

**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

**ESTUDIO ETNOMICOLÓGICO Y BIOTECNOLÓGICO DE  
HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES ECTOMICORRÍZICOS  
EN *Pinus pseudostrobus* Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS  
PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL**

**MARIO JIMÉNEZ RUIZ**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

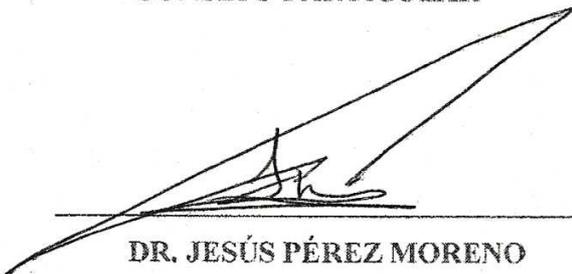
**2011**

La presente tesis titulada: **Estudio etnomicológico y biotecnológico de hongos comestibles silvestres ectomicorrízicos en *Pinus pseudostrobus* y evaluación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal**, realizada por el alumno: **Mario Jiménez Ruíz**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EDAFOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

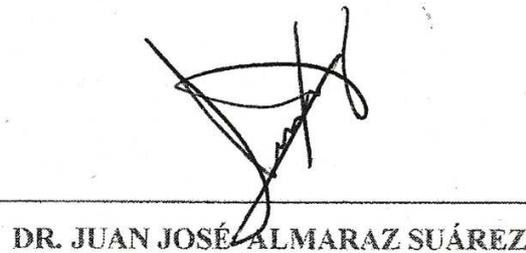
**CONSEJERO:**



---

**DR. JESÚS PÉREZ MORENO**

**ASESOR:**



---

**DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUÁREZ**

**ASESOR:**



---

**DRA. MARGARITA TORRES AQUINO**

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2011

## **A g r a d e c i m i e n t o s**

**Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), por otorgamiento de la beca para continuar con mis estudios de Maestría en Ciencias.**

**Al Dr. Jesús Pérez Moreno, por permitirme realizar mis estudios de maestría y compartir sus amplios conocimientos sobre los hongos comestibles ectomicorrízicos, además, por su apoyo incondicional y sabios consejos brindados durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.**

**Al Dr. Juan José Almaraz Suárez, por su asesoramiento y disponibilidad académica, así como, asesoramiento técnico dentro del laboratorio durante el periodo de tesis, además por brindarme su confianza y amistad en este proceso de formación profesional.**

**A la Dr. Margarita Torres Aquino, por su apoyo como asesora en la presente tesis.**

**Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, por compartir sus amplios conocimiento y experiencia laboral académica como catedrático dentro del área de microbiología de suelos y brindarme su apoyo para la utilización de material y equipo dentro del laboratorio de Fijación de Nitrógeno.**

**Al Dr. Alejandro Alarcón, por sus enseñanzas como catedrático dentro del área de microbiología de suelos y por su apoyo brindado en la prestación de material y equipo en el laboratorio de Micorrizas y de esta manera contribuir con mi preparación profesional.**

**Al Dr. Roberto Quinteros por su apoyo incondicional como sinodal de tesis.**

**A las M.C. María Encarnación Lara, Alicia Franco por su amistad y apoyo dentro del área de microbiología.**

**Al personal del laboratorio de Fijación de Nitrógeno: Manuel Solano, Lorenzo Viana, Edmundo Martínez y Fernando López, por su apoyo técnico dentro del laboratorio.**

**A la Dra. Magdalena Martínez, M. C. Cristina Arteaga, M. C. Violeta Carrasco, M. C. Armando Lorenzana, Biol. Cristina Heredia y Biol. Alfonso por compartir conmigo sus amplios conocimientos y experiencias sobre los hongos comestibles ectomicorrízicos, apoyándome con técnicas de laboratorio, fotografías y trabajo en invernadero.**

## **D e d i c a t o r i a**

### *A DIOS*

*Antes que todo, doy gracias a dios, porque él siempre ha estado conmigo en momentos difíciles y alegres de mi vida, además, de darme fuerzas y entendimiento para salir adelante “porque dios da la sabiduría y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia” (Proverbios 2. 6.).*

### *A MIS PADRES*

*Doroteo Jiménez Cosme y Cándida Ruiz, por su apoyo que me han brindado durante los años de mi existencia*

### *A MIS HERMANOS*

*Margarito, Catalina y José Manuel, porque siempre contare con ellos, también a mi sobrino Neto y mi sobrina Katy y a mi abuelita Vida que los quiero mucho.*

*A mis compañeros y amigos del área de microbiología de suelos: Miguel Ángel, Esmeralda, Claudia, Rosalba, Alejandra, Yadira, Esther, Yessica, Vivian, Judith, Virginia, Elvia, Isele, Blanca, Susana, Monserrat, Felipe, Ramiro y Luis. Gracias por su amistad y por compartir experiencias.*

# ESTUDIO ETNOMICOLÓGICO Y BIOTECNOLÓGICOS DE HONGOS SILVESTRES COMESTIBLES ECTOMICORRÍZICOS EN *Pinus pseudostrobus* Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO VEGETAL

Mario Jiménez Ruiz, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2011

## RESUMEN

Los hongos comestibles silvestres son un recurso forestal no maderable que ha sido consumido por su alto contenido nutrimental y utilizado en medicina tradicional desde épocas prehispánicas en México. Adicionalmente, México constituye un importante reservorio de dichos hongos a nivel mundial. En el presente trabajo, se efectuaron estudios etnomicológicos de hongos comestibles silvestres comercializados en Valles Centrales, Oaxaca, para determinar el uso potencial de las especies. Además, se estudió la ontogenia de la ectomicorriza de *Laccaria proxima* con *Pinus pseudostrobus* en condiciones de invernadero y se evaluó el efecto de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en la inducción del crecimiento hifal de *Suillus* aff. *pseudobrevipesa* nivel *In vitro*. Se identificaron 20 especies de hongos comestibles silvestres comercializados en Valles Centrales, Oaxaca con potencial de exportación; alto contenido nutricional, con propiedades medicinales y potencial biotecnológico. En el desarrollo ontogénico de la ectomicorriza de *Laccaria proxima* con *Pinus pseudostrobus*, se caracterizó detalladamente el morfotipo, manto, red de Hartig y micelio externo. En la evaluación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal se encontraron 16 cepas solubilizadores de fosfato, 4 productoras de acidoindolacético y 4 que inducen el crecimiento micelial de *Suillus* sp. *in vitro*. Es importante conocer el potencial de uso de los hongos comercializados en Oaxaca, para incorporarlos en modelos de desarrollo sustentable de comunidades de Oaxaca. Así mismo, es necesario conocer la ontogenia de *Laccaria proxima* para posteriores investigaciones y para aprovechar los hongos ectomicorrízicos en la producción de plantas forestales a nivel vivero, en conjunto con el uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal que conduciría a mejor calidad y salud de las plantas.

**Palabras clave:** *etnomicología, hongos comestibles silvestres, Pinus pseudostrobus, bacterias promotoras de crecimiento vegetal, ecosistemas forestales, ectomicorriza.*

**ETHNOMYCOLOGICAL AND BIOTECHNOLOGICAL STUDY OF  
ECTOMYCORRHIZAL WILD EDIBLE MUSHROOMS IN *Pinus pseudostrabus* AND  
EVALUATION OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA**

Mario Jiménez Ruiz, M.C.  
Colegio de Postgraduados, 2011

**ABSTRACT**

Wild edible mushrooms are a non-timber forest resource that has been consumed for its high nutritional content and used in traditional medicine since pre-Hispanic times in Mexico. In addition, Mexico is an important reservoir of these fungi at worldwide level. In this work, an ethnomycological study of wild edible mushroom, marketed in Valles Centrales, Oaxaca, was conducted to determine the potential use of these species. Also, the ontogeny of the ectomycorrhiza of *Pinus pseudostrabus* inoculated with *Laccaria proxima* and the effect of plant growth promoting bacteria on the mycelial growth of *Suillus* aff. *pseudobrevipes* were studied. Twenty species of wild edible mushrooms marketed in Valles Centrales, Oaxaca with export potential, high nutritional content, medicinal properties and biotechnological potential were identified. In the ontogenetic study of the ectomycorrhiza of *Pinus pseudostrabus* with *Laccaria proxima*, the present morphotype was characterized in detail, including mantle, Hartig net, and external mycelium. With respect to the plant growth promoting bacteria, it was found that 16 strains were phosphate solubilizers, 4 indolacetic acid producers and 4 inducers of mycelial growth of *Suillus* sp.. It is important to know the potential use of the mushrooms marketed in Oaxaca in order to incorporate it into models of sustainable development of Oaxaca communities. It is also necessary to know the ontogeny of *Laccaria proxima* to take advantage of ectomycorrhizal fungi along with the use of plant growth promoting bacteria in the production of forest plants at nursery level resulting plants with better quality and health.

**Keywords:** *ethnomycology, wild mushrooms, pine pseudostrabus, plant growth promoting bacteria, forest ecosystems, ectomycorrhizae.*

## CONTENIDO

	Pag.
<b>ÍNDICE DE CUADROS.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>3</b>
2.1 Objetivo general .....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
2.3 Hipótesis.....	4
<b>CAPÍTULO III. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>5</b>
3.1 Características del genero <i>Pinus</i> .....	5
3.1.1 Distribución.....	6
3.1.2 <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	6
3.2 Hongos comestibles silvestres en México.....	7
3.3 Comercio de hongos comestibles silvestres .....	8
3.4 Definición de micorriza.....	9
3.5 Clasificación de micorrizas .....	10
3.5.1 Ectomicorrizas.....	11
3.5.2 Transferencia de carbohidratos .....	13
3.5.3 Nutrición vegetal por ectomicorrizas .....	13
3.5.4 Ecología de la ectomicorriza.....	15
3.6 Potencial biotecnológico .....	15
3.7 Interacción bacteriana y hongos ectomicorrízicos .....	16
3.7.1 Micorrizosfera .....	17
3.7.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	18
3.7.3 Bacterias auxiliadoras de la micorrización.....	18
3.8 BIBLIOGRAFÍA.....	19
<b>CAPITULO IV. HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES COMERCIALIZADOS EN VALLES CENTRALES DE OAXACA: NOMBRES COMUNES, IMPORTANCIA ECOLÓGICA Y POTENCIAL NUTRICIONAL, MEDICINAL Y BIOTECNOLÓGICO.....</b>	<b>29</b>

4.1 RESUMEN.....	29
4.2 ABSTRACT.....	30
4.3 INTRODUCCIÓN .....	30
4.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	32
4.4.1 Área de estudio.....	32
4.4.2 Recolección de hongos.....	34
4.4.3 Determinación taxonómica y de potencial de usos .....	34
4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.5.1 Diversidad y conocimiento tradicional .....	35
4.5.2 Comercialización y nombres comunes.....	36
4.5.3 Propiedades nutrimentales.....	40
4.5.4 Uso medicinal.....	42
4.5.5 Importancia ecológica y potencial biotecnológico.....	45
4.6 CONCLUSIONES .....	48
4.7 BIBLIOGRAFÍA.....	48
<b>CAPITULO V. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE DIFERENTES ESTADIOS FENOLÓGICOS DE LA ECTOMICORRIZA SINTETIZADA ENTRE <i>Laccaria proxima</i> Y <i>Pinus pseudostrobus</i> Y SU DINÁMICA DE COLONIZACIÓN.....</b>	<b>55</b>
5.1 RESUMEN.....	55
5.2 ABSTRACT.....	56
5.3 INTRODUCCIÓN .....	56
5.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	58
5.4.1 Identificación y descripción de <i>Laccaria proxima</i> .....	58
5.4.2 Preparación del inoculante ectomicorrízico .....	58
5.4.3 Desinfección de la semilla y tubetes .....	59
5.4.4 Germinación de las semillas.....	59
5.4.5 Trasplante e inoculación.....	59
5.4.6 Variables evaluadas.....	60
5.4.6.1 Colonización ectomicorrízica.....	60
5.4.6.2 Crecimiento vegetal.....	60
5.4.7 Análisis de variables.....	60

5.4.8 Caracterización de la ectomicorriza .....	61
5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
5.5.1 Identificación y descripción de <i>Laccaria proxima</i> .....	61
5.5.2 Colonización micorrízica .....	64
5.5.3 Crecimiento vegetal.....	65
5.5.4 Caracterización morfológica y ontogenia de la ectomicorriza.....	66
5.5.4.1 Formación del manto y red de Hartig.....	70
5.5.4.2 Hifas emanantes.....	72
5.5.4.3 Manto fúngico.....	74
5.6 CONCLUSIÓN .....	76
5.7 BIBLIOGRAFÍA.....	76
<b>CAPITULO VI. EVALUACIÓN DE BACTERIAS QUE PROMUEVEN EL CRECIMIENTO VEGETAL Y AUXILIAN LA MICORRIZACIÓN .....</b>	<b>81</b>
6.1 RESUMEN.....	811
6.2 ABSTRACT .....	822
6.3 INTRODUCCIÓN .....	82
6.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	844
6.4.1 Material bacteriano.....	844
6.4.2 Determinación de la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico.....	866
6.4.3 Determinación de la capacidad de producir ácidoindolacético (AIA) .....	866
6.4.4 Efecto de las bacterias sobre el crecimiento del hongo ectomicorrízico <i>in vitro</i> .....	877
6.5 RESULTADOS .....	87
6.5.1 Determinación de la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico.....	87
6.5.2 Determinación de la capacidad de producir ácidoindolacético (AIA) .....	88
6.5.3 Efecto de las bacterias sobre el crecimiento del hongo ectomicorrízico <i>in vitro</i> .....	88
6.6 DISCUSIÓN.....	922
6.7 CONCLUSIONES .....	955
6.8 BIBLIOGRAFÍA.....	959
<b>ANEXO 1. COINOCULACIÓN ECTOMICORRÍZICA CON <i>Laccaria proxima</i> Y UNA BACTERIA SOLUBILIZADORA DE FOSFATO EN <i>Pinus pseudostrobus</i>.....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO 2. SUPERVIVENCIA DE <i>Pinus pseudostrobus</i> INOCULADO CON SEIS ESPECIES DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS EN CONDICIONES DE CAMPO...</b>	<b>104</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

		<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 3.1.</b>	Clasificación de micorrizas de acuerdo a su tipo de exploración en las raíces de los fitosimbiontes.....	10
<b>Cuadro 3.2.</b>	Hongos ectomicorrízicos descritos por su capacidad de solubilizar minerales.....	14
<b>Cuadro 4.1.</b>	Nombres comunes de hongos comestibles silvestres recolectados en mercados de Valles Centrales de Oaxaca y su uso potencial.....	36
<b>Cuadro 4.2.</b>	Composición macronutricional, reportada por distintos autores, de especies de hongos silvestres comestibles silvestres comercializados en mercados de Valles Centrales de Oaxaca comparados con maíz y cacahuate.....	41
<b>Cuadro 4.3.</b>	Hongos comestibles silvestres comercializados en mercados de Valles Centrales de Oaxaca con potencial medicinal.....	44
<b>Cuadro 4.4.</b>	Hongos comestibles ectomicorrízicos comercializados en mercados de Valles Centrales de Oaxaca con potencial biotecnológico en la producción de inoculantes para especies forestales y algunos hospederos reportados en México .....	46
<b>Cuadro 5.1.</b>	Características distintivas de los esporomas de <i>Laccaria proxima</i> ....	62
<b>Cuadro 5.2.</b>	Colonización ectomicorrízica de las raíces cortas de <i>Pinus pseudostrobus</i> inoculados con <i>Laccaria proxima</i> , evaluados mensualmente durante ocho meses.....	65
<b>Cuadro 5.3.</b>	Biomasa mensual de plantas de <i>Pinus pseudostrobus</i> inoculadas con <i>Laccaria proxima</i> , durante ocho meses.....	66
<b>Cuadro 5.4.</b>	Características morfológicas de las raíces cortas micorrizadas con <i>Laccaria proxima</i> , comparados con estudio previos.....	68
<b>Cuadro 6.1.</b>	Características de los sitios donde fueron aisladas las cepas bacterianas.....	85
<b>Cuadro 6.2.</b>	Cepas bacterianas promotoras de crecimiento vegetal y auxiliaoras de la micorrización a nivel <i>in vitro</i> .....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 3.1.</b> Estructura de un hongo ectomicorrízico, que transloca los nutrimentos y minerales desde la solución del suelo hasta las células corticales de la raíz de la planta.....	11
<b>Figura 3.2.</b> Representación esquemática del complejo de la rizosfera y establecimiento de la simbiosis ectomicorrízica con bacterias auxiliaadoras de la micorrización.....	17
<b>Figura 4.1.</b> Ubicación de la región de Valles Centrales de Oaxaca y las áreas estudiadas: 1) Municipio de Oaxaca de Juárez, 2) Municipio de Tlacolula de Matamoros, 3) Santiago Etlá, 4) Municipio de Ixtlán de Juárez y 5) Municipio de San Antonio Cuajimoloyas.....	33
<b>Figura 4.2.</b> Hongos comestibles de Oaxaca.....	37
<b>Figura 5.1.</b> Preparación del inoculo fúngico e inoculación de <i>Pinus pseudostrobus</i> ....	63
<b>Figura 5.2.</b> Desarrollo ontogénico de la ectomicorriza de <i>Laccaria proxima</i> con <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	69
<b>Figura 5.3.</b> Ontogenia de la penetración de la red de Hartig entre los espacios intracelulares de las células corticales de la raíz ectomicorrizada de <i>Laccaria proxima</i> con <i>Pinus pseudostrobus</i> (corte transversal de la ectomicorriza).....	71
<b>Figura 5.4.</b> Anatomía y caracterización de hifas emanantes de la ectomicorriza de <i>Laccaria proxima</i> con <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	73
<b>Figura 5.5.</b> Manto fúngico de <i>Laccaria proxima</i> con <i>Pinus pseudostrobus</i> .....	75
<b>Figura 6.1.</b> Ensayo de inducción de crecimiento colonial (micelial) de <i>Suillus</i> aff. <i>pseudobrevipes</i> por cepas de bacterias en condiciones <i>in vitro</i> .....	90

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En México existe una alta diversidad de especies fúngicas que habitan en bosques templados de coníferas y bosques tropicales, favoreciendo el desarrollo de los hongos y alberga alrededor de 200 000 especies de estos (Guzmán, 2008a). Sin embargo, en el planeta existe alrededor de 5000 a 6000 especies de hongos que son reconocidos como simbioses micorrízicas que establecen simbiosis con Angiospermas y Gimnospermas (Smith y Read, 1997; Agere, 2006) de cuales gran numero están distribuidas en el territorio mexicano, estas especies se encuentran principalmente dentro de los grupos de Glomeromycotina, Ascomycotina y Basidiomycotina (Agerer, 2006; Bonfante y Anca, 2009). Los hongos micorrízicos se clasifican en seis diferentes tipos, tales como: i) Versículo-Arbuscular (VAM); ii) Ectomicorriza (ECM); iii) Monotropide; iv) Arbutoide; v) Orquidiode; y vi) Ericoide (Brundrett, 2004). La característica principal de la simbiosis micorrízica establece que, los hongos micorrízicos reciben carbono y las plantas reciben nutrimentos como fósforo y nitrógeno, en esta interacción existe un intercambio bidireccional de nutrimentos (Smith y Read, 2008; Pérez-Moreno y Read, 2004).

En el presente trabajo se estudiaron hongos comestibles silvestres ectomicorrízicos por el impacto social, cultural, económico y ecológico que han tenido a través de los años, ya que es un recurso forestal no maderable que ayuda en el funcionamiento y sostén de los ecosistemas forestales (Pilz y Molina, 2002; Pilz *et al.*, 2003) Adicionalmente los hongos comestibles silvestres han sido consumidos en comunidades rurales de México desde épocas prehispánicas y se ha demostrado que existen 300 especies de hongos comestible silvestres (Boa, 2004). Los

hongos comestibles silvestres son considerados un recurso forestal no maderables que al ser consumidos proporcionan alto contenido de proteínas, carbohidratos, fibra y minerales, pero bajo contenido de grasas, además proporciona vitaminas y aminoácidos (Colak *et al.*, 2009; Beluhan y Ranogajec, 2011; Agrahar-Murugkar y Subbulakshmi, 2005; Caglarlrmak *et al.*, 2002). Adicionalmente, los hongos comestibles silvestres ha sido utilizado en medicina tradicional y actualmente han cobrado interés en la medicina moderna, donde han sido utilizados como: antitumorales, antioxidantes, antimicrobianos (Barros *et al.*, 2008; Elmastas *et al.*, 2007; Yamac y Bilgili, 2006; Queiros *et al.*, 2009; Yu-Cheng *et al.*, 2009).

El objetivo general del presente estudio fue identificar los hongos comestibles silvestres comercializados en Valles Centrales de Oaxaca, así como desarrollar un estudio biotecnológico con *Pinus pseudostrabus* utilizando dos hongos ectomicorrízicos y bacterias promotoras de crecimiento vegetal en condiciones de laboratorio e invernadero. La especie de pino que se utilizó en presente estudio fue *Pinus pseudostrabus*, ya que es una especie forestal de crecimiento rápido con amplia distribución en el territorio Mexicano, incluyendo al estado de Oaxaca, además es una especie importante ecológica y económicamente en los bosque templados de la zona Sur y Centro de México (Perry, 1991).

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 2.1 Objetivo general

Identificar los hongos comestibles silvestres comercializados en Valles Centrales de Oaxaca, así como desarrollar un estudio biotecnológico con *Pinus pseudostrobus* utilizando dos hongos ectomicorrízicos y bacterias promotoras de crecimiento vegetal en condiciones de laboratorio e invernadero.

