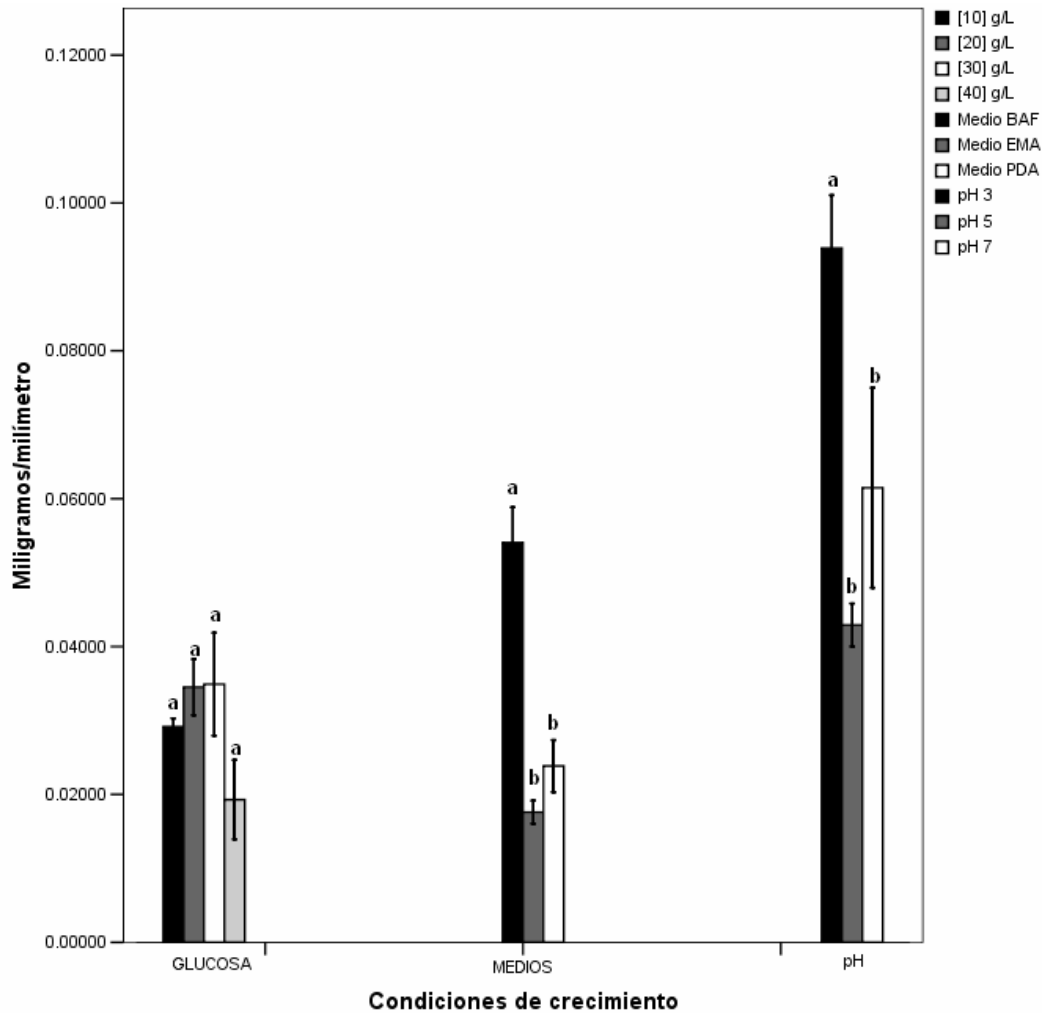
Los resultados de la ANOVA para esta prueba no muestran diferencias entre la biomasa obtenida en las cuatro concentraciones.

Medios:

Los valores de BAF fueron estadísticamente mayores a los obtenidos en los medios PDA y EMA, éstos últimos no presentaron diferencias entre sí.

pH:

La biomasa más alta se registro en pH 7, que difiere estadísticamente de pH 3 y 5.



Gráfica 11. Relación biomasa/área promedio (\pm EE) de las colonias de *I. aff splendens* (TLAX64) en tres condiciones de crecimiento

Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.7.2.2 Diámetro final (Gráfica 10)

Glucosa:

