



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
CEPAS DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS EN DIFERENTES
FUENTES DE NITRÓGENO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MIRIAM MILDRED RESÉNDIZ MARTÍNEZ



DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. GEMA LILIA GALINDO FLORES

2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno

Reséndiz

Martínez

Miriam Mildred

56 96 93 29

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

304008753

2. Datos del tutor

M en C

Gema Lilia

Galindo

Flores

3. Datos del sinodal 1

Dr

Francisco Javier

Álvarez

Sánchez

4. Datos del sinodal 2

Dra

Hermelinda Margarita

Villegas

Ríos

5. Datos del sinodal 3

Dr

Sigfrido

Sierra

Galván

6. Datos del sinodal 4

Dra

María Guadalupe

Barajas

Guzmán

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación del crecimiento y caracterización de cepas

de hongos ectomicorizógenos en diferentes fuentes de nitrógeno

75p

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Evaluación del crecimiento y caracterización de cepas de hongos ectomicorrizógenos en diferentes fuentes de nitrógeno

realizado por **Reséndiz Martínez Miriam Mildred** con número de cuenta **3-0400875-3** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez

Propietario Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos

Propietario M. en C. Gema Lilia Galindo Flores
Tutora

Suplente Dr. Sigfrido Sierra Galván

Suplente Dra. María Guadalupe Barajas Guzmán

Atentamente

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU ”

Ciudad Universitaria, D. F., a 26 de marzo de 2015
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/MGM/mdm *Uau*

Comité revisor:

Presidente: Dr. Francisco Javier Álvarez Sánchez

Vocal: Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos

Secretario: M. en C. Gema Lilia Galindo Flores
Tutor

Suplente: Dr. Sigfrido Sierra Galván

Suplente: Dra. María Guadalupe Barajas Guzmán.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis se llevó a cabo en los Laboratorios de Micorrizas del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala y del Laboratorio de Ecología del Suelo del Depto. de Ecología y Recursos Naturales de la Facultad de Ciencias, UNAM, bajo la dirección de la M. en C. Gema Lilia Galindo Flores.

Esta tesis formó parte del proyecto “Aislamiento, Caracterización y Pruebas de Conservación de Cepas de Hongos Micorrizógenos” financiado por Coordinadora Nacional de Fundaciones Produce A.C.-SAGARPA (RGAG-2012-2013). 2013.

A la M. en C. Gema Lilia Galindo Flores, por su apoyo, paciencia y asesoría durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Javier Álvarez Sánchez y a la Dra. Guadalupe Barajas Guzmán, por sus importantes observaciones en el escrito. Así mismo agradezco a la Dra. Irene Sánchez Gallen y el M. en C. Juan Carlos Peña Becerril por su apoyo durante el taller y por sus críticas constructivas durante las presentaciones que sin duda ayudaron a mejorar.

A la Dra. Hermelinda Margarita Villegas Ríos y el Dr. Sigfrido Sierra Galván por sus correcciones y valiosas observaciones que ayudaron a mejorar el trabajo.

A la UNAM y a la Facultad de Ciencias que han sido mi segundo hogar durante la carrera y que para mí es un orgullo pertenecer a la máxima casa de estudios.

DEDICATORIAS

Primero, dedico esto a mis padres, Enrique Reséndiz Rafael y Alejandra Martínez Castillo que siempre han sido un gran ejemplo para mí. Les agradezco su incondicional apoyo y paciencia durante toda la carrera y en este proceso de titulación, ya que sin ellos no hubiera logrado este objetivo.

A mis hermanas Ingrid Alejandra y Cintia Gabriela Reséndiz Martínez que han sido mis mejores compañeras y consejeras en cada momento de mi vida.

A mis amigos que siempre han estado para apoyarme y animarme cuando más lo he necesitado.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Importancia ecológica y funcional de los HECM	6
1.2 Nutrición e importancia del nitrógeno en hongos	7
1.3 Asociación de HECM con plantas y uso de inoculantes en zonas forestales	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Estudios de pruebas de crecimiento con HECM en diferentes condiciones <i>in vitro</i>	12
2.2 Estudios con fuentes de nitrógeno en HECM	16
3. JUSTIFICACIÓN	21
3.1 Pregunta de estudio	22
3.2 Hipótesis	22
3.3 Objetivos	22
3.3.1 Objetivo general	22
3.3.2 Objetivos particulares	22
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 Sistema biológico de estudio	23
4.2 Pruebas de crecimiento	24
4.2.1 Preparación del medio de cultivo	24
4.2.2 Cultivo de los HECM	25
4.3 Caracterización morfológica macro y microscópica de las colonias	25
4.4 Evaluación de las variables de crecimiento	26
5. RESULTADOS	28
5.1 Caracterización morfológica de cinco cepas de HECM	28
5.1.1 Caracterización morfológica macro y microscópica de <i>Suillus pseudobrevipes</i> GF 2328	28
5.1.2 Caracterización morfológica macro y microscópica de <i>Suillus</i> aff. <i>pseudobrevipes</i> KL2296	31
5.1.3 Caracterización morfológica macro y microscópica de <i>Suillus tomentosus</i> GF2359	33
5.1.4 Caracterización morfológica macro y microscópica de <i>Suillus tomentosus</i> GF2362	36
5.1.5 Caracterización morfológica macro y microscópica de <i>Boletus edulis</i> GF2160	39

5.2 Evaluación de las variables de crecimiento. Diámetro final, biomasa, velocidad media de crecimiento y relación biomasa/área en cinco cepas de HECM	41
5.2.1 <i>Suillus pseudobrevipes</i> GF 2328	41
5.2.2 <i>Suillus</i> aff. <i>pseudobrevipes</i> KL2296	42
5.2.3 <i>Suillus tomentosus</i> GF2359	43
5.2.4 <i>Suillus tomentosus</i> GF2362	44
5.2.5 <i>Boletus edulis</i> GF2160	45
6. DISCUSIÓN	47
6.1. Caracterización morfológica macro y microscópica de cinco cepas de HECM en diferentes fuentes de nitrógeno.	47
6.2. Evaluación de las variables de crecimiento en cinco cepas de HECM con diferentes fuentes de nitrógeno	51
7. CONCLUSIONES	56
8. RECOMENDACIONES	58
9 LITERATURA CITADA	59
10 ANEXO	66
Composición de medio nutritivo BAF (Biotina-Aneurina-Ácido Fólico)	

Índice de cuadros

1. Características macroscópicas de <i>S. pseudobrevipes</i> GF2328 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno	28
2. Características microscópicas de <i>S. pseudobrevipes</i> GF2328 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno	29
3. Características macroscópicas de <i>S. aff. pseudobrevipes</i> KL2296 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno.	31
4. Características microscópicas de <i>S. aff. pseudobrevipes</i> KL2296 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno.	31
5. Características macroscópicas de <i>S. tomentosus</i> GF2359 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno	33
6. Características microscópicas de <i>S. tomentosus</i> GF2359 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno	34
7. Características macroscópicas de <i>S. tomentosus</i> GF2362 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno	36
8. Características microscópicas de <i>S. tomentosus</i> GF2362 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno	37
9. Características macroscópicas de <i>B. edulis</i> GF2160 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno.	39

10.	Características microscópicas de <i>B. edulis</i> GF2160 diferentes fuentes de nitrógeno.	39
11.	Variables de crecimiento de <i>S. pseudobrevipes</i> GF2328 en diferentes fuentes de nitrógeno.	42
12.	Variables de crecimiento de <i>S. aff. pseudobrevipes</i> KL2296 en diferentes fuentes de nitrógeno.	43
13.	Variables de crecimiento de <i>S. tomentosus</i> GF2359 en diferentes fuentes de nitrógeno.	44
14.	Variables de crecimiento de <i>S. tomentosus</i> GF2362 en diferentes fuentes de nitrógeno.	45
15.	Variables de crecimiento de <i>B. edulis</i> GF2160 en diferentes fuentes de nitrógeno.	46
16.	Medio nutritivo: BAF (Biotina Aneurina Ácido Fólico) (Moser, 1960)	66

Índice de figuras

1.	Tipos de micorrizas	4
2.	Estructura de la ectomicorriza	5
3.	<i>Suillus tomentosus</i>	24
4.	<i>Suillus pseudobrevipes</i>	24
5.	<i>Boletus edulis</i>	24
6.	Caracterización macroscópica de <i>S. pseudobrevipes</i> GF2328	30
7.	Caracterización microscópica de <i>S. pseudobrevipes</i> GF2328	30
8.	Caracterización macroscópica de <i>S. aff. pseudobrevipes</i> KL2296	32
9.	Caracterización microscópica de <i>S. aff. pseudobrevipes</i> KL2296	32
10.	Caracterización macroscópica de <i>S. tomentosus</i> GF2359	35
11.	Caracterización microscópica de <i>S. tomentosus</i> GF2359	35
12.	Caracterización macroscópica de <i>S. tomentosus</i> GF2362	38
13.	Caracterización microscópica de <i>S. tomentosus</i> GF2362	38
14.	Caracterización macroscópica de <i>B. edulis</i> GF2296	40
15.	Caracterización microscópica de <i>B. edulis</i> GF2296	40

RESUMEN

Los bosques de coníferas son de gran importancia ya que proporcionan servicios ecosistémicos a todo el planeta, sin embargo una gran proporción se encuentra afectado por factores antropocéntricos lo cual ha provocado su deterioro. Para tratar de recuperarlos es necesario implementar acciones que favorezcan su rehabilitación. Una alternativa es la reforestación, la cual puede ser favorecida por organismos capaces de establecer simbiosis mutualista con plantas de interés forestal presentes en los ecosistemas, como los hongos ectomicorrizógenos (HECM) que al asociarse con las raíces de las plantas les brindan beneficios importantes para que puedan tener un mejor y mayor crecimiento apoyando así la estructura vegetal de la comunidad. No obstante, antes de usar los HECM se requiere evaluar el crecimiento micelial *in vitro* de éstos bajo diferentes condiciones para conocer sus características fisiológicas, ya que éstas nos señalarán los requerimientos nutricionales de cada especie o cepa y con ello se podrá hacer una selección adecuada de HECM para ser utilizados en programas de producción de inoculo en plantas de interés forestal. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el crecimiento micelial de cinco cepas de HECM, las cuales fueron aisladas previamente y forman parte del cepario del Lab. De Micorrizas de la UATX, estas corresponden a una cepa de *Suillus pseudobrevipes*, una de *Suillus* aff. *pseudobrevipes*, dos cepas de *Suillus tomentosus* y una de *Boletus edulis*. Las cepas de los HECM se sometieron a pruebas de crecimiento *in vitro* con diferentes fuentes de nitrógeno, las cuales fueron KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HP0}_4$, peptona y un control sin fuente de nitrógeno, estandarizado a 116 mg/L de nitrógeno. El medio de cultivo utilizado fue Biotina-Aneurina-Ácido Fólico (BAF), cada uno de los tratamientos se incubaron en una cámara de crecimiento en condiciones de oscuridad, a 24°C, durante 30 días. Se realizó la caracterización morfológica macro y microscópica del crecimiento micelial para cada cepa en cada fuente de nitrógeno. En las características macroscópicas se tomaron en cuenta coloraciones, margen de la colonia y textura. Para las microscópicas se realizaron cortes transversales de las colonias, se observaron en campo claro y de contraste de fases de Nomarski; observando el tipo de ramificación, diámetro de las hifas, coloración, forma, septos y ápices de las hifas (terminación). Para todas las coloraciones se utilizó la tabla de Colores de Munsell.

Por otro lado se analizaron variables de crecimiento como el diámetro final de la colonia, biomasa, velocidad media de crecimiento y relación biomasa/área. Estas variables se analizaron con ANOVA de una vía y se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0.05$) para conocer cuáles fueron los tratamientos estadísticamente diferentes.

Como resultados en las caracterizaciones macro-morfológicas, se observó que *Suillus pseudobrevipes* GF2328 y *S. tomentosus* GF2359, GF2362, tuvieron semejanzas en cuanto a la coloración y forma de las colonias como el micelio algodonoso, fibriloso, anillos concéntricos y pliegues radiales, además las cepas GF2328 y GF2359 presentaron exudados hialinos. Debido a que *S. aff. pseudobrevipes* KL2296 presentó un crecimiento mínimo sólo se observaron características morfológicas en los tratamientos control y KNO_3 como micelio laxo con hifas filamentosas. *Boletus edulis* GF2160 también presentó un crecimiento muy limitado por lo que sólo se logró observar escaso micelio blanco y laxo. En las características micro-morfológicas de las cepas, todas presentaron características similares como las ramificaciones en Y, tricotómicas, hifas sinuosas y puntas redondeadas. Además en *Suillus aff. pseudobrevipes* KL2296 se observó la presencia de cristales. En cuanto a las variables de crecimiento no hubo diferencias significativas en *S. tomentosus* GF2359 y GF2362, en *S. pseudobrevipes* GF2328 se encontraron diferencias significativas en la biomasa y la relación B/A. *S. aff. pseudobrevipes* KL2296 presentó diferencias significativas en diámetro, biomasa y velocidad media de crecimiento (VMC), mientras que *B. edulis* GF2160 presentó diferencias significativas en diámetro y velocidad media de crecimiento. Con base en los resultados de las variables de crecimiento, se concluye que las cepas estudiadas presentaron diferentes estrategias de crecimiento debido a su capacidad de explorar, explotar y usar los recursos disponibles. Asimismo, las cepas que podrían ser más viables para su uso en programas de reforestación son *S. pseudobrevipes* GF2328 y *S. tomentosus* GF2359 y GF2362

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos, como organismos vivos que son, no pueden considerarse aislados puesto que al carecer de clorofila y de pigmentos foto o quimiosintéticos se ven obligados a buscar los nutrientes orgánicos producidos por otros organismos para su supervivencia. De acuerdo al tipo de nutrición los hongos pueden ser saprófitos, simbióticos mutualistas o parásitos. Un grupo particular de hongos simbióticos mutualistas son los que establecen la asociación denominada micorriza la cual se da con plantas superiores (Calonge, 1990).

La micorriza es la asociación simbiótica mutualista que existe entre las raíces de la planta y las hifas de los hongos; este término viene del griego *mykes* (hongo) *rhiza* (raíz). Estas interacciones mutualistas son importantes para la vegetación ya que es uno de los mecanismos desarrollados por las plantas para competir por los nutrientes que se encuentran en la solución del suelo, mejorando la absorción de agua y nutrientes de la raíz, de esta manera favorecen su establecimiento en los suelos con escasos nutrimentos (Calonge, 1990; Smith y Read, 1997).

Actualmente las asociaciones micorrízicas se encuentran distribuidas en todos los ecosistemas terrestres, las cuales tienen importancia tanto en el funcionamiento como en el mantenimiento de estos ecosistemas, principalmente de las regiones boreales, templadas y tropicales. Uno de los principales beneficios de esta simbiosis es el intercambio de nutrientes, en el cual los hongos reciben carbono de las plantas y éstas reciben fósforo, nitrógeno y sales minerales a través de las hifas del hongo asociado, así como el mejoramiento hídrico en las plantas. Debido a esto, las raíces micorrizadas de las plantas que forman dicha asociación son consideradas más eficientes para nutrirse que las que no están colonizadas (Pérez-Moreno y Read, 2004; Álvarez-Sánchez y Monroy-Ata, 2008).

Otro beneficio de las plantas micorrízicas es que pueden adquirir protección contra parásitos, depredadores, nematodos y otros patógenos del suelo, es por ello que las micorrizas son de gran importancia en el funcionamiento de los ecosistemas (Timonen y Marschner, 2006; Futai, *et al.*, 2008).

Actualmente se considera que el 90% de las plantas terrestres forman algún tipo de micorriza. Dependiendo del grado de penetración que presenta el micelio, el cual puede ser dentro o fuera de las células corticales de la raíz. Se distinguen dos tipos principales de micorriza, las ectomicorrizas y las endomicorrizas (Santiago-Martínez y Estrada-Torres 1999; Tedersoo *et al.*, 2006).

Sin embargo, algunos autores como Smith y Read (1997) proponen siete tipos diferentes, de acuerdo al grado de inserción del hongo, el grupo de plantas y hongos involucrados en la asociación, así como de las estructuras que desarrollen (Figura 1).

- Arbuscular
- Ectomicorriza
- Ectendomicorriza
- Arbutoide
- Monotropoide
- Ericoide
- Orquideoide

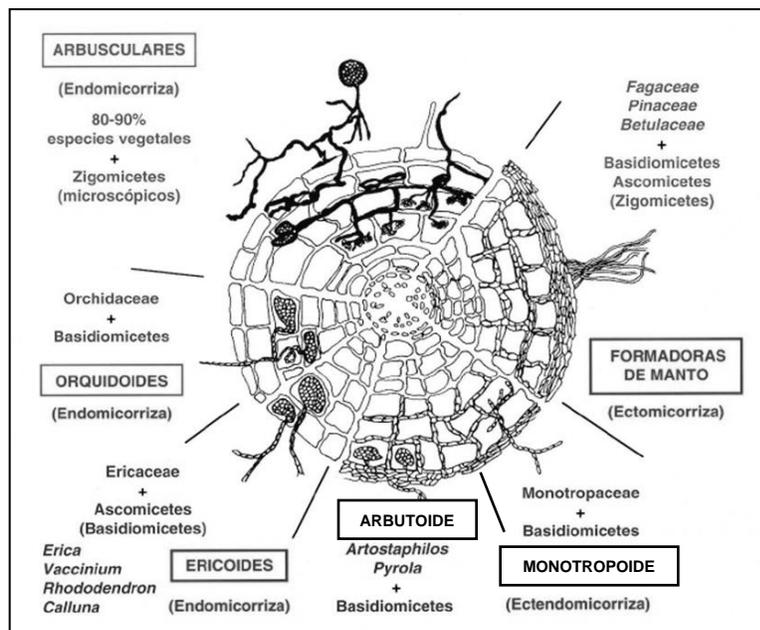


Figura 1.- Tipos de micorriza. (Tomado de <http://dungun.ufro.cl/~cesararriagada/Laborat.htm>)

Este trabajo se enfocó al estudio de la asociación ectomicorrízica (ECM), en las cuales durante su formación las raíces sufren alteraciones morfológicas y fisiológicas en donde funcionan de forma integrada con el hongo y de esta manera se convierten en simbioses mutualistas. El hongo asociado (principalmente Agaricomycetes), cubre las raíces cortas formando un manto, las hifas crecen del manto hacia adentro entre los espacios intersticiales de las células corticales de la raíz, formando un complejo sistema intercelular denominado “red de Hartig” (Figura 2), esto sin que exista penetración intracelular en la planta huésped (Smith y Read, 1997; Dutra *et al.*, 2002; Siddiqui y Pichtel, 2008).