#### 2.2 Objetivos específicos

Identificar las especies de hongos comestibles silvestres comercializados en Valles Centrales de Oaxaca con potencial medicinal, económico y ecológico, como preámbulo del uso de un recurso forestal no maderable que puede incorporarse en el desarrollo sustentable en las comunidades rurales de Oaxaca.

Sintetizar ectomicorrizas entre el hongo ectomicorrízico comestible *Laccaria proxima* y la especie forestal *Pinus pseudostrobus*, así como evaluar su desarrollo ontogénico morfológico y anatómico.

Seleccionar cepas de bacterias solubilizadoras de fosfatos, productoras de auxinas y compatibles con el hongo ectomicorrízico *Suillus* aff. *Pseudobrevipes* que no inhiban o que promuevan el crecimiento hifal a nivel *In Vitro*.

### 2.3 Hipótesis

Los hongos comestibles silvestres comercializados en Valles Centrales de Oaxaca poseen, adicional a su importancia como alimento, potencial de uso medicinal, económico y ecológico.

La ectomicorriza sintetizada entre el hongo ectomicorrízico comestible *Laccaria proxima* y *Pinus pseudostrabus* presenta modificaciones en su ontogenia, las cuales pueden ser caracterizadas morfológica y anatómicamente.

Existen bacterias forestales que producen auxinas o solubilizan fosfatos capaces de promover o inhibir el crecimiento *in vitro* de *Suillus* aff. *pseudobrevipes*.

## CAPITULO III

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Características del genero *Pinus*

El género *Pinus* tiene más de 100 especies ampliamente reconocidas, es el más amplio dentro de las coníferas (Gernandt *et al.*, 2005). Está formado por plantas leñosas de hojas aciculares y frutos en forma de conos o estróbilos. La semilla de los pinos tiene una estructura particular que consiste en una combinación de generaciones: esporofítica la cubierta seminal y el embrión de una generación gametofítica (Raven *et al.*, 1992).

Los pinos son ecológicamente importantes, como componente dominante en los bosques boreales, subalpinos, templados y tropicales. La distribución natural del género se confina al Hemisferio Norte excepto una población de *P. merkusii* localizada justo al sur del Ecuador en Sumatra (Mirov, 1967).

Desde el punto de vista morfológico los pinos presentan una gran variedad, tanto en altura como en diámetro. La zona radicular se extiende hasta 50 ó 60 cm de profundidad. Cuando las circunstancias extremas lo exigen pueden sobrevivir con un sistema superficial de raíces. Los pinos poseen un sistema bien desarrollado de producción de resina que los hace resistentes a la infección y a los daños físicos. La estructura de la corteza es compleja y varía en composición en función de las sucesivas etapas de desarrollo del tronco. La asociación simbiótica con hongos ectomicorrizicos es una característica importante del género *Pinus* que ocurre naturalmente aún en suelos de alta fertilidad donde aparentemente no es necesaria su presencia (León y Suárez, 1998).

### 3.1.1 Distribución

La distribución natural del género está confinada al hemisferio Norte, excepto una población de *P. merkusii* localizado justamente al sur del Ecuador en Sumatra. Especies como *P. caribaea*, *P. patula*, *P. pinaster*, y *P. radiata* son ampliamente cultivados en todo el mundo (Perry, 1991). En África no existe una sola especie nativa de pino tropical. Tampoco en Sudamérica, Nicaragua es el límite meridional de estas especies en Centroamérica, a 12° al norte del Ecuador. El género *Pinus* en América del Norte se resume a un rango máximo de 59 especies en total, siendo este género de árboles el más esparcido en esta área (Mirov, 1967).

### 3.1.2 *Pinus pseudostrabus*

*Pinus pseudostrabus* es un árbol de 15 a 40 m de altura y diámetro de 40 a 80 cm, el tallo es recto, libre de ramas de 30 a 50% de su altura. Las ramas por lo regular son horizontales, con copa espesa y corteza áspera y grisácea. Follaje verde oscuro, acículas de 4 a 6 de 16 a 35 cm de largo (López-Upton, 2002).

*Pinus pseudostrabus* se localiza en el continente Americano desde el sur de Guatemala hasta el noroeste de México entre 13° 50' a 21° 10' latitud N y 87° 20' a 103° 00' longitud W (Hernández *et al.*, 2003). En el territorio mexicano se encuentra distribuido en los estados de: Jalisco, Michoacan, Distrito federal, Morelos, Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, Veracruz, Guerrero, Chiapas y Oaxaca (Perry, 1991). Está adaptada a climas de templado-frío a templado-cálido; se localiza en una altitud de 1900 a 3000 m (Farjon y Style, 1997). La precipitación anual donde crece esta especie oscila entre 800 y 1500 mm. Su óptimo desarrollo lo presenta en altitudes de 2000 a 2400 m en suelos volcánicos profundos de aproximadamente 1500 mm de precipitación (Perry, 1991). *Pinus pseudostrabus* es una especie forestal de crecimiento rápido con amplia distribución

en el territorio Mexicano, incluyendo al estado de Oaxaca, además es una especie importante ecológica y económicamente en los bosque templados de la zona Sur y Centro de México (Perry, 1991).

### **3.2 Hongos comestibles silvestres en México**

México es uno de los países con alta diversidad de especies fúngicas y se estima que existen alrededor de 2400 especies son *Ascomycetos* y 2200 especies de *Basidiomicetos*, de las cuales aproximadamente 300 especies de hongos silvestres son consumidas por personas en comunidades rurales de México (Garibay-Orijel *et al.*, 2006). Las especies de hongos presentes en territorio Mexicano generalmente se encuentran en las zonas templadas húmedas localizadas en la zona Centro y Sureste del país, principalmente en los estados de Veracruz, estado de México, Puebla, Oaxaca, Tabasco, Chiapas y Quintana Roo (Villareal y Pérez-Moreno, 1989; Pérez-Moreno *et al.*, 2008; Ruan-Soto *et al.*, 2004; Zamora-Martínez y Pascual-Paola, 2004; Ruan-Soto *et al.*, 2006). Los hongos comestibles se han utilizado desde la época prehispánica como estimulantes, alimento y para curar enfermedades relacionadas principalmente con aspectos rituales y espirituales. Los hongos alucinógenos se han usado para la realización de ritos ceremoniales realizados en diferentes comunidades indígenas del centro y sureste de nuestro país (Guzmán, 2008b). En muchos países del mundo los hongos comestibles han sido utilizados como tónicos y para solucionar problemas relacionados con la salud humana, además son utilizados en la medicina moderna porque contienen propiedades nutricionales y medicinales útiles en tratamientos terapéuticos (Barros *et al.*, 2008). Los hongos comestibles silvestres aportan un valor agregado al ser comercializados y consumidos por las personas que se dedican a su

recolección. Además, son un recurso forestal no maderable de importancia ecológica, económica, ecológica y cultural (Garibay-Orijel *et al.*, 2009).

### 3.3 Comercio de hongos comestibles silvestres

El comercio de hongos comestibles silvestres es una actividad que se realiza en parte central y Sur de la república Mexicana (Pérez-Moreno *et al.*, 2008, Montoya *et al.*, 2008; Ruan-Soto *et al.*, 2006; Ruan-Soto *et al.*, 2004; Garibay-Orijel *et al.*, 2009). El comercio a nivel regional o dentro de las comunidades rurales del país es una actividad que proporciona ingresos económicos a familias que se dedican a la venta de este producto (Martínez-Carrera *et al.*, 2005). La recolecta de hongos comestibles es una actividad familiar, donde se realiza primeramente por el padre de familia, la madre y los hijos (Montoya *et al.*, 2008; Pérez-Moreno *et al.*, 2008). Los hongos comestibles son vendidos directamente en tianguis por personas recolectoras en este caso la madre de familia (Ruan-Soto *et al.*, 2006). La importancia económica de los hongos comestibles en algunas regiones contribuye para el mantenimiento de estos conocimientos ancestrales (Pérez-Moreno *et al.*, 2008). Los hongos silvestres comestibles son cosechados y consumidos desde hace miles de años, actualmente son comercializados aproximadamente en 80 países del mundo (Boa, 2004). Los más caros y comercializados en mercados internacionales son: *Tuber melanosporum* Vitt. (trufa de Périgord negro), *Tuber magnatum* Pico & Vitt. (trufa blanca de Italia), *Tricholoma matsutake* (Ito & Imai) Sing. (matsutake), *Boletus edulis* Bull: Fr. sensu lato (porcini) *Cantharellus cibarius* Fr.: Fr. (chanterelle), y *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Pers: Schw. (hongo del Cesar). Globalmente estos hongos comestibles ectomicorrízicos están evaluados anualmente en billones de dólares (Yun y Hall, 2004).

### 3.4 Definición de micorriza

El término micorriza proviene de la palabra griega “mico” que significa hongo y “rizos” que significan raíz (Bonfante y Anca, 2009). Ecológicamente, es una interacción simbiótica mutualista establecida entre hongos y las raíces de las plantas (Frank, 2005). La característica principal establece que el hongo recibe carbono y las plantas reciben nutrientes como fósforo y nitrógeno, es decir, existe un intercambio bidireccional de nutrientes (Smith y Read, 2008; Pérez-Moreno y Read, 2004). La micorriza incrementa la capacidad de absorción de nutrientes de la raíz, porque el micelio del hongo explora mucho mayor volumen del suelo que la raíz sola (Pera y Parladé, 2005; Bonfante y Anca, 2009).

La relación que existe entre la planta y el hongo ectomicorrízico puede traer diversos beneficios para la planta, misma que es protegida por el hongo contra los factores ambientales que pueden causarle daños (Smith y Read, 2008). Los hongos ectomicorrízicos contribuyen a contrarrestar el estrés hídrico, permitiendo mayor absorción de agua mediante estructuras conocidas como rizomorfos, donde posteriormente el agua es llevado a las raíces de las plantas en suelos secos (Morte *et al.*, 2001; Agerer, 2001). También protege contra agentes patógenos que causan daños a la raíz mediante la formación del manto fúngico que recubre la raíz (Morin *et al.*, 1999). Además, ayuda a degradar los metales pesados producidos por la contaminación que pueden provocar intoxicación en las plantas y mejorar las condiciones de suelos erosionados (Marx, 1991; Boyd y Hellebrand, 1991; Krpata *et al.*, 2009).

### 3.5 Clasificación de micorrizas

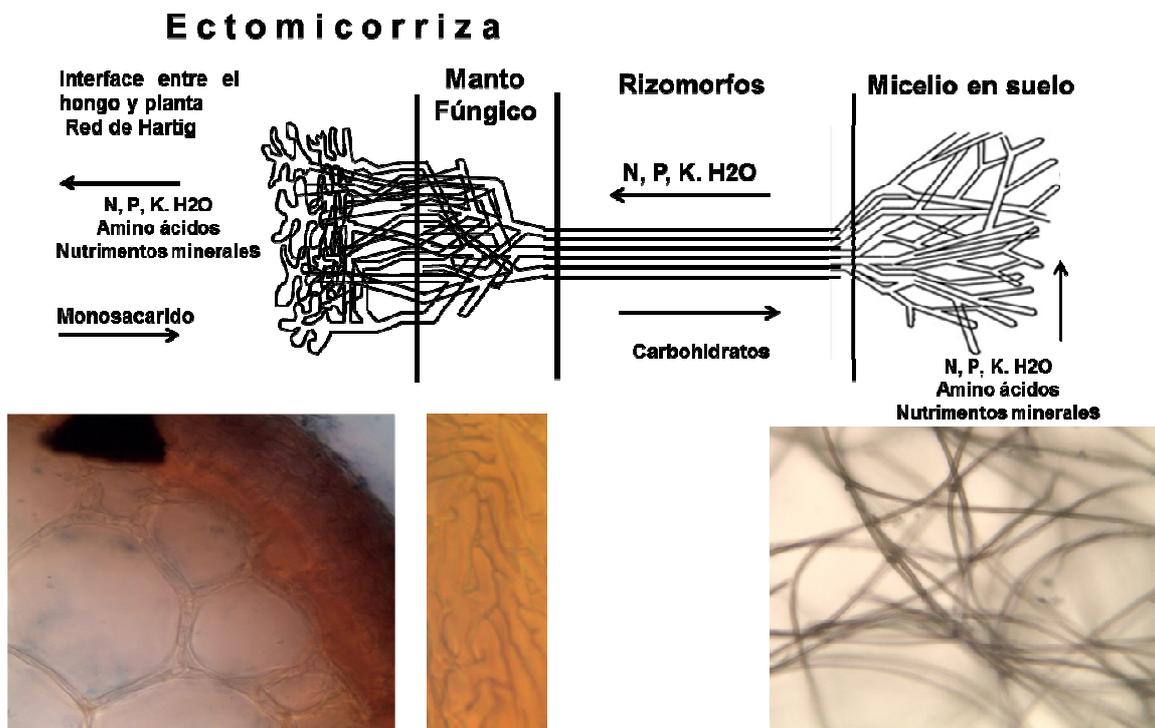
En el planeta existen alrededor de 5000 a 6000 especies de hongos que establecen simbiosis micorrízica con las raíces cortas de los árboles (Smith y Read, 1997; Agerer, 2006). Las especies micorrízicas se encuentran dentro de los grupos de Glomeromycotina, Ascomycotina y Basidiomycotina (Agerer, 2006; Bonfante y Anca, 2009). Read (1999) clasificó a las micorrizas fundamentalmente en tres grupos, según la forma de la estructura de la micorriza: ectomicorriza o formadoras de manto; ectendomicorrizas, que incluye Arbutoides y Monotropoides; y Endomicorrizas, caracterizadas por la colonización intracelular del hongo, que a su vez, se subdividen en Ericoides, Orquidoides y Arbusculares (Cuadro 3.1).

**Cuadro 3.1.** Clasificación de micorrizas de acuerdo a su tipo de exploración en las raíces de los fitosimbiontes. Fuente: (Brundrett, 2004).

Tipos de micorrizas	Características
Versículo-Arbuscular (VAM)	Asociación micorrízica formada por hongos Glomeromicetes en plantas terrestres y usualmente forma vesículas y arbusculos.
Ectomicorriza (ECM)	Asociación de macromicetos con las raíces cortas de plantas terrestres, donde un manto de hifas encierra a la raíz y una red de Hartig penetra entre los espacios de las células corticales.
Monotropoide	Asociación Ectomicorrízica que explora la epidermis de las plantas mico-heterótrofas en las Ericales donde la hifa individual penetra limitadamente las células epidérmicas.
Arbutoide	Son variaciones de ectomicorrizas de plantas autótrofas en las Ericaceae, caracterizada por bobinas de hifas (pelotones) en las células epidérmicas.
Orquidiode	Este tipo de micorrizas consiste en pelotones de hifas en las raíces o tallos de las plantas de orquídeas.
Ericoide	Presenta pelotones de hifas en las raíces finas de las plantas que pertenecen a la familia Ericaceae.

### 3.5.1 Ectomicorrizas

Este tipo de micorriza se caracteriza porque el micelio fúngico no penetra en el interior de las células del córtex radical y forma una estructura alrededor de las raíces secundarias y cortas, llamada manto, la cual es inconfundible (Brundrett, 2004; Nehls, 2008). Los hongos ectomicorrízicos están formados por estructuras básicas conocidas como: red de Hartig, manto fúngico, micelio externo y en algunos casos con rizomorfos (Taylor y Alexander, 2005; Agerer, 2006). Estas estructuras del hongo ectomicorrízico participan en la traslocación bidireccional de nutrientes (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Estructura de un hongo ectomicorrízico, que transloca los nutrientes y minerales desde la solución del suelo hasta las células corticales de la raíz de la planta.

La red de Hartig es una estructura formada por hifas creciendo en los espacios intercelulares de las células corticales de la raíz, que proporciona una gran superficie de contacto entre el hongo y

la planta hospedante (Nehls, 2008). Además, es la zona de intercambio de nutrientes en ambas direcciones (Taylor y Alexander, 2005). Las hifas de la red de Hartig nunca penetran el interior de las células de la raíz de las plantas con las que establece simbiosis (Ruano, 2008; Pérez-Moreno y Read, 2004). El manto es un conjunto de hifas que recubre las células epidérmicas radicular, de acuerdo a su desarrollo de las hifas, se han reconocido dos tipos principales de manto: pseudoparequimantoso (hifas muy diferenciadas) y plectenquimantoso (hifas entrelazadas ligeramente) (Agerer, 2006). El manto también es conocido como vaina desarrollada (Dutra *et al.*, 2002). Las hifas del manto son capaces de sintetizar los compuestos de reserva como glucógenos, proteínas y polisfosfatos (Smith y Read, 1997).

El micelio extramatricial crece ya sea como hifas simples del manto en el suelo o puede estar unido a rizomorfos diferenciados con pequeña organización de hifas capaces de transportar agua y nutrientes (Agerer, 2006). La traslocación de nutrientes puede variar de acuerdo al tipo de exploración de las hifas (Agerer, 2001). El micelio extramatricial puede tener diferentes tipos de exploración: contacto, distancia corta, lisas de distancia media, distancia media con bordes o enmarañas y distancias largas (Agerer, 2001; Hobbie y Agerer, 2010). Los rizomorfos de hongos ectomicorrízicos son llamados como agregados lineales de múltiples hifas (Cairney *et al.*, 1991; Agerer, 2006). Las especies que no presentan rizomorfos, se cree que tienen una capacidad limitada para explorar el suelo, mientras los que poseen rizomorfos diferenciados se consideran más adaptadas a la exploración a largas distancias (Nehls, 2008).

### **3.5.2 Transferencia de carbohidratos**

El beneficio que proporciona la planta al hongo ectomicorrízico a través de la simbiosis establecida entre los dos simbioses, es mediante la transferencia de carbohidratos (Nehls *et al.*, 2010). El hongo ectomicorrízico recibe de la planta entre 1 a 25% de fotoasimilados producidos en la fotosíntesis (Staddon *et al.*, 2003). Las hifas ectomicorrízicas solo pueden usar glucosa y fructosa como fuente de carbono los cuales resultan del catabolismo de la sacarosa a través de una invertasa acida de origen vegetal (Hampp *et al.*, 1999; Nehls *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2007).

### **3.5.3 Nutrición vegetal por ectomicorrizas**

La importancia de la simbiosis ectomicorrízica (ECM) para la nutrición de plantas y ecosistemas forestales, radica principalmente en la relación que existe entre el carbono y el nitrógeno, donde existe un intercambio que ha sido reconocido en diversos estudios sobre las ectomicorrizas (Meyer *et al.*, 2010). Los hongos ectomicorrízicos forman relaciones mutualistas a fin de recibir hidratos de carbono de las plantas y en intercambio, el hongo le otorga nutrientes importantes como N, P, K y Ca (Nehls, 2008).

Los hongos ectomicorrízicos producen diversas enzimas extracelulares capaces de degradar la materia orgánica particularmente proteínas, lignocelulosa y polifenoles, permitiendo la mineralización del nitrógeno (Talbot y Treseder, 2010). Además, presentan mecanismos de disolución de compuestos minerales en suelos, mismo que se llevan a cabo con la liberación de compuestos orgánicos como: ácido oxálico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido acético y ferricrosinas que solubilizan compuestos minerales del suelo y hacen disponibles los nutrientes para el hongo y las plantas (Courty *et al.*, 2010). En el cuadro 3.2 se muestra los

principales iones solubilizados ( $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ ) y que son absorbidos por los HECM, estos se derivan de la disolución de las partículas del suelo como: apatita, que contiene fósforo, feldespatos y micas de donde proviene el Mg, mientras que el  $\text{Fe}^{3+}$  se encuentra en micas y minerales secundarios como óxidos de hierro (Landeweert *et al.*, 2001).

**Cuadro 3.2.** Hongos ectomicorrízicos descritos por su capacidad de solubilizar minerales.

Especie EMC	Tipo de experimento	Mineral solubilizado	Mecanismo de Mineralización	Referencias
<i>Laccaria bicolor</i> , <i>Lactarius zonarius</i> , <i>Lactarius detrogimus</i>	Micelio	Proteína de leche en polvo	Enzima proteasa	(Nygren <i>et al.</i> , 2007).
<i>Cenococcum geophilum</i>	Micelio	Vermiculita, flogopita	Acido orgánico (oxalato)	(Yuan <i>et al.</i> , 2004).
<i>Paxillus involutus</i>	Micelio	Ortofosfato	Acido orgánico (oxalato)	(Arvieu <i>et al.</i> , 2003).
<i>Pisolithus tinctorius</i>	Micelio	Apatita	Dilución mineral	(Jayakumar y Tan, 2005).
<i>Pisolithus</i> sp.	Micelio	Vermiculita, flogopita	Ácido orgánico (oxalato)	(Yuan <i>et al.</i> , 2004).
<i>Suillus variegatus</i>	Plántula	Biotita, Apatita	Ácido orgánico (A. oxálico A. cítrico)	(A. Wallander <i>et al.</i> , 2003).
<i>Scleroderma verrucosum</i>	Micelio	-----	Ácidos orgánicos (Á. oxálico, Á. cítrico, Á. succínico),	(Machuca <i>et al.</i> , 2007).

El proceso de asimilación de los nutrientes por la planta implica tres procesos: a) del suelo a la membrana del hongo ectomicorrízico; b) del hongo al apoplasto de la epidermis de la raíz; y c) del apoplasto a la raíz de la planta (Chalot *et al.*, 2002).