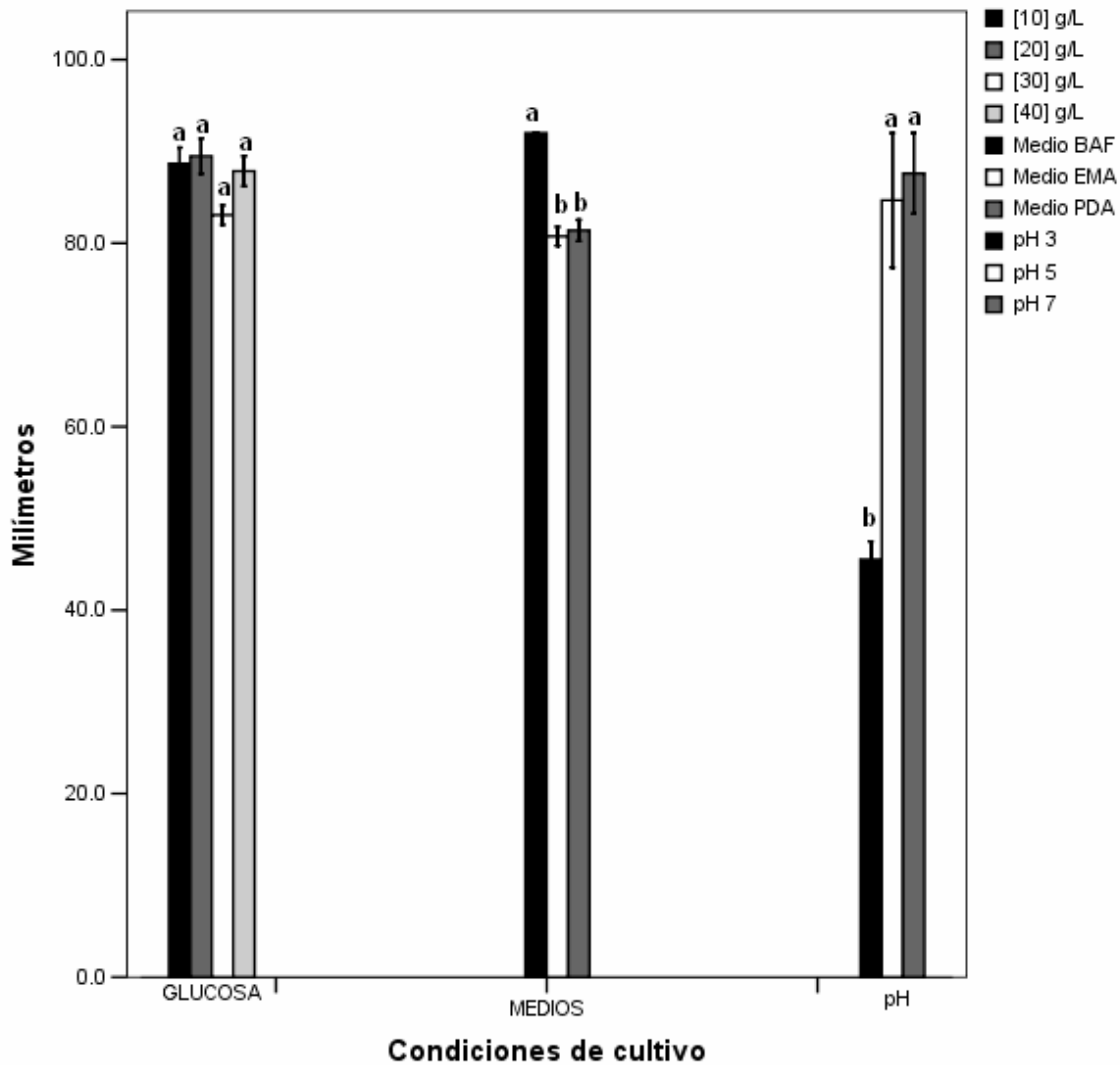
En esta condición de crecimiento no se encontraron diferencias significativas sobre el diámetro final.

Medios:

El medio BAF, donde se registró el mayor diámetro, fue estadísticamente diferente de EMA y PDA. Éstos últimos no difieren entre sí.

pH:

Bajo estas condiciones se observó que los valores de diámetro mayor se presentaron en pH 7 y 5 que no difieren significativamente, pH 3 fué estadísticamente distinto a éstos dos.



Gráfica 10. Diámetro promedio (\pm EE) de las colonias de *I. aff splendens* (TLAX64) en tres condiciones de crecimiento

Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.7.2.3 Relación biomasa/área (Gráfica 11)

Glucosa:

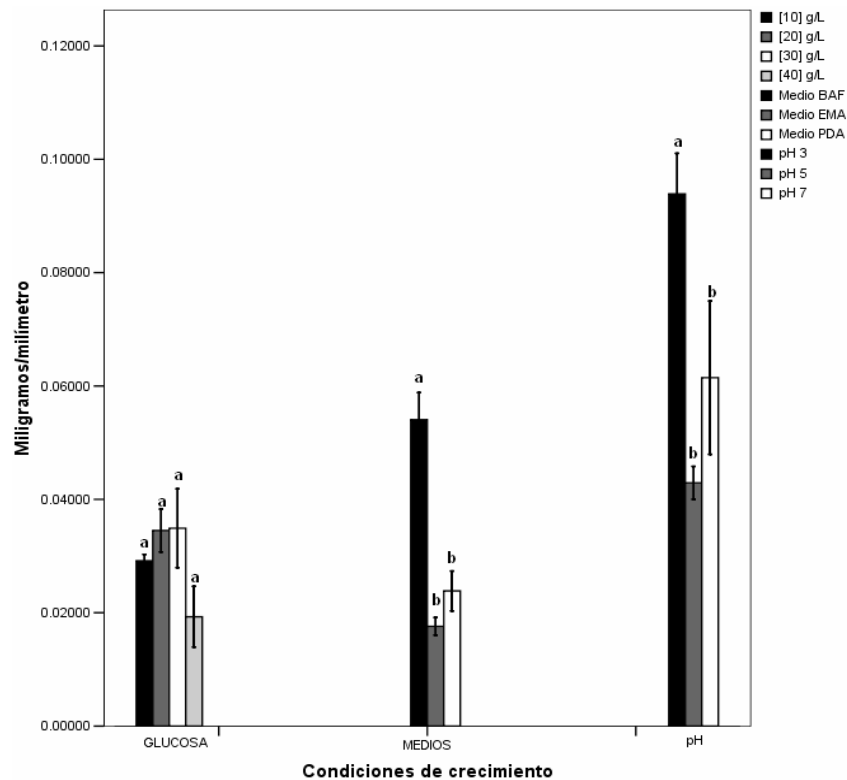
En la relación biomasa/área, los valores obtenidos en las diferentes concentraciones no presentaron diferencias significativas entre sí.

Medios:

De los tres medios, BAF fue el medió en el cuál se encontró la relación biomasa/área más alta y fue estadísticamente diferente EMA y PDA. Entre estos dos últimos no hubo diferencias significativas.

pH:

Los valores obtenidos en la relación biomasa/área se vieron favorecidos en pH 3, que fue estadísticamente distinto tanto de pH 5 como de pH 7. Estos últimos no son significativamente distintos entre sí.