La mayoría de este tipo de asociaciones se encuentra en el 3% de las plantas fanerógamas y en regiones templadas, así como también en el 90% de las plantas forestales (Siddiqui y Pichtel, 2008). En Brasil muchas plantas arbóreas de importancia económica, como *Pinus*, *Eucalyptus* y *Acassia mangium* son capaces de asociarse con hongos, este hecho sugiere una gran importancia en el uso de los HECM para mejorar la producción forestal (Dutra *et al.*, 2002). Particularmente en nuestro país, existen escasas investigaciones que han abordado la importancia de los HECM en el crecimiento de las plantas y rehabilitación de bosques templados perturbados (Estrada-Torres, 2003), estos estudios consistieron en ensayos de inoculación de especies como *Pinus greggi*, *P. hartwegii*, *P. montezumae*, *P. patula*, *P. pseudostrobus*, y *Eucalyptus urophylla* (Cuevas-Rangel, 1979; Estrada-Torres y Valdés, 1986; Santiago-Martínez, 2002; Muñoz, 2003; Carrera-Nieva y López, 2004; García-Rodríguez *et al.*, 2006; Perea-Estrada *et al.*, 2009).

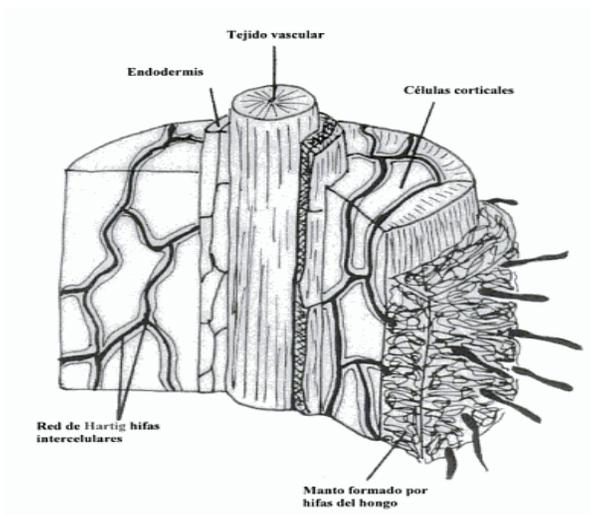


Figura 2.- Estructura de la ectomicorriza (tomado de Jackson y Mason, 1984)

1.1 Importancia ecológica y funcional de los HECM

Los hongos ectomicorrizógenos tienen un papel importante en la productividad y restablecimiento de la vegetación, desempeñando funciones ecológicas vitales para el desarrollo de poblaciones vegetales. En las plántulas, ayuda a que éstas se establezcan más fácilmente en un bosque manteniendo así el hábitat (Zamora-Martínez, 1999). También son importantes en los ciclos del nitrógeno y fósforo ya que son capaces de promover la mineralización de los nutrientes y de solubilizar minerales por medio de ácidos orgánicos, dejando los elementos disponibles para las plantas. Las hifas del manto también son capaces de sintetizar compuestos de reserva como el glucógeno, polifosfatos y proteínas (Botton y Chalot, 1991; Dutra *et al.*, 2002).

La simbiosis ectomicorrízica es la más diversa de todas las asociaciones micorrízicas, la diversidad surge de los grupos de hongos y plantas que conforman dicha asociación, los cuales incluyen alrededor de 6000 especies de hongos, en su mayoría Basidiomycetes, Ascomycetes y algunos Zygomycetes. En cuanto a las especies de plantas, se encuentran Pinaceae, Cupressaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Dipterocarpaceae y Myrtaceae. Estos grupos de plantas constituyen un gran componente de los árboles dominantes de los bosques templados, por lo tanto la simbiosis ectomicorrízica es importante para estos ecosistemas, debido a que la mayoría de los árboles de estos bosques son altamente dependientes de sus hongos simbioses y por lo tanto no podrían existir sin ellos ya que favorecen su establecimiento y ayudan a un mejor crecimiento en suelos que se encuentren con cierto grado de deterioro (Pérez-Moreno y Read, 2004; Pera y Parladé, 2005; Futai *et al.*, 2008).

Los HECM son considerados un grupo funcional debido al papel que desempeñan las ECM en los ecosistemas, como el intercambio de fotosintatos y elementos nutritivos entre los diferentes estratos de la vegetación y del suelo, también actúan como reguladores de la sucesión vegetal (McGuire *et al.*, 2008).

El micelio externo de estos hongos juega un papel importante en la absorción y transporte de nutrientes minerales y orgánicos, debido a que al asociarse con la raíz de la planta ayudan a una mejor absorción y por lo tanto dependen de los HECM para su crecimiento y supervivencia (Leake *et al.*, 2004).

Otra de las funciones que tiene el micelio es la de formar redes miceliales, las cuales conectan a una serie de diferentes plantas hospederas. Estas redes de micelio son los componentes más dinámicos y funcionales de esta simbiosis, debido a que reciben aproximadamente el 10% de la fotosíntesis neta de las plantas hospederas, los costos y los beneficios funcionales de las plantas que están conectadas con estas redes son específicos de cada hongo, esto debido a las variaciones que hay en su fisiología y la especificidad que tienen con el hospedero, por lo que algunas plantas incluso dependen exclusivamente de estas redes para adquirir los nutrientes (Lee *et al.*, 1997; Futai *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista fisiológico los HECM facilitan la absorción de nutrientes poco disponibles en el suelo para las plantas, como el fosforo, nitrógeno, azufre y potasio. Además de ser mediadores e integradores, ya que a través del transporte de agua y nutrientes regulan la tasa fotosintética, esto debido al crecimiento de las hifas que modifican la permeabilidad y estructura del suelo, aumentando de esta manera la sobrevivencia de las plantas asociadas al incrementar la superficie de absorción de agua. (Zamora-Martínez, 1999).

1.2 Nutrición e importancia del nitrógeno en hongos

Los hongos para su nutrición requieren de compuestos orgánicos como fuentes de energía y de carbono, así como moléculas más simples; los monosacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos, también requieren de compuestos complejos como los disacáridos. Sin embargo, la fuente de energía más abundante que se encuentra en la naturaleza para el crecimiento de los hongos son los carbohidratos de origen vegetal, ya que casi todos los hongos requieren glucosa, pero también pueden utilizar maltosa, sacarosa y almidón (Deacon, 1997).

Es por eso que la proporción carbono: nitrógeno en los HECM es de aproximadamente 10:1, esto quiere decir que hay 10 veces más carbono que nitrógeno en las células de los hongos, por lo tanto estos elementos se deben de suministrar en esa proporción en un medio balanceado, debido a que parte del carbono del sustrato lo utilizan en la producción de energía eliminándolo en forma de CO_2 , ya que en el proceso de la respiración éste se convierte en biomasa. Por lo tanto, la cantidad exacta va a depender de las condiciones de crecimiento, por lo que un medio ideal es aquel que tiene una proporción C: N de 20:1 para que el hongo agote el nitrógeno al mismo tiempo que el carbono. Cuando hay un desbalance en el medio de crecimiento, el metabolismo del organismo se desequilibra y el crecimiento se hace más lento. Por otro lado, los hongos también requieren del nitrógeno para crecer, tales como los aminoácidos. La mayoría de los hongos pueden utilizar NH_4^+ y algunos otros utilizan NO_3^- , sin embargo si al hongo se le suministra una mezcla de éstos, muestra una clara preferencia por el NH_4^+ (Deacon, 1997).

Es por ello que el nitrógeno tiene un efecto importante en la formación de HECM, debido a que si hay una baja en la cantidad de compuestos de nitrógeno, la diversidad de especies de hongos puede disminuir. Sin embargo, esto depende de las especies, ya que existen HECM que responden positivamente a una mayor disponibilidad de nitrógeno, mientras que otros disminuyen en abundancia de este elemento o desaparecen. Por ejemplo especies del género *Cortinarius* y *Russula* muestran disminución en la producción de esporomas y la diversidad de especies, mientras que *Lactarius rufus*, *L. necator*, *Cantharellus tubaeformis* y *Paxillus involutus* presentan una mayor formación de esporomas después de la fertilización nitrogenada (Brandrud, 1995).

El desarrollo, mantenimiento y función de las ectomicorrizas también están regulados por la disponibilidad de carbohidratos, debido a que el desarrollo de las ectomicorrizas está correlacionado con los ritmos de crecimiento que regulan la translocación de carbohidratos a partir de las raíces adventicias. Así mismo, el estrés ambiental también afectará a las comunidades de plantas micorrizadas debido a que cualquier factor puede alterar la

asignación de hidratos de carbono a las raíces y por lo tanto, el estrés tiene el potencial de influir en la simbiosis ectomicorrízica (Nylud y Wallander, 1989).

En los suelos forestales no contaminados, el nitrógeno está presente como NH_4^+ y compuestos orgánicos de NO_3^- tales como aminoácidos, péptidos y proteínas, los cuales se encuentran principalmente en la hojarasca. Sin embargo, el éxito de la asimilación del nitrógeno va a depender de las ECM, que al formarse en las capas del suelo donde los compuestos orgánicos de nitrógeno están presentes en grandes cantidades y a través de sus hifas tendrán la capacidad de degradar el nitrógeno orgánico para tomar y asimilar los productos de la degradación hidrolítica. Esto ayuda a las plantas que tienen una capacidad muy limitada para utilizar sustancias orgánicas complejas que se encuentran en la capa del suelo. También es importante mencionar que el P y N son los nutrientes más limitantes en el suelo y que los HECM al producir exoenzimas ayudan a que las plantas hospederas puedan obtener los nutrientes que no están disponibles (Chalot y Brun, 1998).

Por otro lado, el nitrógeno inorgánico representa menos del 1% total presente en los suelos forestales y es uno de los principales factores que limitan el crecimiento de los árboles en los bosques templados. Tal es el caso de los Abetos en donde el nitrógeno es importante porque la absorción de amonio ha mejorado en las raíces micorrizadas en comparación con las raíces no micorrizadas (Rygiewicz *et al.*, 1984; Rudawska, 2007).

La capacidad que tienen los HECM de utilizar una amplia gama de compuestos nitrogenados va a depender del crecimiento que estos presenten, debido a que si tienen un crecimiento rápido van a tener una capacidad limitada para utilizar fuentes de nitrógeno complejas, mientras que los de crecimiento lento tienen la capacidad de degradar las fuentes de nitrógeno complejas y estos últimos van a estar asociados con los ecosistemas de bosques maduros (Eaton y Ayres, 2002).

1.3 Asociación de HECM con plantas y uso de inoculantes en zonas forestales

Los HECM son muy abundantes en el suelo de los ecosistemas forestales a escala global, debido a que las especies vegetales con las que se asocian son abundantes (Smith y Read, 1997). Aunado a lo anterior, varias especies de HECM pueden asociarse con una sola planta e interactuar entre ellos, esta forma de asociarse entre los micelios de los hongos de varias especies con las raíces de diversas plantas incrementa el área de absorción e intercambio de nutrimentos, lo cual le proporciona ventajas adicionales. A esta capacidad que tienen los hongos ectomicorrizógenos de formar la asociación con una sola especie de planta hospedera o con una amplia gama de ellas, se denomina especificidad (Cordell y Marx, 1994).

De acuerdo a las especies de plantas que forman micorriza con las especies fúngicas se pueden apreciar tres categorías de especificidad: 1) estrecha, en donde los hongos ectomicorrizógenos se asocian solo con un género de planta, a estas especies de hongos se les conoce como especialistas, 2) intermedia, estos hongos tienen la particularidad de establecer la asociación con un sola familia de plantas, por ejemplo *Suillus* y *Rhizopogon* que se asocian con Pinaceae, 3) amplia, donde los hongos tienen la capacidad de formar micorrizas con una gran diversidad de plantas hospederas denominándose como especies generalistas, tal es el caso de *Cenococcum geophilum*, que es quizá el hongo con la gama más amplia, con cerca de 150 diferentes hospederos (Molina y Trappe, 1982; Molina *et al.*, 1992).

Una especie generalista hace referencia además a aquellas que pueden desarrollarse en una amplia variedad de condiciones ambientales, de la misma manera tienen la capacidad de asimilar una gran variedad de nutrientes; de manera contraria, las especialistas solo pueden crecer en un estrecho rango de condiciones y sus requerimientos nutricionales son específicos (Finlay, 2008).

La estructura y diversidad de las comunidades vegetales y de los HECM son afectadas además por variables climáticas y edáficas en forma interdependiente, es decir, que los cambios que ocurran en una de ellas se reflejará en la otra y viceversa. Esto sugiere la existencia de una relación positiva entre la diversidad de especies vegetales y de HECM (Richard *et al.*, 2005).

Es por ello que la micorrización controlada en vivero, así como el efecto en los procesos de reforestación sugieren que los HECM son un componente esencial en los ecosistemas forestales ya que ayudan a la recuperación de suelos degradados (Castellano y Molina, 1989). Sin embargo, el efecto que tenga el HECM sobre las plantas micorrizadas va a depender de la especie fúngica asociada y las condiciones ambientales, por lo tanto la selección de HECM para producción de inóculo es uno de los aspectos más relevantes para la producción de especies forestales destinadas a programas de reforestación o restauración de suelos (Trappe, 1977). En este contexto, la presencia de HECM en asociación con la planta es de vital importancia para mantener y estimular la absorción y retención de agua, así como la fijación de CO₂ y con ello contribuir a la recuperación de ecosistemas forestales (Aguilar-Aguilar *et al.*, 2009).

Para conocer la efectividad del HECM inoculado es necesario evaluar el porcentaje de colonización micorrízica, aunado a la descripción morfológica de las ectomicorrizas y el efecto que tienen sobre el crecimiento de la planta. No obstante, para hacer una adecuada selección y producción de los HECM destinados a la elaboración de inóculo y micorrización de plantas de interés forestal, primero es necesario realizar pruebas de crecimiento en condiciones *in vitro* de las cepas de HECM y de esta forma conocer la fisiología de los hongos, las condiciones del cultivo que favorecen su crecimiento y sus características morfológicas.

2. ANTECEDENTES

Se han realizado diversos estudios en cuanto a pruebas de crecimiento *in vitro* en cepas de hongos ectomicorrizógenos, esto con diferentes condiciones de crecimiento como es el pH, fuentes de carbono, nitrógeno y medios de cultivo, esto se hace para tener un conocimiento más amplio y poder saber en que condiciones crecen mejor las cepas de HECM.

2.1 Estudios de pruebas de crecimiento con HECM en diferentes condiciones *in vitro*

En un estudio realizado por Sánchez *et al.* (2000) describieron las características macro y microscópicas de las colonias miceliales de 21 especies de hongos ectomicorrizógenos cultivados en condiciones *in vitro*, en donde mencionan la importancia de carácter taxonómico que tiene estas descripciones. Los aislamientos los realizaron a partir de los esporomas de HECM recolectados en distintos bosques de España, los medios de cultivo utilizados fueron Modified Melin-Norkrans (MMN) y Biotina-Aneurina-Ácido Fólico (BAF) en donde los dejaron crecer durante cuatro semanas y posteriormente hicieron la descripción macro-morfológica. Entre sus resultados destaca que los micelios de *Boletus satanas*, *Lactarius deliciosus*, *Hebeloma edurum*, *Lycoperdon perlatum*, *Paxillus atrotomentosus*, *Rhizopogon roseolus* y *Suillus collinitus* presenta características macroscópicas variables entre las distintas cepas tal como la coloración del micelio, abundancia de micelio aéreo y presencia de exudados, mientras que en las características microscópicas fue la presencia de engrosamientos y de hifas flexuosas. Concluyen que las cepas tienen una variabilidad intra-específica relacionada con las características genéticas dentro de la misma especie. Por ello sugieren que la diversidad de características miceliales puede constituir una herramienta taxonómica importante como complemento a los caracteres macro y microscópicos ya conocidos en la taxonomía de hongos. Finalmente estos autores sugieren realizar más trabajos de esta índole, ya que son necesarios para caracterizar el banco de inóculo de las diferentes especies de hongos ectomicorrizógenos.

Santiago-Martínez *et al.* (2003) estudiaron la capacidad de *Laccaria bicolor* al asociarse con *Pinus montezumae*, para lo cual realizaron pruebas de crecimiento con una cepa de *L.*

bicolor en siete medios de cultivo, esto se hizo para saber las condiciones adecuadas en las que puede crecer. Los medios de cultivo que utilizaron fueron, Agar Papa Dextrosa (PDA), Extracto de Malta y Agar (EMA), Sabouraud-Agar (SAB), ING, Medio Melin-Norkrans Modificado (MNM), Hagem (HG) y Biotina-Aneurina-Ácido-Fólico (BAF). También caracterizaron morfológicamente la cepa en cada uno de los medios de cultivo. Para evaluar crecimiento, tomaron en cuenta valores de velocidad media, diámetro colonial y la biomasa. Los resultados que obtuvieron muestran que la mayor biomasa fue en BAF y SAB, por lo que concluyen que estos medios son idóneos para obtener una mayor cantidad de biomasa y el medio EMA y BAF para obtener una mayor velocidad de crecimiento y diámetro colonial. Por último mencionan la importancia de la asociación con *Pinus montezumae* ya que puede ser utilizada para reforestación.

Daza *et al.* (2005), evaluaron el crecimiento *in vitro* de siete cepas de *Lactarius deliciosus* en diferentes fuentes de carbono, nitrógeno, pH y temperatura. Como fuente de carbono usaron almidón, malato, glucosa, maltosa, manitol y sacarosa (20 g/L); para las fuentes de nitrógeno probaron Bacto-Casaminoácidos, albúmina bovina, extracto de levadura, KNO₃ y (NH₄)₂HPO₄, en cuanto a temperaturas probaron 20, 24 y 28°C, y pHs de 5, 6, 7 y 8. Los parámetros que utilizaron para medir el crecimiento de estas cepas fueron el peso seco y el diámetro del micelio. Posteriormente estas cepas las probaron como inoculantes fúngicos en plantas de *P. pinea*. Sus resultados mostraron que la maltosa y sacarosa fueron las fuentes de carbono en donde se obtuvo el mayor diámetro micelial, mientras que las mayores biomásas se observaron en glucosa y fructosa. En las fuentes de nitrógeno, el extracto de levadura como fuente compleja obtuvo valores altos en biomasa y el amonio fue mejor utilizado que el nitrato. La temperatura y pH óptimo fue de 24°C y 5-6, respectivamente.