### 3.5.4 Ecología de la ectomicorriza

La simbiosis ectomicorrízica se establece en unas 3000 especies de plantas y alrededor de 5000 especies de hongos, principalmente *Basidiomicetos* y *Ascomicetos* (Smith y Read, 1997; Brundrett, 2002). En la actualidad se tiene conocimiento sobre la simbiosis ectomicorrízica y su importancia en los ecosistemas forestales de las regiones boreales, templadas y mediterráneas (Read y Pérez-Moreno, 2003). En estas regiones los hongos ECM se encuentran estableciendo simbiosis con árboles pertenecientes a las familias Pinaceae, Abietaceae, Fagaceae, Tiliaceae, Betulaceae y Mirtaceae (Pérez-Moreno y Read, 2004). Las ectomicorrizas en estado natural se forman en la mayoría de los árboles de los ecosistemas forestales, y por tanto, es integrante de sus sistemas radicales y un factor a tener en cuenta a la hora de valorar su calidad del árbol. La importancia de las ectomicorrizas radica en la práctica forestal, que se lleva a cabo desde hace mucho tiempo. Donde, se demostró que las ectomicorrizas ayudan a los problemas de crecimiento de los plantas en algunos viveros (Pera y Parladé, 2005).

### 3.6 Potencial biotecnológico

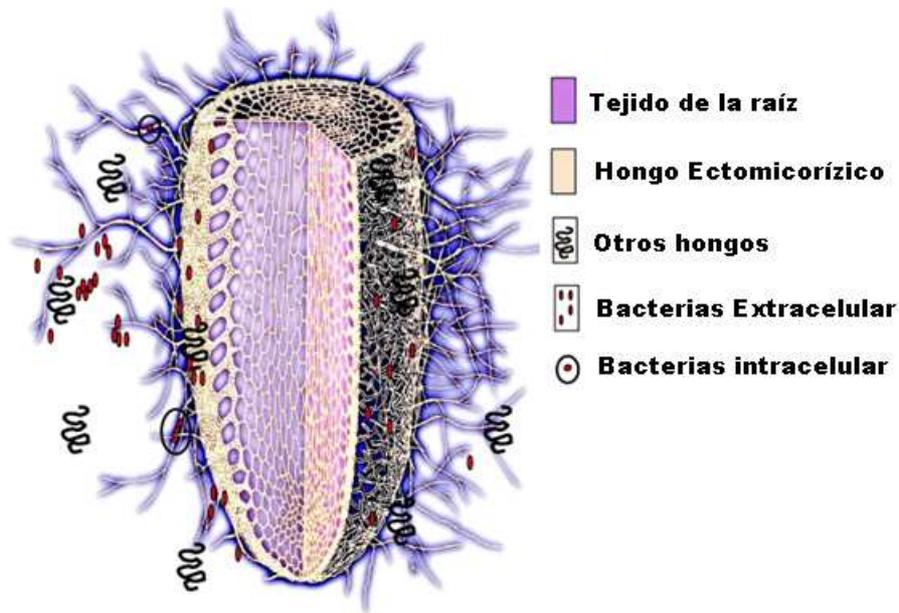
Para la inoculación de plantas forestales las fuentes de inóculo ectomicorrízico usadas en propagación de plantas han sido tradicionalmente esporas y cultivos miceliales (Pérez-Moreno *et al.*, 2010). **Inóculo esporal:** este tipo es más utilizado para la inoculación de plantas a gran escala, ya que este método es sencillo, eficaz, además es práctico y barato debido al porcentaje de esporas que presenta. Este inóculo consiste en limpiar los esporomas de los hongos recolectados en campo y previa identificación, retirando el pileo y cortando el estípite como es el caso de los hongos epigeos. Posteriormente se procede al fragmentado o triturado de los hongos; se hace el

conteo de las esporas, con técnicas precisas y confiables; se recomienda que las esporas estén en concentraciones de  $10^5$  y  $10^7$  por planta (Chávez *et al.*, 2009).

**Inoculo micelial:** el crecimiento micelial del hongo se realiza por lo regular en un soporte sólido (turba-vermiculita) suplementado con solución nutritiva, y su incorporación al sustrato o suelo del vivero ha sido uno de los métodos más eficaces para la producción y aplicación de inóculos ectomicorrízicos. Esta técnica de producción de inóculo ha sido adoptada universalmente y se ha utilizado con éxito, incluso a escala comercial, para la inoculación de distintas especies forestales (Pera *et al.*, 1998).

### **3.7 Interacción bacteriana y hongos ectomicorrízicos**

El suelo forestal es un recurso natural que contiene una extensa y compleja comunidad de microorganismos vivos. Estos microorganismos viven en simbiosis con las raíces de los árboles y participan en el reciclamiento de carbono y nutrientes minerales (Nazir *et al.*, 2010). Las raíces de árboles forestales constituyen un importante órgano de la planta porque absorbe agua y nutrientes. Además, libera una gran cantidad de compuestos de carbono llamados exudados (Hampp y Tarkka, 2009). Estos compuestos incrementan las diversidades de poblaciones microbianas en una zona estrecha del suelo, la cual está influenciada por las raíces vivas llamada “rizosfera” (Tarkka *et al.*, 2008). Las bacterias son una parte importante de la población de microorganismos que existen en la rizosfera (Figura 3.2). Además, las raíces de las plantas forestales desarrollan estructuras simbióticas con hongos ectomicorrízicos del suelo (Garbaye, 1994).



**Figura 3.2.** Representación esquemática del complejo de la rizosfera y establecimiento de la simbiosis ectomicorrízica con bacterias auxiliaadoras de la micorrización. Fuente: (Frey-Klett y Garbaye, 2005).

### 3.7.1 Micorrizosfera

Los hongos ectomicorrízicos son miembros de la población mutualista de la rizosfera, los cuales desempeñan diversas funciones en los micro-ecosistemas de los suelos forestales (Duponnois, 2006). En la asociación micorrízica ocurren mecanismos bioquímicos y físico-químicos que modifican a la rizosfera y su entorno. Este cambio es considerado en términos funcionales y estructurales como “micorrizosfera”, que describe el ambiente microbiano alrededor de la micorriza (Linderman, 1988). La micorrizosfera se caracteriza por una alta actividad y diversidad microbiana, estos incluyen bacterias benéficas, perjudiciales, neutras y otros hongos. Además, es la zona donde se lleva a cabo el intercambio de nutrientes como carbono hacia el hongo ectomicorrízico y minerales (N, P, K, Ca) que son utilizados por las plantas (Reddy y Satyanarayana, 2006; Balogh-Brunstad *et al.*, 2008).

### **3.7.2 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal**

Las bacterias de vida libre que habitan en la rizosfera de las plantas ayudan a su crecimiento mediante procesos bioquímicos que permiten la disponibilidad de los nutrientes (Landeweert *et al.*, 2001; Tarkka *et al.*, 2008). Algunas bacterias presentan características como: i) fijar nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) convirtiéndolo en  $N-NH_4^+$  (van der Heijden *et al.*, 2008); ii) transformar los compuestos de fósforo orgánico a fósforo inorgánico soluble mediante enzimas conocidas como fosfatasa; (Fernández *et al.*, 2008), así como, solubilizar el fósforo adherido en minerales inorgánico mediante ácidos orgánicos (Ivanova *et al.*, 2006); iii) capacidad de producir hormonas como ácido indolacético (Gamalero *et al.*, 2003; Frey-Klett *et al.*, 2005). Las bacterias que presentan estas características de promover el crecimiento vegetal en ocasiones no manifiestan efecto positivo en el crecimiento de las plantas, ya que necesitan la co-inoculación con las micorrizas (Domenech *et al.*, 2004). Generalmente, la relación entre bacterias y los hongos ectomicorrízicos es una simbiosis obligatoria, por lo tanto, este tipo de bacterias es conocida como “mycorrhization helper bacteria” (MHB) por su siglas en inglés (Frey-Klett *et al.*, 2007).

### **3.7.3 Bacterias auxiliaoras de la micorrización**

Las bacterias auxiliaoras de la micorrización (BAM) establecen simbiosis con la micorrizosfera y manifiestan un efecto positivo en el crecimiento de las plantas en presencia de la ectomicorriza (Domenech *et al.*, 2004). Este tipo de bacterias pueden promover la tasa de micorrización en diferentes estadios de la interacción bacteria-hongo-planta, mediante mecanismos como: i) la secreción de exudados que estimulan la germinación de esporas de hongos ectomicorrízicos; ii)

promoviendo el crecimiento de las hifas en condiciones *in vitro* y aumentando la biomasa fúngica en el suelo (Frey-Klett, *et al.*, 2005) y iii) puede alterar la arquitectura de la ectomicorriza aumentando el número de raíces cortas (Aspray *et al.*, 2006).

### 3.8 BIBLIOGRAFÍA

- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae.. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11: 107-114.
- Agerer, R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Progress* 5: 67-107.
- Agrahar-Murugkar, D. and Subbulakshmi, G. 2005. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry* 89: 599–603.
- Arvieu, J.C.; Leprince, F. and Plassard, C. 2003. Release of oxalate and protons by ectomycorrhizal fungi in response to P- deficiency and calcium carbonate in nutrient solution. *Ann. For. Scien.* 60: 815-821.
- Aspray, T. J.; Frey-Klett, P.; Jones, J. E.; Whipps, J. M.; Garbaye, J. and Bending, G. D. 2006. Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza* 16:533-54.
- Balogh-Brunstad, Z.; Keller, C. K.; Gill, R. A.; Bormann, B. T. and Li, C. Y. 2008. The effect of bacteria and fungi on chemical weathering and chemical denudation fluxes in pine growth experiments. *Biogeochemistry* 88: 153-167.

- Barros, L.; Cruz, T.; Baptista, P.; Estevinho, L. M. and Ferreira, I. C. F .R. 2008. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food. Chem. Tox.* 46: 2742- 2747.
- Beluhan, S. and Ranogajec, A. 2011. Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chemistry* 124: 1076-1082.
- Boa, E. 2004. Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people. FAO, Roma. 147 p.
- Bonfante, P. and Anca, I. A. 2009. Plants, Mycorrhizal Fungi, and Bacteria: A Network of Interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 363-383.
- Boyd, C. D. and Hellebrand, K. E. 1991. Assessment of the effect of mycorrhizal fungi on drought tolerance of conifer seedlings. *Can. J. Bot.* 69:1764-1771.
- Brundrett, M. C. 2002. Tansley review N°.134: Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275-304.
- Brundrett, M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol. Rev.* 79: 473-495.
- Cairney, J.W. G.; Jennings, D. H. y Agerer, R. 1991 The nomenclature of fungal multi-hyphal linear aggregates. *Cryptogam Bot* 2/3: 246-251.
- Caglarlrmak, N.; Unal, K. and Otles, S. 2002. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the black sea region of Turkey. *Micol. Apl. Int.* 14: 1-5.
- Chalot, M.; Javelle, A.; Blaudez, D.; Lambilliotte, R.; Cooke, R.; Sentenac, H.; Wipf, D. and Botton, B. 2002. An update on nutrient transport processes in ectomycorrhizas. *Plant Soil* 244: 165-175.

- Chávez, M. D.; Pereira, C. G. and Machuca, H. A. 2009. Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. *Bosque* 30: 4-9.
- Colak, A.; Faiz, Ö. and Sesli, E. 2009. Nutritional composition of some wild edible mushrooms. *Turk. J. Biochem.* 34: 25-31.
- Courty, P. E.; Buée, M.; Diedhiou, A. G.; Frey-Klett, P.; Tacon, F. L.; Rineau, F.; Turpault, M. P.; Uroz, S. y Garbaye, J. 2010. The role of ectomycorrhizal communities in forest ecosystem processes: New perspectives and emerging concepts. *Soil Biol. Bioch.* 42: 679-698.
- Domenech, J.; Ramos-Solano, B.; Probanza, A.; Lucas-García, J. A.; Colón, J. J. and Gutiérrez-Mañero, F. J. 2004. *Bacillus* spp. and *Pisolithus tinctorius* effects on *Quercus ilex* ssp. *ballota*: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. *Forest Ecology and Management* 194: 293-303.
- Duponnois, R. 2006. Chapter 15: Bacteria helping mycorrhiza development. *In*: K.G. Mukerji, C. Manoharachary y J. Singh (eds.). *Microbial Activity in the rhizosphere*. *Soil Biology* 7: 297-310.
- Dutra, C. M.; Liparini, P. O.; Megumi, K. M. C. y Chaer, B. A. 2002. Ectomicorrizas: A Face Oculta das Florestas. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento* 29:38-46.
- Elmastas, M.; Isildak, O.; Turkekul, I. and Temur, N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 337-345.
- Farjon, A., and B.T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). *Flora Neotropica Monograph* 75. New York, NY: The New York Botanical Garden.

- Fernández, L. A.; Sagardoy, M. A. y Gómez, M. A. 2008. Estudio de la fosfatasa ácida y alcalina en suelos de la región pampeana norte del área sojera argentina. *CI. Suelo (Argentina)* 26: 35-40.
- Frank. B. 2005. On the nutritional dependence of certain trees on root symbiosis with belowground fungi (an English translation of A.B. Frank's classic paper of 1885). *Mycorrhiza* 15: 267-275.
- Frey-Klett, P.; Chavatte, M.; Clausse, M. L.; Courier, S.; Roux, C. L.; Raaijmakers, J.; Martinotti, M. G.; Pierrat, J. C. and Garbaye, J. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165: 317-328.
- Frey-Klett, P. and Garbaye, J. 2005. Mycorrhiza helper bacteria: a promising model for the genomic analysis of fungal-bacterial interactions. *New Phytologist* 168: 1-4.
- Frey-Klett, P.; Garbaye, J. and Tarkka, M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176: 22-36.
- Gamalero, E.; Fracchia, L.; Cavaletto, M.; Garbaye, J.; Frey-Klett, P.; Varese, G. C. and Martinotti, M. G. 2003. Characterization of functional traits of two fluorescent pseudomonads isolated from basidiomes of ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology y Biochemistry* 35: 55-65.
- Garbaye, J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 128: 197-210.
- Garibay-Orijel, R.; Cordova, J.; Cifuentes, J.; Valenzuela, R.; Estrada-Torres, A. and Kong. A. 2009. Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for indigenous community forests. *For. Eco. Man.* 258: 122-131.

- Garibay-Orijel, R., J. Cifuentes, A. Estrada-Torres y J. Caballero. 2006. People using macro-fungal diversity in Oaxaca, Mexico. *Fungal Diversity* 21: 41-64.
- Gernandt, D.; Geada, G.; Ortiz, S. and Liston, A. 2005. Phylogeny and classification of *Pinus*. *Taxon* 54 :29-42.
- Guzmán, G. 2008a. Diversity and use of traditional mexican medicinal fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10: 209-217.
- Guzmán, G. 2008b. Hallucinogenic Mushrooms in Mexico: An Overview. *Economic Botany* 62: 404-412.
- Hampp, R.; Wiese, J.; Mikolajewski, S. y Nehls, U. 1999. Biochemical and molecular aspects of C/N interaction ectomycorrhizal plants: an update. *Plant and Soil* 215:103-113.
- Hampp, R. and Tarkka, M. T. 2009. Chapter 12: Interaction with Soil Microorganisms. *In: A. Varma, y A.C. Kharkwal (eds.). Symbiotic Fungi. Soil Biology* 18: 197-210.
- Hernández, C. O; Ramírez, G. E. A y Mendizábal, H. L. 2003. Variación en semillas de cinco procedencias de *Pinus pseudostrobus* Lindl. *Forestal Veracruzana* 5: 23-28.
- Hobbie, E. A. y Agerer, R. 2010. Nitrogen isotopes in ectomycorrhizal sporocarps correspond to belowground exploration types. *Plant Soil* 327: 71-83.
- Ivanova, R.; Bojinova, D. and Nedialkova, K. 2006. Rock phosphate solubilization by soil bacteria. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 41: 297-302.
- Jayakumar, P. and Tan, T. K. 2005. Phosphorus solubilization by ectomycorrhizal *Pisolithus tinctorius* in pure culture and in association with *Acacia mangium*. *Symbiosis* 39: 125-130.
- Krpata, D.; Fitz, W.; Peintner, U.; Langer I. y Schweiger, P. 2009. Bioconcentration of zinc and cadmium in ectomycorrhizal fungi and associated aspen trees as affected by level of pollution. *Environ. Pollut.* 157: 280-286.

- Landeweert, R.; Hoffland, E.; Finlay, R. D.; Kuyper, T. and van Breemen, N. 2001. Linking plants to rocks. Ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Tren. Ecol. Evol.* 16: 248-254.
- León, S., T. y Suárez, A. 1998. Efecto de las plantaciones forestales sobre el suelo y agua. CONIF, Santa Fe de Bogota. 143 p.
- Linderman, R. G. 1988. Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78: 366-371.
- López-Upton, J. 2002. *Pinus pseudostrobus* Lindl. In: Vozzo, J. A. (ed). Tropical tree seed manual. U. S. D. A. Forest service. 636-638.
- Machuca, A.; Pereira, G.; Aguiar, A. and Milagres, A. M. F. 2007. Metal-chelating compounds produced by ectomycorrhizal fungi collected from pine plantations. *Lett. Appl. Microb.* 44: 7-12.
- Marks, G., C. 1991. Causal morphology and evolution of micorrizas. *Agriculture, Ecosystems and Environmental* 35: 89-104.
- Martínez-Carrera, D.; Nava, D.; Sobal, M.; Bonilla, M. and Mayett, Y. 2005. Marketing channels for wild and cultivated edible mushrooms in developing countries: the case of México. *Micol. Apl. Int.* 17: 9-20.
- Meyer, A.; Grote, R.; Polle, A. and Butterbach-Bahl, K. 2010. Simulating mycorrhiza contribution to forest C- and N cycling-the MYCOFON model. *Plant Soil* 327: 493-517.
- Montoya, A.; Hernández, N.; Mapes, C.; Kong, A. and Estrada-Torres, A. 2008. The collection and sale of wild mushrooms in a community of Tlaxcala, Mexico. *Economic Botany* 62: 413-424.
- Morin, C.; Samson, J. y Dessureault, M. 1999. Protection of black spruce seedlings against *Cylindrocladium* root rot with ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.* 77: 169-174.

- Muller, T.; Avolio, M.; Olivi, M.; Benjdia, M.; Rikirsch, E.; Kasaras, A.; Fitz, M.; Chalot, M. and Wipf, D. 2007. Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: The *Hebeloma cylindrosporum*–*Pinus pinaster* model. *Phytochemistry* 68: 41-51.
- Nazir, R.; Warmink, J. A.; Boersma, H. and van Elsas, J. D. 2010. Mechanisms that promote bacterial fitness in fungal-affected soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 71: 169-185.
- Nehls, U.; Micholajewski, S.; Magel, E. and Hampp, R. 2001. Carbohydrate metabolism in ectomycorrhizas: gene expression, monosaccharide transport and metabolic control. *New Phytol.* 150: 533-541.
- Nehls, U. 2008. Mastering ectomycorrhizal symbiosis: the impact of carbohydrates. *J. Exp. Bot.* 59: 1097-1108.
- Nehls, U.; Gohringer, F.; Wittulsky, S. y Dietz, S. 2010. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review. *Plant Biology* 12: 292-301.
- Nygren, C.M. R.; Edqvist, J.; Elfstrand, M.; Heller, G. and Taylor, A. F. S. 2007. Detection of extracellular protease activity in different species and genera of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 17: 241-248.
- Pera, J. I.; Álvarez, F. y Parlade, J. 1998. Eficacia del inoculo miceliar de 17 especies de hongos ectomicorrícicos para la micorrización controlada de: *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* y *pseudotsuga menziesii* en contenedor. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.* 7: 139-153.
- Pera, J y Parladé, J. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Invest. Agrar.Sist. Recur. For* 14: 419-433.
- Pérez-Moreno, J. y Read D. J. 2004. Los hongos ectomicorrícicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia.* 29: 239-247.

- Pérez-Moreno, J.; Martínez-Reyes, M.; Yescas-Pérez, A.; Delgado-Alvarado, A. and Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany* 62: 425-436.
- Pérez-Moreno, J.; Lorenzana-Fernández, A.; Carrasco-Hernández, V. y Yescas-Pérez, A. 2010. Los hongos comestibles silvestres del parque nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACYT. Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico. 167 p.
- Perry, P. J. 1991. *Pines of Mexico and Central America*. Timber Press, Portland, OR.
- Mirov, N. T. 1967. The genus *Pinus*. Ed. The Ronald Press Company. New York. 602 p.
- Pilz, D. and Molina, R. 2002. Commercial harvests of edible mushrooms from the forests of the Pacific Northwest United States: issues, management, and monitoring for sustainability. *Forest Ecology and Management* 155: 3-16.
- Pilz, D.; Norvell, L.; Danell, E. and Molina, R. 2003. *Ecology and Management of Commercially Harvested Chanterelle Mushrooms*. United States Department of Agriculture. Pacific Northwest Research Station, USA. 87 p.
- Queiros, B; Barreira, J. C. M.; Sarmiento, A. C. and Ferreira, I. C. F. R. 2009. In search of synergistic effects in antioxidant capacity of combined edible mushrooms. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 60: 160-172.
- Read, D., J. 1999. The state of the art. *Mycorrhiza* 2: 3-34.
- Read, D. J. and Pérez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems. *New Phytol.* 157: 475-492.