Gráfica 11. Relación biomasa/área promedio (\pm EE) de las colonias de *I. aff splendens* (TLAX64) en tres condiciones de crecimiento
 Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.7.2.4 Tasa media de crecimiento (Gráfica 12)

Glucosa:

Al analizar el efecto de la concentración de glucosa sobre la tasa media de crecimiento se encontró que la concentración 20 g/L registró la media más alta y difieren estadísticamente de 30 g/L, la media más baja. Las concentraciones 10 y

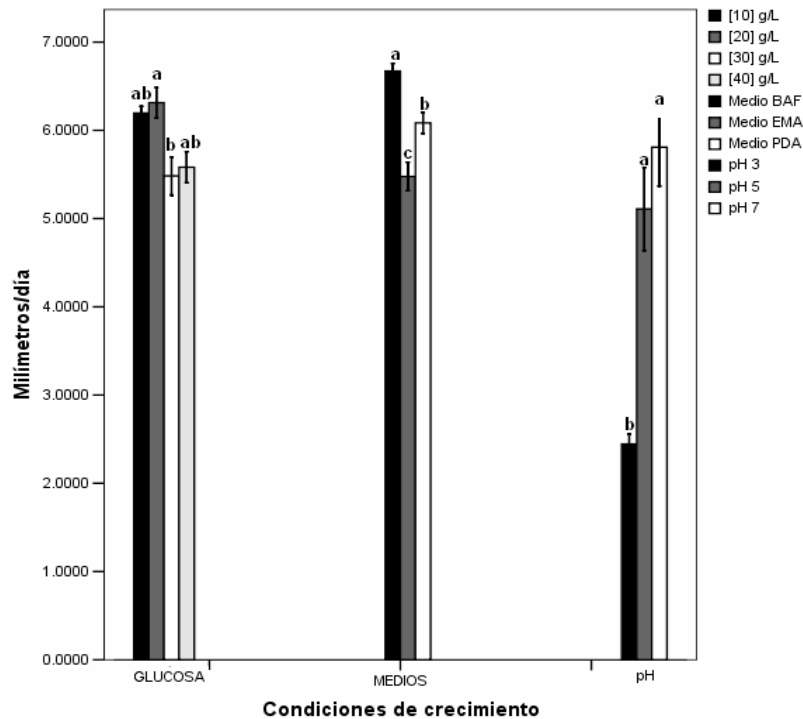
40 fueron valores intermedios y no difieren estadísticamente con ninguna de las concentraciones.

Medios:

En la prueba de medios, resultó que todos los medios son estadísticamente distintos entre sí. La media más alta la encontramos en BAF, seguido de PDA y por último EMA.

pH:

Mientras que para la prueba de pH las tasas de crecimiento más altas las encontramos en pH 7 y pH 5, estadísticamente iguales; en pH 3 registró la tasa más baja y fue estadísticamente de los dos anteriores.



Gráfica 12. Tasa media de crecimiento promedio (\pm EE) de las colonias de *I. aff splendens* (TLAX64) en tres condiciones de crecimiento
 Letras iguales por condición de crecimiento indican que no existen diferencias significativas

4.8 Morfología macro y microscópica de las especies estudiadas.

Para los hongos filamentosos como ascomicetos y deuteromicetos, la morfología macro y microscópica de las colonias cuando se cultivan *in vitro*, se ha considerado como un carácter taxonómico importante. Sin embargo, para el caso de los hongos ectomicorrizógenos, su clasificación depende tradicionalmente de los caracteres de los carpóforos sin contemplar la descripción morfológica colonial, debido a que aún es limitado el número de especies estudiadas desde este punto de vista (Hutchinson, 1991).

No obstante, el estudio de las características morfológicas de los hongos ectomicorrizógenos resulta ser de gran relevancia para evaluar las respuestas en estudios fisiológicos a pesar de la gran variabilidad que se ha reportado en este tipo de hongos (Hutchinson, 1991; Santiago-Martínez, 1992).

4.9 Pruebas de crecimiento

El hecho de que se observen diferentes requerimientos de glucosa y medios de cultivo las distintas cepas estudiadas se puede explicar considerando dos factores:

1) Las diferentes estrategias de crecimiento que tienen los hongos de acuerdo con su capacidad de adaptación, exploración, explotación y optimización de los nutrimentos en un hábitat determinado. En este sentido, Jennings y Lisek (1999) proponen que la manera en la que crecen los hongos depende del ambiente en el que se desarrollan y de la dificultad con la que encuentran los nutrimentos. Dichos autores señalan que cuando hay escasos nutrimentos el micelio es poco denso con ramificaciones muy distantes. La energía es utilizada en la elongación de unas cuantas hifas (crecimiento) para la búsqueda de sustratos. Asimismo, cuando hay nutrimentos abundantes el micelio es compacto con presencia de vesículas y gran ramificación por la mayor capacidad de distribución de los nutrimentos. La tasa de crecimiento se ve reducida y la biomasa aumenta.

Las estrategias de sobrevivencia que desarrolla el micelio dependiendo del tipo de

translocación, pasiva o activa (Olsson, 1995), que llevan a cabo, repercute en los patrones de crecimiento micelial, es decir, en la densidad de biomasa. A partir de esto Olsson (1999) propuso tres tipos de crecimiento:

- a) **Explotación del recurso disponible.** En este caso la tasa de extensión radial del micelio es baja, el micelio es denso y las colonias presentan un diámetro reducido.

- b) **Trasmigración exploratoria para usar todos los recursos en un área grande.** El micelio se caracteriza ser laxo y tener una tasa de extensión radial alta, sus colonias desarrollan diámetros grandes.