Otro estudio fue realizado por Daza *et al.* (2006) en donde obtuvieron varias cepas de *Amanita caesarea* que se encontraban asociadas a *Quercus suber* y *Castanea sativa* procedente del suroeste de España, las cuales sometieron a pruebas de crecimiento en diferentes condiciones de pH, temperatura, fuentes de nitrógeno y carbono. Observaron que las mejores condiciones de crecimiento para *A. caesarea* es un pH 6-7, una temperatura de

24-28°C, la fuente de nitrógeno en la que tuvo un mejor crecimiento fue amonio y las fuentes de carbono manitol y glucosa, se observaron los valores mas altos en biomasa y sólo con manitol se produjeron los diámetros más grandes. También observaron que el almidón, sacarosa y fructosa fueron los que menos utilizaron las cepas y la xilosa inhibió el crecimiento en todas las cepas. En este estudio concluyen que el conocimiento *in vitro* de *A. caesarea*, así como los requerimientos que necesita para su crecimiento son importantes para la producción de inóculo ya que puede ser aplicado en campo o vivero para aumentar así la producción de esporomas y de sus beneficios ecológicos.

García-Rodríguez *et al.* (2006) caracterizaron varias cepas del hongo ectomicorrizógeno *Pisolithus tinctorius*, el cual es de importancia para la inoculación de plantas de interés forestal y al mismo tiempo es una especie comestible en estadios juveniles. Los esporomas fueron recolectados de plantaciones forestales tropicales de eucalipto y pino. Se describieron las características morfológicas de estas cepas en condiciones *in vitro* contemplando tres medios de cultivo sólidos (PDA, MNM y extracto de malta). También se evaluó el crecimiento micelial en medio MNM líquido y en una mezcla de vermiculita-turba. Observaron que en medio líquido se obtuvieron los mayores diámetros y el incremento de la biomasa en los medios PDA y MNM, esto en comparación con el extracto de malta. Los autores concluyen que las variaciones que tuvieron estos hongos en cuanto a su crecimiento en los diferentes medios de cultivo son importantes para caracterizar dichas cepas y que con base en sus características de crecimiento se puede hacer una selección adecuada de los HECM con fines de producción de inóculo.

Por su parte Alvarado (2008) realizó una evaluación del crecimiento micelial de tres cepas de hongos ectomicorrizógenos, *Suillus brevipes*, *Boletus pinophilus* e *Inocybe aff. splendens*, estos hongos están asociados a especies de coníferas de los bosques de la Cuenca del Río Magdalena, México, DF. Las cepas las sometió a pruebas de crecimiento con diferentes concentraciones de glucosa y en diferentes medios de cultivo (BAF, EMA y PDA), así como también distintos pH (3, 5 y 7) en medio de cultivo BAF. Dicho autor observó que las altas concentraciones de glucosa favorecieron al crecimiento de *Suillus brevipes*, sin embargo en concentraciones bajas de glucosa *Boletus pinophilus* tuvo un

crecimiento favorable y finalmente para la cepa de *Inocibe. aff. splendens* tuvo un mejor crecimiento en los medios enriquecidos.

Chávez, *et al.* (2008) realizaron un estudio con *Lactarius deliciosus*, el cual crece asociado a *Pinus radiata*. En los medios sólido MNM y BAF determinaron la velocidad de crecimiento radial y en el medio líquido de BAF evaluaron la biomasa micelial, variación de pH y la determinación del consumo de azúcares. Los autores concluyeron que hubo un mayor incremento en velocidad media de crecimiento radial en el medio BAF mostrando diferencias significativas con el medio MNM. Por otro lado, mencionan que la producción de biomasa micelial en el medio líquido aumentó a medida que avanzaban los días de incubación, lo que ocasionó una disminución del pH en el medio de cultivo y hubo un aumento en el consumo de azúcar como producto del crecimiento del hongo.

El trabajo que realizaron Flores *et al.* (2008) sobre caracterización morfológica de cultivos miceliales en medio nutritivo BAF de ocho cepas de *Lactarius deliciosus*, *L. aff. salmonicolor*, *L. indigo* y *L. aff. rubrilacteus* procedentes de Guatemala y España, mostraron diferencias en color, forma y textura. Las cepas europeas fueron fibrilosas y con sectores con coloraciones amarillo a naranja, por otro lado, las Neotropicales formaron colonias fibrilosas muy compactas de color naranja-rosado, por lo que consideraron la posibilidad de que fueran especies diferentes.

Díaz *et al.* (2009) observaron el crecimiento *in vitro* de siete cepas de *Boletus edulis*, *B. pinohilus*, *B. luteoloincrustatus*, *Boletellus russelii*, *Suillus tomentosus* y *S. bovinus*, procedentes de Guatemala, como patrón de referencia usaron tres cepas procedentes de España de *Boletus edulis* y *B. pinohilus*. Para la caracterización micelial emplearon los medios Moser-B, modificado-MNM y Pachlewski y Gamburg.

Dichos autores observaron que principalmente en *Suillus tomentosus* los mayores crecimientos de micelio los obtuvo con los medios MNM y Moser, obteniendo un diámetro de 50mm a los 35 días de cultivo. Por otro lado, en cuanto a la morfología de las colonias miceliales, observaron que los micelios de las cepas de *Boletus* fueron similares entre sí, en donde *B. luteoloincrustatus* produjo micelios de color beige más oscuro que *B. edulis* y *B.*

pinophilus. Dichos autores concluyen que para la selección de cepas fúngicas es importante conocer las características nutricionales y ambientales que requiere cada una para su crecimiento y fructificación ya que esto podría ayudar a nuevas investigaciones acerca de estos hongos comestibles.

Dorothee Sianard *et al.* (2010) realizaron un estudio en donde examinaron el efecto del pH en el crecimiento de *Rhizopogon luteolus*, *Scleroderma sp.*, *Scleroderma verrucosum*, *Suillus gamuletus* y *Suillus bellinii*, aislados a partir de los esporomas y cultivados en el medio nutritivo BAF con pH de 4.6, 5.6, 6.6 y 7.6, fueron incubados a 24°C durante 28 días. Dichos autores evaluaron la velocidad de crecimiento radial, el área de crecimiento colonial y la variación de pH del medio. Una variación en el pH tuvo un efecto significativo sobre la velocidad y área final de las dos especies de *Scleroderma sp.*, alcanzando los mayores crecimientos en pH 5.8 y 6.8. Mientras que *S. bellinii* obtuvo la mayor área y velocidad de crecimiento en los pH de 4.8 y 5.8 respectivamente, *R. luteolus* obtuvo la máxima velocidad de crecimiento en pH 5,6 y 6,6 y el que obtuvo una mayor área de crecimiento en todas las condiciones de pH. En cuanto a las cepas de *Suillus*, estas lograron sus máximos crecimientos en área total en pH 5,6 y 6,6 y finalmente la especie *S. verrucosum* tuvo un comportamiento similar a las cepas de *Suillus* logrando su mayor área total de crecimiento a pH 5,6. Estos autores indican que el pH del medio es determinante en el comportamiento de las especies de los HECM en condiciones *in vitro* y podrían ayudar a la selección de especies ectomicorrizógenas para producir inóculo micelial.

2.2 Estudios con fuentes de nitrógeno en HECM

Con respecto a la importancia del nitrógeno en la nutrición de los HECM en condiciones *in vitro*, los trabajos aún son más escasos destacando los siguientes.

Abuzinadah y Read (1986) evaluaron ocho cepas de HECM de importancia ecológica, las cuales fueron: *Amanita muscaria*, *Cenococcum geophilum*, *Laccaria laccata*, *Lactarius rufus*, *Paxillus involutus*, *Pisolithus tinctorius*, *Rhizopogon roseolus* y *Suillus bovinus*. Las

cepas fueron aisladas a partir de esporomas y sometidas a pruebas de crecimiento *in vitro*, los cultivaron en medios líquidos con péptidos o proteínas (alanina) como únicas fuentes de nitrógeno. Mediante la determinación de los patrones de crecimiento y absorción de nitrógeno en cultivos líquidos observaron que la capacidad de los hongos para utilizar péptidos, aminos y proteínas como única fuente de nitrógeno es muy amplia. También encontraron que algunos de los hongos tenían poca capacidad para crecer en péptidos o proteínas pero crecieron bien en amonio. Otros crecieron favorablemente en péptidos y proteínas, agotando los contenidos de nitrógeno en los medios de cultivo. Con los resultados obtenidos concluyeron que los hongos tienen la capacidad de sostener un hábito saprófito o micorrízico en suelos que difieren en su contenido de nitrógeno.

El estudio de Duñabeitia *et al.* (1991) con cultivos puros de los hongos ectomicorrizógenos *Pisolithus tinctorius*, *Boletus pinicola*, *Xerocomus badius* y *Suillus luteus*, en asociación con *Pinus radiata* y sembrados en medio MN líquido, mostraron que en la actividad fosfatasa con *Suillus luteus* y *Xerocomus badius* se obtienen valores semejantes entre sí, mientras que *Pisolithus tinctorius* y *Boletus pinicola* obtuvieron valores inferiores; mencionan que una capacidad limitada en la producción de fosfatasa reduce las posibilidades de que el hongo pueda colonizar el suelo. Por el contrario en la actividad nitrato reductasa las especies de *Pisolithus tinctorius* y *Boletus pinicola* obtuvieron valores muy altos y los valores más bajos los obtuvieron *Suillus luteus* y *Xerocomus badius*.

Estos datos indican la capacidad que tiene algunos hongos respecto a como asimilan los nutrientes en el medio donde se encuentren, ya que algunas cepas asimilaron mejor compuestos de nitrógeno y otros compuestos de fosfato. Con sus resultados concluyeron que el valor potencial de las actividades enzimáticas sirve para hacer una selección de hongos, de esta manera, los valores altos suponen una mayor viabilidad de los hongos para utilizarse como inoculantes en condiciones de vivero. Dichos autores sugieren que la actividad fosfatasa resulta útil en la selección de los hongos micorrizógenos para su uso como inoculantes.

Las observaciones del crecimiento de los hongos ectomicorrizógenos: *Laccaria bicolor*, *Laccaria proxima*, *Thelephora terrestres*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Paxillus involutus*, *Piloderma croceum*, *Lactarius rufus*, *Suillus variegatus* realizadas por Finlay *et al.* (1991) en medio líquido de Melin- Norkrans modificado y adicionado con sulfato de amonio, nitrato de calcio, albúmina de suero bovino, alanina, asparagina, ácido glutámico, arginina y la proteína gliadina en diferentes concentraciones, muestran que los hongos tienen la capacidad de utilizar las proteínas para su crecimiento, por otro lado mencionan que *P. involutus* es capaz de utilizar nitrato como única fuente de nitrógeno.

Kieliszewska-Rokicka (1992) sometió a cultivo *in vitro* ocho cepas de *Paxillus involutus*, con tres variantes de nitrógeno; $[(\text{NH}_2)_2\text{HPO}_4/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, N0 (0.17mM), N1 (3.78mM), N5 (18.92mM). Posteriormente inoculó plántulas de *Pinus sylvestris*, con diferentes cepas de *P. involutus* previamente aislados en condiciones axénicas. En este trabajo se observó que los niveles más altos de nitrógeno en forma de amonio estimularon el crecimiento de los micelios e incrementó la actividad total de fosfatasa ácida, por otro lado, las tasas de crecimiento del micelio y actividades de la fosfatasa ácida variaron ampliamente de una cepa a otra. También se encontró que las plántulas de *Pinus sylvestris* micorrizadas contenían más fósforo que las no micorrizadas. Dicho autor concluyó que no hay relación entre la actividad de la fosfatasa ácida de los hongos en cultivos puros y su capacidad para formar micorriza. La eficiencia de los hongos ectomicorrizógenos parece ser dependiente tanto de la estructura de las hifas como de la forma en la que el hongo es capaz de utilizar el medio, por lo tanto las cepas con una alta actividad de fosfatasa pero con un crecimiento lento podrían ser menos eficientes en la formación de micorrizas y en la nutrición de las plantas hospederas que aquellos con menor actividad enzimática pero con una capacidad de propagación muy rápida.

Dickie *et al.* (1998) analizaron la respuesta de los hongos ectomicorrizógenos en diferentes concentraciones de nitrógeno (7 y 70 mg/L de N usando como fuente a la arginina), estos hongos fueron *Amanita rubescens*, *Lactarius affinis*, *Leccinum aurantiacum*, *Tylopilus felleus* y dos aislamientos de *Suillus intermedius* recolectados en una plantación de *Pinus resinosa*.

Para su cultivo utilizaron el medio de cultivo Melin-Norkrans gelificado al cual modificaron añadiendo diferentes concentraciones de arginina y/o proteína. Con excepción de *Leccinum aurantiacum* y un aislamiento de *S. intermedius*, el resto de las cepas fueron capaces de utilizar las proteínas como fuente de nitrógeno evidenciado en el aumento de la biomasa. Por otro lado, también *Leccinum aurantiacum* mostró una tendencia hacia una menor biomasa en medio con proteínas y fue más lento su crecimiento. Dichos autores concluyen que los hongos tienen el potencial para utilizar las proteínas y sugieren que estos HECM alteran sus formas de crecimiento de acuerdo a la concentración de nitrógeno.

Un análisis *in vitro* de tres cepas hongos ectomicorrizógenos (*Paxillus involutus*, *Suillus variegatus* y *Lactarius rufus*) para observar la capacidad de crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno como sulfato de amonio, nitrato de calcio, albúmina de suero bovino, gliadina, ácido glutámico, glutamina, alanina, arginina, asparagina y ornitina. Las habilidades de los tres HECM para utilizar fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas se determinaron midiendo el crecimiento y las poliaminas libres, mostró diferencias en la utilización de fuentes de nitrógeno y en las concentraciones de poliaminas entre las especies de hongos. Todos los hongos crecieron bien en amonio y en aminoácidos, sin embargo, los niveles de poliaminas endógenas variaron con respecto a la fuente de nitrógeno usada. En el caso de espermidina fue la poliamina más abundante, pero en *P. involutus* se encontró espermidina y putrescina, así como un mejor crecimiento en nitrógeno inorgánico o arginina. En el caso de las cepas de *S. variegatus* y de *L. rufus*, se encontraron bajas cantidades de espermina. Con sus resultados concluye que en todos los hongos las concentraciones de putrescina fueron mayores con amonio que con nitrato (Sarjala, 1999).

Barr y Stanton (2000) realizaron un estudio *in vitro* en donde examinaron las interacciones entre HECM, hongos basidiomicetos saprófitos y hongos microscópicos del suelo presentes en los bosques de pino, esto en relación con las diferentes concentraciones de amonio. Utilizaron basidiomicetos saprófitos como *Clitocybe marginella* y *C. vibecina*, microscópicos como *Penicillium pinetorum*, *Oidiiodendron avum* y *Torulomyces lagena*, estos hongos los cultivaron para compararlos con los HECM *Cenococcum geophilum*,

Laccaria bicolor y *Rhizopogon luteolus*. El medio de cultivo que ocuparon fue MMN, el cual modificaron al agregarle diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. En sus resultados encontraron diferencias significativas entre los HECM, basidiomicetos saprófitos y los microscópicos del suelo, esto debido a que las diferentes concentraciones de amonio afectaron de manera diferencial a las interacciones en condiciones *in vitro*. Los autores sugieren que se tienen que realizar otros estudios para mejorar el conocimiento sobre las interacciones dentro de las comunidades de hongos ya que se podrían ver afectados por las condiciones ambientales.

Rangel-Castro *et al.* (2002) realizaron un estudio en donde observaron el crecimiento de *Cantharellus cibarius* en un medio líquido MFM con diferentes fuentes de nitrógeno, como el amonio, albúmina de suero bovino y nitrato. Sus resultados mostraron que los aislamientos de *C. cibarius* tuvieron diferentes patrones de crecimiento con las diferentes fuentes de nitrógeno. Dichos autores sugieren que el amonio es la fuente de nitrógeno que más fácilmente usan la mayoría de los HECM, la cual es adecuada para *C. cibarius*. La producción de biomasa fúngica fue similar cuando el amonio se suministra por separado o en combinación con nitrato. Por otro lado, mencionan que *C. cibarius* tiene una capacidad limitada para metabolizar nitrato. También señalaron que si la concentración de nitrato en el suelo aumentara podría ser perjudicial para este hongo. Dichos autores concluyeron que *C. cibarius* al utilizar varias fuentes de nitrógeno presenta diferentes patrones de crecimiento y esto puede sugerir una variación intraespecífica dentro del género.

Como se puede observar, con los estudios ya mencionados es importante realizar pruebas de crecimiento en cepas de hongos ectomicorizógenos puesto que ayudan a conocer los requerimientos nutricionales y las condiciones en las cuales los hongos tienen un mejor crecimiento, así como las características fisiológicas que presentan.

3. JUSTIFICACIÓN

Los hongos ectomicorrizógenos (HECM) tienen una función importante dentro del mantenimiento de los ecosistemas forestales por lo que representan una alternativa para reforestación, restauración y conservación de estos ecosistemas. Dichos hongos ayudan al crecimiento de las plantas debido al incremento de la superficie de absorción de agua y nutrimentos, además de proteger a las raíces de organismos patógenos. Cada HECM contribuye de manera diferencial en la obtención y translocación de los elementos minerales hacia la planta, lo cual está determinado por las condiciones en que se desarrolla de manera natural. El nitrógeno es el elemento principal que los HECM traslocan hacia la planta, no obstante, dependiendo de sus características metabólicas son capaces de obtener el nitrógeno de fuentes simples o complejas.

Para hacer un uso adecuado de los HECM en la reforestación primero es necesario realizar estudios en donde se involucren directamente a estos organismos, entre los que destacan pruebas fisiológicas del micelio *in vitro* con el fin de conocer las condiciones óptimas de su crecimiento puesto que cada hongo tiene requerimientos específicos.

Un factor relevante en el crecimiento de los HECM es la fuente de nitrógeno por lo que es de gran importancia aproximarse a los valores que optimizan el desarrollo de diferentes cepas de HECM en condiciones *in vitro*. Asimismo, 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 esporomas de los HECM, además de que sus características de crecimiento en condiciones *in vitro* nos pueden brindar información sobre su comportamiento en la rizósfera. Es por ello que este trabajo se enfocó a la realización de pruebas de crecimiento con diferentes cepas de HECM (*Suillus* y *Boletus*) en diferentes fuentes de nitrógeno (simples y complejas), lo cual contribuirá al conocimiento de algunos aspectos de la fisiología de los HECM y ello permitirá hacer una selección adecuada de las cepas con fines de producción de inóculo útil en programas de reforestación.

3.1 Pregunta de estudio

¿Cómo influyen las diferentes fuentes de nitrógeno (simple o complejo) en la morfología y crecimiento de las colonias miceliales de cepas de hongos ectomicorrizógenos?