- Reddy, M. S. and Satyanarayana, T. 2006. Chapter 13: Interactions between ectomycorrhizal fungi and rhizospheric microbes. *In*: K.G. Mukerji, C. Manoharachary y J. Singh (eds.). Microbial Activity in the rhizosphere. *Soil Biology* 7: 246-263.
- Raven, P.; Evert R. y Eichhorns, S. 1992. *Biología de las plantas*. Editorial Reverte S.A. Barcelona España. 745 p.
- Ruan-Soto, F.; Garibay-Orijel, R. y Cifuentes, J. 2004. Conocimiento micológico tradicional en la planicie costera del Golfo de México. *Rev. Mex. Mic.* 19: 57-70.
- Ruan-Soto, F.; Garibay-Orijel, R. and Cifuentes, J. 2006. Process and dynamics of traditional selling wild edible mushrooms in tropical Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2: 1-13.
- Ruano, M. J. R. 2008. *Viveros forestales: manual de cultivo y proyectos*. 2ª edición. Mundi-Prensa. España. 233 p.
- Smith, S. E. y Read, D. J. 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd. Ed. Academic Press. London, England. 605 p.
- Smith S. E y Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal symbiosis*. 3rd Ed. Academic express. London. 776 p.
- Staddon, P.L.; Ramsey, C. B.; Ostle, N.; Ineson, P. and Fitter, A. H. 2003. Rapid turnover of hyphae of mycorrhizal fungi determined by AMS microanalysis of C-14. *Science* 300: 1138-1140.
- Talbot, J. M. and Treseder, K. K. 2010. Controls over mycorrhizal uptake of organic nitrogen. *Pedobiologia* 53: 169-179.
- Tarkka, M.; Schrey, S. and Hampp, R. 2008. Chapter 1: Plant associated soil micro-organisms. *In*: R. Hampp, C.S. Nautiyal y P. Dion (eds.). Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence. *Soil Biology* 15: 3-51.

- Taylor, A. F. S. y Alexander, I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19: 102-112.
- van der Heijden, M.G.A; Bardgett, R. D. and van Straalen, N. M. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11: 296-310.
- Villareal L. y J. Pérez-Moreno. 1989. Los hongos comestibles silvestres de México. *Micologia Neotropical Aplicada* 2: 77-114.
- Wallander, H.; Mahmood, S.; Hagerberg, D. and Johansson, L. 2003. Elemental composition of ectomycorrhizal mycelia identified by PCR-RFLP analysis and grown in contact with apatite or wood ash in forest soil. *FEMS Microb. Ecol.* 44: 57-65.
- Yamac, M. and Bilgili, F. 2006. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology* 44: 660-667.
- Yuan, L.; Huang, J. G.; Li, X. L. and Christie, P. 2004. Biological mobilization of potassium from clay minerals by ectomycorrhizal fungi and eucalypt seedlings roots. *Plant and Soil* 262: 351-361.
- Yu-Cheng, D.; Zhu-Liang, Y.; Bao-Kai, C.; Chang-Jun, Y. and Li-Wei, Z. 2009. Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (Riew). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 11: 287-302.
- Yun, W. and Hall, I. R. 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Can. J. Bot.* 82: 1063-1073.
- Zamora-Martínez, M. C. and Nieto de Pascual-Paola, C. 2004. Studies of *Tricholoma magnivelare* in México. *Micol. Apl. Int.* 6: 13-23.

## CAPITULO IV

### HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES COMERCIALIZADOS EN VALLES CENTRALES DE OAXACA: NOMBRES COMUNES, IMPORTANCIA ECOLÓGICA Y POTENCIAL NUTRICIONAL, MEDICINAL Y BIOTECNOLÓGICO

#### 4.1 RESUMEN

Los hongos comestibles silvestres son un recurso forestal no maderable que han sido utilizados desde épocas prehispánicas en México por su alto contenido nutrimental y sus propiedades medicinales. México constituye un importante reservorio de dichos hongos a nivel mundial. En el presente trabajo, se identificaron las especies de hongos comestibles silvestres comercializados en mercados de Valles Centrales de Oaxaca durante 2009 y 2010. Se realizaron encuestas a las personas recolectoras sobre el conocimiento tradicional de los hongos comercializados. Se identificaron 20 especies de hongos comestibles adscritos a 12 géneros. Se determinó que dichas especies de hongos tienen diferentes usos, tales como: i) potencial de exportación; ii) nutricional, con alto contenido de proteínas y aminoácidos; iii) propiedades medicinales como antioxidante, anticancerígenos, antibióticos y antitumoral, iv) potencial biotecnológico para la producción de bioinoculantes útiles en especies forestales de México. *Por esta razón, los hongos comestibles silvestres colectados en mercados de Valles Centrales pueden ser utilizados íntegramente en modelos de desarrollo sustentable en las comunidades rurales de Oaxaca.*

**Palabras clave:** *etnomicología, hongos medicinales, ectomicorrizas, potencial de exportación, propiedades nutricionales, sustentabilidad.*

## 4.2 ABSTRACT

Wild edible mushrooms are a non-timber forest resources that have been used since pre-hispanic times in Mexico for its high nutritional and medicinal properties. Mexico is an important reservoir of these fungi worldwide. In this study, we identified the species of wild edible mushrooms sold in markets in Central Valleys of Oaxaca during 2009 and 2010. Surveys were conducted of people gathering on the traditional knowledge of commercial mushrooms. We identified 20 species of edible fungi assigned to 12 genera. It was determined that these species of fungi have different uses, such as: i) export potential, ii) nutrition, high in protein and amino acids; iii) medicinal properties as an antioxidant, anticarcinogenic, and antitumor antibiotics, iv) potential for biotechnological bioinoculants production of useful forest species in Mexico. For this reason, wild edible mushrooms collected in Valles Centrales markets can be fully used in models of sustainable development in rural communities in Oaxaca.

**Key words:** *ethnomycology, medicinal mushrooms, ectomycorrhizal, export potential, nutritional properties, sustainability.*

## 4.3 INTRODUCCIÓN

En México existe una alta diversidad de especies fúngicas debido a que el país se ubica entre dos importantes regiones biogeográficas: el Neotrópico y Neártico. En el territorio Mexicano existen bosques templado de Gimnospermas y Angiospermas, los cuales favorecen el desarrollo de alrededor de 200 000 especies de hongos (Guzmán, 2008), se ha estimado que más de 300 especies de hongos silvestres son comestibles (Boa, 2004). Los hongos se han utilizado como alimento y medicina tradicional desde épocas prehispánica y han sido incorporados en la dieta de diversos grupos étnicos (Guzmán, 2008b). Los hongos comestibles poseen altos contenidos de proteínas, carbohidratos y vitaminas, y bajos contenidos de grasas (Colak *et al.*, 2009).

Actualmente, el interés de los hongos comestibles ha crecido significadamente debido a que se ha demostrado propiedades nutrimentales y medicinales utilizadas en tratamientos terapéuticos (Barros *et al.*, 2008). En México existen alrededor de 70 especies de hongos usadas en prácticas de medicina tradicional para el tratamiento de 40 tipos de problemas de salud humana (Guzmán, 2008a). Esto sugiere que los hongos comestibles silvestres son recursos altamente recomendables para su comercialización y consumo, ya que su comercialización es una actividad que beneficia a los recolectores, y su venta se realiza directamente de recolectores a compradores en mercados regionales en pequeña y gran escala o con fines de exportación (Pérez-Moreno *et al.*, 2008, 2010). Adicionalmente, los hongos comestibles silvestres son considerados un recurso forestal no maderable que contribuyen a la conservación de bosques, dado que forman parte de la estructura y funcionamiento de los mismos y están entonces vinculados en la prestación de servicios forestales, tales como: recreación, captura de agua y carbono, conservación de la biodiversidad y ecoturismo (Pilz y Molina, 2002).

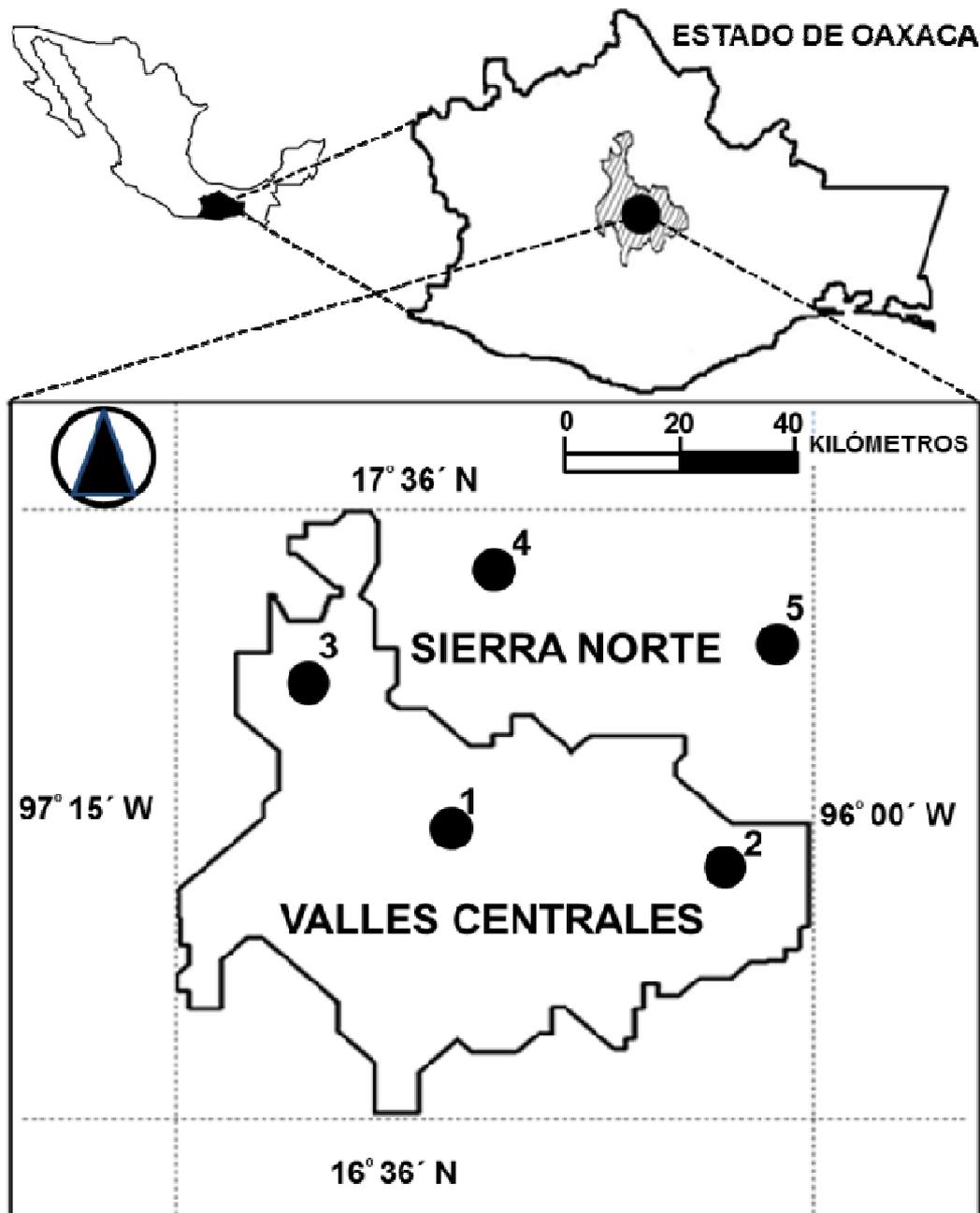
Diversos estudios realizados en Oaxaca, sobre hongos comestibles silvestres se han basado en registros, venta, consumo y conocimiento tradicional (Zamora-Martínez y Pascual-Paola, 2004; Garibay-Orijel *et al.*, 2006; Garibay-Orijel *et al.*, 2009; Ruan-Soto *et al.*, 2004). Sin embargo, pocos son los trabajos que analizan la importancia de los hongos comestibles silvestres de Oaxaca en la medicina moderna y su potencial de aplicación biotecnológica a través de la producción de bioinoculantes de árboles forestales. Por ello, el objetivo de este trabajo fue identificar especies de hongos comestibles silvestres comercializados en Valles Centrales de Oaxaca con potencial medicinal, económico y ecológico, como preámbulo del uso de un recurso forestal no maderable que puede incorporarse en el desarrollo sustentable en las comunidades rurales de Oaxaca.

## 4.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.4.1 Área de estudio

La región de Valles Centrales se encuentra en el centro del estado de Oaxaca, México entre los 17° 36' a 16°36' N y 97° 15' a 96°00' W (Figura 4.1). En la región existen diversos tipos de vegetación como: bosques tropical caducifolio, matorral xerófilo, bosques de *Quercus*, bosques de *Pinus* y bosques de *Pinus-Quercus* (Torres, 2004). En las montañas de región de Valles Centrales predominan: *Pinus douglasiana*, *p. herrerae*, *P. lawsoni*, *P. oaxacana*, *P. teocote*, *Quercus castanea*, *Q. crassifolia*, *Q. lawsoni*, *Q. magnoliifolia*, *Q. rugosa* y *Alnus* spp. (Flores y Manzanero, 1999).

La región de la Sierra Norte de donde provienen la mayoría de los hongos comestibles silvestres se localiza entre 17°48'a 16° 54' N y 96° 36'a 95° 15' W al norte de Valles Centrales en el estado de Oaxaca (Figura 4.1). La Sierra Norte de Oaxaca presenta bosques mesofilo de montaña, bosques caducifolios, bosque de *Pinus*, bosque de *Quercus* y bosque de *Pinus-Quercus* (Torres, 2004). Las especies de pinos presentes son: *Pinus oaxacana*, *P. ayacahuite*, *P. douglasiana*, *P. hartwegii*, *P. leiophylla*, *P. michoacana*, *P. montezumae*, *P. oocarpa*, *P. patula*, *P. pseudostrobus*, y *P. teocote*. Estas especies están acompañadas de otras como: *Quercus castanea*, *Q. crassifolia*, *Q. elliptica*, *Q. glaucescens*, *Q. laurina*, *Q. magnoliifolia* *Q. obtusata*, *Abies oaxacana*, *A. guatemalensis*, *A. hickeli* y *Cupressulindleyi* (Flores y Manzanero, 1999).



**Figura 4.1.** Ubicación de la región de Valles Centrales de Oaxaca y las áreas estudiadas: 1) Municipio de Oaxaca de Juárez, 2) Municipio de Tlacolula de Matamoros, 3) Santiago Etlá, 4) Municipio de Ixtlán de Juárez y 5) Municipio de San Antonio Cuajimoloyas.

#### **4.4.2 Recolección de hongos**

Se realizaron visitas en la región de los Valles Centrales de Oaxaca con la finalidad de recolectar los hongos comestibles comercializados en dicha región. Los mercados explorados fueron: i) la Central de Abastos en la ciudad de Oaxaca de Juárez, y ii) el mercado regional del Municipio de Tlacolula de Matamoros. Los hongos recolectados en la Central de Abastos provenían del municipio de Santiago de Etlá e Ixtlán de Juárez, mientras que los recolectados en el mercado regional del municipio de Tlacolula de Matamoros provenían del municipio de San Antonio Cuayimoloyas (Figura 4.1). En total se realizaron 8 visitas en 2009 a 2010. Los mercados fueron visitados en temporada de lluvias en los meses de julio a septiembre. El mercado de la Central de Abastos se visitó en los días de tianguis (martes y viernes), mientras, que el mercado de Tlacolula se visitó los días de plaza (domingo). En los puestos donde se comercializaban los hongos comestibles, se realizaron encuestas a las personas que vendían los hongos. Se efectuaron preguntas relacionadas con: i) los nombres comunes de los hongos; ii) sus conocimientos fenológicos; iii) sus conocimientos ecológicos; iv) sus conocimientos económicos de los hongos comercializados y v) usos de los hongos comestibles siguiendo los criterios de Ruan-Soto *et al.* (2004).

#### **4.4.3 Determinación taxonómica y de potencial de usos**

Se tomaron fotografías tanto en los mercados estudiados como a los especímenes frescos posterior a su recolección. Asimismo se tomaron datos de las características morfológicas de los especímenes recolectados. Posterior a su caracterización macromorfológica, se efectuó una caracterización micromorfológica, siguiendo los métodos de Largent (1973) y Largent *et al.*

(1977) para la identificación de los hongos. Para la determinación del carácter ectomicorrízico de las especies, se siguieron los criterios considerados por Rinaldi *et al.* (2008) y para ubicar el potencial medicinal de las especies se consultó a Sasata (2011); Yu-Cheng *et al.*, (2009) y Guzmán (2008a). Los especímenes herborizados se encuentran depositados como colecciones “voucher” en el área de Microbiología en el Colegio de Postgraduados en Texcoco estado de México.

## **4.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.5.1 Diversidad y conocimiento tradicional**

Se identificaron 20 especies de hongos comestibles silvestres, adscritos a 12 géneros: *Amanita*, *Cantharellus*, *Hydnum*, *Hygrophorus*, *Hypomyces*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Lepista*, *Marasmius*, *Ramaria*, *Tricholoma* y *Tylopilus*. Dentro de ellos, el género con mayor número de especies fue *Ramaria* con 7 y posteriormente *Laccaria* y *Cantharellus* con 2 especies cada uno. Todas las especies que se señalan en el Cuadro 4.1, se registraron en la Central de Abastos de la ciudad de Oaxaca, excepto *Amanita caesarea* la cual fue registrada también en municipio de Tlacolula, Oaxaca.

**Cuadro 4.1.** Nombres comunes de hongos comestibles silvestres recolectados en mercados de Valles Centrales de Oaxaca y su uso potencial.

Especie	Nombre común	UP	GT
<i>Amanita caesarea</i> (Scop.) Pers.	“Nanacate”, “hongo rojo”	C, B, E, M	ECM
<i>Cantharellus cibarius</i> Fr.	“Mantequilla”, “flor de calabaza”	C, B, E, M	ECM
<i>Cantharellus tubaeformis</i> Fr.	“Chimequito”	C, M	ECM
<i>Hydnum repandum</i> L.	“Espinitas”, “gusanito”	C, E, M,	ECM
<i>Hygrophorus russula</i> (Schaeff.) Kauffman.	“Trompeta”	C	ECM
<i>Hypomyces lactifluorum</i> (Schwein.) Tul. & C. Tul.	“Cresta de gallina”	C, M	P
<i>Laccaria amethystina</i> (Huds.) Cooke.	“Hongo de pajarito”	C, B, M	ECM
<i>Laccaria laccata</i> (Scop.) Cooke.	“Hongo de pajarito”	C, B, M	ECM
<i>Lactarius volemus</i> Fr.) Fr.	“Hongo de leche”	C, B, M	ECM
<i>Lepista nuda</i> (Bull.) Cooke.	“Hongo moradito”, “Hongo de frijol”	C, M	S
<i>Marasmius oreades</i> (Bolton) Fr.	“Hongo de corralito”	C, M	S
<i>Ramaria</i> sp.	“Cacho de venado”	C	ECM?
<i>Ramaria</i> (cf.) <i>araiospora</i> Marr & D.E. Stuntz	“Hongo de venado”	C	ECM
<i>Ramaria</i> (cf.) <i>aurea</i> (Schaeff.) Quél.	“Cacho de venado”	C, M	ECM?
<i>Ramaria fennica</i> (P. Karst.) Ricken	“Hongo de arbolito”	C	ECM?
<i>Ramaria</i> (cf.) <i>pallida</i> (Schaeff.) Ricken.	“Cacho de venado”	C	ECM?
<i>Ramaria suecica</i> (Fr.) Donk.	“Cacho de venado”, “coliflor”	C	ECM?
<i>Ramaria rubrievanescent</i> Marr & D.E. Stuntz.	“Hongo de coliflor “	C	ECM?
<i>Tylopilus</i> (cf.) <i>felleus</i> (Bull.) P. Karst.	“Lengua de toro”	C, M	ECM
<i>Tricholoma magnivelare</i> (Peck) Redhead.	“Matsutake”, “hongo blanco”	C, B, E, M	ECM

UP= uso potencial; C: comestible; B: con potencial biotecnológico como bioinoculante; E: con potencial de exportación; M: medicinal; GT: grupo trófico; ECM: ectomicorrízico; P: parásito; S: saprobio.

#### 4.5.2 Comercialización y nombres comunes

Los hongos comestibles son vendidos junto con otros productos forestales no maderables, tales como plantas medicinales, plantas ornamentales y frutos nativos. Los hongos comestibles silvestres son recolectados en los bosques principalmente por el padre de familia y por la madre acompañados de sus hijos por las mañanas con ayuda de canastas, mientras que la comercialización en mercados se realiza por las mujeres (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Hongos comestibles de Oaxaca. a) vista general del mercado de Tlacolula, b) vendedora de hongos comestibles del mercado de la Central de Abastos, c) *Tricholoma magnivelare*: hongo objeto de exportación, d) *Amanita caesarea*: hongo de mayor comercialización en mercados regionales, e) *Cantharellus tubaeformis*: hongo con potencial ectomicorrízico, f) *Marasmius oreades*: hongo medicinal, g) *Lactarius volemus*: hongo comestible poco reconocido por los consumidores h) esporas de *Cantharellus tubaeformis*.

Los hongos comestibles silvestres son vendidos directamente por las personas recolectoras, lo que incrementa su ingreso económico. Las especies que más frecuentemente se comercializan en el área de estudio fueron: *Amanita caesarea*, *Cantharellus cibarius*, *Hydnum repandum*, seguidas por *Tricholoma magnivelare*, *Lactarius volemus* y *Hypomyces lactiflorum*. *Amanita caesarea*, *Cantharellus cibarius* y *Tricholoma magnivelare* tienen potencial para ser comercializados en mercados internacionales, dado que globalmente la comercialización anual de estos hongos comestibles ectomicorrízicos están evaluados en billones de dólares (Yun y Hall, 2004).