- c) **Trasmigración exploratoria para buscar más allá de donde se encuentra el recurso.** Translocando los nutrientes tomados de diferentes puntos, el micelio se caracteriza por tener unas tasas de extensión radial altas o bajas y presentarse denso o laxo, a veces formando cordones miceliales (para búsqueda y translocación de nutrientes), además de tener grandes periodos de vida.

De acuerdo con los criterios de estos autores, las cepas de *S. brevipes* en 30, 40 g de glucosa por litro y en BAF y *B. pinophilus* en los medios de BAF y PDA presentan una estrategia de explotación del recurso. En estas condiciones se obtuvo la producción de biomasa más alta y valores de diámetro y velocidad medias bajas.

Estas dos cepas tienen la capacidad de desarrollar una estrategia de trasmigración exploratoria para buscar más allá de donde se encuentra el recurso cuando crecen en concentraciones bajas de glucosa, 10 y 20 g/L, y en el medio EMA para el caso de *Suillus* y en EMA para *Boletus*. Ya que bajo estas condiciones se registraron los diámetros y las tasas de crecimiento más altas,

micelios laxos y con poca biomasa. En el caso particular de *B. pinophilus* no se define un patrón de crecimiento en las diferentes concentraciones de glucosa.

Aquihuatl (2003) encontró resultados parecidos a los obtenidos en este trabajo con respecto a la relación biomasa/área; dicha autora señaló que las colonias de *Suillus tormentosus* con textura más algodonosa presentaron densidades menores, mientras que los de textura aterciopelada o pegada al medio tuvieron de mayor densidad, éstas últimas se obtuvieron en concentraciones altas de glucosa. A su vez Galindo (2004) refiere que las cepas de *Suillus sp.* y *S. granulatus* se desarrollan de manera óptima en altas concentraciones de glucosa.

La cepa de *Inocybe splendens* presenta una estrategia de transmigración exploratoria para buscar más allá de donde se encuentra el recurso de manera indistinta en todas las condiciones de cultivo. Presentó diámetros grandes, tasas de crecimiento altas, micelios laxos y cordones miceliarios.

En el caso de *Inocybe*, Cruz Ulloa (1999) encontró que las cepas de *I. bresadolae* e *I. geophilla* var. *lilacina* presentaron crecimiento rápido en los medios MMN, PDA y EMA, ya que alcanzaron un diámetro de 90 mm en 10 días. Para el caso de *I. grammata*, dicho autor reporta un crecimiento menor en comparación con las dos cepas anteriores. No obstante, éste coincide con el encontrado para *I. splendens* en este trabajo. Asimismo, en ambos trabajos se presentaron micelios laxos y aéreos y con cordones miceliarios.

2) Las fases sucesionales de los hongos con respecto a la edad de la planta: esta es una de las interacciones más importantes que se da entre las distintas especies de hongos durante el crecimiento de la planta hospedera. Se basa en la presencia de cuerpos fructíferos de diferentes especies de hongos a lo largo del desarrollo de los árboles en condiciones naturales (Miller, 1983), por lo que se considera que hay hongos que se asocian con árboles maduros y otros que lo hacen con árboles juveniles, denominándose a este proceso como etapas tardías y tempranas,

respectivamente (Deacon y Fleming, 1992). Algunos autores han observado que la aparición de los hongos ectomicorrizógenos en un bosque, se da en secuencias tanto en espacio como en tiempo durante la conformación del sistema radical de un árbol (Thomas *et al.*, 1983; Dighton *et al.*, 1986). Este tipo de estudios sugiere una clara distinción entre hongos micorrizógenos de etapas tempranas y de etapas tardías. Estos términos están en función del tiempo durante el cual aparecen cuerpos fructíferos con relación a la edad del árbol, sin embargo, algunos hongos de etapas tempranas no se asocian exclusivamente con árboles jóvenes (Deacon y Fleming, 1992).

Los hongos de etapas tempranas se caracterizan porque los cuerpos fructíferos se desarrollan al mismo tiempo sus hospederos. Tanto los cuerpos fructíferos y sus micorrizas se localizan en la periferia del sistema radical. Tienen una baja demanda de azúcar y nutrimentos para su crecimiento y colonización en condiciones *in vitro*. (Deacon y Fleming, 1992).

Los hongos de etapas tardías, por su parte, se caracterizan porque los cuerpos fructíferos aparecen cuando los árboles son maduros, las esporas o el micelio no colonizan a la planta cuando son adicionados al suelo en condiciones *ex vitro*, también es difícil que persistan cuando son inoculados a plántulas en condiciones asépticas ya que tienen una alta demanda de azúcar y nutrimentos para su crecimiento y colonización en ambas condiciones (Deacon y Fleming, 1992).

Aunque se ha reportado que las especies de *Suillus* e *Inocybe* pertenecen a etapas sucesionales tempranas, para el caso particular de las especies estudiadas (*Suillus brevipes* e *Inocybe aff. splendens*), ambas presentaron la capacidad de crecer tanto en bajas como en altas concentraciones de nutrimentos (glucosa y medios) lo cual está determinado por las condiciones microambientales de los bosques donde crecen, esto se puede explicar por su capacidad para adaptarse a diferentes condiciones de hábitat, es decir, que se pueden desarrollar tanto en condiciones adversas u óptimas, presentando diferentes estrategias de

crecimiento dependiendo del medio en el que crecen.

Este mismo hecho lo observó Aquiahuatl *et al.* (1998) y Aquiahuatl (2003), quienes al evaluar tres cepas de *Suillus* (*S. granulatus*, *S. tomentosus* y *S. collinitus*) en cinco concentraciones de glucosa (0, 1, 19, 30 y 50 g/l) establecieron que tales cepas fueron capaces de crecer en un intervalo amplio de concentraciones de glucosa (10-50 g/l). A igual que las cepas de *S. subaureus*, *S. glandulosipes*, *S. lakei*, y *Suillus sp.* Estudiadas por Galindo (2004), quien reportó que las cepas tuvieron la capacidad de explorar el medio donde se desarrollan, además de que explotaron y optimizaron los recursos disponibles.