3.2 Hipótesis

Al someter las cepas de HECM a diferentes fuentes de nitrógeno (simples y complejas) se espera que sus características morfológicas macro y microscópicas puedan variar dependiendo de su habilidad para aprovechar el recurso disponible. Sin embargo, se espera que las cepas conserven características morfológicas propias del género.

En cuanto a las variables de crecimiento, se espera que los mayores crecimientos (diámetro final, biomasa, velocidad media de crecimiento y relación biomasa/área) se presenten en las fuentes de nitrógeno simples.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Evaluar el crecimiento micelial *in vitro* de cinco cepas de hongos ectomicorrizógenos bajo diferentes fuentes de nitrógeno.

3.3.2 Objetivos particulares

◆ Determinar el efecto que tienen las diferentes fuentes de nitrógeno ((NH₄)₂HPO₄, KNO₃, Peptona) en la morfología micelial macro y microscópica de cinco cepas de HECM.

◆ Evaluar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno ((NH₄)₂HPO₄, KNO₃ y Peptona) en el crecimiento colonial (diámetro de la colonia, biomasa, velocidad media de crecimiento y relación biomasa/área) de cepas de HECM.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Sistema biológico de estudio

El sistema de estudio consistió de cinco cepas de HECM, dos corresponden a *Suillus tomentosus* (GF2359, GF2362), una de *Suillus pseudobrevipes* (GF2328), una de *Suillus* aff. *pseudobrevipes* (KL2296) y una de *Boletus edulis* (GF2160). Estas cepas fueron previamente aisladas de esporomas procedentes de diferentes localidades, La Malinche en Tlaxcala y los Dinamos, en la delegación Magdalena Contreras, Distrito Federal.

Estas cepas forman parte el Ceparario de Hongos Ectomicorrizógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Suillus

De forma general, las especies de *Suillus* pertenece a la familia Suillaceae del orden Boletales, producen esporomas caracterizados por un píleo convexo, con cutícula viscosa, himenóforo formado por tubos y poros amarillos, estípite cilíndrico, a menudo granulado y en ciertas especies con anillo. Las especies de *Suillus* son consideradas de etapas tempranas debido a que en los ecosistemas se asocian con plántulas, aunado a que para su crecimiento no requieren de la planta hospedera. *Suillus* forma esporomas asociados sólo con especies vegetales particulares como *Pinus* spp. y por lo tanto son considerados como hongos de hospederos específicos (Santiago-Martínez, 1992).

Boletus

Las especies del género *Boletus* son hongos carnosos y generalmente de gran tamaño, algunos ejemplares pueden medir hasta los 20 cm, de forma hemisférica durante buena parte de su desarrollo, presenta tonos rojizos o pardos. Se encuentra en primavera y otoño en bosques de pino y Fagus. Estas especies generalmente son de etapas tardías, es decir se asocian con plantas adultas y requieren de su huésped para crecer adecuadamente.

Los *Boletus* tienen una asociación amplia con varias especies de árboles en las familias Fagaceae, Betulaceae, Malvaceae, Cistáceas, Salicaceae y Pinaceae (Catcheside y Catcheside, 2012).

Las funciones ecológicas de estos hongos ectomicorrízicos son que establecen simbiosis con especies de coníferas, especialmente pinos (Calonge, 1990).



Figura 3.- *Suillus tomentosus*



Figura 4.- *Suillus* aff. *pseudobrevipes*



Figura 5.- *Boletus edulis*

4.2 Pruebas de crecimiento

Para las pruebas de crecimiento se establecieron cuatro tratamientos los cuales consistieron en fuentes de nitrógeno simples y complejas, así como un control sin fuente de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno que se utilizaron fueron KNO_3 (nitrato de potasio) el cual es considerado un compuesto simple debido a su estructura química, seguido del $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (fosfato ácido de amonio bibásico) y finalmente la peptona el cual un compuesto complejo.

4.2.1 Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo que se utilizó fue Biotina-Aneurina-Ácido Fólico (BAF) el cual es uno de los medios que se utilizan para el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrizogénicos. Para su elaboración se pesaron cantidades exactas de los compuestos que lleva el medio (ver anexo 1).

Al medio BAF se le adicionó cada una de las fuentes de nitrógeno, fosfato diamónico ((NH₄)₂HPO₄), Nitrato de potasio (KNO₃) y Peptona, estandarizados a una concentración de 116 mg/L de nitrógeno (Daza *et al.*, 2006), además se consideró un control sin fuente de N. El medio de cultivo se ajustó a un pH de 6, posteriormente se esterilizó en autoclave a 120 libras de presión durante 15 minutos (Santiago-Martínez y Estrada-Torres, 1999).

4.2.2 Cultivo de los HECM

En una campana de flujo laminar y con las condiciones de asepsia necesarias, se procedió a vaciar el medio de cultivo en cajas de Petri estériles de 100x20 mm con 30 ml del medio BAF al que previamente se le añadieron las fuentes de nitrógeno, se dejaron solidificar. Posteriormente se sembró el inóculo de la cepa seleccionada, con un horador se tomaron fragmentos de 6 mm de diámetro de cada una de las cepas. Se realizaron siete repeticiones por cada cepa y por tratamiento, obteniendo una muestra de 140 cajas. Posteriormente se colocaron en cámaras de crecimiento en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 24°C (Santiago-Martínez y Estrada-Torres, 1999) y se dejaron en estas condiciones durante 30 días. En este periodo se tomaron mediciones del crecimiento de las colonias con la ayuda de un vernier.

4.3 Caracterización morfológica macro y microscópica de las colonias

Se realizó la caracterización morfológica macro y microscópica de las cepas para cada uno de los tratamientos aplicados (KNO₃, (NH₄)₂HPO₄, Peptona y un control).

La caracterización morfológica de las cepas para cada una de las condiciones de cultivo se realizó considerando los criterios de Pantidou (1961), Nobles (1965) y Pantidou y Groves (1966).

Para la caracterización macroscópica se consideraron características como 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).

Para la caracterización microscópica se hicieron preparaciones semipermanentes, lo cual consistió en hacer cortes radiales del centro hasta el margen de la colonia y tomar un fragmento micelial procurando tomar solo parte del micelio (sin agar) para una mejor visualización de la hifas, posteriormente se colocó en un porta-objetos al cual se le añadió Alcohol Polivinílico (PVL) para fijar el micelio y se cubrió con un cubre-objetos. La revisión microscópica consistió en la observación de las preparaciones en microscopio de campo claro y de contraste interferencial de Nomarski. Se describieron características en cuanto a la morfología de las hifas como el patrón de ramificación, color, diámetro, forma de las terminaciones, vesículas intercalares, cristales y fíbulas (Hutchinson, 1991; Santiago-Martínez, 2002; Galindo-Flores, 2004). Se tomaron fotografías utilizando una cámara Infinity 1 Capture Versión 6.1.0 acoplada al microscopio de campo claro y de Nomarski Zeiss Axioscop 2 Plus. Para las mediciones se utilizó el digitalizador de imágenes Image-Pro Plus Versión 4.5.1.

Todas las coloraciones que presentaron los micelios, hifas y los cambios en la coloración del medio se caracterizaron en base a las tablas de Munsell (1975). Posteriormente se hizo referencia a ellas con una nomenclatura alfanumérica: número-letra-número para Munsell.

4.4 Evaluación de las variables de crecimiento

Se consideraron cuatro variables para evaluar el crecimiento de las cepas:

- ◆ Diámetro final (mm): se determinó mediante la medición que se hizo al final de los 30 días de crecimiento de la colonia, utilizando para ello un vernier.

- ◆ Biomasa (mg). Se obtuvo mediante la evaluación del peso seco de cada una de las colonias, a los 30 días de crecimiento. Para obtener la biomasa de cada una de las colonias, se separó el micelio del medio de cultivo y se colocó en vasos de precipitado con agua hirviendo, esto para deshacer los restos de agar y así obtener solo el micelio.

Posteriormente se colocaron en charolas de aluminio previamente pesadas, se dejaron durante dos días en un horno de secado a 60°C. Después de este tiempo se pesaron, restando el peso inicial que tenía la charola al peso final obteniendo así la biomasa del micelio.

◆ Relación biomasa/área (mg/mm^2): se obtuvo con el cociente de la biomasa total entre el área de la colonia.

◆ Velocidad media de crecimiento ($\text{mm}/\text{día}$): se realizaron mediciones del diámetro de la colonia cada tercer día durante treinta días, obteniendo un total de quince mediciones, éstos se ajustaron a un modelo de regresión lineal, en donde se obtuvo el valor de la pendiente la cual fue considerada como la velocidad media de crecimiento (VMC).

Para determinar si existían diferencias significativas entre tratamientos en cada una de las cepas, se aplicó un Análisis de Varianza de una vía (ANOVA). También se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($P < 0.05$) para conocer cuáles fueron los tratamientos estadísticamente diferentes. Para esto se utilizaron los programas estadísticos SPSS y el JMP4 (Zar, 1984., SPSS V 22, 2013).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización morfológica de cinco cepas de HECM

A continuación se muestran cuadros con las características macro y microscópicas observadas en cada una de las cepas estudiadas en las diferentes fuentes de nitrógeno y un control. En la caracterización macroscópica los esquemas corresponden a la revisión de los 30 días de cultivo mostrando las coloraciones que se obtuvieron en las fuentes de nitrógeno.

5.1.1 Caracterización morfológica macro y microscópica de *Suillus pseudobrevipes* GF2328.

Cuadro1.-Características macroscópicas de *Suillus pseudobrevipes* GF2328 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Características macroscópicas	Descripción
Color del micelio	
Textura del micelio	Aterciopelada con micelio aéreo – algodónoso en el centro, laxo y fibriloso hacia el margen.
Forma y margen de la colonia	Circular con margen homogéneo a ligeramente irregular,
Exudados	Sólo presentes en el tratamiento con peptona.
Cambio en la coloración del medio	Color café oscuro (7.5YR3/4) en KNO ₃ , peptona y control. En tratamiento con (NH ₄) ₂ HPO ₄ no hubo cambio.
Reverso de la colonia	
Otros	Presencia de pliegues radiales solo en (NH ₄) ₂ HPO ₄ y KNO ₃ .

Cuadro 2.- Características microscópicas de *Suillus pseudobrevipes* GF2328 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	2.39– 3.46µm ((NH ₄) ₂ HPO ₄), 2.55 – 3.68µm (KNO ₃), 2.65 – 3.11µm (peptona), 2.26 – 3.08µm (control)
Color	Amarillo olivo (2.5Y6/8) en (NH ₄) ₂ HPO ₄ , KNO ₃ y control, amarillo pálido (5Y 6/4) en peptona.
Morfología	Sinuosas, tortuosas, filamentosas y con pared delgada
Ramificación	
Terminaciones	Globosas, en gancho y redondeadas
Tipos de uniones	Septos con fíbulas,
Vesículas intercalares	Solo presentes en el control
Fíbulas	Si, (KNO ₃)
Cristales	Ausentes en todos los casos
Otros	Presencia de contenidos citoplasmáticos (vacuolas) y contenidos lipídicos

SIMBOLOGÍA

Ramificación: Dicotómica: en “Y” , en “H” 

Terminaciones: Globosa , gancho  Redondeada 

Tipos de uniones entre hifas: Septo redondeado 

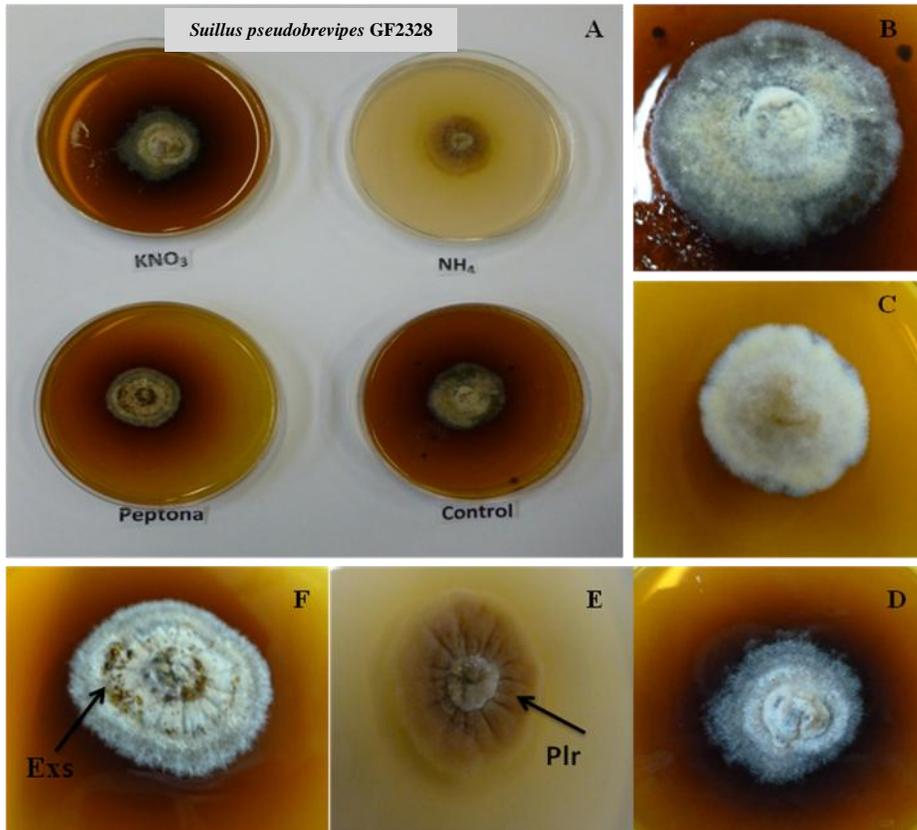


Figura 6.- Caracterización macroscópica de *Suillus pseudobrevipes* GF2328. **A** Crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno. **B** Micelio aterciopelado. **C** Micelio algodonoso. **D** Micelio laxo y aéreo con margen fimbriado. **E** Micelio laxo con pliegues radiales (Plr). **F** Presencia de exudados (Exs)

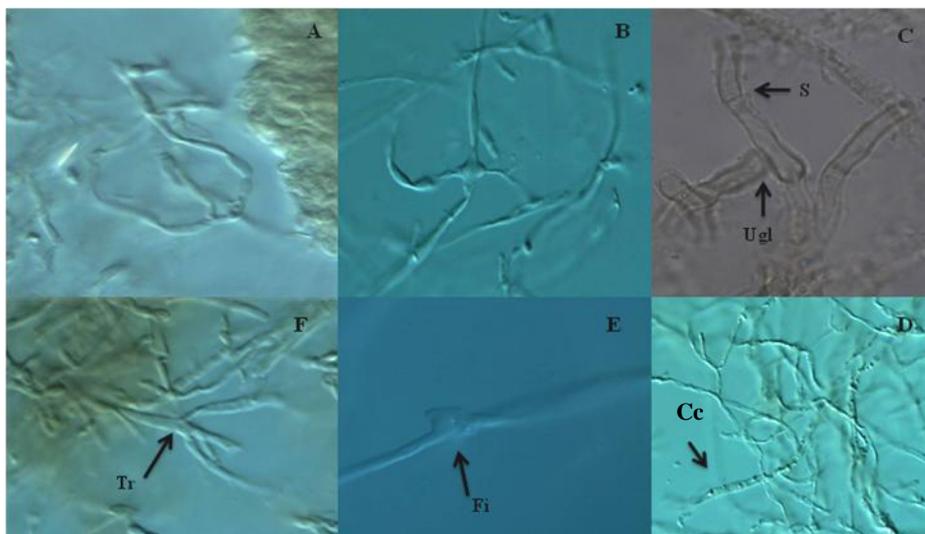
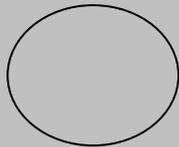


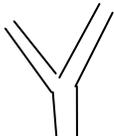
Figura 7.- Caracterización microscópica de *Suillus pseudobrevipes* GF2328. **A** Ramificación Y 40x. **B** Hifa unión globosa (hifas infladas) 40x. **C** Hifa con septo (S) y uniones globosas (Ugl) 100x. **D** Hifas sinuosas y contenido citoplasmático (Cc) 40x. **E** Hifa con fíbula (Fi) 100x. **F** Ramificación tricotómica (Tr) 40x

5.1.2 Caracterización morfológica macro y microscópica de *Suillus* aff. *pseudobrevipes* KL2296

Cuadro 3- características macroscópicas de *Suillus* aff. *pseudobrevipes*. KL2296 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Características macroscópicas	Descripción
Color del micelio	Blanco 10YR 8/1 →  En KNO ₃ y control
Textura del micelio	Laxa y fibrilosa en todas las condiciones
Forma y margen de la colonia	Circular con margen regular
Exudados	Ausentes
Cambio en la coloración del medio	No hay cambio
Reverso de la colonia	Se observa un ligero cambio en el medio de cultivo

Cuadro 4 - características microscópicas de *Suillus* aff. *pseudobrevipes*. KL2296 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno.

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	2.90 - 4.71 μm ((NH ₄) ₂ HPO ₄), 3.30 - 4.29 (KNO ₃), 4.15 - 5.10 (peptona), 3.16 - 4.08 μm (control)
Color	Amarillo pálido 5Y 6/4
Morfología	Tortuosas y filamentosas
Ramificación	
Terminaciones	Globosas y redondeadas
Tipos de uniones	Septo redondeado
Vesículas intercalares	Si, escasas
Fíbulas	Si, escasos
Cristales	No
Otros	Contenidos oleicos en las hifas

SIMBOLOGÍA.