Los nombres comunes de los hongos comestibles se les atribuyen principalmente por la forma (parecido a estructuras de animales y plantas) y color, pero también por su textura y aspectos ecológicos (lugar donde crecen o animales que los consumen). i) las especies que reciben su nombre común relacionados con la forma son: *Marasmius oreades* es conocido como “hongo corralito”, ya que crece formando una estructura similar a un corral; *Hydnum repandum* es conocido como “hongo de espinita” u “hongo de gusanito” las personas le asignan este nombre, porque su himenio está constituido por estructuras parecidas a espinas o gusanitos; *Cantharellus cibarius* es conocido por los comerciantes como flor de calabaza por su similitud con la flor de *Curcubita maxima*; *Tylopilus felleus* es denominado “lengua de toro”, porque es poroso y áspero en la parte inferior del sombrero. Las personas adultas aprecian este hongo por su sabor amargo y por ser muy carnoso; *Hygrophorus russula* es comúnmente llamado “trompeta” por su similitud a este instrumento musical; *Hypomyces lactiflorum* es nombrado “cresta de gallina” por su parecido a esta estructura en la especie de *Gallus gallus*; *Ramaria* spp. comúnmente son llamadas “hongo de arbolito” (forma parecida a un árbol), “cacho de venado” u “hongo de venado” (parecido a las astas de venado) y “hongo de coliflor” (parecido en la forma a una coliflor). Las personas mencionaron que no todas las especies de *Ramaria* son comestibles dado que las que tienen un sabor picoso no son consumidas. ii) las especies que reciben su nombre común

relacionados con el color son: *Amanita caesarea* es nombrado como “nanacate” u “hongo rojo”. Las personas recolectoras identifican *A. caesarea* de color rojo con láminas amarillas, ya que algunos ejemplares pueden confundirse con *A. muscaria* que presenta las láminas color blancas; *Cantharellus cibarius* es conocido por los comerciantes como “hongo de mantequilla” porque presenta un color amarillo, y “cantarel amarillo” por la influencia de extranjeros Americanos; *Cantharellus tubaeformis* se conoce comúnmente como “chimequito” por, el color oscuro que presenta en el sombrero, según los comerciantes tiene una tonalidad sucia; *Lepista nuda* comúnmente llamado “hongo moradito” u “hongo de frijol”, porque presenta un color morado en las láminas; *Tricholoma magnivelare* es conocido como “hongo blanco” porque en campo se observa de color blanco. iii) las especies que reciben su nombre común tomando en consideración aspectos ecología son: *Laccaria laccata* y *Laccaria amethystina* los cuales son nombrados como “hongo de pajarito”, ya que son consumidos por los pájaros; *Tricholoma magnivelare* es conocido como “hongo de venados”, porque es consumido por los venados, otras personas mencionaron que este hongo crece en el estiércol de venado. En el caso de *Cantharellus cibarius* los recolectores reconocen dos variedades, una color amarillo fuerte que proviene se tierra caliente y la otra de color oscuro (casi café) que es de clima frío y se encuentran a orilla de los ríos. iv) la especie que reciben su nombre común por su textura es *Lactarius volemus* y es como “hongo de leche”, porque al cortar las laminas del sombrero secreta un exudado lechoso (parecido a la leche).

### 4.5.3 Propiedades nutrimentales

Nutritionalmente, los hongos comestibles silvestres poseen bajos contenidos de grasas, sin embargo, presentan altos contenidos de proteínas, carbohidratos, minerales y energía comparados con algunos vegetales como maíz y cacahuete (Cuadro 4.2). Adicionalmente tienen gran cantidad de agua (70 a 90%), como se ha reportado para *Lactarius volemus*, *Cantharellus cibarius* y *Hydnum repandum* (Colak *et al.*, 2009). Los hongos comestibles silvestres proporcionan una gran variedad de minerales (Ca, K, P), elementos traza (Cu, Zn, Fe). Además son fuente de vitaminas, tales como: vitamina C (L-ácido ascórbico), B1 (tiamina), B2 (riboflavina), niacina y ácido fólico con valores de 4.79, 0.30, 0.12, 5.94 y 0.06 (valores reportados en mg 100g<sup>-1</sup> de peso seco), respectivamente para el caso de *Cantharellus cibarius* (Caglarlrmak *et al.*, 2002).

La proteína cruda en los hongos comestibles silvestres identificados en el presente trabajo es alta y se encuentra dentro de un intervalo de 20% en *Tricholoma magnivelare* a 69% en *Cantharellus cibarius* (Cuadro 4.2). Las especies de hongos comestibles identificados presentan cantidades de aminoácidos (peso seco) como: ácido glutámico (5.49 mg g<sup>-1</sup>), alanina (2.36 mg g<sup>-1</sup>), aspartato (2.31 mg g<sup>-1</sup>) y leucina (1.87 mg g<sup>-1</sup>) encontrados en *Tricholoma magnivelare* (Liu *et al.*, 2010). Las cantidades de carbohidratos reportados para las especies estudiadas en nuestro caso se encontraron en un intervalo de 13% en *Laccaria laccata* a 64% en *Lactarius volemus* (Cuadro 4.2), estos valores tienen una variación muy amplia entre especies, posiblemente por las condiciones edáficas y climáticas, así como la propia fisiología de los hongos (Heleno *et al.*, 2009; Colak *et al.*, 2009). Los carbohidratos encontrados en *Cantharellus cibarius* y *Marasmius oreades* son principalmente manitol (8.33 g/100 g) y trehalosa (10.49 g/100 g), respectivamente (Barros *et al.*, 2008).

**Cuadro 4.2.** Composición macronutricional, reportada por distintos autores, de especies de hongos silvestres comestibles silvestres comercializados en mercados de Valles Centrales de Oaxaca comparados con maíz y cacahuate.

Especie	Proteína	Carbohidratos	Grasas	Cenizas	Referencia
<i>Amanita caesarea</i>	34.77	55.63	3.50	6.05	Ouzouni <i>et al.</i> (2009)
<i>Cantharellus cibarius</i>	69.14	14.25	4.49	12.12	Barros <i>et al.</i> (2008)
<i>Hydnum repandum</i>	34.14	55.00	8.80	11.38	Colak <i>et al.</i> (2009)
<i>Hygrophorus russula</i>	32.47	53.33	6.00	8.18	Ouzouni <i>et al.</i> (2009)
<i>Laccaria laccata</i>	62.78	12.77	3.76	20.69	Heleno <i>et al.</i> (2009)
<i>Lepista nuda</i>	34.37	56.33	3.23	6.03	Ouzouni <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactarius volemus</i>	25.21	64.00	3.98	2.91	Colak <i>et al.</i> (2009)
<i>Marasmius oreades</i>	52.22	29.41	2.99	11.39	Barros <i>et al.</i> (2008)
<i>Tricholoma magnivelare</i>	20.30	36.60	5.00	8.89	Liu <i>et al.</i> (2010)
Maíz	13.34	71.39	13.13	2.14	Mosha <i>et al.</i> (2000)
Cacahuate	21.4	68.3	2.9	7.5	Mosha y Gaga (1999)

Los hongos comestibles proporcionan bajas cantidades de grasas, las concentraciones de grasas se encuentran dentro de un intervalo de 3% en *Marasmius oreades* a 9% en *Hydnum repandum* (Cuadro 4.2). Los niveles de ácidos grasos insaturados (85%) son más altos que los ácidos grasos saturados (15%), estos valores ha sido reportados para *Cantharellus cibarius* y *Marasmius oreades* (Barros *et al.*, 2008). El contenido de cenizas presentes en hongos comestibles, se encuentra en un intervalo de 3% en *Lactarius volemus* a 21% en *Laccaria laccata* (Cuadro 4.2). También se ha evaluado el nivel de energía en hongos comestibles como: *Cantharellus cibarius*, *Marasmius oreades*, *Lactarius volemus* y *Hydnum repandum* con valores de 375.67 (Kcal100 g<sup>-1</sup>), 379.74 (Kcal100 g<sup>-1</sup>) 393.06 (Kcal 100 g<sup>-1</sup>), 434.20 (Kcal 100g<sup>-1</sup>), respectivamente (Barros *et al.*, 2008; Colak *et al.*, 2009). Las especies de hongos comercializados en mercados de Valles

Centrales de Oaxaca, tienen un gran potencial nutrimental como recurso alimenticio. Esto sugiere que se fomente aun más el consumo de hongos comestibles en la dieta diaria de los habitantes en la ciudad de Oaxaca.

#### **4.5.4 Uso medicinal**

Por miles de años los hongos comestibles han sido relacionados con la medicina tradicional y se han utilizado como tónicos en los países orientales (Yu-Cheng *et al.*, 2009). En México, los hongos comestibles medicinales se han utilizado desde épocas prehispánicas para curar enfermedades relacionadas principalmente con aspectos rituales y espirituales. En 1952 se descubrió el uso de hongos alucinógenos para la realización de ritos ceremoniales realizados por la chamana María Sabina en Huatla de Jiménez, Oaxaca (Guzmán, 2008b). Además, los hongos comestibles como *Cantharellus cibarius* y *Lactarius volemus* han sido utilizados en la medicina tradicional en la Sierra de Ixtlán de Juárez, Oaxaca (Garibay-Orijel *et al.*, 2009). En la medicina tradicional los hongos comestibles se han utilizados en México para curar malestares como: ansiedad, asma, dolores musculares, quemaduras, malestares estomacales, diuréticos, epilepsia, conjuntivitis, mal de ojo, problemas dentales, problemas de sobre peso y rejuvenecimiento (Guzmán, 2008a). Actualmente ha existido un creciente interés en la farmacología moderna para la extracción y estudio de compuestos químicos (metabolitos activos secundarios) extraídos de hongos comestibles silvestres con propiedades antioxidantes, antitumorales, antibacteriales, antivirales e hipocolesterolémico (Barros *et al.*, 2008; Yu-Cheng *et al.*, 2009). Algunas de las especies de hongos comestibles silvestres identificadas en el presente trabajo se han utilizado en la medicina tradicional como: antiinflamatorio, mejoramiento de la vista, tratamiento respiratorio, infecciones gastrointestinales, dolor de cabeza, tratamiento de lumbalgia y esquelalgia,

entumecimiento del miembro, tonificante del estómago, tratamiento de bronquitis tratamiento de la hepatopatía (Cuadro 4.3). De las especies de hongos comestibles estudiados se han encontrado que contienen compuestos antioxidantes capaces de eliminar radicales libres (Cuadro 4.3). La capacidad antioxidante ( $EC_{50}$ ) se ha evaluado mediante la capacidad de barrido de radicales de DPPH (diphenylpicrylhydrazyl) en hongos como: *Marasmius oreades* que se ha registrado altas propiedades antioxidante ( $EC_{50}= 2.78 \text{ mg mL}^{-1}$ ), mientras que en *Cantharellus cibairus* dicha propiedad es menor ( $EC_{50}=7.14 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (Queiros *et al.*, 2009). Además, se ha determinado un alto contenido de tocoferol (un poderoso antioxidante) en especies como *Hydnum repandum* y *Lepista nuda* (Murcia *et al.*, 2002; Elmastas *et al.*, 2007).

En el Cuadro 4.3 se observan algunas especies de hongos comestibles identificado con propiedades antitumorales, que contienen compuesto capaces de eliminar células cancerígenas, tales como: i) diepóxido citotóxicos llamado repandiol en *Hydnum repandum* capaz de combatir varios tipos de células tumorales, especialmente células del colon adenocarcima (Takahashi *et al.*, 1992); ii) polisacáridos en *Tricholoma matsutake* con actividad antitumoral contra el sarcoma 180 en ratones inhibiéndolo en 91.8% (Ikekawa *et al.*, 1979); iii) péptido-glucano extraído de micelio *Tricholoma matsutake* con actividad en contra de fibrosarcoma singénico de ratones (Ebina *et al.*, 2002); iii) además, péptido-glucano de cultivo micelial de *Tylopilus felleus* inhibe el crecimiento de células cancerígenas de sarcoma 180 Ehrlich en un 100% (Defaye *et al.*, 1988).

Otros hongos comestibles silvestres presentas propiedades antibacterianas, ya que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas de humanos como: i) *Amanita caesarea* contra *Bacillus subtilis*; ii) *Lepista nuda* contra *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*; iii) *Hydnum repandum* contra *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* y iv) *Cantharellus cibarius* contra *Bacillu subtilis* y *Staphylococcus*

*aureus* (Cuadro 4.3). Esto sugiere que los metabolitos secundarios de algunos hongos comestibles silvestres son una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobiano que pueden ser utilizados como antibióticos comerciales.

**Cuadro 4.3.** Hongos comestibles silvestres comercializados en mercados de Valles Centrales de Oaxaca con potencial medicinal.

Especie	Propiedades medicinales	Referencia
<i>Amanita caesarea</i>	Antioxidante, antibacteriano, antiinflamatorio.	Ramírez-Anguiano <i>et al.</i> (2007); Yamac y Bilgili (2006); Guzmán (2008a)
<i>Cantharellus cibarius</i>	Antioxidante, antibacteriano, mejora de la vista, tratamiento respiratorio, infecciones gastrointestinales, antitumoral.	Queiros <i>et al.</i> (2009); Barros <i>et al.</i> (2008); Yu-Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	Antibacteriano	Yu-Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Hydnum repandum</i>	Antioxidante, antibacteriano, antitumoral	Murcia <i>et al.</i> (2002); Yamac y Bilgili (2006); Takahashi <i>et al.</i> (1992)
<i>Hypomyces lactifluorum</i>	Dolor de cabeza	Guzmán (2008a)
<i>Laccaria amethystina</i>	Antitumoral	Yu-Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Laccaria laccata</i>	Antitumoral	Yu-Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Lactarius volemus</i>	Antitumoral	Yu-Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Lepista nuda</i>	Antioxidante, antibacteriano, antitumoral	(Elmastas <i>et al.</i> (2007); Yamac y Bilgili (2006) Queiros <i>et al.</i> (2009); Yu-Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Marasmius oreades</i>	Antioxidante, tratamiento de lumbalgia y esquelalgia, entumecimiento del miembro, antitumoral	Yu-Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Ramaria aurea</i>	Antitumoral	Yu-Cheng <i>et al.</i> (2009); Ebina <i>et al.</i> (2002)
<i>Tricholoma. magnivelare</i>	Tonicante del estómago, tratamiento de bronquitis, antitumoral	Yu-Cheng <i>et al.</i> (2009); Defaye <i>et al.</i> (1988)
<i>Tylopilus felleus</i>	Antiinflamatorio, tratamiento de la hepatopatía, antitumoral	

*Ramaria* spp. ha utilizado tradicionalmente contra el dolor de cabeza, problemas estomacales, inflamación muscular y la debilidad (Guzman, 2008a). Dentro de este género existen especies como: *R. apiculata*, *R. aurea*, *R. formosa* y *R. hemirubella* que contienen propiedades antitumorales (Yu-Cheng *et al.*, 2009). Debido a que *Ramaria* spp. tiene una gran diversidad de especies de hongos comestibles en el estado de Oaxaca, es necesario encaminar investigaciones en el descubrimiento de metabolitos secundarios que ayuden a combatir enfermedades en humanos.

#### **4.5.5 Importancia ecológica y potencial biotecnológico**

Los hongos comestibles silvestres identificados en mercados de Valles Centrales de Oaxaca, se pueden clasificar desde el punto de vista ecológico en tres tipos: i) ectomicorrízicos: aquellos que establecen una relación simbiótica mutualista con las raíces de los árboles forestales intercambiando nutrimentos en ambas direcciones; ii) saprobios: aquellos que descomponen la materia orgánica, tales como la madera y la hojarasca, reciclando nutrimentos en los bosques; y iii) micoparasitos: aquellos que atacan a otros hongos.

Los hongos ectomicorrízicos están formados por estructuras básicas conocidas como: i) la red de Hartig; ii) el manto; iii) el micelio extramatricial y iv) los rizomorfos. Estas estructuras son conjunto de hifas que interconectan al hongo ectomicorrízico con la células corticales y la corteza de la raíz en forma de redes, que ayudan al intercambio de nutrimentos en ambas direcciones (Pérez-Moreno *et al.*, 2010). El entendimiento ecológico y fisiológico de algunos hongos comestibles silvestres es muy importante para la conservación de los ecosistemas forestales, ya que son el sostén y el funcionamiento de los bosques (Pilz y Molina, 2002).

**Cuadro 4.4.** Hongos comestibles ectomicorrízicos comercializados en mercados de Valles Centrales de Oaxaca con potencial biotecnológico en la producción de inoculantes para especies forestales y algunos hospederos reportados en México.

Especie de hongo	Arboles hospederos en México	Referencias
<i>Amanita caesarea</i>	<i>Pinus patula</i>	Carrera-Nieva y López-Ríos (2004)
	<i>P. hartwegii</i> y <i>Abies religiosa</i>	Arteaga y Moreno (2006)
	<i>Quercus obtusata</i> y <i>Q. rugosa</i>	Mendoza-Chávez <i>et al.</i> (2006)
	<i>P. pringlei</i> y <i>Q. urbanii</i>	Nava y Valenzuela (1997)
<i>Cantharellus cibarius</i>	<i>Pinus hartwegii</i>	Villarruel y Cifuentes (2007)
	<i>Q. affinis</i> , <i>Q. obtusata</i> y <i>Q. rugosa</i>	Mendoza-Chávez <i>et al.</i> (2006)
	<i>Abies religiosa</i>	Arteaga y Moreno (2006)
	<i>P. pringlei</i> , <i>Q. urbanii</i> y <i>Q. magnolifolia</i>	Nava y Valenzuela (1997)
<i>Cantharellus tubaeformis</i>	<i>Pinus pringlei</i> , <i>Q. urbanii</i> y <i>Q. magnolifolia</i>	Nava y Valenzuela (1997)
	<i>Pinus pringlei</i> y <i>Q. urbanii</i>	Nava y Valenzuela (1997)
<i>Hydnum repandum</i>	<i>Pinus patula</i> y <i>P. hartwegii</i>	Perea-Estrada <i>et al.</i> (2009)
<i>Laccaria</i> spp.	<i>P. patula</i> y <i>P. pseudostrobus</i>	Carrasco-Hernández <i>et al.</i> (2010)
	<i>Pinus greegii</i> , <i>P. patula</i> , <i>P. culminicola</i> , <i>P. pringlei</i> , <i>Q. urbanii</i> , <i>Abies religiosa</i> , <i>Liquidambar stracyflua</i>	Carrera-Nieva y López-Ríos (2004); Garza <i>et al.</i> (2002); Nava y Valenzuela (1997); Landeros <i>et al.</i> (2006); Chanona-Gómez <i>et al.</i> (2007)
<i>Laccaria laccata</i>	<i>Quercus</i> spp. y <i>Abies</i> spp.	Villarruel y Cifuentes (2007)
	<i>Q. obtusata</i>	Mendoza-Chávez <i>et al.</i> (2006)
<i>Laccaria amethystina</i>	<i>Pinus culminicola</i>	Garza <i>et al.</i> (2002)
	<i>P. pringlei</i> , <i>Q. urbanii</i> y <i>Q. magnolifolia</i>	Nava y Valenzuela (1997)
<i>Lactarius volemus</i>	<i>Pinus teocote</i> , <i>P. douglasiana</i> , <i>P. patula</i> , <i>Quercus scytophylla</i> , <i>Q. crassifolia</i> , <i>Q. laurina</i> , <i>Q. rugosa</i> y <i>Q. consatti</i>	Zamora-Martínez y Pascual-Paola (2004)
	<i>P. pringlei</i> y <i>Q. urbanii</i>	Nava y Valenzuela (1997)

Para inducir la formación de micorrizas en árboles forestales, se utilizan tres tipos inoculantes: esporal, miceliar líquido y miceliar sólido, las esporas se pueden extraer de los píleos o de los esporomas en su totalidad. Mientras, que el micelio se produce en medio líquido o cultivos

estériles mezclándose con diversos sustratos inertes como: turba-vermiculita, lignato polimerizado y arcilla (Pérez-Moreno *et al.*, 2010).

Algunas de las especies de hongos ectomicorrízicos identificados en mercados de Oaxaca, se han estudiado desde el punto de vista biotecnológico. En México se han utilizado esporomas deshidratados y molidos de especies como: *Amanita caesarea* para *Pinus patula*; *Laccaria* spp. para inocular *P. patula* y *P. hartwegii* y *P. pseudostrobus*; *Laccaria laccata* para *P. greegii*, *P. patula*, en todos los casos los hongos indujeron la formación micorrizas incrementando el crecimiento de la planta (Cuadro 4.4). Mientras que en condiciones naturales se ha registrado que los árboles forestales establecen simbiosis con algunas especies hongos ectomicorrízicos colectados en mercados de Valles Centrales de Oaxaca (Cuadro 4.4). En otras partes del mundo se han estudiado algunas especies de hongos comestibles ectomicorrízicos identificados en mercados de Oaxaca, donde los esporomas molidos de *Lactarius volemus* se han aplicado en soluciones en las raíces de *Pinus kesiya* Royle ex Good var. *langbianensis* (Liu *et al.*, 2009). Mientras que en condiciones *in vitro* se ha propagado el micelio de hongos ectomicorrízicos como: *Cantherellus cibarius* para *P. sylvestris* (Danell, 1994); *Laccaria amethystina* para *Q. serrata* y *Q. glauca* (Tateishi *et al.*, 2003); *Laccaria laccata* para *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii* (Pera *et al.*, 1998). Por lo tanto, las especies con potencial biotecnológico en la aplicación de inoculantes ectomicorrízicos en especies forestales son *Amanita caesarea*, *Cantherellus cibarius*, *Laccaria laccata*, *Laccaria amethystina*, *Lactarius volemus* y *Tricholoma magnivelare*, debido a que: i) se han registrado que forman simbiosis con plantas forestales en condiciones naturales; ii) se encuentran en grandes cantidades en los mercados donde se comercializan; y iv) se tiene registros de la formación de micorrizas en plantas forestales.