La cepa de *Boletus pinophilus* presentó un crecimiento indistinto en las diferentes condiciones de glucosa valores máximos de crecimiento a concentraciones altas de glucosa y medios enriquecidos (PDA, BAF), y debido a que pertenece a hongos de fases tardías, sus requerimientos de carbohidratos son mayores y son proporcionados por árboles maduros (Deacon y Fleming, 1992). Sin embargo, dada a las condiciones particulares de La CRM, esta cepa ha desarrollado la capacidad de crecer en condiciones *in vitro*, lo cual es indicativo de su posibilidad de formar micorriza con plántulas

En cuanto al pH podríamos decir que *Suillus brevipes* es un HEM acidófilo, ya que los valores más altos de la biomasa, diámetro y tasa media de crecimiento se registraron en los pH 3 y 5; la relación biomasa/área fue mayor en pH 5. Estos resultados coinciden con los publicados por Vázquez-García *et al* (2002) quienes reportaron el crecimiento de siete cepas de *Suillus* (tres de *S. glandulosipes*, dos y dos de *S. tomentosus* y *Suillus sp*) encontrando que su crecimiento se veía favorecido en pH ácidos. Coincidiendo con la cepa estudiada en este trabajo.

Para la cepa de *B. pinophilus* la única variable que se vio favorecida fue la biomasa en pH 5. Pero en general podríamos decir que el pH no fue un factor

determinante para el crecimiento de este hongo. Esto puede ser reflejo de las condiciones a las que se enfrenta en su hábitat natural.

I. aff. splendens por su parte registró una tendencia de crecimiento en pH ligeramente ácidos-neutros (5 y 7). Sólo la relación biomasa/área se vio favorecida en pH 3. Debido a que esta especie ha sido reportado como HEM de etapas tempranas probablemente presenta la capacidad de desarrollarse en diferentes condiciones.

Capítulo 5. Conclusiones

- Se recolectaron 132 morfotipos de hongos potencialmente ectomicorrizógenos en la CRM., 97 para bosque de *Abies*, 31 para *Pinus* y 4 en bosque mixto. Los géneros mejor representados fueron *Inocybe*, *Boletus*, *Laccaria* y *Amanita*.
- Se obtuvieron y mantienen en cultivo *in vitro* los asilamientos de cepas correspondientes a 7 especies de HEM..
- Las tres especies estudiadas en este trabajo: *Suillus brevipes*, *Boletus pinophilus* e *Inocybe splendens*, son nuevos registros para esta zona.
- En cuanto a la caracterización macro y microscópica, *S. brevipes*: presentó colonias regulares de coloraciones cafés, textura aterciopelada, pliegues radiales y exudados cafés. Hifas amarillentas septadas de pared delgada y rugosa, de 1.55-3.47 μm diámetro, con ramificación dicotómica y terminaciones redondeadas, globosas y forma de gancho. Presencia de hifas oleíferas y vesículas intercalares.
- Las colonias de *B. pinophilus* fueron regulares circulares, de color amarillo blanco a amarillo verdoso y olivo, de textura pruinosa y margen fimbriado. Presentaron hifas septadas de pared delgada, verdes grisáceo con un diámetro de 1-3.83 μm . Con terminaciones redondeadas y globosas. Y presencia de hifas oleíferas.
- Las cepas de *I. aff. splendens* presentaron una forma regular circular, coloraciones con tonos grisáceos, de textura algodonosa laxa, con micelio aéreo, cordones miceliares y exudados hialinos. Las hifas fueron color verde grisáceo con alto contenido citoplasmático, de 1.22 a 3.76 μm de diámetro, sinuosas y septadas. Ramificación dicotómica. Terminaciones redondeadas, gancho y globosas. Presencia de fíbulas, vesículas intercalares, cordones miceliares e hifas oleíferas.

- Con respecto a las variables de crecimiento *S. brevipes* presentó los valores más altos de crecimiento en concentraciones altas de glucosa y en los medios BAF y PDA
- Para *B. pinophilus* su crecimiento se vio favorecido en concentraciones bajas de glucosa y en los medios BAF y EMA.
- . Para la cepa de *I. aff. splendens* las concentraciones de glucosa no fueron determinantes para su crecimiento, además éste se vio favorecido en medios enriquecidos
- Tanto la cepa de *S. brevipes* como de *B. Pinophilus* desarrollaron las estrategias de crecimiento de explotación del recurso disponible y trans migración exploratoria dependiendo de las condiciones en las que se desarrollaban.
- *Inocybe aff. splendens* presentó la estrategia de trans migratoria exploratoria para buscar mas allá de donde se encuentra el recurso independientemente del medio en el que se desarrollo.
- En cuanto al pH: *S. brevipes* presento tendencias acidófilas, *Inocybe* neutras y *B. pinophilus* fue indistinto.

Lo anterior es indicativo de que las cepas estudiadas tienen diferentes estrategias de crecimiento, las cuales están determinadas por la capacidad que tiene el hongo por explorar, explotar y optimizar los recursos disponibles en el medio donde se desarrollan.

Por lo que para la selección de cepas para fines de producción de inóculo, inoculación de planta de interés forestal y restauración o rehabilitación de bosques es indiscutible y necesario conocer su fisiología, y de esta manera asegurar el éxito de la reforestación. Además de la importancia que representa el considerar cepas nativas de la zona en estudio.