Ramificación: Dicotómica: en “Y” 

Terminaciones: Globosa , Redondeada 

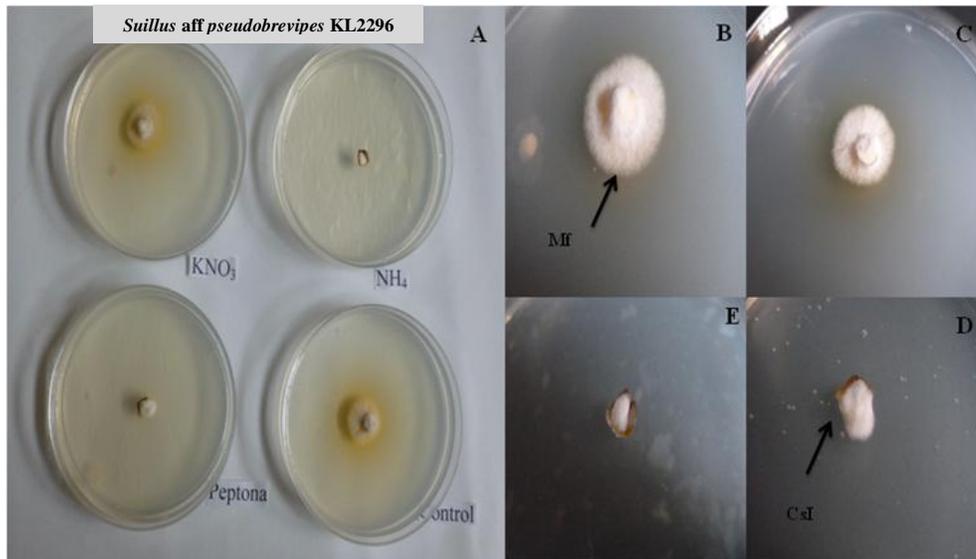


Figura 8.- Caracterización macroscópica de *Suillus aff pseudobrevipes* KL2296. **A** Crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno. **B y C** Margen fimbriado (Mf) **D y E** Crecimiento de micelio sobre inoculo (Csi)

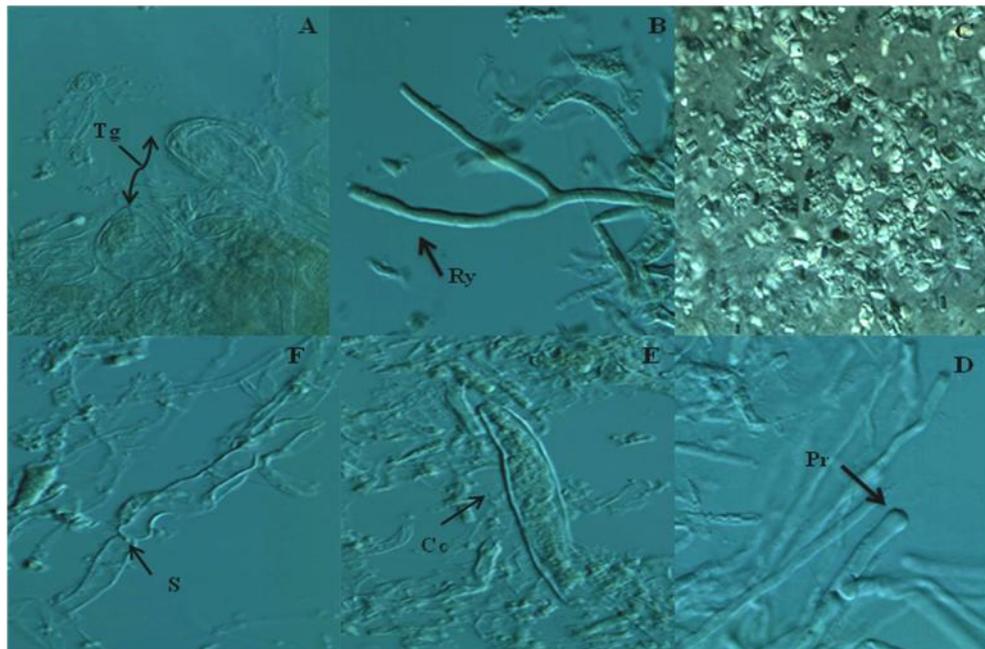


Figura 9.- Caracterización microscópica de *Suillus aff pseudobrevipes* KL2296. **A** Terminaciones globosas (Tg) 40x. **B** Ramificación en Y (Ry) 40x. **C** Presencia de cristales 40x. **D** Puntas redondeadas (Pr) 40x. **E** Contenidos citoplasmáticos (Cc) 40x. **F** Septo (S) 40x.

5.1.3 Caracterización morfológica macro y microscópica de *Suillus tomentosus* GF2359

Cuadro 5.- Características macroscópicas de *Suillus tomentosus* GF2359 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Características macroscópicas	Descripción
Color del micelio	
Textura del micelio	Aterciopelada, con micelio laxo en margen, y con micelio algodonoso/aéreo hacia el centro Algunas colonias presentaron micelio con textura algodonosa y muy fibrilosa.
Forma y margen de la colonia	Circular con margen regular a irregular
Exudados	Solo se encontró en peptona, color hialino en colonias jóvenes a café rojizo oscuro en colonias maduras
Cambio en la coloración del medio	A color café oscuro (7.5YR3/4) en todas las condiciones
Reverso de la colonia	Café oscuro a café claro, con tonalidades amarillo blanquecino en todas las condiciones
Otros	Presencia de pliegues radiales

Cuadro 6.- Características microscópicas de *Suillus tomentosus* GF2359 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	2.56 – 3.12µm ((NH ₄) ₂ HPO ₄), 2.40 – 3.89µm (KNO ₃), 2.53 – 3.47µm (peptona), 2.51 – 4.01 (control)
Color	Se encontraron dos tonalidades amarillo pálido (5Y 6/4) en (NH ₄) ₂ HPO ₄ , KNO ₃ y control. Amarillo olivo (2.5Y 6/8) en peptona.
Morfología	Sinuosas, tortuosas y filamentosas
Ramificación	
Terminaciones	Globosas y redondeadas
Tipos de uniones	Septos redondeados, a veces con fibula
Vesículas intercalares	No
Fíbulas	Si
Cristales	No
Otros	Hifas con contenidos lipídicos de color amarillento, contenidos citoplasmáticos (vacuolas)

SIMBOLOGÍA

Ramificación: Dicotómica: en  “H” 

Terminaciones: Globosa , Redondeada 

Tipos de uniones: Septo redondeado  septo con fibula 

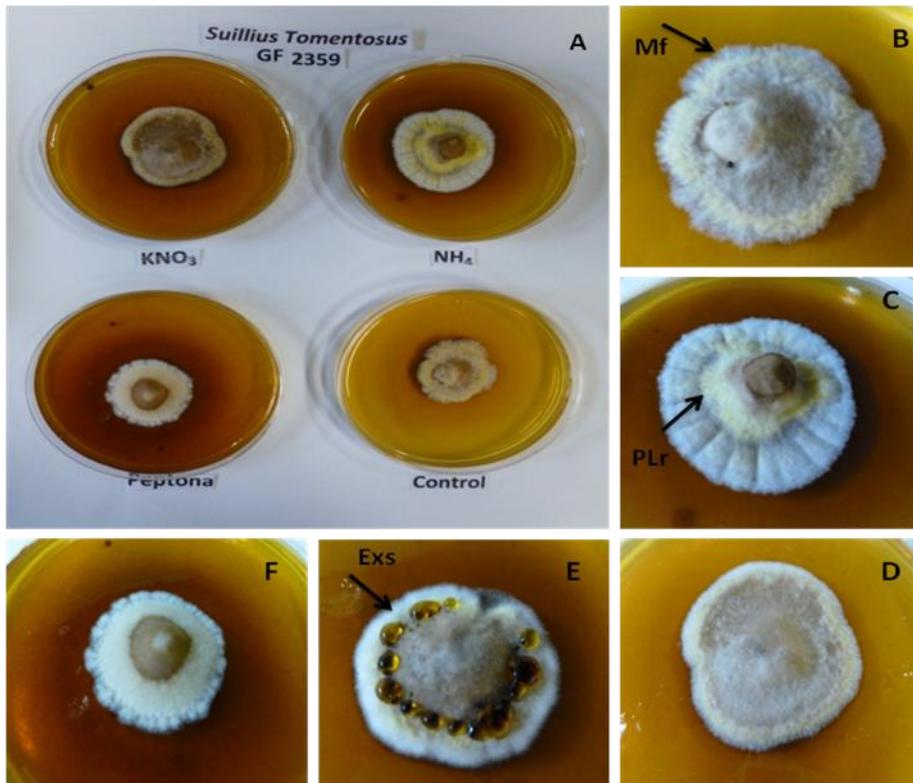


Figura 10.- Caracterización macroscópica de *Suillus tomentosus* GF2359. **A** Crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno. **B** Margen fimbriado (Mf). **C** Pliegues radiales (PLr) **D** Micelio con margen irregular. **E** Presencia de exudados hialinos (Exs). **F** Micelio algodonoso-aéreo

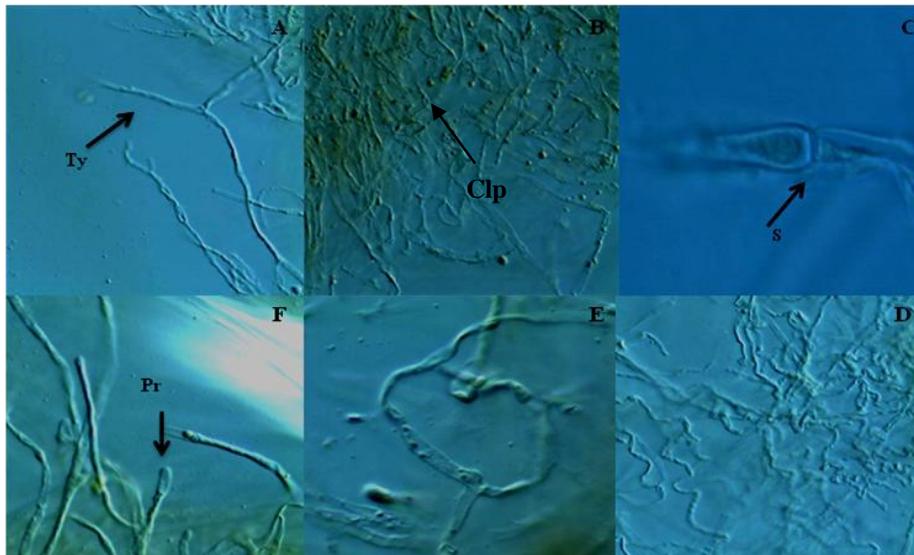
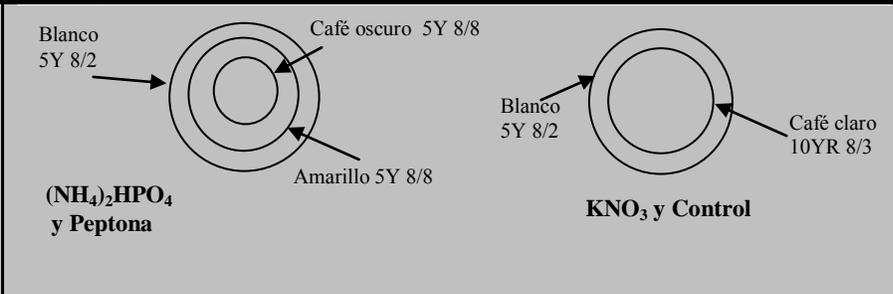
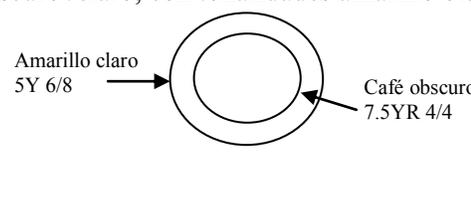


Figura 11.- Caracterización microscópica de *Suillus tomentosus* GF2359. **A** Ramificación Y (Ty) 40x. **B** Contenidos lipídicos (Clp) 40x **C** Hifa con septo (S) y paredes muy marcadas 100x. **D** Hifas sinuosas 40x **E** Hifa en forma de anillo 40x **F** Puntas redondeadas (Pr) 40x

5.1.4 Caracterización morfológica macro y microscópica de *Suillus tomentosus* GF2362

Cuadro 7.- características macroscópicas de *Suillus tomentosus* GF2362 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno y un control

Características macroscópicas	Descripción
Color del micelio	 <p>Blanco 5Y 8/2 → Café oscuro 5Y 8/8 Amarillo 5Y 8/8 (NH₄)₂HPO₄ y Peptona</p> <p>Blanco 5Y 8/2 → Café claro 10YR 8/3 KNO₃ y Control</p>
Textura del micelio	Aterciopelada, laxa y micelio aéreo en ((NH ₄) ₂ HPO ₄). Aterciopelada, laxa y muy fibrilosa en control. Algodonosa, aterciopelada, poco fibrilosa y aérea en el centro (peptona y KNO ₃)
Forma y margen de la colonia	Colonia circular regular a irregular, esto se observó en todos los tratamientos
Exudados	Ausentes
Cambio en la coloración del medio	Color café oscuro (7.5YR3/4)
Reverso de la colonia	Color café oscuro /claro, con tonalidades amarillo blanquecino  <p>Amarillo claro 5Y 6/8 → Café oscuro 7.5YR 4/4</p>
Otros	Presencia de pliegues radiales y anillos concéntricos

Cuadro 8.- Características microscópicas de *Suillus tomentosus* GF2362 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	2.30 – 5.31 μm ((NH ₄) ₂ HPO ₄), 2.89 – 4.13 μm (KNO ₃), 2.61 – 4.30 μm (peptona), 2.84 – 4.24 μm (control)
Color	Amarillo olivo (2.5Y6/8) en ((NH ₄) ₂ HPO ₄) y KNO ₃ . Amarillo pálido (5Y6/4) en peptona y control
Morfología	Sinuosas, tortuosas y filamentosas
Ramificación	
Terminaciones	Globosas, en gancho y redondeada
Tipos de uniones	Septos redondeados, a veces con presencia de fibula
Vesículas intercalares	No
Fíbulas	Solo presentes en peptona
Cristales	Solo presentes en peptona
Otros	Contenidos citoplasmáticos ((NH ₄) ₂ HPO ₄), cordones miceliales (KNO ₃ y Peptona), contenidos lipídicos (control)

SIMBOLOGÍA.

Ramificación: Dicotómica: en “Y” , en “H” , Tricotómica glol 

Terminaciones: Globosa , gancho  Redondeada 

Tipos de uniones: Septo redondeada , septo con fibula 

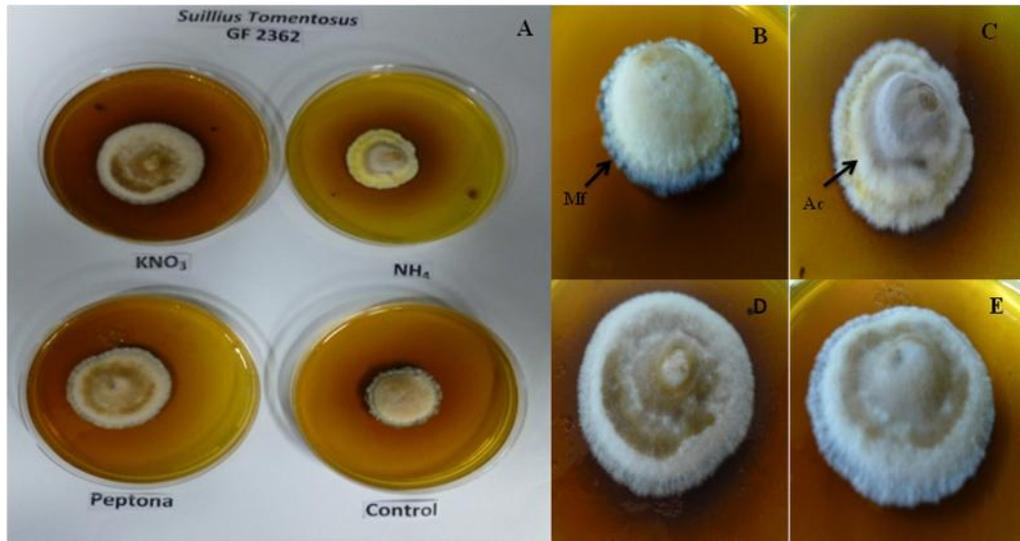


Figura 12.- Caracterización macroscópica de *Suillus tomentosus* GF2362. **A** Crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno. **B** Margen fimbriado (Mf). **C** Anillos concéntricos (Ac). **D** y **E** Micelio algodónoso-aéreo

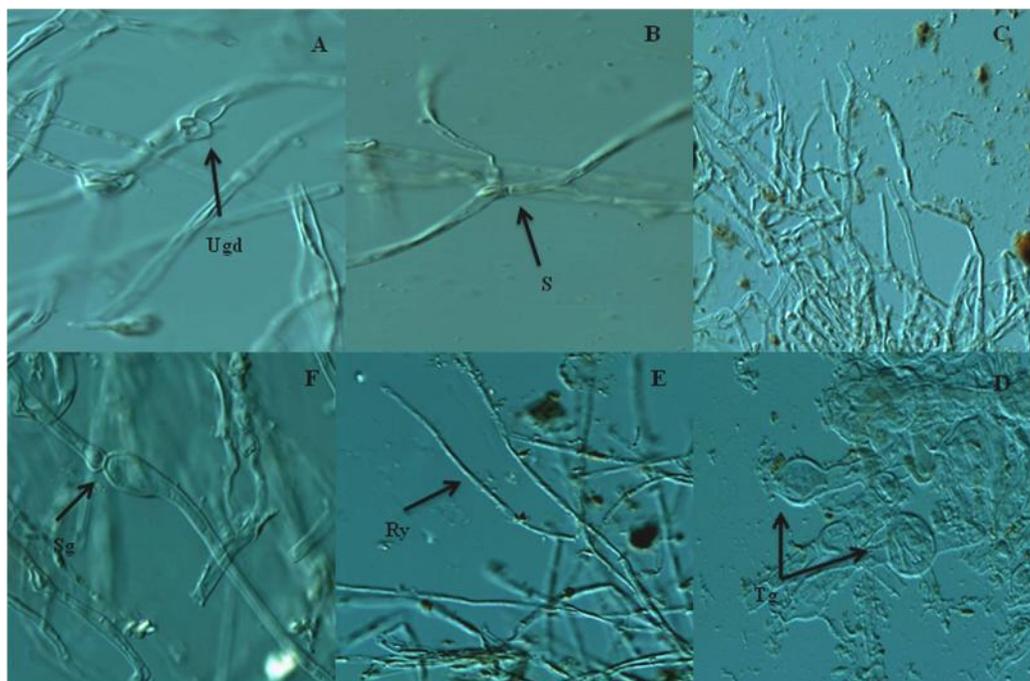
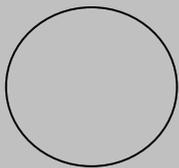


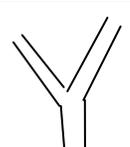
Figura 13.- Caracterización microscópica de *Suillus tomentosus* GF2362. **A** Unión globosa doble (Ugd) 40x. **B** Septo (S) en hifa con ramificación en Y 40x. **C** Hifas sinuosas 40x. **D** Terminación globosa (Tg) 40x y **E** Ramificación en Y (Ry) 40x. **F** Septo globoso (Sg) 40x.