#### **4.6 CONCLUSIONES**

Los hongos comestibles silvestres comercializados en mercados de Oaxaca poseen un potencial económico, porque son comercializados en mercados locales y regionales, además pueden ser comercializados en mercados internacionales. Los hongos comestibles recolectados proporcionan nutrimentos esenciales, así como, vitaminas y minerales para la dieta alimenticia de los seres humanos. Además, tienen un potencial medicinal en el uso terapéutico de diversas enfermedades humanas. Las especies recolectadas tienen un potencial biotecnológico en el uso de bioinoculantes de plantas forestales, porque se encuentran en grandes cantidades en los bosques de las comunidades rurales y se ha demostrado su utilización en México y otros países. Los hongos comestibles silvestre recolectados en mercados de Oaxaca son un recurso forestal no maderable que puede ser utilizados íntegramente en modelos de desarrollo sustentable en las comunidades rurales forestales del estado de Oaxaca.

#### **4.7 BIBLIOGRAFÍA**

- Arteaga, M. B. y Moreno, Z. C. 2006. Los hongos comestibles silvestres de Santa Catarina del Monte, estado de México. *Revista Chapingo. Serie Ciencia Forestal y Medio Ambiente* 12: 125-131.
- Barros, L.; Cruz, T.; Baptista, P.; Estevinho, L. M. and Ferreira, I. C. F .R. 2008. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food. Chem. Tox.* 46: 2742-2747.
- Boa, E. 2004. Los hongos silvestres comestibles. *Perspectiva global de su uso e importancia para la población*, No. 17. FAO, Roma. 161p.

- Carrasco-Hernández, V.; Pérez-Moreno, J.; Espinosa-Hernández, V.; Almaraz-Suárez, J. J.; Quintero-Lizaola, R. y Torres-Aquino, M. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1: 567-577.
- Carrera-Nieva, A. y López-Ríos, G. P. 2004. Manejo y evaluación de ectomicorrizas en especies forestales. *Universidad Autónoma de Chapingo* 10: 93-98.
- Caglarlrmak, N.; Unal, K. and Otles, S. 2002. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the black sea region of Turkey. *Micol. Apl. Int.* 14: 1-5.
- Chanona-Gómez, F.; H. Andrade-Gallegos, R.; Castellanos-Albores, J. y Sánchez, J. E. 2007. Macromicetos del parque educativo Laguna Bélgica, municipio de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78: 369-381.
- Colak, A.; Faiz, Ö. and Sesli, E. 2009. Nutritional composition of some wild edible mushrooms. *Turk. J. Biochem.* 34: 25-31.
- Danell, E. 1994. Formation and growth of the ectomycorrhiza of *Cantharellus cibarius*. *Mycorrhiza* 5: 89-97.
- Defaye, J.; Kohlmunzer, S.; Sodzawiczny, K. and Wong, E. 1988. Structure of an antitumor, water-soluble D-glucan from the carpophores of *Tylopilus felleus*. *Carbohydrate Research*. 173: 316-323.
- Ebina, T.; Kubota, T.; Ogamo, N. and Matsunaga, K. 2002. Antitumor Effect of a Peptide-Glucan Preparation Extracted from a Mycelium of *Tricholoma Matsutake* (S. Ito and Imai) Sing. *Biotherapy* 16: 255-259.
- Elmastas, M.; Isildak, O.; Turkekul, I. and Temur, N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 337-345.

- Flores, M. A. y Manzanero, M. G. 1999. Los tipos de vegetación del estado de Oaxaca. *In*: M. A. Vásquez-Dávila (ed.). Vegetación y Flora. Serie Sociedad y Naturaleza en Oaxaca 3. ITAO y Carteles editores, México. pp: 17-40.
- Garibay-Orijel, R.; Cordova, J.; Cifuentes, J.; Valenzuela, R.; Estrada-Torres, A. and Kong, A. 2009. Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for indigenous community forests. *For. Eco. Man.* 258: 122-131.
- Garibay-Orijel, R.; Cifuentes, J.; Estrada-Torres, A. and Caballero, J. 2006. People using macro-fungal diversity in Oaxaca, Mexico. *Fungal Diversity* 21: 41-67.
- Garza, O. F.; García J. J.; Estrada, C. E. y Villalón, M. H. 2002. Macromicetos, ectomicorrizas y cultivos de *Pinus culminicola* en Nuevo León. *Ciencia UANL* 4: 203-210.
- Guzmán, G. 2008a. Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10: 209-217.
- Guzmán, G. 2008b. Hallucinogenic Mushrooms in Mexico: An Overview. *Economic Botany* 62: 404-412.
- Heleno, S. A.; Barros, L.; Sousa, M. J.; Martins, A. and Ferreira, I. C.F.R. 2009. Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal* 93: 195-199.
- Ikekawa, T.; Uehara, N. and Maeda, Y. 1969. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research* 29: 734-735.
- Landeros, F.; Castillo, J.; Guzmán, G. y J. Cifuentes. 2006. Los hongos (macromicetos) conocidos en el Cerro el Zamorano (Querétaro-Guanajuato), México. *Revista Mexicana de Micología* 22: 25-31.

- Largent, D. L. 1973. How identify mushrooms to genus. I: Macroscopic Features. Mad River press In. Eureka, California. 86 p.
- Largent, D. L.; Jonson, D. and Watling, R. 1977. How identify mushrooms to genus. III: Macroscopic Features. Mad River press Inc. Eureka, California. 148 p.
- Liu, P. G.; Yu, F. Q.; Wang, X. H.; Zheng, H. D.; Chen, J.; Chen, J. Y.; Tian, X. F.; Xie, X. D.; Shi, X. F. and Deng, X. J. 2009. The cultivation of *Lactarius volemus* in China. Acta Botanica Yunnanica 16: 15-16.
- Liu, G.; Wang, H.; Zhou, B.; Guo, X. and Hu, X. 2010. Compositional analysis and nutritional studies of *Tricholoma matsutake* collected from Southwest China. J. Med. Plant. Res.4: 1222-1227.
- Mendoza-Díaz, M. M.; Zavala- Chávez, F. y Estrada-Martínez, E. 2006. Hongos asociados con encinos en la porción Noroeste de la Sierra de Pachuca, Hidalgo. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 12: 13-18.
- Mosha, T. C. and Gaga, H. E. 1999. Nutritive value and effect of blanching on the trypsin and chymotrypsin inhibitor activities of selected leafy Vegetables. Plant Foods for Human Nutrition 54: 271-283.
- Mosha, T. C. E.; Laswai, H. S. and Tetens, I. 2000. Nutritional composition and micronutrient status of home made and commercial weaning foods consumed in Tanzania. Plant Foods for Human Nutrition 55: 187-205.
- Murcia, M. A.; Martínez-Tomé, M.; Jiménez, A. M.; Vera, A. M.; Honrubia, M. and Parras, P. 2002. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. J. Food. Prot. **65**: 1614-1622.
- Nava, M. R. y Valenzuela G. R. 1997. Los macromicetos de la sierra de Nanchititlan. Polibotánica 5: 21-36.

- Ouzouni, P.; Petridis, K. D; Koller, W. D. and Riganakos, K. A. 2009. Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry* 115: 1575-1580.
- Pera, J.; Álvarez, I.F. y Parladé, J. 1998. Eficacia del inoculo miceliar de 17 especies de hongos ectomicorrizicos para la micorrizacion controlada de: *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* y *Pseudotsuga menziesii*, en contenedor. *Invest. Agr.: Sist. Recur. For.* 7: 139-153.
- Perea-Estrada, V. M.; Pérez-Moreno, J.; Villarreal, R. L.; Trinidad, S. A.; Bauer, I. M. L.; Cetina, A. V. M. y Tijerina, C. L. 2009. Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32: 93-109.
- Pérez-Moreno, J.; Martínez-Reyes, M.; Yescas-Pérez, A.; Delgado-Alvarado, A. and Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Economic Botany* 62: 425-436.
- Pérez-Moreno, J.; Lorenzana-Fernández, A.; Carrasco-Hernández, V. y Yescas-Pérez, A. 2010. Los hongos comestibles silvestres del parque nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACYT. Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico. 167p.
- Pilz, D. and Molina, R. 2002. Commercial harvests of edible mushrooms from the forests of the Pacific Northwest United States: issues, management, and monitoring for sustainability. *Forest Ecology and Management* 155: 3-16.
- Queiros, B; Barreira, J. C. M.; Sarmiento, A. C. and Ferreira, I. C. F. R. 2009. In search of synergistic effects in antioxidant capacity of combined edible mushrooms. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 60: 160-172.

- Ramírez-Anguiano, A. C.; Santoyo, S.; Reglero, G. and Soler-Rivas, C. 2007. Radical scavenging activities, endogenous oxidative enzymes and total phenols in edible mushrooms commonly consumed in Europe. *J. Sci. Food. Agric.* 87: 2272-2278.
- Rinaldi, A. C.; Comandini, O. and Kuyper, T. W. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity: separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33: 1-45.
- Ruan-Soto, F.; Garibay-Orijel, R. y Cifuentes, J. 2004. Conocimiento micológico tradicional en la planicie costera del Golfo de México. *Rev. Mex. Mic.* 19: 57-70.
- Sasata, R. 2011. Medicinal mushrooms. (healing-mushrooms.net). (citado: 15 de enero 2011).
- Takahashi, A.; Endo, T. and Nozoe, S. 1992. Repandiol, a new cytotoxic diepoxide from the mushrooms *Hydnum repandum* and *H. repandum* var. album. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 3181-3184.
- Tateishi, T.; Yokoyama, K.; Kohno, N.; Okabe, H. and Marumoto, T. 2003. Estimation of mycorrhizal colonization of the roots of oak seedlings inoculated with an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria amethystea*. *Soil. Sci. Plant. Nutr.* 49: 641-645.
- Torres, C. T. 2004. Tipos de vegetación. *In: Biodiversidad de Oaxaca.* García, M. A., M. J. Ordoñez, M. Briones S. (eds.). Instituto de Biología. UNAM, fondo Oaxaqueño para la conservación de la Naturaleza. World Wildlife Fund. México. pp: 105-117.
- Villarruel, O. J. L. y Cifuentes, B. J. 2007. Macromicetos de la cuenca del río de Magdalena y zonas adyacentes, delegación Magdalena contreras, México, D.F. *Revista Mexicana de Micología* 25: 59-68.
- Yamac, M. and Bilgili, F. 2006. Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelial cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceutical Biology* 44: 660-667.

- Yu-Cheng, D.; Zhu-Liang, Y.; Bao-Kai, C.; Chang-Jun, Y. and Li-Wei, Z. 2009. Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (Riew). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 11: 287-302.
- Yun, W. and Hall, I. R. 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Can. J. Bot.* 82: 1063-1073.
- Zamora-Martínez, M. C. and Nieto de Pascual-Paola, C. 2004. Studies of *Tricholoma magnivelare* in Mexico. *Micol. Apl. Int.* 6: 13-23.

## CAPITULO V

### CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE DIFERENTES ESTADIOS FENOLÓGICOS DE LA ECTOMICORRIZA SINTETIZADA ENTRE *Laccaria proxima* Y *Pinus pseudostrabus* Y SU DINÁMICA DE COLONIZACIÓN

#### 5.1 RESUMEN

Algunos hongos comestibles silvestres establecen simbiosis con especies forestales formando estructuras ectomicorrízicas características de cada especie de hongo y su simbiote forestal. En el presente estudio se sintetizó y se evaluó el desarrollo ontogénico de la ectomicorriza entre el hongo ectomicorrízico comestible *Laccaria proxima* y la especie forestal *Pinus pseudostrabus*. Se utilizaron esporomas deshidratados y molidos de *L. proxima* para la inoculación con esporas en *P. pseudostrabus*. Tres meses después de la inoculación, se inició la evaluación y caracterización ectomicorrízica cada 30 días durante ocho meses, además se determinó el porcentaje de micorrización y se evaluó la biomasa vegetal, la altura de las plantas, diámetro del tallo, peso seco de la raíz, y la parte aérea, se contabilizó el número de acículas y fascículos. Adicionalmente, con la ayuda de un microscopio estereoscópico y un microscopio óptico se tomaron fotografías de algunas características anatómicas como: color y forma de la ectomicorriza; micelio externo; manto fúngico; y red de Hartig. Once meses después de la inoculación, las plantas alcanzaron 65% de micorrización y un total de 2570 raíces cortas. Mientras que la biomasa fue de 1.2 g de peso seco de la parte aérea, 1.57 g de peso seco de la raíz, 21 cm de altura, 3.18 mm de diámetro del tallo. Se encontró que las ectomicorrizas adultas (estadio 3) tuvieron ramificaciones de primer orden, color café en la base y blanco-anaranjado en la punta, de 2-6 mm de longitud y 0.3 mm de diámetro. La presencia de hifas emanantes fue baja, ya que el tipo de hifas es de alcance corto. El reconocimiento detallado de la ectomicorriza es una alternativa que ayudará a los investigadores a realizar estudios posteriores, relacionados con la inoculación y utilización de biotecnologías de *Laccaria proxima* en especies de importancia forestales.

**Palabras clave:** micorrización, micelio externo, ontogenia, morfotipo, pinos mexicanos.

## 5.2 ABSTRACT

Some wild mushrooms establish symbiosis with ectomycorrhizal tree species forming structures of each species of mushroom and forest symbiont. In the present study was synthesized and evaluated the ontogenetic development of ectomycorrhiza between edible ectomycorrhizal *Laccaria proxima* and the forest species *Pinus pseudostrobus*. We used dried and ground esporomas *L. proxima* to the inoculation with spores of *P. pseudostrobus*. Three months after inoculation, began the evaluation and characterization ectomycorrhizal every 30 days for eight months, and determined the percentage of mycorrhization and evaluated plant biomass, plant height, stem diameter, root dry weight and the air was recorded the number of needles and fascicles. Additionally, with the help of a stereomicroscope and an optical microscope photographs were taken of some anatomical features such as color and shape of the ectomycorrhiza, external mycelium, fungal mantle, and Hartig net. Eleven months after inoculation, the plants reached 65% of mycorrhization and a total of 2570 short roots. While biomass was 1.2 g dry weight of aerial parts, 1.57 g of root dry weight, 21 cm in height, 3.18 mm diameter stem. We found that adult ectomycorrhizae (stage 3) were first order branches, brown at the base and white-orange on top, 2-6 mm long and 0.3 mm in diameter. The presence of emanating hyphae was low, since the type of hyphae is short range. The detailed survey of the ectomycorrhiza is an alternative that will help researchers to conduct further studies related to the inoculation and the use of biotechnologies *Laccaria proxima* important species in forestry.

**Keywords:** *mycorrhizae, external mycelium, ontogeny, morphotype, mexican pines.*

## 5.3 INTRODUCCIÓN

El género *Laccaria* spp. incluye especies comestibles en México como: *L. amethystina*, *L. laccata*, *L. bicolor* y *L. proxima*. Estas especies son consumidas en las comunidades rurales y son comercializadas en mercados regionales de la zona Centro y Sureste del país (Pérez-Moreno *et al.*, 2010; Garibay-Orijel *et al.*, 2009). Adicionalmente *Laccaria* spp. son hongos

ectomicorrízicos que establecen simbiosis con una diversidad de Gimnospermas y Angiospermas, dentro de las cuales destacan especies de pinos mexicanos como: *Pinus greegii*, *P. patula*, *P. culminicola*, *P. pringlei* y *P. pseudostrobus* (Carrera-Nieva y López-Ríos, 2004); Garza *et al.*, 2002; Carrasco-Hernández *et al.*, 2011). Además, este género tiene la capacidad de formar ectomicorrizas con especies pioneras forestales de sucesión primaria, ya que es una especie promiscua con alta capacidad de germinación esporal e infectividad de plantas (Ishida *et al.*, 2008; Hogberg *et al.*, 1999; Collie *et al.*, 2009).

Por ello, es importante el estudio de la simbiosis ectomicorrízica, porque contribuye a incrementar el desarrollo y salud de las plantas forestales, además participa en los ciclos de nutrientes y funcionamiento de los ecosistemas forestales (Read y Pérez-Moreno, 2003; Smith y Read, 2008). Para la asociación simbiótica ectomicorrízica es necesario la señalización mediante compuestos orgánicos producidas por ambos simbiosiontes (Kikuchi *et al.*, 2007). Estas señales originan cambios morfológicos y desarrollo de estructuras complejas y específicas, tanto en la planta como en el hongo (Martin *et al.*, 2001). Los cambios de la planta y el hongo se caracterizan por el desarrollo continuo de tres componentes estructurales: un manto o vaina de hifas que cubren la raíz corta; la red intrarradical de hifas, llamada red de Hartig; y un micelio extrarradical que se extiende a través del suelo (Taylor, 2005). Aunque, se conocen las tres estructuras que componen a la ectomicorriza, la información de las características morfológicas y anatómicas de los morfotipos de la gran mayoría de las especies mexicanas no han sido descritas (Carrasco-Hernández *et al.*, 2010). A pesar de que en la actualidad existen buenas bases de datos como la de Deemy (2011), es necesario identificar y describir la gran diversidad de morfotipos de hongos ectomicorrízicos de México, ya que cada especie tiene características específicas, pero existen pequeñas modificaciones morfológicas y anatómicas para cada morfotipo en condiciones

de campo o invernadero (Agerer y Rambold, 2011). En función de este escenario, el objetivo de este capítulo fue sintetizar ectomicorrizas entre el hongo ectomicorrízico comestible *L. proxima* y la especie forestal *P. pseudostrobus*, así como evaluar su desarrollo ontogénico morfológico y anatómico y los cambios en términos de colonización micorrízica y su efecto en el crecimiento de las plantas.

## **5.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.4.1 Identificación y descripción de *Laccaria proxima***

*L. proxima* fue colectada en el mercado de Ozumba (Figura 5.1 a), se clasificó e identificó de acuerdo a las principales características macro y microscópicas especificadas por Largent (1973) y Largent *et al.*, (1977).

### **5.4.2 Preparación del inoculante ectomicorrízico**

Una vez colectados los especímenes de *L. proxima*, se separó el estúpido del píleo y se utilizó únicamente el píleo, ya que es donde se encuentran concentradas las esporas (Figura 5.1 b). Los píleos se deshidrataron en la sombra a temperatura ambiente hasta alcanzar peso contante. Posteriormente, los píleos se molieron y el inoculo obtenido se depositó en microtubos Eppendorf con capacidad de 1.5 mL a una temperatura de 5 °C (Figura 5.1 d). A cada planta se le inóculo de  $10^6$  a  $10^8$  esporas aproximadamente (Carrasco-Hernández *et al.*, 2010).

### **5.4.3 Desinfección de la semilla y tubetes**

Las semillas de *P. pseudostrobis* se remojaron en agua durante 24 h como tratamiento pre-germinativo, después se desinfectaron con peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) al 30%, manteniendo las semillas en agitación durante 20 minutos. Posteriormente, se enjuagó con abundante agua destilada-esterilizada hasta eliminar la presencia del  $H_2O_2$ . Los tubetes de 140 mL se lavaron y desinfectaron con alcohol previo a su llenado con el sustrato.

### **5.4.4 Germinación de las semillas**

La germinación de semillas se realizó en noviembre de 2009. El sustrato utilizado para la germinación de *P. pseudostrobis* fue peat moss, el cual se depositó en costales de manta para su esterilización en autoclave con vapor de agua durante 2 h en dos sesiones. Los riegos para la germinación fueron cada tres días con agua destilada-esteril aplicando Captan  $2g L^{-1}$  para evitar enfermedades por hongos patógenos. Las plántulas germinaron 15 días después de la siembra.

### **5.4.5 Trasplante e inoculación**

Las plantas fueron trasplantadas en febrero de 2010 en tubetes con capacidad de 370 mL, estos fueron llenados con el sustrato hasta un 80% del total del volumen (Figura 5.1 e). El sustrato utilizado para el crecimiento de las plántulas fue una mezcla arena-corteza-suelo en proporción 2:2:1, el cual también fue esterilizado. Tres meses después de la inoculación (mayo de 2010) se realizó la primera evaluación, posteriormente las evaluaciones fueron cada mes durante ocho meses.

## **5.4.6 Variables evaluadas**

### **5.4.6.1 Colonización ectomicorrízica**

Una vez establecido el experimento y las plantas cumplieron los tres meses de haber sido inoculadas, las plantas se extrajeron del tubetes, se eliminó el sustrato adherido y se lavaron cuidadosamente. Posteriormente, se estudió a detalle la dinámica de colonización ectomicorrízica en raíces de *P. pseudostrobis* cada 30 días, utilizando tres plantas por sección en un periodo de ocho meses. Se contabilizó el número total de raíces cortas por planta, el número de raíces micorrizadas y no micorrizadas, el número de raíces vivas y muertas con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Se determinó el porcentaje de micorrización (número de raíces cortas ECM x 100/número total de raíces cortas).

### **5.4.6.2 Crecimiento vegetal**

Las plantas se extrajeron del tubete, se eliminó el sustrato adherido y se lavaron cuidadosamente. Se midió la altura desde la base del tallo hasta la yema apical (cm). El diámetro se midió en la base del tallo (mm). Después las plantas fueron colocadas en bolsas de papel y se secaron en una estufa a 70 °C hasta obtener peso constante y se evaluó la biomasa total. Se pesó la parte aérea (g) y la parte radical (g).