Literatura citada

Agerer, R.1986. Studies on ectomycorrhizae II. Introducing remarks on characterization and identification. *Mycotaxon* 26:473-492

Agerer, R. 2001 Exploration types of ectomycorrhizae: a proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11:107-114

Agerer, R. 2006 Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Progress* 5: 67-107

Álvarez, K.E. 2000. Geografía de la educación ambiental: algunas propuestas de Trabajo en el Bosque de los Dinamos, Área de Conservación Ecológica de la Delegación Magdalena Contreras. Facultad de Filosofía y Letras, UNAM. México, D.F

Amarantus, M.P.y D.A Perry.1994.The functioning of ectomycorrhizal fungi in the field linkages in space and time. *Plant and Soil* 159:133-140

Aquihuatl, M.A., W. Rodríguez, y S. Roussos. 1998. Efecto de la glucosa en el crecimiento de hongos ectomicorrizógenos del género *Suillus*. Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica. Colima, Colima.

Aquihuatl, M.A. 2003 Fisiología del crecimiento miceliar de hongos ectomicorrizógenos en medio sólido. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias

Arnols, E. 1991.Dieback of ectomycorrhizal fungi in Europe. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 35 209-244

Ávila, Z.H., 1988. Aislamiento, caracterización y confirmación de micelios en cuatro especies de *Amanita muscaria* (Agaricales) de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Ávila- Akeberg, V. 2002. La vegetación en la cuenca alta del río Magdalena: un enfoque florístico, fitosociológico y estructural. Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.

Bledsoe, C., 1992. Physiological ecology of ectomycorrhize: implication for field application. Chapman and Hall. Londres

Bowen, G. 1994. The ecology of the ectomycorrhiza formation and functioning. Plant and Soil 159: 61-67.

Brundett M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove, N. Malajczuk.1994. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture Murdoch University-CSIRO-ACIAR, Australia

Burnett, J. 2003. Fungal populations and species. Oxford, Oxford. USA.

Buscot, F., J.C. Munch, M.J. Charcosset, M. Gardes, N. Nehls y R. Hanpp.2000. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomicorrhizal highlight the function of those symbioses in ecosystems. Microbiology Reviews 24 601-614

Cairney, J. y S. Chambers (Eds). 1998. Ectomycorrhial Fungy: Key Genera in Profile. Springer- Verlang. Alemania

Cruz Ulloa, B. 1990 Cultivo *in vitro* y caracterización de micelios de Basidiomycetes ectomicorrizógenos. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Cruz Ulloa, B. 1991. Características miceliales de *Pisolithus tinctorius* y tres especies de *Rhizopogon*. Memorias IV Congreso Nacional de Micología. Tlaxcala. Tlax.

Dahlberg, A. y Finlay, R. 1999. *Suillus* en Cairney, J., Chambers, S. (Eds). *Ectomycorrhizal Fungy: Key Genera in Profile*. Springer-Verlag. Alemania

Daza, A., M., L. Camacho, Romero de la Osa, A. Aguilar. 2006. Effect of carbon and nitrogen sources, pH and temperatures in vitro culture of several isolates of *Amanita caesarea*. *Mycorrhiza* 16, 133-136

Deacon J.W. y L.V. Fleming. 1992. Interactions of ectomycorrhizal fungus. En Allen M.J. (Ed). *Mycorrhizal functioning. An integrative plant-fungal process*. Chapman y Hall. New York.

Delgado, M.R. 2004. Los hongos ectomicorrizógenos como herramienta para la recuperación de la cubierta forestal de los ecosistemas perturbados. Tesis de maestría en ciencias biológicas. Instituto de Biología.

Delgado, A., M. Villegas y J. Cifuentes. 2005. Glosario ilustrado de los caracteres macroscópicos en Basidiomicetes con himenio laminar. Las prensas de Ciencias. UNAM. México, D.F.

Dighton, J.W. y P.A. Manson. 1985. Mycorrhizal dynamics during forest tree development. En: Moore, D., Casselton, L.A., Wood, D.A.; Frankland J.C. (Eds) *Developmental biology of higher fungi*. Cambridge Univ. Cambridge

Duddridge, J. A.; 1987. Specificity and recognition in ectomycorrhizal associations. En: Peg G. F. y P. G. Ayres (Eds) *Fungal infection of plants*. Cambridge University Press, Cambridge. Reino Unido. 25-44

Estrada- Torres, A. 2003. Ecología de los hongos ectomicorizógenos en Estrada-Torres, A. y G. Santiago-Martinez. 2003 Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. México

Estrada-Torres, A. y G. Santiago-Martinez, 2003 Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. México.

Francis, R. y D.J. Read. 1994. The Contributions of Mycorrhizal Fungi to the Determination of Plant Community Structure. En: Robson, A.D., L. K. Abbott y N.Malajczuk (eds). Management of micorrizas in Agricultura, Horticulture and Forestry. Kluwer Academia Publishers, Netherlands. 11-25

Franco-Molano, A., A. Vasco-Palacios, C. López-Quintero, Boekhout. 2005. Macrohongos de la región del Medio Caquetá, Colombia. Universidad de Antioquia. Colombia.