5.1.5 Caracterización morfológica macro y microscópica de *Boletus edulis* GF2160.

Cuadro 9.- Características macroscópica de *Boletus edulis* GF2160 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Características macroscópicas	Descripción
Color del micelio	Blanco 10YR 8/1 → 
Textura del micelio	Laxo poco visible
Forma y margen de la colonia	Colonia circular, poco visible
Exudados	Ausentes
Cambio en la coloración del medio	No hay cambio
Reverso de la colonia	No hay coloración

Cuadro 10.- Características microscópica de *Boletus edulis* GF2160 crecido en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Características de las hifas	Descripción
Diámetro	2.96– 3.37µm (control)
Color	Amarillo pálido (5Y 6/4) en ((NH ₄) ₂ HPO ₄) y control
Morfología	tortuosas y filamentosas
Ramificaciones	
Terminaciones	Redondeadas
Tipos de uniones	Septo redondeados
Vesículas intercalares	No
Fíbulas	No
Cristales	No
Otros	Contenidos citoplasmáticos

SIMBOLOGÍA.

Ramificación: Dicotómica: en “Y” 

Terminaciones: Globosa , Redondeada 

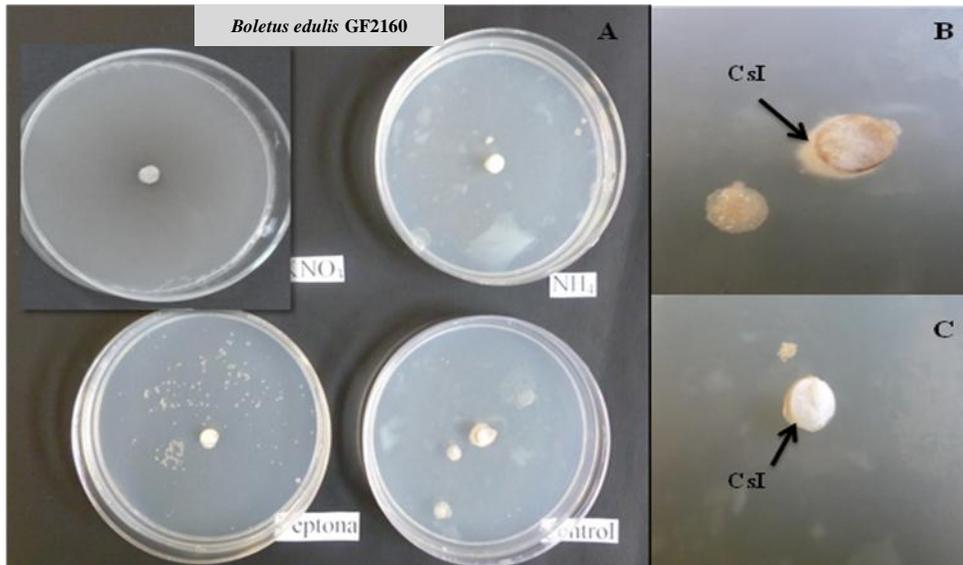


Figura 14.- Caracterización macroscópica de *Boletus edulis* GF2160. A Crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno. B y C Ligero crecimiento de micelio sobre inoculo (CsI).

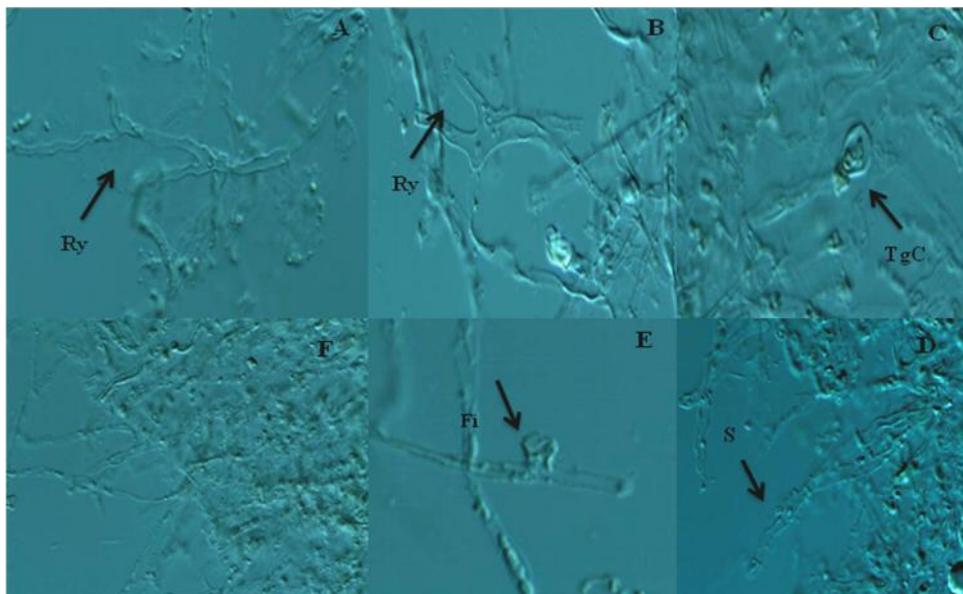


Figura 15.- Caracterización microscópica de *Boletus edulis* GF2160. A y B Terminaciones en Y (Ry) 40x. C Terminación globosa con contenido lipídicos (TgC) 40x D Septo (S) 40x. E Hifa con fibula (Fi) 40x. F Hifas sinuosas 40x

5.2 Evaluación de las variables de crecimiento: Diámetro final, biomasa, velocidad media de crecimiento (VMC) y relación biomasa/área en cinco cepas de HECM.

5.2.1 *Suillus pseudobrevipes* GF2328

En el cuadro 11 se muestran los valores promedio obtenidos en las diferentes variables de crecimiento. Para el diámetro se observó que los valores en KNO_3 fueron de (25.10 mm), seguido de peptona con (24.55 mm), el tratamiento control con (22.75 mm) y con $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (22.05 mm) en donde se obtuvo un diámetro menor. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los valores obtenidos en los diámetros con las distintas fuentes de nitrógeno ($P=0.73$). En cuanto a la biomasa, los resultados que se obtuvieron mostraron que hubo diferencias significativas debido a que en los tratamientos de control (28.16mg) y peptona (41.66mg) se obtuvieron valores más bajo estadísticamente con respecto a KNO_3 (50.16mg) y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (53.66mg), tratamiento en donde obtuvieron los promedios más altos de biomasa ($F_{3, 0.05}= 4.50$, $P=0.014$), es indicativo de que en estos tratamientos hubo una mayor producción de micelio. Para la velocidad media de crecimiento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en los tratamientos ($P=0.513$), dichos valores oscilaron entre 1.13 y 1.38. Finalmente, en la relación biomasa/área solo se obtuvieron diferencias significativas en los tratamientos de peptona (0.083 mg/mm^2) y control (0.070 mg/mm^2) con respecto al tratamiento con $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0.193 mg/mm^2), ya que registraron los promedios más bajos, KNO_3 (0.112 mg/mm^2) no fue estadísticamente diferente a los otros tres tratamientos ($F_{3, 0.05}= 4.63$, $P=0.013$)

Cuadro 11. Promedio (\pm EE) de las variables de crecimiento de *Suillus pseudobrevipes* GF2328 en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Parámetros	Concentración de Nitrógeno g/L					
	control	(NH ₄) ₂ HPO ₄	KNO ₃	Peptona	F	P
Diámetro (mm)	22.75 \pm 1.08 a	22.05 \pm 3.27 a	25.10 \pm 2.38 a	24.55 \pm 1.88 a	.429	.735
Biomasa (mg)	28.16 \pm 3.17 b	53.66 \pm 8.28 a	50.16 \pm 4.19 a	41.66 \pm 4.34 b	4.509	.014
Velocidad Media de Crecimiento (mm/día)	1.131 \pm 0.11 a	1.15 \pm 0.21 a	1.38 \pm 0.08 a	1.30 \pm 0.10 a	.791	.513
Biom/área (mg/mm²)	0.0707 \pm 0.003 b	0.1932 \pm 0.043 a	0.1122 \pm 0.020 ab	0.083 \pm 0.016 b	4.634	.013

Letras iguales no hay diferencias significativas por tratamientos de fuentes de nitrógeno para cada variable $P < 0.05$.

5.2.2 *Suillus aff pseudobrevipes* KL2296

En el cuadro 12 se muestran los valores de los promedios obtenidos, en donde se puede observar que hubo diferencias significativas en el diámetro final, biomasa y VMC. Por otro lado, la variable relación biomasa/área no presentó diferencias significativas. En el caso del diámetro final, el tratamiento con peptona (7.37 mm) fue el que obtuvo el promedio más bajo en comparación con el KNO₃ (18.73 mm), los tratamientos con (NH₄)₂HPO₄ (11.56 mm) y control (12.25 mm) obtuvieron valores intermedios ($F_{3, 0.05} = 3.41$, $P = 0.043$). En la biomasa los tratamientos con peptona (13.58 mg) y control (14.16 mg) obtuvieron los promedios más bajos con respecto al KNO₃ (24.20 mg) en donde se obtuvo el promedio más alto, en el (NH₄)₂HPO₄ (16.00 mg) se obtuvo un valor intermedio ($F_{3, 0.05} = 4.53$, $P = 0.017$). En la velocidad media de crecimiento el tratamiento con peptona (0.036 mm/día) fue significativamente diferente con respecto al valor promedio obtenido en KNO₃ (.680 mm/día), los demás tratamientos NH₄ (0.220 mm/día) y control (0.290 mm/día), presentaron valores intermedios ($F_{3, 0.05} = 5.10$, $P = 0.011$).

Finalmente, en la relación biomasa/área el promedio más alto lo obtuvo el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0.445 mg/mm^2), seguido de la peptona (0.302 mg/mm^2) y el KNO_3 (0.251 mg/mm^2), en el control (0.188 mg/mm^2) se obtuvo el promedio más bajo, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P=0.227$).

Cuadro 12.- Promedio (\pm EE) de las variables de crecimiento de *Suillus* aff. *pseudobrevipes* KL2296 en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Parámetros	Concentración de Nitrógeno g/L					
	control	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	KNO_3	Peptona	F	P
Diámetro (mm)	12.25 ± 3.14 ab	11.56 ± 3.89 ab	18.73 ± 0.94 a	7.37 ± 0.084 b	3.41	.043
Biomasa (mg)	14.16 ± 2.51 b	16.00 ± 1.36 ab	24.20 ± 3.37 a	13.58 ± 1.36 b	4.53	.017
VMC (mm/día)	.290 ± 0.14 ab	.220 ± 0.17 ab	.680 ± 0.064 a	.036 ± 0.006 b	5.10	.011
Biom/área (mg/mm²)	0.188 ± 0.059 a	0.445 ± 0.107 a	0.2515 ± 0.105 a	0.3020 ± 0.060 a	1.60	.227

Letras iguales no hay diferencias significativas por tratamientos de fuentes de nitrógeno para cada variable $P < 0.05$.

5.2.3 *Suillus tomentosus* GF2359

En el cuadro 13 se muestran los valores promedio obtenidos en las pruebas de crecimiento, se puede observar que no hubo diferencias estadísticas significativas para ninguno de los tratamientos. En el caso del diámetro los promedios variaron entre (32.50 mm) en KNO_3 y (28.73 mm) para $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (24.83 mm) para el control y (23.00 mm) en peptona, ($P=0.092$). En el caso de la biomasa se pudo observar que los valores promedio más alto se mostraron en KNO_3 (69.16 mg) y NH_4 (68.16 mg), mientras que el control (53.66 mg) y peptona (47.83 mg) obtuvieron promedios bajos ($P=0.040$).

En la velocidad media de crecimiento el promedio más alto lo obtuvo KNO_3 (1.76 mm/día) seguido del $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1.49 mm/día), el control (1.20 mm/día) y peptona (1.01 mm/día).

(P=0.062). Finalmente en la relación biomasa/área se observó que el promedio más alto lo obtuvo el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0.131) seguido del control (0.113) y peptona (0.113), mientras que el KNO_3 (0.084) obtuvo el promedio mas bajo (P=0.353).

Cuadro 13. Promedio (\pm EE) de las variables de crecimiento de *Suillus tomentosus* GF2359 en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Parámetros	Concentración de Nitrógeno g/L					
	control	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	KNO_3	Peptona	F	P
Diámetro (mm)	24.83 \pm 1.59 a	28.73 \pm 4.73 a	32.50 \pm 1.76 a	23.00 \pm 1.08 a	2.46	.092
Biomasa (mg)	53.66 \pm 5.09 a	68.16 \pm 17.69 a	69.16 \pm 6.62 a	47.83 \pm 7.13 a	1.02	0.405
VMC (mm/día)	1.206 \pm 0.11 a	1.495 \pm 0.34 a	1.760 \pm 0.10 a	1.015 \pm 0.07 a	2.875	.062
Biom/área (mg/mm²)	0.1138 \pm 0.012 a	0.1315 \pm 0.030 a	0.0845 \pm 0.007 a	0.1130 \pm 0.013 a	1.151	0.353

Letras iguales no hay diferencias significativas por tratamientos de fuentes de nitrógeno para cada variable P< 0.05.

5.2.4 *Suillus tomentosus* GF 2362

En el cuadro 14 se muestran los valores promedio, en el caso del diámetro final el promedio mas alto lo obtuvo KNO_3 (34.36 mm), seguido del control (26.40 mm) y la peptona (26.23 mm) y finalmente el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (23.67 mm) siendo el promedio mas bajo, sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P=0.116). En la biomasa los promedios mas altos se observaron en la peptona (83.00 mg), seguido del KNO_3 (82.66 mg), el control (56.00 mg) y el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (51.66 mg), no habiendo diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (P=0.142). En cuanto a la velocidad media de crecimiento, el promedio mas alto lo obtuvo el KNO_3 (1.78 mm/día), seguido del control (1.38 mm/día) y la peptona (1.30 mm/día), el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (1.09 mm/día) obtuvo el promedio más bajo, sin embargo no hubo diferencias estadísticas

significativas entre tratamientos ($P=0.195$). Finalmente para la relación biomasa/área el promedio más alto se observó en peptona (0.190 mg/mm^2) seguido del $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0.145 mg/mm^2), mientras que control (0.101 mg/mm^2) y KNO_3 (0.090 mg/mm^2) obtuvieron los promedios más bajos, pero tampoco se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($P=0.177$).

Cuadro 14. Promedio (\pm EE) de las variables de crecimiento de *Suillus tomentosus* GF2362 en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Parámetros	Concentración de Nitrógeno g/L					
	Control	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	KNO_3	Peptona	F	P
Diámetro (mm)	26.40 ± 1.25 a	23.67 ± 4.10 a	34.36 ± 2.56 a	26.23 ± 3.73 a	2.228	.116
Biomasa (mg)	56.00 ± 5.98 a	51.66 ± 18.36 a	82.66 ± 10.82 a	83.00 ± 8.56 a	2.027	.142
VMC (mm/día)	1.38 ± 0.06 a	1.09 ± 0.24 a	1.78 ± 0.16 a	1.303 ± 0.32 a	1.720	.195
Biom/área (mg/mm^2)	0.1013 ± 0.005 a	0.1454 ± 0.034 a	0.09003 ± 0.008 a	0.1901 ± 0.057 a	1.813	.177

Letras iguales no hay diferencias significativas por tratamientos de fuentes de nitrógeno para cada variable $P < 0.05$.

5.2.5 *Boletus edulis* GF2160

En el cuadro 15 se presentan los valores promedio que se obtuvieron en los tratamientos de fuentes de nitrógeno, se pudo observar que solo hubo diferencias significativas en la variable de diámetro final en donde el tratamiento con peptona (7.07 mm) con respecto al valor promedio obtenido en el KNO_3 (8.68 mm), el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (7.15 mm) y el control (7.52 mm) presentaron valores intermedios ($F_{3, 0.05}=3.72$, $P=0.033$). En cuanto a la biomasa, el promedio más alto lo obtuvo el $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (24.40 mg) seguido del control (23.20mg),

la peptona (22.80 mm) y el KNO₃ (21.00 mm) obtuvieron valores bajos, sin embargo no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P=0.806). En la velocidad media de crecimiento, los promedios más altos se presentaron en KNO₃ (0.049 mm/día) y el control (0.044 mm/día), seguido de (NH₄)₂HPO₄ (0.014 mm/día) y la peptona (0.004 mm/día), presentándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (F_{3, 0.05}= 3.58, P=0.037). Finalmente en la relación biomasa/área el promedio más alto se observó en (NH₄)₂HPO₄ (0.604 mg/mm²), seguido de peptona (0.586 mg/mm²) y control (0.570 mg/mm²), mientras que KNO₃ (.375 mg/mm²) obtuvo el promedio más bajo, pero no fueron estadísticamente significativos (P=0.195).

Cuadro 15. Promedio (± EE) de las variables de crecimiento de *Boletus edulis* GF2160 en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

Parámetros	Concentración de Nitrógeno g/L					
	control	(NH ₄) ₂ HPO ₄	KNO ₃	Peptona	F	P
Diámetro (mm)	7.52 ± 0.46 ab	7.15 ± 0.15 ab	8.68 ± 0.59 a	7.07 ± 0.073 b	3.72	0.033
Biomasa (mg)	23.20 ± 2.87 a	24.40 ± 2.62 a	21.00 ± 1.41 a	22.80 ± 2.67 a	.327	0.806
VMC (mm/día)	0.044 ± 0.02 a	0.014 ± 0.011 a	0.049 ± 0.002 a	0.004 ± 0.002 b	3.58	0.037
Biom/área (mg/mm²)	0.570 ± 0.11 a	0.604 ± 0.05 a	0.375 ± 0.05 a	0.586 ± 0.08 a	1.76	00.195

Letras iguales no hay diferencias significativas por tratamientos de fuentes de nitrógeno para cada variable P< 0.05.

6.- DISCUSIÓN

6.1. Caracterización morfología macro y microscópica de cinco cepas de HECM en diferentes fuentes de nitrógeno y un control.

En cuanto a las características morfológicas *Suillus pseudobrevipes* GF2328 y las dos cepas de *Suillus tomentosus* GF2359 y GF2362 presentaron morfologías similares en los tratamientos. Estas características fueron micelios con forma circular-regular, textura algodonosa y laxa, con coloraciones blanco grisácea, manchones de color café y tonalidades amarillas, así como la presencia de pliegues radiales, anillos concéntricos y exudados. No obstante, la cepa de *Suillus* aff. *pseudobrevipes* KL2296 obtuvo un crecimiento muy escaso de la colonia por lo que únicamente se observó micelio laxo, margen muy fibriloso y tonalidades blanquecinas, esta morfología diferente a las otras cepas de *Suillus* pudo deberse a que es una cepa que se aisló en el 2002 y debido a que ha permanecido durante mucho tiempo almacenada en condiciones *in vitro*, fue perdiendo el vigor y por consecuencia su crecimiento es muy lento.