## **5.4.7 Análisis de variables**

El porcentaje de micorrización fue convertido a números reales por la siguiente formula: (% micorrización + 0.05)<sup>1/2</sup>, para realizar análisis estadístico (Alves *et al.*, 2010). El porcentaje de

micorrización y las variables de crecimiento fueron evaluadas mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ).

#### **5.4.8 Caracterización de la ectomicorriza**

Las raíces de las plantas fueron observadas detalladamente y después fotografiadas con la ayuda de un microscopio óptico (LEICA MD1000) y estereoscopio (LEICA EZ4) conectados a una cámara digital (LEICA DFC290) con ayuda de un software (XView). Se tomaron fotografías de las raíces jóvenes, adultas, senescentes y muertas para determinar el desarrollo de la micorriza. Las características macroscópicas fueron examinadas por el color, forma, tamaño, textura superficial del manto y micelio externo (Mukerji *et al.*, 2002). Se utilizó un microscopio óptico (Olympus VX51) conectado a una cámara digital (H100H) y un software para determinar medidas microscópicas de la ectomicorriza, tales como: diámetro del corte transversal de la ectomicorriza, células corticales, hifas emanantes y grosor del manto fúngico (Agerer, 2001, 2006; Agerer y Rambold, 2011).

### **5.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.5.1 Identificación y descripción de *Laccaria proxima***

El píleo acampanado o convexo, puede ser plano o levantado rara vez, umbilicado con escamas en el centro, color rojizo pardo y ocre cuando está seco, con un diámetro aproximado de 40-70 mm (Figura 5.1 b). Láminas libres de 15-30 mm de longitud y 5-10 mm de ancho, color rosáceo claro. Estípite cilíndrico de 30-70 mm de longitud y 5-9 mm de diámetro, presenta estrías pardas

rojizas. Esporas en formas elipsoide y cafés de 6-9 x 5-7 de diámetro, presenta ornamentación equinulada de espinas de 1-1.5  $\mu\text{m}$  longitud (Figura 5.1 c). En el cuadro 5.1, se compara las principales características distintivas de *L. proxima* con otros estudios previos.

**Cuadro 5.1.** Características distintivas de los esporomas de *Laccaria proxima*.

Estructura	Características	Especímenes utilizados	Mueller (1992)	Carrasco-Hernández <i>et al.</i> (2010)
Píleo	Forma	Acampanado y plano, umbilicado con escamas en el centro	Acampanado, llega a ser plano a levantado, algunas veces deprimido	Plano
	Color	Rojizo pardo	Rojizo a marrón	Vino
Estípites	Diámetro (mm)	40-70	anaranjado	20-60
	Forma	Cilíndrico	15-70	Cilíndrico
	Color	Rojizo pardo	Subclavado	Vino
Láminas	Diámetro (mm)	5-9	3-10	3.6-9.3
	Longitud (mm)	30-70	24-72	20-80
	Adheridas	Libres	Disantes o libres	Libres
Esporas	Color	Rosáceo claro	Rosáceo	Rosa
	Forma	Elipsoide	Elipsoide	Globosa
	Color	Café claro	-----	Café
	Longitud ( $\mu\text{m}$ )	6-9	7-9	-----
	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	5-7	6-8	5.2
	Ornamentación	Equinuladas	Equinulada	Nodulosa



**Figura 5.1.** Preparación del inoculo fúngico e inoculación de *Pinus pseudostrobus*. a) venta de hongos comestibles silvestres (Foto cortesía de la Dra. Martínez-Reyes Magdalena); b, c) esporomas y esporas de *Laccaria proxima*; d) inóculo fúngico (Foto cortesía de Biol. Cristina Heredia Acuña); e, f) trasplante e inoculación de *P. pseudostrobus*.

### 5.5.2 Colonización micorrízica

La colonización micorrízica de *Laccaria proxima* en raíces de *Pinus pseudostrobus* se observó durante el tercer mes después de haber sido inoculadas las plantas. Durante los seis primeros meses (tercera evaluación) después de la inoculación ectomicorrízica, las plantas produjeron 836 raíces cortas de las cuales 171 fueron micorrizadas y 660 no micorrizadas, alcanzando 20% de colonización ectomicorrízica (Cuadro 5.2). En contraste en otro estudio se determinó el 20% de colonización en *Quercus serrata* inoculada con *L. amethystina* 1 mes después de la inoculación (Teteishi *et al.*, 2003).

En el sexto mes de evaluación, el porcentaje de micorrización fue 56% con un total de 1172 raíces cortas. Mientras que el mes séptimo y octavo de evaluación alcanzó el 57% y 65%, con un total de 1605 y 2570 raíces cortas, respectivamente (Cuadro 5.2). Sin embargo, se ha determinado que en *P. pinaster* inoculada con micelio de *L. proxima* alcanzó el 32% de micorrización de seis meses después de la inoculación (Pera *et al.*, 1993). Mientras que Carrasco-Hernández *et al.* (2011), encontraron 70% y 89% de micorrización en *P. pseudostrobus* y *P. patula*, respectivamente después de 13 meses de la inoculación con esporas de *L. proxima*. La variación de la infección ectomicorrízica se debe posiblemente a la heterogeneidad del inoculo fúngico (Southworth *et al.*, 2009). Respecto al porcentaje de micorrización, se encontró diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) de la evaluación 1 hasta la evaluación 6. Mientras que en el número totales de raíces cortas existen diferencias significativas de la evaluación 1 hasta la evaluación 4 (Cuadro 5.2). Por ello, después de esta etapa se observó una homogeneidad en la colonización ectomicorrízica y un aumento considerable de raíces cortas. La muerte de raíces cortas micorrizadas y no micorrizadas no afecta el crecimiento de la planta, ya que en estas variables no presentas diferencias significativas ( $\alpha=0.05$ ) y estos valores fueron bajos (Cuadro 5.2).

**Cuadro 5.2.** Colonización ectomicorrízica de las raíces cortas de *Pinus pseudostrobus* inoculados con *Laccaria proxima*, evaluados mesualmente durante ocho meses.

Meses evaluados*	R. C. M. V.	R. C. M. M.	R. C. N. M. V.	R. C. N. M. M.	Total de raíces cortas	% micorrización
1	59.7 d	1.33 c	318.67 b	4.67 a	384.30 e	16.37 c
2	124.3 d	0.33 c	440.67 ab	23.67a	589.00 ed	17.33 c
3	171.7 cd	2.33 c	660.70 ab	1.67 a	836.30 cde	20.12 bc
4	284.3 cd	18.66 bc	596.00 ab	14.33 a	913.30 cd	31.74 abc
5	233.3 cd	16.33 bc	798.00 a	4.33 a	1052.00 cd	24.84 bc
6	650.7 bc	4.66 bc	514.00 ab	2.67a	1172.30 bc	56.41ab
7	922.0 b	25.76 ab	651.00 ab	6.00 a	1605.00 b	57.36
8	1623.7 a	44.00 a	878.00 a	6.00 a	2570.00 a	65.52

\*inicio de la evaluación tres meses después de la inoculación. Medias con la misma letra para cada categoría de raíz no son significativamente diferentes Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Donde R. C. M. V.: raíces cortas micorrizadas vivas; R. C. M. M.: raíces cortas micorrizadas muertas; R. C. N. M. V.: raíces cortas no micorrizadas vivas; y R. C. N. M. M: raíces cortas no micorrizadas muertas.

### 5.5.3 Crecimiento vegetal

La primera evaluación de la biomasa de *P. pseudostrobus* inoculada inoculado con *L. proxima* se realizó tres meses después de la inoculación, una vez que se observó la micorrización. Las plantas alcanzaron hasta la última evaluación 1.2 g de peso seco de la parte aérea, 1.57 g de peso seco de la raíz, 21 cm de altura, 3.18 mm de diámetro del tallo (Cuadro 5.3). Mientras que el número de acículas con 75 y fascículos con 14, estos valores variaron considerablemente en las plantas evaluadas (Cuadro 5.3). La biomasa de las plantas micorrizadas aumenta en promedio mensualmente 0.02 (g), 0.23 (g), 0.12 (cm) y 0.35 (mm) para peso seco de la parte aérea, peso seco de la raíz, altura de la planta y diámetro del tallo, respectivamente.

Se observaron diferencias significativas ( $\alpha= 0.05$ ) en el peso seco de la parte aérea de la primera evaluación hasta la cuarta, mientras que en el peso seco de la raíz se observaron diferencias de la primera evaluación hasta la tercera y del diámetro del tallo de la primera hasta la quinta evaluación (Cuadro 5.3). Respecto a la altura de la planta, número de acículas y fascículos no se observó diferencias significativas entre los meses de evaluación, posiblemente la heterogeneidad genética entre las plantas (Salazar *et al.*, 1999).

**Cuadro 5.3.** Biomasa mensual de plantas de *Pinus pseudostrobus* inoculadas con *Laccaria proxima*, durante ocho meses.

Mes de evaluación*	Peso seco parte aérea (g)	Peso seco raíz (g)	Altura (cm)	Diámetro (mm)	Nº de Acículas	Nº de Fascículos
1	0.11 d	0.42 c	14.83 a	1.46 c	28.33 a	7.33 a
2	0.26 cd	0.76 bc	18.00 a	1.97 bc	47.67 a	14.00 a
3	0.41 bcd	1.06 ab	19.33 a	2.16 bc	23.00 a	5.66 a
4	0.50 cb	1.18 ab	16.50 a	2.18 bc	75.00 a	14.00 a
5	0.58 cb	1.20 ab	19.73 a	2.43 ab	54.67 a	10.66 a
6	0.63 cb	1.23 ab	20.33 a	2.50 ab	37.67 a	9.66 a
7	0.71 b	1.36 ab	21.00 a	2.69 ab	15.00 a	5.00 a
8	1.20 a	1.57 a	21.00 a	3.18 a	47.67 a	9.66 a

\*inicio de la evaluación tres meses después de la inoculación. Medias con la misma letra, para cada variable no son significativamente diferentes según Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

#### 5.5.4 Caracterización morfológica y ontogenia de la ectomicorriza

La colonización y formación de la ectomicorriza de *L. proxima* y *P. pseudostrobus* fue visible con el microscopio estereoscópico tres meses después de la inoculación. Este criterio se tomó en cuenta considerando la intensidad de las hifas que cubren las raíces cortas (Teteishi *et al.*, 2009).

Esta caracterización se realizó cuando las primeras raíces cortas jóvenes se transformaron en ectomicorrízicas, como característica particular presentaban escasos pelos absorbentes (Figura 5.2 a). La transformación de la raíz corta joven a ectomicorriza se inicia con señales por medio de compuestos químicos producidos por ambos simbiosis (Kikuchi *et al.*, 2007).

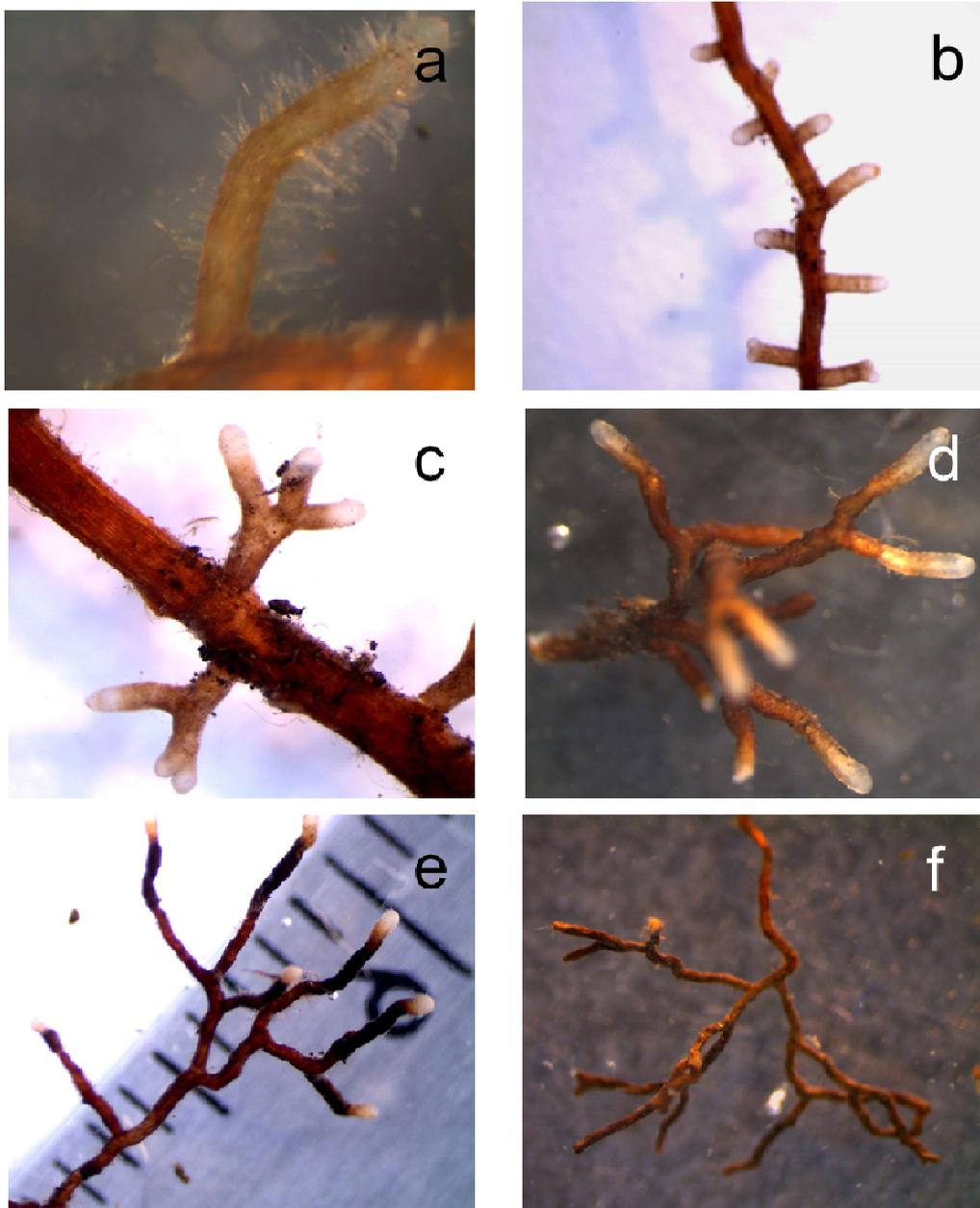
En nuestro sistema estudiado, la formación de la ectomicorriza empezó cuando la raíz presentaba pocos pelos absorbentes, y en este periodo las raíces cortas se transformaron a micorrizas jóvenes-inmaduras (estadio 1), las cuales presentaban una forma dicotómica y simple, color transparente, de 1-3 mm longitud, sin ramificación y la presencia de escaso a nulo micelio externo (Figura 5.2 b). Además, durante la primera evaluación se observaron micorrizas jóvenes-maduras (estadio 2) con formas dicotómicas y simples, color café-claro en la base y blanco transparente en la punta, de 2-4 mm de longitud, 0.1 mm de diámetro, con presencia de manto fúngico y escaso micelio externo (Figura 5.2 c). Durante la cuarta y quinta evaluación continuaron formándose ectomicorizas jóvenes-inmaduras y jóvenes-maduras. En esta etapa se observaron ectomicorizas adultas (estadio 3) formando ramificaciones de primer orden, color café en la base y blanco-anaranjando en la punta, de 2-6 mm de longitud y 0.3 mm de diámetro (Figura 5.2 d). La presencia de hifas emanantes fue escasa, ya que el tipo de hifas es de distancia corta. En previos estudios realizados se encontró que la ectomicorriza adulta formada por *Laccaria proxima* y *Pinus* spp. fue similar en el tamaño, la forma, y el color con respecto a lo encontrado en el presente trabajo (Cuadro 5.4).

**Cuadro 5.4.** Características morfológicas de las raíces cortas de micorrizadas con *Laccaria proxima*.

Característica	Especies forestales		
	<i>Pinus pseudostrobus</i>	<i>Pinus patula</i>	<i>Pinus</i> spp.
	Caso estudiado	(Carrasco-Hernández <i>et al.</i> , 2010)	(Agerer y Rambold, 2011)
Longitud (mm)	1-9	1-8	1-8
Diámetro (mm)	0.2-0.4	0.2	0.6
Proporción de longitud (base: ápice)	Mayor la base que el ápice	Mayor la base que el ápice	SD
Tipo de ramificación	Dicotómicas y en pocos casos simples	Dicotómicas	Dicotómicas
Orden de ramificación	Segundo	SD	Primero
Forma de las puntas no ramificadas	Sinuosa o inclinadas	Sinuosa o inclinadas	Sinuosa o inclinadas
Textura del manto	Liso o ligeramente algodonoso	Liso	Liso o ligermente algodonoso
Color del ápice (estadio juvenil)	Café claro	Café claro	Café blanco
Color del ápice (estadio maduro)	Café-oscuro	Café claro y la base del apice oscuro	Café, naranja, gris
Anatomía de la capa externa del manto	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso
Anatomía de la capa interna del manto	Plectenquimatoso	SD	Plectenquimatoso
Hifas emanantes	Presentes	Presentes	Presentes
Tipo de exploración	Distancia corta	SD	Distancia corta
Diámetro de las hifas (µm)	2-2.5	SD	2.5-5

En la sexta evaluación continuaba la formación de ectomicorrizas jóvenes-inmaduras, jóvenes-maduras y adultas. En esta etapa se observó la presencia de micorrizas senescentes (estadio 4) con ramificaciones de primero y segundo orden, color café-negro con puntas blancas, 3-9 mm de longitud y 0.2-0.4 mm de diámetro, cabe mencionar que la mayoría de micorrizas senescentes presentaban estas características, sin embargo pueden ser similares a las adultas solo cambia el color café-negro (Figura 5.2 e). El proceso de formación de la ectomicorriza que incluye la pérdida de los pelos radicales, recubrimiento de la raíz por las hifas emanantes, formación del

manto y penetración de la red de Hartig, es considerado como la ontogenia de la ectomicorriza, el cual también fue observado en *Quercus serrata* y *Q. glauca* con *L. amethystina* 5 meses después de la inoculación (Teteishi *et al.*, 2003).

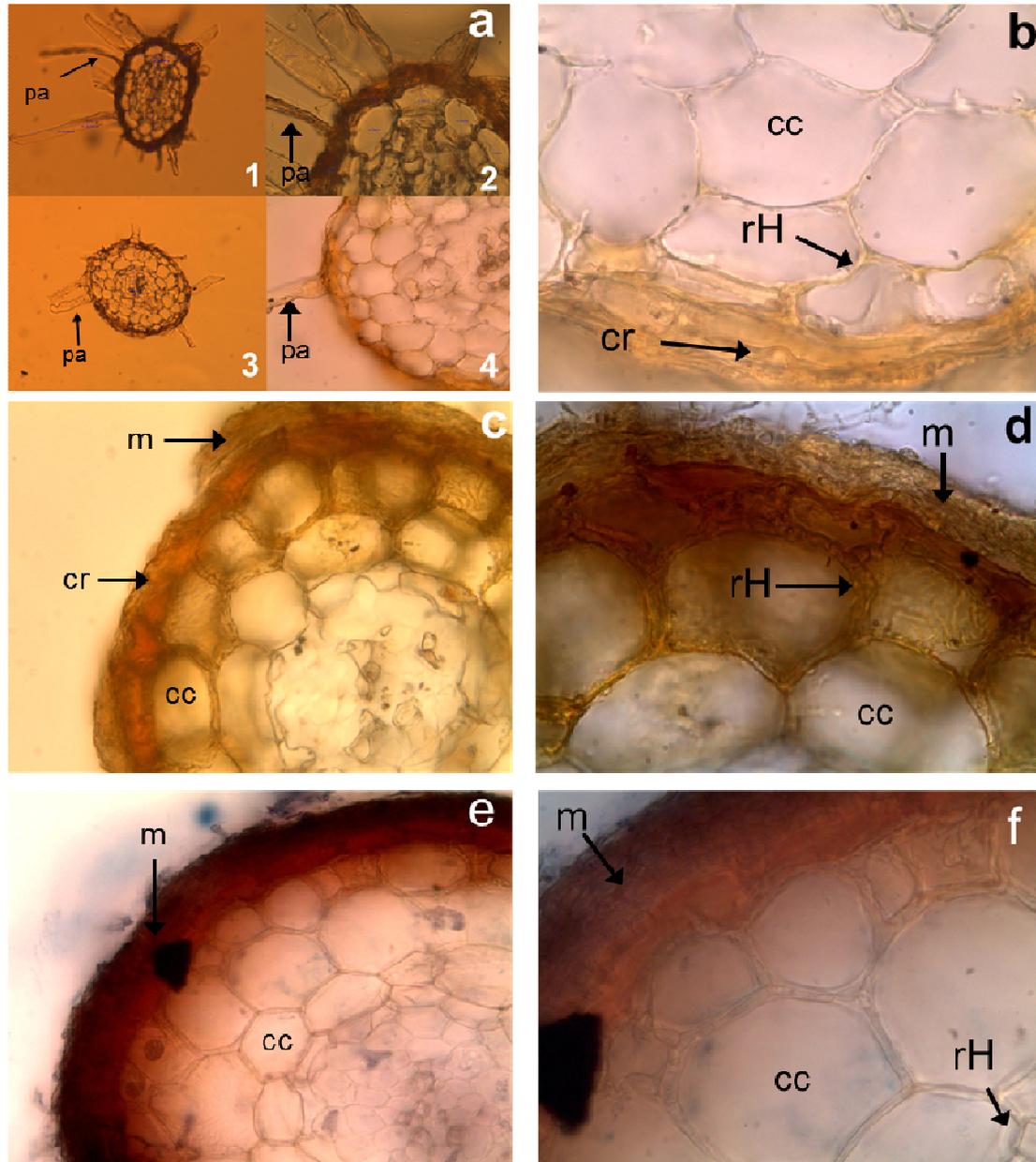


**Figura 5.2.** Desarrollo ontogénico de la ectomicorriza de *Laccaria proxima* con *Pinus pseudostrobus*: a) raíz corta con pelos absorbentes; b) estadio 1, ectomicorriza joven-inmadura; c) estadio 2, ectomicorriza joven-madura; d) estadio 3, ectomicorriza adulta; e) estadio 4, ectomicorriza senescente; f) estadio 5, ectomicorriza muerta.