García, E.1978. Los climas del valle de México. Colegio de Posgraduados. Chapingo. SARH. México

Garza Ocañas, F. 1986. Hongos ectomicorízicos en el Estado de Nuevo León. Rev. Mex. Mic. 2: 197-206

Galindo, G y Santiago-Martínez, G. 2003. El manejo de los hongos ectomicorizógenos en Tlaxcala. En Estrada-Torres, A. y G. Santiago-Martinez, Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. México

Galindo, G., 2004 Introducción de brotes adventicios in vitro y micorrización en condiciones de vivero de *Pseudotsuga macrolepis* FLOUS. Tesis de maestría en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Gibson, F. y Deacon, JW.1988. Experimental study of establishment of mycorrhizas in different regions of birch root systems. *Trans Br Mycol Soc* 91:239-251

Harley, J.L. 1973 Simbiosis in ecosystems. *J. Nat. Sci.Counc.* 1, 31-48

Harley, J.L. y E.L. Harley. 1987. A check-list of the mycorrhiza in the British flora. *New Phytol* 105 (2): 1-102

Harley, J.L. y S.E. Smith. 1983. *Mycorrhizal simbiosis*. Academia Press. Londres. Inglaterra

Hernández, L., S. Castillo, P. Guadarrama, Y Martínez,, M.A. Romero, I. Sánchez, 2003. Hongos micorrizógenos arbusculares del Pedregal de San Ángel. Las Prensas de la Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Herrera, T. y Ulloa, M., (1990) *El reino de los hongos*. Fondo de cultura económica. México

Honrubia, M., P. Torres, G. Díaz, A Cano. 1992. *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales*. ICONA. España.

Hutchinson, L. 1991 Description and identification of cultures of ectomicorrhizal fungi found in North America. *MICOTAXON*, XLII:387-504

Jennings, D.H. y Lisek, G. (Eds).1999.*Fungy Biology: understanding the fungi lifestyle*. 2da ed. Springer. USA

Jujnovsky, J. 2003. *Las unidades de paisaje en la cuenca alta del Río Magdalena, México D.F.* Base fundamental para la planificación ambiental. Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.

Kaul, T.N. 2002. Biology and conservation of mushrooms. Science Publishers, Inc. India.

Kliromonos, J.N. y W.B. Kendrick. 1993 Research on micorrizas- trends in the past 40 years as expressed in the mycolite database. *New Phytol* 125: 595-600

Kobayashi , T. 2002 Notes of genus *Inocybe* of Japan I. *Micoscience* 43:207-211

Kobayashi , T. 2003 Notes of genus *Inocybe* of Japan II. *Micoscience* 44:383-388

Kobayashi , T. 2005 Notes of genus *Inocybe* of Japan III. *Micoscience* 46:184-191

Kong-Luz, A. 1998. Ectomycorrhizal Agaricales of Tlaxcala, México *Mcllvainea* 13: 13-24

Kong-Luz, A., A. Montoya, y A. Estrada-Torres, 2002. *Russula herrerae*, a new species with marginal veil from Mexico. *Mycologia* 94:290-296

Kong-Luz, A. 2003. Clasificación de los hongos ectomicorrizógenos. En: Estrada, A. y Santiago-Martinez, G., (2003) Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. México

Kornerup, A. y J.H. Wanscher. 1984. *Methuen handbook of colour*. 3^a ed. Richarg Clayltd. Londres. Inglaterra

Last, F.T., J. Dighton y P.A. Mason 1987. Successions of Sheating Micorrhizal Fungi. *Trends in Ecology and Evolution*. 2: 157-161

Lankhanpal, T. 2000. Ectomicorrhiza-an overview. En: Mukerji. *Mycorrhizal Biology*. Kluwer Academic/Plenum Publisher. USA

León, G. y G. Guzman, 1980. Las especies de hongos micorrízicos conocidos en la region de Uxpanapa-Coatzacoalcos-Los Tuxtlas-Papaloapan-Xalapa. Bol. Soc. Mex. Mic. 14: 27-38

LePage, B.A. R.S. Currah, R.A.Stockey, and G.W. Rothwell. 1997 Fossil ectomycorrhizae from the middle Eocene Am. J. Bot. 84:410-412

López E. L. 2000 Los hongos de la familia *Boleaceae sensu stricto* (Fungi, Basidiomycotina (Agaricales) de Morelos. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM.

Masera, O. M. Ordoñez, F. Dirzo. 1992. Emisiones de carbono, producto de la deforestación en México. Centro de Ecología, UNAM, México.

Mason P., F. Last, J. Pelma, K. Ingleby. 1982. Ecology of some fungi associated with an ageing stand of birches (*Betula pendula* and *B. pubescens*). Ecol Manegement. 4: 19-39

Mason, P., J. Wilson, F. Last, C. Walker. 1983 The concept of succession in relation to the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedings growing in unsterile soils. Plant and soil 71: 247-256

Mazari, M. (Comp) 2000. Dualidad Población-Agua: Inicio del tercer Milenio. Ed. El colegio Nacional. México.D.F.

Miller, O.K. 1983. Ectomycorrhiza in the agaricales and gasteromycetes. Can J. Bot. 61:909-916

Miller, S.L. y E.B. Allen, 1992. Mycorrhizae nutrient translocation, and interaction between plants. En: Allen M.F. (Ed.) Mycorrhizal functioning. Chapman y Hall. New York

Molina, R. y J.G. Palmer. 1982. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. En: Schenk N.C. (Ed) Methods and principles of mycorrhizal research. American Phytopathological Society, St. Paul.

Molina, R y J.G. Trappe.1982. Patterns of ectomycorrhizal host especificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungus. FOR. SCI. 28:423-458

Molina, R y J.M., Trappe. 1984. Mycorrhiza management in bareroot nurseries. En Duryea M.L. y T.D. Landis (Eds). Forest nurseries manual:Production of bareroot seeding. Martinus Nijhoff/Dr. W Junk Publisher, La Haya. Pp 211-223

Moore-Landecker. 1990. Fundamentals of fungi. Prentice Hall. USA

Munsell Soil Color Charts. 1975. Soil Test Inc. Maryland

Newton, A.C. 1992. Toward a functional classification of ectomycorrhizal fungus. Mycorrhiza 2:75-79

Nobles, M.K. 1965. Identification of cultures of wood inhabiting hymenomycetes. Can J. Bot. 43: 1097-1139

O'dell, E., J. Ammirati, E. Schreiner. 1999. Species richness and abundance of ectomycorrhizal basidiomycete sporocarps on a moisture gradient in the *Tsuga heterophylla* zone. Can. J. Bot. 77: 1699-1699.