Por otro lado, cada una de las cepas presentó diferencias macro-morfológicas entre tratamientos:

Suillus pseudobrevipes GF2328 presentó una diferencia con el tratamiento de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ya que el micelio fue de textura laxa, color grisáceo y sin cambio en la coloración del medio, mientras que en los demás tratamientos (KNO_3 , peptona y control) tuvieron textura algodonosa, muy fibrilosa y con coloraciones café-claro, así como cambio en la coloración del medio. Sin embargo, se identificó una característica distintiva en el tratamiento con peptona debido a que se observó la presencia de exudados, de igual manera se observó con la cepa *S. tomentosus* GF2359. Hutchinson (1991) señala que la presencia de exudados o cristales son metabolitos secundarios excretados por algunas cepas de HECM, principalmente del género *Suillus* y *Boletus* como producto de procesos fisiológicos en los hongos.

En el caso de *S. tomentosus* GF2362 fue la que presentó un crecimiento más homogéneo ya que no se encontraron diferencias macro-morfológicas entre los diferentes tratamientos. Por otro lado *S. aff. pseudobrevipes* KL2296 presento características distintas entre tratamientos debido a que solo logro crecer en KNO_3 y control, en el caso de peptona sólo se observó un ligero crecimiento sobre el inculo.

Las características macro-morfológicas que presentan las cepas de *Suillus* coinciden con las reportadas por Alvarado (2008) que al estudiar una cepa de *S. brevipes* procedente de bosque de Pino de la Magdalena Contreras, D.F. encontró morfologías similares como la coloración del micelio, textura algodonosa y presencia de pliegues, así como exudados. Por otro lado, Atriano-Corona (2013) al estudiar las mismas cepas que en este trabajo pero con diferentes concentraciones de glucosa, reportó que las características macro-morfológicas de las cepas *S. tomentosus* GF2359 y GF2362 presentaron micelio algodonoso, aéreo y presencia de exudados, mismas que se observaron en este estudio. De la misma manera los resultados reportados por Juárez-Zacarías (2015) con diferentes pHs coinciden con las características de las cepas de *S. pseudobrevipes* GF2328, *S. tomentosus* GF2359 y GF2362, estas características son: coloraciones blanquecinas, amarillo y café, textura algodonosa, micelio aéreo, colonias circulares regulares e irregulares, presencia de pliegues radiales, anillos circuncéntricos y exudados, mismas características reportadas en este trabajo. Así mismo Aquiahuatl *et al.* (2003) al evaluar cepas de *Suillus* observaron colonias circulares-irregulares, micelio algodonoso y aéreo. Por otro lado, Díaz *et al.* (2009) al evaluar cepas de *S. tomentosus* reporto características como micelio algodonoso, exudados y margen irregular. Por su parte Galindo Flores (2004) al estudiar cepas de *Suillus* también reporto características morfológicas similares como la coloración café amarillento, pliegues radiales y textura algodonosa.

En cuanto a las características microscópicas todas las cepas fueron similares en cuanto a la morfología de las hifas, éstas presentaron la ramificación tricotómica, en forma de H o Y, fíbulas, septos globosos, puntas de las hifas con terminaciones redondeadas y en forma de gancho, hifas sinuosas y tortuosas.

Sin embargo, en las cepas de *S. tomentosus* GF2359 y GF2362 fueron las únicas que presentaron contenidos citoplasmáticos o vacuolas y contenidos lipídicos, así como la presencia de cristales que solo se observó en la cepa de *S. aff. pseudobrevipes* KL2296. En cuanto al diámetro de sus hifas, *S. pseudobrevipes* GF2328 presentó valores que van de 2.26-3.68µm, *S. tomentosus* GF2359 y GF2362 de 2.40-4.01µm y de 2.30-5.31µm, respectivamente. *S. aff. pseudobrevipes* KL2296 presentó valores de 2.90-5.10µm.

Las características micro-morfológicas de las cepas de *Suillus* coinciden con las reportadas por Juárez-Zacarías (2015), en donde observo la presencia de cristales, terminaciones globosas y uniones entre hifas, así mismo Alvarado (2008) reporta vesículas intercalares e hifas delgadas. Por su parte Atriano Corona (2013), observo hifas sinuosas, septadas y de pared delgada. En cuanto al diámetro de las hifas, los valores observados coinciden con los intervalos señalados por los autores antes mencionados, debido a que en condiciones de pHs las cepas de *Suillus* obtuvieron diámetros de 1.16 a 7.25 µm y en concentraciones de glucosa fue de 2.50 a 5.07 µm.

En el caso de *Boletus edulis* GF2160 tuvo un crecimiento casi nulo, pues sólo se observó un escaso crecimiento del micelio sobre el inóculo, esto solo con KNO₃, el micelio fue blanquecino y laxo. El escaso crecimiento que presentó esta cepa pudo ser debido a que fue asilada en el 2006 y desde esa fecha ha permanecido en condiciones *in vitro* por lo que posiblemente se ha reducido su capacidad para crecer en medio nutritivo, como se ha mencionado en literatura (Honrubia *et al.*, 1992; Brundrett *et al.*, 1996). Aunado a esto, es una especie de etapas tardías y por lo tanto necesita del hospedero para su crecimiento (Brundett *et al.*, 1996). Microscópicamente se observó un micelio amarillo pálido, con hifas tortuosas a filamentosas, septadas, con puntas redondeadas y rara vez con contenidos lipídicos, los diámetros de las hifas fueron de 2.96-3.37µm.

Estas características no coincidieron con las reportadas por Atriano Corona (2013) y Juárez Zacarías (2015) debido a que ellos reportaron diámetros entre 1.08 y 6.16 µm, esto se pudo deber a que se trata de especies diferentes de *Boletus*. Asimismo, las características macro-morfológicas que presentó *Boletus edulis* GF2160 no coinciden con ningún otro estudio, tal

es el caso de Díaz *et al.* (2009) los cuales reportaron características distintas a las presentadas en este trabajo, estos resultados fueron que en medio MNM, Moser B, Gamborg y PACH, la cepa presentó micelios con textura algodonosa-fibriloso, coloraciones blanquecinas y aunque creció lento fue favorable, lo contrario reportado en este trabajo. Esto se puede deber a que se trata de cepas de distinta procedencia y a las condiciones *in vitro* a las que fueron sometidas.

De igual manera Hutchinson (1991) reportó características distintas a las presentadas en este trabajo con una cepa de *Boletus edulis* en medio de cultivo BAF, dicha cepa presentó colonias circulares, algodonosas y blanquecinas. Por su parte Alvarado (2008) al trabajar con una cepa de *B. pinophilus* en diferentes pH, concentraciones de glucosa y diferentes medios de cultivo, reportó colonias regulares-circulares, con margen fimbriado y coloraciones amarillo blanco a amarillo verdoso.

Otros trabajos como el de Sánchez *et al.* (2000) quienes trabajaron con una cepa de *Boletus satanas* en medio BAF reportaron coloraciones café, micelio aéreo, con coloraciones café grisácea en el centro y blanco en el margen, así como la presencia de exudados, características no observadas con la cepa de *B. edulis* GF2160.

Como se puede ver en estos estudios las características morfológicas macro y microscópica de *Suillus* en cultivos, presentan rasgos similares independientemente de las condiciones de crecimiento en las que fueron evaluadas. Aunque presentaron algunas variaciones en general mantuvieron las características propias de la especie. Por otro lado, estas características que son similares entre los *Suillus* se pueden usar como un carácter para identificar a nivel de género como lo señala Sánchez *et al.* (2000) en donde dice que las cepas tienen una variabilidad intraespecífica, es decir, hay una variabilidad genética dentro de la misma especie. Por lo que la diversidad de características miceliales puede constituir una herramienta taxonómica importante a los caracteres macro y microscópicos, ya conocidos en la taxonomía de hongos. Por otro lado estas características que presentan dichas cepas podrían proporcionarnos información acerca de cómo están asimilando el nitrógeno, por ejemplo la presencia de contenidos citoplasmáticos o vacuolas.

6.2 Evaluación de las variables de crecimiento en cinco cepas de HECM con diferentes fuentes de nitrógeno.

Al someter a las cepas a diferentes fuentes de nitrógeno se observó que cada una de ellas tuvo comportamientos específicos, esto se puede atribuir a las características genéticas particulares lo cual influye en su habilidad para adaptarse a las diferentes condiciones de cultivo, así como a las estrategias que tengan cada una de estas cepas para su crecimiento y supervivencia (Olsson, 1999).

Con los resultados que se obtuvieron, se observó que *Suillus pseudobrevipes* GF2328 presentó diferencias significativas en los tratamientos control y peptona, así como también en las variables de crecimiento biomasa y relación biomasa/área, debido a que los valores promedio más altos de las variables se obtuvieron con $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y KNO_3 y en las demás variables analizadas de esta cepa (Diámetro final y VMC) se obtuvieron valores semejantes en las diferentes fuentes de nitrógeno (Peptona, y KNO_3) (Cuadro 11). En este sentido es importante mencionar que estos resultados indicaron que la cepa obtuvo una mayor biomasa en un menor diámetro colonial por lo que se observó un micelio denso.

Esto coincide con lo mencionado por Jennings y Lisek (1999) los cuales proponen que al existir una gran abundancia de nutrientes, fácilmente asimilables como el KNO_3 y NH_4 , el crecimiento radial se verá reducido y la biomasa aumentará debido al efecto que pueden tener en la cantidad de ramificaciones y la velocidad media de crecimiento (Moore *et al.*, 2011). Este aumento en biomasa puede ser un rasgo importante desde el punto de vista de producción de inóculo.

En el caso de *S. tomentosus* GF2359 y GF2362, no se encontraron diferencias significativas en las variables de crecimiento (diámetro final, biomasa, VMC y relación biomasa/área) para los diferentes tratamientos (Cuadros 13 y 14). Esto es indicativo de que ambas cepas además de tener la habilidad de asimilar fuentes simples de nitrógeno, también poseen la maquinaria enzimática para reducir fuentes de nitrógeno complejas a más simples para su mejor asimilación (Olsson, 1999).

Esta característica es de gran importancia, debido a que nos indica que estas cepas son capaces de adaptarse y crecer bajo diferentes condiciones nutrimentales en suelo, por lo que son las cepas más viables para producción de inóculo y micorrización de plantas de interés forestal.

Por el contrario *Suillus* aff. *pseudobrevipes* KL2296 sí presentó diferencias significativas en las variables de crecimiento. Estas diferencias se observaron en el diámetro, biomasa y VMC sólo en el tratamiento con peptona (Cuadro 12). Estos resultados nos indican que la cepa obtiene crecimientos óptimos en fuentes simples de nitrógeno y no son capaces de utilizar fuentes de nitrógeno complejas. Sin embargo, como ya se mencionó, al ser una cepa que ha permanecido almacenada en cultivo *in vitro* durante mucho tiempo su metabolismo pudo haberse afectado y por lo tanto presentar un crecimiento limitado (Honrubia *et al.*, 1992; Brundrett *et al.*, 1996), puesto que en otros trabajos como el de Santiago-Martínez (2002) reportó un crecimiento favorable al ser sometida a pruebas con diferentes medios nutritivos.

Finalmente en *Boletus edulis* GF2160 se observaron diferencias significativas en diámetro final y VMC, debido a que con el tratamiento de peptona obtuvo los promedios más bajos. Estos valores pudieron estar afectados por el tiempo de almacenamiento en condiciones *in vitro*, debido a que las cepas al permanecer mucho tiempo en almacenamiento pierden la viabilidad, es decir la capacidad de crecer en medio de cultivo (Honrubia *et al.*, 1992; Brundrett *et al.*, 1996). Aunado a lo anterior, *Boletus* es reportado como un género de etapas sucesionales tardías con respecto a su hospedero por lo que requiere de la asociación con este para obtener un adecuado desarrollo (Deacon y Fleming, 1992).

Estos resultados coinciden con los reportados por Juárez-Zacarías (2015) con respecto a las cepas de *S. tomentosus* GF2359 y GF2362 debido a que obtuvieron crecimientos similares, no obstante, el autor reporta diferencias significativas en las variables y entre cepas ya que cada una de ellas se desarrolló mejor en cierto tipo de pH, tal es el caso de *S. pseudobrevipes* GF2328 que obtuvo un crecimiento óptimo en pH de 5, mientras que para *S. tomentosus* GF2359 y GF2362 fue en pH de 3.

Por su parte, Atriano-Corona (2013) reportó para estas mismas cepas que los *S. tomentosus* crecieron mejor en concentraciones bajas de glucosa, mientras que *S. pseudobrevipes* se desarrolló mejor tanto en bajas como en altas concentraciones de glucosa. Este mismo patrón se observó en el presente estudio, esto debido a que se tratan de las mismas cepas. Esto nos sugiere que las especies de *Suillus* son generalistas en cuanto a sus requerimientos nutricionales debido a que pueden crecer favorablemente bajo diferentes condiciones.

En *B. edulis* GF2160 no hay estudios que coincidan con los reportadas en este trabajo con respecto a las variables de crecimiento, esto es debido al nulo crecimiento que presento. Sin embargo, si existen estudios con cepas de *B. edulis* pero de distinta procedencia en los cuales presentaron un crecimiento favorable, tal es el caso del estudio realizado por Díaz *et al.* (2009) en donde las cepas obtuvieron un mejor crecimiento micelial en medio MNM. Por otro lado Alvarado (2008) reporta que la cepa de *B. pinophilus* obtuvo un crecimiento favorable en la biomasa con un pH 5. Como se puede observar las cepas de *Boletus* aunque son especies de etapas tardías y que en cultivo *in vitro* presentan un crecimiento lento son capaces de crecer bajo diferentes condiciones.

De los parámetros de crecimiento evaluados, el diámetro, la biomasa y la velocidad medio de crecimiento pueden ser las variables más importantes a considerar desde el punto de vista de producción de inoculo pues es importante tener una mayor biomasa en periodos cortos.

Con base en los resultados ya mencionados podemos decir que cada una de las cepas presentó diferentes estrategias de crecimiento de acuerdo a su capacidad de aprovechar el recurso disponible del medio. Tal como lo propone Olsson (1999) quien menciona las diferentes estrategias que tienen los HECM para la absorción de nutrimentos:

- 1) Explotación del recurso disponible:** Las cepas presentan un diámetro colonial grande, micelio denso y la velocidad media de crecimiento es baja. En esta estrategia se ubican las dos cepas de *Suillus tomentosus* GF2359 y GF2362 y *S. pseudobrevipes* GF2328.

- 2) **Trasmigración exploratoria para usar todos los recursos en un área grande:** Se caracteriza por que presenta diámetros grandes, un micelio laxo y la velocidad media de crecimiento alta.

- 3) **Trasmigración exploratoria para buscar más allá de donde se encuentra el recurso:** Los nutrientes se translocan de diferentes puntos y por lo tanto el diámetro de la colonia puede ser grande o pequeña, micelio denso o laxo y la velocidad media de crecimiento alta o baja. En esta estrategia se ubican *S. aff. pseudobrevipes* KL2296 y *B. edulis* GF2160

Por otro lado, el crecimiento de los HECM está influenciado por las etapas sucesionales de los hongos con respecto a la edad de la planta. Este es un fenómeno importante que se da entre las distintas especies de hongos durante el crecimiento de la planta hospedera (edad). Se basa en la presencia de esporomas de diferentes hongos a lo largo del desarrollo de los árboles en condiciones naturales (Miller, 1987). 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. Los hongos de etapas tempranas se caracterizan porque la micorriza se desarrolla al mismo tiempo que sus hospederos. Tienen una baja demanda de azúcar y nutrientes para su crecimiento y colonización en condiciones *in vitro*. Los hongos de etapas tardías, por su parte, se caracterizan porque la micorriza se forma en los árboles maduros, ya que requieren de una alta demanda de azúcar y nutrientes para su crecimiento (Deacon y Fleming, 1992).

En el caso de las cepas de *Suillus* corresponden a etapas tempranas ya que no requieren de los nutrientes que proporciona la planta para su crecimiento y es por ello que se asocian a plantas juveniles, caso contrario de *Boletus* que es de etapas tardías, lo que nos indica que requiere de la planta adulto para poder obtener los nutrientes necesarios y crecer adecuadamente.

En este trabajo se pudo observar que aunque las cepas eran de la misma especie, al ser sometidas a diferentes fuentes de nitrógeno presentaron características morfológicas y estrategias de crecimiento diferentes, esto es debido a que hay una variación intraespecífica proporcionada por la variación genética de las cepas. Autores como Finlay *et al.* (1991) han observado diferencias de crecimiento entre aislamientos distintos de una misma especie.

Para finalizar se puede decir que los diferentes tipos de nutrientes, así como las distintas concentraciones afectan el crecimiento de los HECM, esto es debido a que cada uno presenta diferentes estrategias de explotación y exploración del recurso, en donde generalmente la biomasa y el diámetro colonial no estarán directamente correlacionados (Dickie *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2000).

Sin embargo, al seleccionar las cepas adecuadas para producción de inóculo en plantas de interés forestal es necesario conocer los requerimientos nutricionales de cada hongo, es por ello que en este trabajo las mejores cepas para ser usadas con estos fines son *S. tomentosus* GF2359 y GF2362 y *S. pseudobrevipes* GF2328, debido a que fueron las cepas que mejor asimilaron los recursos y por lo tanto tuvieron el mejor crecimiento en todos los tratamientos.

Esto mismo lo sugieren otros autores que trabajaron con las mismas cepas pero realizando pruebas de crecimiento en diferentes medios nutritivos (Gerónimo-Vázquez, 2014), concentraciones de glucosa (Atriano-Corona, 2013) y diferentes pH's (Juárez-Zacarías, 2015)

7. CONCLUSIONES

- En lo referente a las características macro-morfológicas de las cepas se concluye que *S. pseudobrevipes* GF2328 y *S. tomentosus* GF2359 y GF2362 tuvieron características similares entre ellas coincidiendo con las ya reportadas en literatura para el género. No obstante hubo ciertas características particulares que se presentaron en algunas fuentes de nitrógeno, tal es el caso de la cepa de *S. pseudobrevipes* GF2328 y *S. tomentosus* GF2359 que presentaron exudados en peptona.
- En las características micro-morfológicas todas las cepas presentaron características semejantes como hifas con ramificación en Y/H, de forma sinuosa y tortuosa, contenidos lipídicos, etc. pero particularmente en la cepa de *S. aff. pseudobrevipes* KL2296 se observaron cristales en peptona.
- En cuanto a las variables de crecimiento se concluye que cada una de las cepas presentó diferentes estrategias de crecimiento, la cual se basa en su capacidad para la translocación de nutrimentos lo cual está influenciado por las condiciones macro y micro ambientales en las que se desarrolla de manera natural.
- *S. pseudobrevipes* GF2328 presentó mayor producción de biomasa y hubo una correlación positiva en relación biomasa/área en fuentes simples de nitrógeno como KNO_3 y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. En base a estos resultados se pueden considerar como un hongo especialista en cuanto a sus requerimientos de nitrógeno, sin embargo, es necesario realizar pruebas en otras fuentes de nitrógeno.

- Las cepas de *S. tomentosus* GF2359 y GF2362 presentaron crecimiento indistinto en las fuentes de nitrógeno simples y complejas. Por lo anterior se consideran como especies generalistas capaces de adaptarse a varias condiciones edafológicas con respecto a la fuente de N, además de que corresponden a etapas de asociación temprana.
- *S. aff. pseudobrevipes* KL2296 no creció en fuentes de nitrógeno complejas como la peptona. Esto se puede atribuir más al tiempo de mantenimiento en el cepario y no al efecto de la fuente de nitrógeno.
- *B. edulis* GF2160 tuvo un crecimiento muy limitado lo cual pudo estar influenciado por tiempo de almacenamiento y no al efecto de las fuentes de nitrógeno. Además de que al ser una especie de etapas tardías depende de su planta hospedera para su crecimiento.
- Las cepas más viables para la producción de inoculo y micorrización de plantas de interés forestal son *S. pseudobrevipes* GF2328 y *S. tomentosus* GF 2359 y GF2362.
- Los estudios *in vitro* de HECM con distintas fuentes de nitrógeno contribuyen a una mejor selección de cepas para producción de micelios y la realización de inóculos en plantas de interés forestal y así garantizar el éxito en los programas de reforestación, convirtiéndose en un componente clave en el mantenimiento de los ecosistemas.

8. RECOMENDACIONES

- Evaluar la capacidad de las cepas de HECM estudiadas para formar la asociación micorrízica con la planta, es decir la síntesis de la micorriza *in vitro* y *ex situ*. De esta manera determinar si son aptas para utilizarse en la producción de plántulas con fines de reforestación.
- Evaluar el efecto positivo que pueden tener las cepas en estudio con el crecimiento de las plantas inoculadas.
- Revigorizar las cepas de *Suillus* aff. *pseudobrevipes* KL2296 y *Boletus edulis* GF2160 induciendo la síntesis *in vitro* de la micorriza y luego de las raíces micorrizadas aislar nuevamente el hongo.
- Posteriormente realizar pruebas de crecimiento con estas cepas en otros medios de cultivo y con las mismas fuentes de nitrógeno para determinar si en estas condiciones crecen mejor.
- Corroborar la identidad de las especies mediante el uso técnicas moleculares, para complementar la caracterización morfológica macro microscópica y de esta manera tener una mayor certeza en su identificación taxonómica.

9. LITERATURA CITADA

- Abuzinadah R.A y Read D.J. 1986. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants utilization of peptides and proteins by ectomycorrhizal fungi. Department of Botany, University of Sheffield, Sheffield S10 2TN, UK. *New Phytologist* 103: 481-493.
- Agerer R. 1986. Studies on ectomycorrhizae. II. Introducing remarks on characterization and identification. *Mycotaxon* 26: 473-492.
- Aguilar-Aguilar S., Pérez-Moreno J., Ferrera-Cerrato R., Grimaldo-Juárez O., Cervantes-Díaz L., González-Mendoza, D. 2009. Hongos ectomicorrízicos y la tolerancia a la salinidad en plantas. *Revista Chilena de Historia Natural* 82:163-168.
- Alvarado I. 2008. Crecimiento y caracterización micelial *in vitro* de tres cepas de hongos potencialmente ectomicorrizógenos de la cuenca del río Magdalena. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Álvarez-Sánchez J. y Monroy A. 2008. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. *Las prensas de Ciencias*. México. Pp. 161-177; 213-215.
- Aquihuatl M.A. 2003. Fisiología del crecimiento micelial de hongos ectomicorrizógenos en medio sólido. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias.
- Atriano Corona E. 2013. Evaluación del crecimiento y caracterización de cinco cepas de hongos ectomicorrizógenos en diferentes concentraciones de carbono. Tesis Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Tlaxcala México.
- Barr J y Stanton N.L. 2000. Ectomycorrhizal fungi challenged by saprotrophic basidiomycetes and soil micro fungi under different ammonium regimes *in vitro*. *Mycological Research* 104 (6): 691-697.
- Brandrud T.E., 1995. The effects of experimental nitrogen addition on the ectomycorrhizal fungus flora in an oligotrophic spruce forest at Gardsjon, Sweden. *Forest Ecology and Management* 71: 111-122.
- Brundrett M., Bougher N., Dell, B., Grove, T. y Malajczuk, N. 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agriculture Research. Wembley, WA.
- Botton B. y Chalot M. 1991. Techniques for the study of nitrogen metabolism in mycorrhizas. *Methods Microbiology* 23: 203-252.

- Calonge F. de. D.1990. Setas (hongos) Guía ilustrada, 2a Edición. Castelló, 37 Madrid. Pp 23-32.
- Carrera-Nieva A. y López-Ríos G.F. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo México 10: 93-98.
- Castellano M y Molina R. 1989. Manual de viveros para la producción de especies forestales en contenedor. Vol. 5. El componente Biológico: Plagas, Enfermedades y Micorrizas en el vivero. Pp 96-108.
- Catcheside P.S y Catcheside David E.A. 2012. *Boletus edulis* (Boletaceae), a new record for Australia. Journal Adelaide Botanical Garden 25: 5–10
- Chávez D., Pereira, G. y Machuca A. 2008. Crecimiento *in vitro* de *Lactarius deliciosus* en medio de cultivo BAF y MNM. Cuarto Congreso Chileno de Ciencias Forestales. Universidad de Talca. Chile.
- Chalot M y Brun A. 1998. Physiology of organic nitrogen acquisition by ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. FEMS Microbiology Reviews 22: 21-44.
- Cordell C.E y Marx D.H. 1994. Effects of nursery cultural practices on management of specific ectomycorrhizae on bare-root tree seedling. In: Mycorrhizae and Plant Health. APS Press, St. Paul, Minnesota. Pp 133-151.
- Cuevas-Rangel R. A. 1979. Pruebas de inoculación con el hongo micorrícico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch, en plántulas de *Pinus moctezumae* Lamb. En suelos de vivero. Ciencia Forestal 4:19:46-62
- Daza A.M., Manjón J.L., Aguilar A., Bernedo M., Camacho M. Romero de la Osa L y SantaMaría, C. 2005. Crecimiento *in vitro* y capacidad micorrízica de varios aislamientos de *Lactarius deliciosus*. Actas 4º Congreso Forestal Español. Zaragoza, España. Pp. 1-7
- Daza A.M., Camacho M., Romero de la Osa L., Aguilar A. 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 Fleming L.V. 1992. Interactions of ectomycorrhizal fungi. En Allen M.J. (Ed). Mycorrhizal functioning. An integrative plant-fungal process. Chapman y Hall. New York.
- Deacon J.W. 1997. Introduction to Modern Mycology. 3ª. Edi. Blackwell Science Ltd. Oxford. London. Pp. 180-186.

- Díaz G., Flores R y Honrubia M. 2009. Descripción de cultivos miceliares de Boletales Neotropicales y europeos (*Boletus* grupo *edulis*, *Boletellus* y *Suillus*) y formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro. *Revista Mexicana de Micología* 30:1-7.
- Dickie Ian A., Koide R.T., Stevens C.M. 1998. Tissue density and growth response of ectomycorrhizal fungi to nitrogen source and concentration. *Mycorrhiza* 8:145-148
- Dorothee Sianard F., Valentín Pangou S y Mountanda A. 2010. Influencia del pH en el desarrollo *in vitro* de cinco especies de hongos ectomicorrízicos. *Centro Agrícola* 37(1): 23-28.
- Duñabeitia M.K., Hormilla S., Pérez Moral E y Peña I.J. 1991. Actividades enzimáticas en basidiomicetos formadores de ectomicorriza en *Pinus Radiata* D. Don. *Acta Botánica Malacitana* 16(1): 115-121.
- Dutra C.M., Liparini P.O., Megumi Kasuya M.C., Chaer Borges A. 2002. Ectomicorrizas: A face oculta das florestas. Aplicações biotecnológicas das ectomicorrizas na produção florestal. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 29(38-46).
- Eaton G. K. y Ayres M.P. 2002. Plasticity and constraint in growth and protein mineralization of ectomycorrhizal fungi under simulated nitrogen deposition. *Mycologia* 94(6):921-932.
- Estrada-Torres A. y Valdés M. 1986. El crecimiento y la micorrización de plántulas de pino inoculadas con *Pisolithus tinctorius* en el semillero o en el envase de trasplante. *Biótica* 11:137-142.
- Estrada-Torres A. 2003. Ecología de los hongos ectomicorrizógenos. En: Estrada-Torres, A. y Santiago-Martínez, G. *Avances en el estudio de la ectomicorriza en el estado de Tlaxcala, México*. Fundación Produce Tlaxcala, A.C. Tlaxcala, México. Pp. 26-34.
- Finlay R.D y Sonnerfeldt A.M. 1991. Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. *New Phytologist* 120:105-115
- Finlay R.D. 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* 59:1115-1126.
- Flores R., Honrubia M., Diaz, G. 2008. Caracterización de cepas de *Lactarius* sección *Deliciosi* de Guatemala y su comparación con cepas europeas de *L. deliciosus*. *Revista Mexicana de Micología* 26:51-55.

- Futai K., Taniguchi T y Kataoka, R. 2008. En: Siddiqui Z.A., Akhtar M.S y Futai k. Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry Springer. Ectomycorrhizae and Their Importance in Forest Ecosystems. Pp 241-285.
- Galindo Flores, 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.
- García-Rodríguez J.L., Pérez-Moreno J., Aldrete A., Cetina-Alcalá V.M. y Vaquera-Huerta H. 2006. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tintorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en síntesis con Eucalipto y Pino. *Agrociencia* 40 (5): 665-676.
- Garza Ocañas F., García Jiménez J., Estrada Castellón E., Villalón H.M. 2002. Macromicetos, ectomicorrizas y cultivos de *Pinus culminicola* en Nuevo León. *Ciencia UANL* 5 (2): 204-210
- Gerónimo Vázquez E. 2014. Pruebas de crecimiento con cepas de hongos ectomicorrizógenos en diferentes medios de cultivo. Tesis de licenciatura en Biotecnología, Universidad Interserrana del Estado de Puebla-Ahuacatlán. Puebla.
- Honrubia M., Torres P., Díaz, G. y Cano A. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA. P. 47
- Hutchinson L. 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* XLII: 387-504.
- Jackson R.M y Mason P.A. 1984. Mycorrhizae, Studies in Biology. Edward Arnold Publishers, London, U.K.
- Jennings D.H y Lisek G. 1999. Fungal Biology: understanding the fungal lifestyle. 2a Ed. Springer. USA.
- Juárez-Zacarías E. 2015. Efecto del pH en el crecimiento *in vitro* de diferentes cepas de hongos ectomicorrizógenos. Tesis de licenciatura en Biotecnología, Universidad Interserrana del estado de Puebla-Ahuacatlán. Puebla.
- Kieliszewska-Rokicka B. 1992. Effect of nitrogen level on acid phosphatase activity of eight isolates of ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* cultured *in vitro*. Institute of Dendrology Polish Academy of Sciences. Kórnik, Poland. *Plant and Soil* 139:229-238
- Leake J., Johnson D., Donnelly D., Muckle G., Boddy L y David Read. 2004. Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany* 82: 1016-1020.

- Lee L.S., Alexander I. J. y Watling R. 1997. Ectomycorrhizas and putative ectomyco-rrhizal fungi of *Shorea leprosula* Miq. (Dipterocarpaceae). *Mycorrhiza* 7: 63-81
- McGuire K.L., Henkel T.W., Granzow de la Cerda I., Villa G., Edmund, F., Andrew C. 2008. Dual mycorrhizal colonization of forest-dominating tropical trees and the mycorrhizal status of non-dominant tree and liana species. *Mycorrhiza* 18: 217-22.
- Miller M. 1897. Mycorrhizae and succession. En: Jordan II W.R., Gilpin M.E. y Aber J.D. *Restoration Ecology: A synthetic approach to ecological research*. Cambridge University Press. Cambridge U.K. Pp 206-219
- Molina R. y Trappe J.M. 1982. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. *Forest Science* 28: 423-457.
- Molina R., Massicotte H y Trappe J.M.1992. Specificity phenomena in mycorrhizal Symbiosis: Community-ecological consequences and practical implications. En Allen M.F. *Mycorrhizal Functioning: A integrative plant fungi proces*. Chapman and Hall, Nueva York, USA. Pp 357-394.
- Moore D., Robson G.D y Trinci Anthony P.J. 2011. From the haploid to the functional diploid: homokaryons, heterokaryons, dikaryons and compatibility. 21st Century Guidebook to Fungi. Cambridge University Press. Cambridge. Pp 180-186
- Muñoz G., J.C. 2003. Inoculación esporal en *Pinus pseudostrobus* y *P. montezumae* con diferentes hongos ectomicorrizógenos, bajo condiciones de vivero. Tesis de Licenciatura en Biología Agropecuaria. Tlaxcala, Tlax.
- Munsell Soil Color Charts. 1975. Soil Test Inc. Maryland, U.S.A.
- Nobles, M.K. 1965. Identification of cultures of wood inhabiting hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany* 43: 1097-1139
- Nylud J.E y Wallander H. 1989. Effects of ectomycorrhiza on host growth and carbon balance in a semi-hydroponic cultivation system. *New Phytologist* 112: 389- 398.
- 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.
- Pantidou, M. E. 1961a. Cultural studies of Boletaceae. *Gyrodon merulioides* and four species of *Boletinus*. *Canadian Journal of Botany* 39: 1149-1162.
- Pantidou M.E y Groves J.W. 1966. Cultural studies of Boletaceae. Some species of *Suillus* and *Fusco boletinus*. *Canadian Journal of Botany* 44(10):1371-1392

- Paul L.R., Chapman B.K y Chanway C.P. 2007. Nitrogen Fixation Associated with *Suillus tomentosus* Tuberculate Ectomycorrhizae on *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Annals of Botany* 99 (6): 1101–1109.
- Pera J y Parladé J. 2005. Inoculación controlada con los hongos ectomicorrizicos en la producción de plantas destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investgación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* 14 (3): 419-433.
- Perea-Estrada V.M., Pérez-Moreno J., Villarreal Ruiz L., Trinidad Santos A., De la I. de Bauer Ma. L., Cetina Alcalá V.M y Tijerina Chávez L. 2009. Humedad edáfica, Nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de Pino. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32 (2): 93-102.
- Pérez- Moreno J y Read D.J. 2004. Los hongos ectomicorrizógenos, lazos vivientes que conectan y nutren los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29(5): 239-247.
- Rangel-Castro J. I., Danell E y Taylor F. S. 2002. Use of different nitrogen sources by the edible ectomycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius*. *Mycorrhiza* 12:131-137.
- Richard F., Millot S., Gardes M y Selosse M-A. 2005. Diversity and specificity of ectomycorrhizal fungi retrieved from an old-growth Mediterranean forest dominated by *Quercus ilex*. *New Phytologist* 166 (3): 1011-1023.
- Rudawska, M.L. 2010. Mycorrhiza: The mycorrhizal status of Norway spruce. En: Tjoelker M.G., Boratynski A. y Bugata W. (Eds) *Biology and Ecology of Norway spruce*. Springer. The Netherlands. Pp 157-181.
- Rygielwicz P.T., Bledsoe C.S y Zasoski R.J. 1984. Effects of ectomycorrhizae and solution pH on ¹⁵N ammonium uptake by coniferous seedlings. *Canadian Journal Forest Research* 14 (6): 885-892.
- Sánchez F., Honrubia M y Torres P. 2000. Características culturales de algunos hongos ectomicorrízicos en cultivo puro. *Revista Iberoamericana de Micología* 17: 127-134.
- Santiago-Martínez G.1992. Pruebas de crecimiento, síntesis *in vitro* y caracterización de diez cepas de hongos ectomicorrizógenos. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias UNAM. México
- Santiago-Martínez Ma. G. y Estrada-Torres A.1999. Hongos ectomicorrizógenos y producción de inoculantes para plantas de interés forestal. Universidad Autónoma de Tlaxcala-Fundación Produce Tlaxcala A.C. Tlaxcala, Méx. Folleto Técnico No. 19. P. 20.
- Santiago-Martínez 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. México.

- Santiago-Martínez G., Estrada-Torres A., Varela L. y Herrera T. 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia* 37:575-584.
- Sarjala T. 1999. Effect of organic and inorganic nitrogen sources on endogenous polyamines and growth of ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Mycorrhiza* 8: 277–281.
- Siddiqui Z.A. y Pichtel J. 2008. Mycorrhizae: An Overview. En: Siddiqui Z.A., Akhtar M.S y Futai k. *Mycorrhizae: Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer. University, Natural Resources and Environmental Management, Muncie, USA. Pp 1-25.
- Smith S.E y Read D.J. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*, 2nd edition, Academic Press, London, UK. Pp 161-276
- Tedersoo L., Suvi T., Larsson E., Ko ~ LjalG U. 2006. Diversity and community structure of ectomycorrhizal fungi in a wooded meadow. *Mycological Research* 110: 734–748
- Timonen S y Marschner P. 2006. Mycorrhizosphere Concept. En: Mukerji K.G., Manoharachary C. y Singh J. *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Springer. Germany. Pp155-172.
- Trappe J. M. 1977. Selection of fungi for inoculation in nurseries. *Annual Review Phytopathol* 15:203-222.
- Vázquez-García A., Santiago-Martínez G y Estrada-Torres A. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorizógenos. *Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica* 73(1): 1-15.
- Zamora Martínez, M. 1999. Distribución conocida y potencial de 48 especies de hongos silvestres comestibles en la región central del país. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Informe final SNIB-CONABIO Proyecto No. J064. México, D.F.
- Zar .1984. *Biostatistical analisis*. 2da Ed. Prentice Hall Inc. New Jersey

Páginas Web

<http://dungun.ufro.cl/~cesararriagada/Laborat.htm>

Programas estadísticos

SPSS Statistics V22, 2013 IBM

JM4 V 4.04, 1989-2001, SAS Institute

10. ANEXO

Anexo 1

Cuadro 16. Medio nutritivo: BAF (Biotina Aneurina Ácido Fólico) (Moser, 1960)

CaCl ₂	0.1g
KH ₂ PO ₄	0.5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5g
MnSO ₄	0.005g
ZnSO ₄	0.001g
Cl ₃ Fe.7H ₂ O	0.01g
Peptona	2.0g
Extracto de levadura	0.2g
Glucosa	30.0g
Tiamina	0.0005g
Biotina	0.00001g
Mio-inositol	0.05g
Ácido fólico	0.0001
Agar	15.0g
Agua destilada	1 litro