Olsson, S.1995. Mycelial density profiles of fungi on heterogeneous media and their interpretation in terms of nutrient reallocation patterns. *Mycol. Res.* 99(2): 143-155

Olsson, S. 1999. Nutrient translocation and electrical and electrical signaling in mycelia. En: Gow, N.A.R. y Robson, G.D. (Eds) *The fungal colony*. Symposium of the British Mycological Society- Cambridge University Press. Cambridge

Palmer J.G. y Hacskeylo, E. 1970. Ectomycorrhizal fungi in pure culture I. Grow on single carbon source. *Physiol.Plant.* 23:1187-1197

Pantidou ME. 1961. Cultural studies of Boletaceae: *Gyrodon merulioides* and four species of *Boletinus*. *Can J Bot* 39:1149.

Pantidou M.E. y Groves. 1966. Cultural studies or boletaceae. Some species of *Suillus* and *Fuscoboletinus*. *Can J. Microbiol.* 44:1371-1394

Peña Cabriales, J. y M. Valdez, 1974. Rhizosphere du Spain (*Abies religiosa*). II Micorrhizes: Isolement et culture. *Can. J. Microbiol.* 20:412-417

Perez-Moreno, J. y R. Ferrera-Cerato. 1991. Aislamiento y caracterización de quince cepas de hongos ectomicorrízicas. *Memorias IV Congreso Nacional de Micología*. Tlaxcala. Tlax.

Quintos, M., Varela, L. y Valdés. 1984. Contribución al estudio de los macromicetos, principalmente los ectomicorrízicas en el Estado de Durango. *Bol.Soc.Mex.Mic.* 19:283-290

Rzendowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa. pp. 263-315. México.

Sánchez, F., M. Honrubia, y P. Torres. 2000. Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. Rev Iberoam Micol 2000; 17: 127-134

Santiago-Martinez, G., 1992. Pruebas de crecimiento, síntesis *in vitro* y caracterización de diez cepas de hongos ectomicorrizógenos. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias UNAM

Santiago-Martinez, G., L. Varela, A. Estrada-Torres, y V. Cuaxilo. 1995. Efecto de seis medios de cultivo sobre el crecimiento de tres cepas de *Pisolithus tinctorius*. Rev.Mex. Mic.11:57-68

Santiago-Martinez, G. L. Varela, A. Estrada-Torres, y A. Kong-Luz. 1997. Efecto de los compuestos fungistáticos sobre algunas cepas de Suillu. Rev. Mex. Mic. 13:28-32

Santiago-Martínez, Ma. G., A. Estrada-Torres. 1999. Hongos ectomicorrizógenos y producción de inoculantes para planta de interés forestal. Folleto Técnico No. 19, Fundación PRODUCE-Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala, Méx.

Santiago-Martinez, Ma. G. 2002. Pruebas de crecimiento, descripción e identificación de cultivos de hongos ectomicorrizógenos e inoculación controlada de plántulas, con esporas. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias UNAM

Smith, E., Read, D. 1992. Micorrhizal Symbiosis. Chapman and Hall. USA. .

Söderström, B.E. y D.J Read,, 1987 Respiratory activity of intact and excised ectomycorrhizal mycelial systems growing. Soil. Biol. Biochem. 11; 231-237.

Thomas,G., D. Rogers, R.M. Jackson. 1983. Changes in the mycorrhizal status of Sitka spruce following outplanting. Plant and Soil 71: 319-323

Toledo, V.M. y M.J. Ordoñez. 1998. El panorama de la Biodiversidad de México: Una Revisión de los Hábitats Terrestres. En Raramoorthy, T.O., R. Bye, R., Lot, A. y Fa, J., (Eds) Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución. Instituto de Biología. UNAM. México.

Vázquez-García A., G. Santiago-Martínez y A. Estrada-Torres. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos. Anales del Instituto de Biología, UNAM. Serie Botánica 73(1):1-15.

Vázquez-Marrufo, G., M. Gálvez-Guerra, V. Olalde-Portugal, 1998. Caracterización de dos cepas del género *Amanita* (Basidiomicetos) Memorias del II Simposium Nacional de la Simbiosis Micorrízica. Colima, Colima.

Velásquez, A., J. Mas, J. Palacio. 2002. Análisis del cambio de uso del suelo, mapas del análisis del cambio de uso del suelo. INEGI-IGg UNAM. México.

Villarreal, L. y J. Pérez-Moreno, 1989. Aprovechamiento y conservación del "mástueke americano" (*Tricoloma magnivelare*) en los bosques de México. Mic. Neotropi. Apl. 2:131-144

Villaruel-Ordaz, J. y J. Cifuentes. 2006. Reporte técnico de la sección de Micología del herbario FCME, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F., como parte del proyecto "Manejo de ecosistemas y desarrollo humano en la Cuenca del Río Magdalena, D.F."

Villalobos, V. M., T.A. Thorpe, y E.C. Yeung. 1983. Aplicaciones del cultivo de tejido en especies forestales. Ciencia y Desarrollo. 51(9):43-59

Villeneuve, N., M. Grandtner y J. Furtin. 1988. Frequency and diversity of ectomycorrhizal and saprophytic macrofungi in the Laurentide Mountain of Quebec. Can. J. Bot. 67. 2616-2629.

Yamanaka, T. 2003. The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi in vitro. *Mycologia* 95(4):584-589

Zar (1984). *Biostatistical analysis*. 2da