#### 5.5.4.1 Formación del manto y red de Hartig

La formación de las micorrizas inicia con la pérdida de los pelos absorbentes en las raíces cortas secundarias jóvenes. Los pelos radicales son sustituidos por las hifas del hongo ectomicorrízico para penetrar los espacios intercelulares de las primeras células corticales e iniciar con la formación del manto fúngico (Figura 5.3 a, b). Wong *et al.* (1990), observaron que 5 días después de inocular *L. bicolor* en *P. banksiana* las hifas penetraban entre los espacios de las células de la raíz, mientras que a los 14 días después de la inoculación ya se podían observar las hifas empaquetadas formando el manto. En contraste, la formación de hifas en raíces laterales de *P. sylvestris* con *L. bicolor* se observó 15 días después de haber sido inoculadas, pero la penetración intracelular (formación de red de Hartig) se observó por primera vez después de 30 días (Heller *et al.*, 2008).

Conforme avanza la edad de la ectomicorriza a un estado adulto las hifas de la red de Hartig penetran claramente hasta las segundas células corticales y el grosor del manto es visible considerablemente (Figura 5.3 c, d). Cuando las micorrizas están en estado senescente, las hifas de la red de Harting penetran hasta la tercera y cuarta capa de células corticales y el manto fúngico se conforma de 4-6 capas (Figura 5.3 e, f). Como características sobresalientes de las micorrizas senescentes, la red de Hartig que se encuentra entre los espacios intercelulares es gruesa ocupando un espacio de 5-8  $\mu\text{m}$  de ancho entre las dos primeras células corticales (grandes de 42  $\mu\text{m}$  de diámetro), mientras que en la tercera y cuarta capas de células corticales (pequeñas 28  $\mu\text{m}$  de diámetros) la red de Hartig es delgado con un espacio de 2-5  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 5.3 c, d).

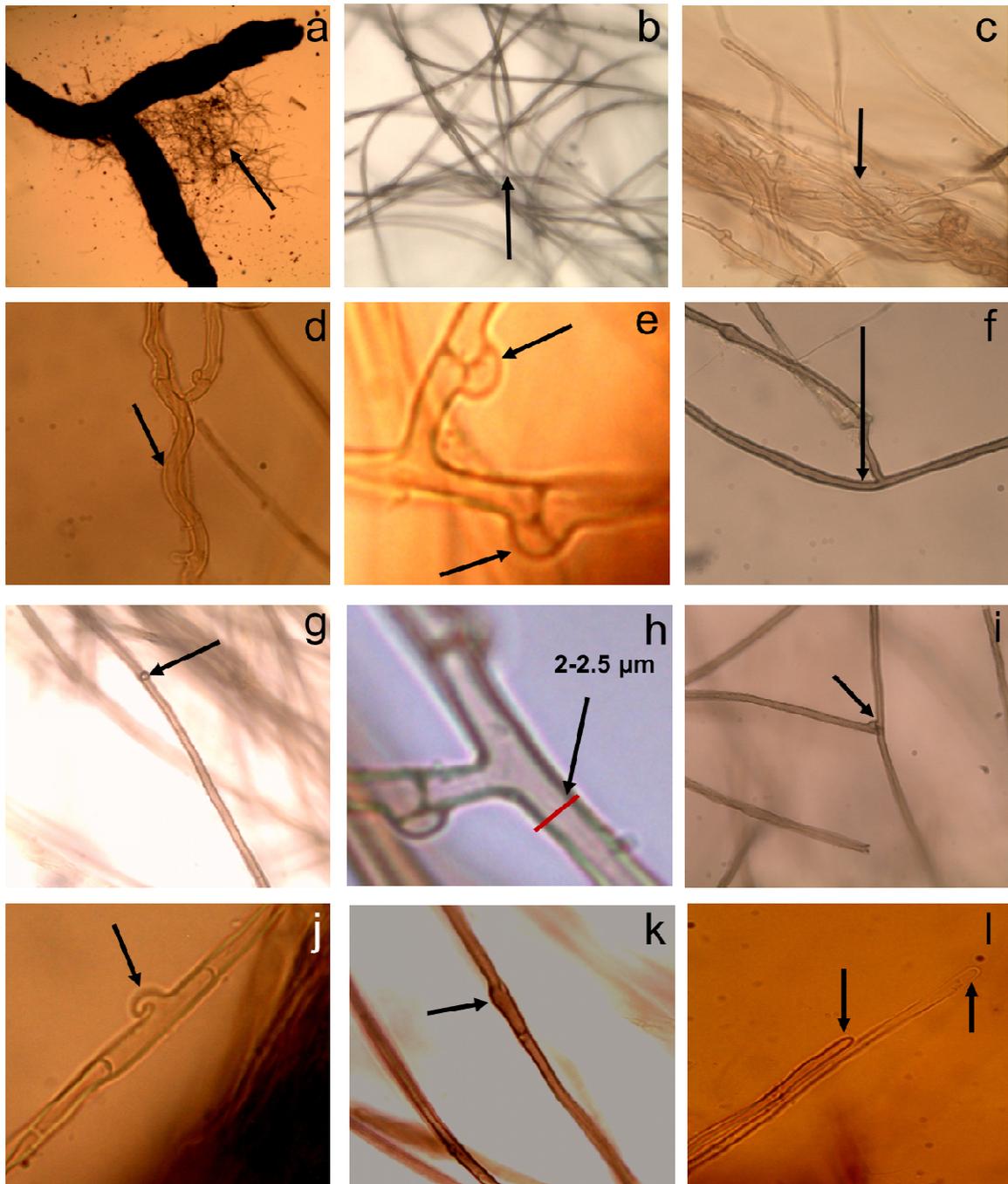


**Figura 5.3.** Ontogenia de la penetración de la red de Hartig entre los espacios intracelulares de las células corticales de la raíz ectomicorrizada de *Laccaria proxima* con *Pinus pseudostrobus* (corte transversal de la ectomicorriza): a 1, 2) raíz joven con pelos absorbentes (a 1: 10x; a 2: 40x); a 3, 4) pérdida de los pelos absorbentes (a 3: 10x; a 4: 40x); b) penetración de la red de Hartig e inicio de la micorrización (100x); c) ectomicorriza adulta vista en 40x, la red de Hartig penetra hasta la segunda capa de células corticales; d) vista en 100x de la red de Hartig en ectomicorriza adulta; e) ectomicorriza senescente vista en 40x, la red de Hartig penetra hasta la tercera y cuarta capa de células corticales; f) vista en 100x de la red de Hartig en ectomicorriza senescente. Pelos absorbentes (pa); corteza de la raíz (cr); manto (m); células corticales (cc); y red de Hartig (rH).

#### 5.5.4.2 Hifas emanantes

El micelio externo o hifas emanantes que forma la micorriza establecida entre *L. proxima* y *P. pseudostrobilus* son considerados de distancia corta en estado natural de acuerdo con Agerer (2001), en el sistema estudiado, el micelio externo no se observa a simple vista y alcanza una distancia aproximada de 1-10 mm de la corteza de la raíz (manto fúngico) extendido hacia la solución del suelo (Figura 5.4 a). La coloración que presenta el micelio externo es de color café-grisáceo y se tiñe con el azul de algodón cuando la micorriza está en un estadio joven (Figura 5.4 b).

Anatomía de hifas emanantes: el sistema micelial tiene hifas primarias en forma tuertuosa u onduladas cuando emanan del manto fúngico (Figura 5.4 c, d). Las hifas emanantes presentan septos en forma de abrazadera conocidas como fíbulas, sin presencia de un orificio (Figura 5.4 e). El sistema hifal presenta ramificaciones secundarias (hifas secundarias), que forman un ángulo de 90° aproximadamente (Figura 5.4 f, i). La distancia entre septos es variado y el diámetro de las hifas es de 2 a 2.5  $\mu\text{m}$  (Figura 5.4 h). Su forma de ramificación es con una rama lateral y forma septos, presenta abrazaderas (forma de agujeros) entre los septos o tabiques (Figura 5.4 f, g). Además, se observaron protuberancias infrecuentemente en septos secundarios de las hifas emanantes en forma de ganchos y codos con distribución no específica (Figura 5.4 j, k). La forma terminal de las hifas emanantes secundarias es simple (Figura 5.4 l). Sin presencia de rizomorfos solo emana hifas enrolladas que se desvanecen en distancia corta.

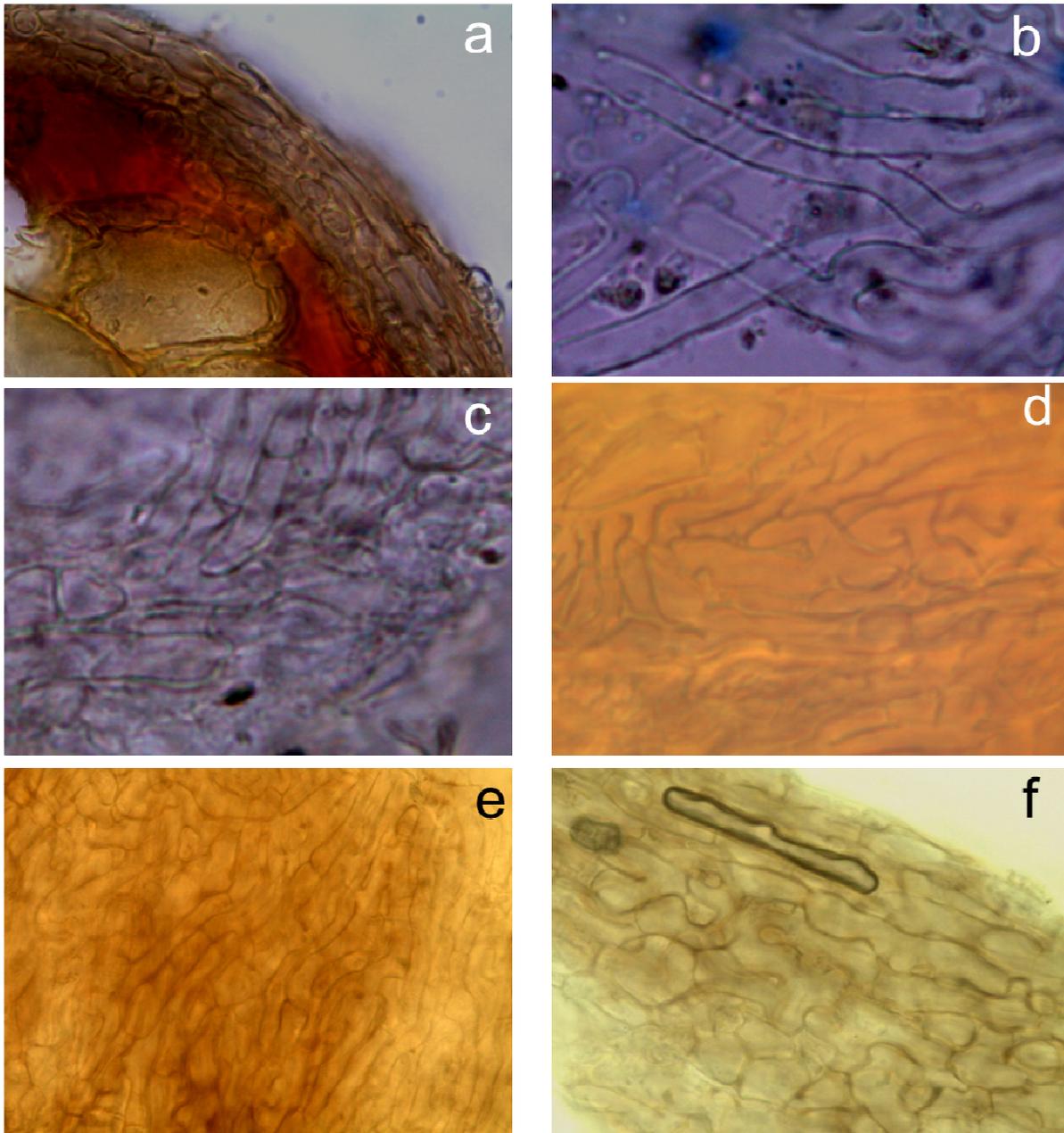


**Figura 5.4.** Anatomía y caracterización de hifas emanantes de la ectomicorriza de *Laccaria proxima* con *Pinus pseudostrobus*: a) vista del micelio externo o hifas emanantes (10x) ; b) micelio externo vista 40x; c) hifas unidas al manto fúngico (hifas primarias); d) hifas curvadas; e) fíbulas; f) hifas secundarias; g) poros en la hifa; h) diámetro de la hifa; i) ramificaciones de las hifas; j) ganchos; k) codos; y l) puna de la hifa con terminación simple. Las figuras de las letras c-l, fueron observadas en 100x.

La anatomía y las características de las hifas emanantes de la ectomicorriza de *L. proxima* y *P. pseudostrobus* coinciden con lo reportado por Agerer y Rambold (2011), para *L. proxima* y *Pinus* sp. Además, las ramificaciones del micelio, diámetro de la hifa, septos, fíbulas presentes en algunos tabiques y ramas de hifas laterales de *L. proxima* es parecido a *L. montana* con *Picea engelmannii* y *Abies lasiocarpa* (Kernaghan, 2001). Esto indica que las características microscópicas de las hifas emanantes de las especies de hongos ectomicorrízicos no se modifican, al menos cuando forman la micorriza con diferentes especies del género *Pinus*.

#### **5.5.4.3 Manto fúngico**

La ectomicorriza de *L. proxima* y *P. pseudostrobus* presentaron manto ligeramente algodonoso y no transparente con escasas hifas emanantes presentes. La anatomía de la parte exterior del manto presentó arreglo plectenquimantoso (células alargadas), con hifas irregulares indiferenciadas, células cilíndricas y no restringidas por los septos, el manto externo es el inicio de la formación de las capas del manto cuando la ectomicorriza es joven (Figura 5.5 b). Cuando se inicia la formación del manto, las hifas se van compactando para formar el manto medio y manto interno (Figura 5.5 c). El manto interno y manto medio son plectenquimantosos puede confundirse con el arreglo pseudoplectenquimantoso (células globosas) (Figura 5.5 d, e). La ectomicorriza en estadio adulta presentó de 3-5 capas y de 5-7 capas en estadio senescente (Figura 5.5 a). Se ha registrado que en *Laccaria* sp. el manto fúngico es plectenquimantoso y presenta de 5-7 capas (Agerer y Rambold, 2011; Kaldorf *et al.*, 2004).



**Figura 5.5.** Manto fúngico de *Laccaria proxima* con *Pinus pseudostrobus*: a) vista del manto externo con formación de capas; b) manto externo con arreglo plectenquimantoso; c) compactación de manto externo; d) capa media del manto fúngico con arreglo plectenquimantoso; e) manto interno plectenquimantoso cercano a la corteza de la raíz; f) manto interno plectenquimantoso parecido al pseudoplectenquimantoso. Imágenes tomadas en 100x.

## 5.6 CONCLUSIÓN

Las características morfológicas y anatómicas externas como color, forma y tamaño de la ectomicorriza *Laccaria proxima* y *Pinus pseudostrabus* se modifica ligeramente de acuerdo al estado fenológico de las raíces cortas, así como la penetración de la red de Hartig avanza de acuerdo al estadio de la micorriza. Mientras que las características microscópicas del micelio y arreglo del manto de la ectomicorriza no sufre modificaciones. El reconocimiento detallado de la ectomicorrizas es una alternativa que contribuye a estudios biotecnológicos relacionados con la inoculación con *L. proxima* en especies forestales debido a que brinda una herramienta para reconocer las características de las ectomicorrizas de este hongo. Además, reconocer la etapa de la planta donde alcanza el mayor porcentaje de micorrización es necesario para tomar decisiones en la producción de plantas de buena calidad en invernaderos y reducir costos de producción. Por lo tanto, para la caracterización de morfotipos de especies forestales ectomicorrízicas de México, se deben describir detalladamente la morfología y la anatomía para cada una de las especies estudiadas.

## 5.7 BIBLIOGRAFÍA

- Agerer, R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11: 107-114.
- Agerer, R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Progress* 5: 67-107.
- Agerer, R. and Rambold, G. 2011. DEEMY : An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. [www.deemy.de](http://www.deemy.de). (citado en enero de 2011).

- Alves, L.; Oliveira, V. L. and Germano N. S. F. 2010. Utilization of rocks and ectomycorrhizal fungi to promote growth of eucalypt. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 676-684.
- Carrasco-Hernández, V.; Pérez-Moreno, J.; Espinosa-Hernández, V.; Almaraz-Suárez, J. J.; Quintero-Lizaola, R. y Torres-Aquino, M. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1: 567-577.
- Carrasco-Hernández, V.; Pérez-Moreno, J.; Espinosa-Hernández, V.; Almaraz-Suárez, J. J.; Quintero-Lizaola, R. y Torres-Aquino, M. 2011. Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural* 84: 83-96.
- Collier, F. A. and Bidartondo, M. I. 2009. Waiting for fungi: the ectomycorrhizal invasion of lowland heathlands. *Journal of Ecology* 97: 950–963.
- Garibay-Orijel, R.; Cordova, J.; Cifuentes, J.; Valenzuela, R.; Estrada-Torres, A. and Kong. A. 2009. Integrating wild mushrooms use into a model of sustainable management for indigenous community forests. *For. Eco. Man.* 258: 122–131.
- Heller, G.; Adomas, A.; Li, G.; Osborne, J.; Zyl, L.; Sederoff, R.; Finlay, R. D.; Stenlid, J. and Asiegbu, F. O. 2008. Transcriptional analysis of *Pinus sylvestris* roots challenged with the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. *BMC Plant Biology* 8: 1-13.
- Hogberg, P.; Plamboeck, A. H.; Taylor, A. F. S. y Fransson, P. M. A. 1999. Natural  $\delta^{13}C$  abundance reveals trophic status of fungi and host-origin of carbon in mycorrhizal fungi in mixed forests. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 8534-8539.

- Ishida, T. A.; Nara, K.; Tanaka, M.; Kinoshita, A. and Hogetsu, T. 2008. Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist* 180: 491–500.
- Tateishi, T.; Yokoyama, K.; Kohno, N.; Okabe, H. and Marumoto, T. 2003. Estimation of mycorrhiza colonization of the roots of oak seedling inoculated with an ectomycorrhizal fungus *Laccaria amethystae*. *Soil Sci. Plant Nutr.*: 49: 641-645.
- Kernaghan, G. 2001. Ectomycorrhizal fungi at tree line in the Canadian Rockies II. Identification of ectomycorrhizae by anatomy and PCR. *Mycorrhiza* 10: 217-229.
- Kikuchi, K.; Matsushita, N.; Suzuki, K. and Hogetsu, T. 2007. Flavonoids induce germination of basidiospores of the ectomycorrhizal fungus *Suillus bovinus*. *Mycorrhiza* 17:563-570.
- Largent, D. L. 1973. How identify mushrooms to genus. I: Macroscopic Features. Mad River press Inc. Eureka, California. 86 p.
- Largent, D. L.; Jonson, D. and Watling, R. 1977. How identify mushrooms to genus. III: Macroscopic Features. Mad River press Inc. Eureka, California. 148 p.
- Martin, F.; Duplessis, S.; Ditengou, F.; Lagrange, H.; Voiblet, C. and Lapeyrie, F. 2001. Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. *New Phytologist* 151:145-154.
- Mueller, G. M. 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the Continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. *Fieldiana: Botany*, n.s., 30. Chicago: Field Museum of Natural History. 158p. ([http://www.fieldmuseum.org/research\\_collections/botany/botany\\_sites/fungi/mushroom.html](http://www.fieldmuseum.org/research_collections/botany/botany_sites/fungi/mushroom.html)). (Citado: 15 de mayo de 2011).

- Mukerji, K. G.; Manoharachary C. and Chamola, B. P. 2002. Techniques in mycorrhizal studies. 211 p.
- Pera, J.; Álvarez, I. F. y Parladé, X. 1993. Selección de hongos ectomicorrícicos para *Pinus pinaster* AIT. Congreso Forestal Español. Lourinzán. Ponencias y comunicaciones. Tomo III: 391-396.
- Pérez-Moreno, J.; Lorenzana-Fernández, A.; Carrasco-Hernández, V. y Yescas-Pérez, A. 2010. Los hongos comestibles silvestres del parque nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACYT. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 167 p.
- Read, D. J. y Perez-Moreno, J. 2003. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems. *New Phytol* 157: 475-492.
- Salazar, G. J. G.; Vargas, H. J. J.; Jasso, M. J.; Molina, G. J. D.; Ramírez, H. C. y López, U J. 1999. Variación en el patrón de crecimiento en altura de cuatro especies de *Pinus* en edades tempranas. *Madera y Bosques* 5: 19-34.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York, USA. 787 p.
- Taylor, A. F. S. and Alexander, I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19:102-112.
- Wong, K. K. Y.; Montpetit, D. Pichei, Y. and Lei, J. 1990. Root colonization by four closely related genotypes of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* (Maire) Orton - comparative studies using electron microscopy. *New Phvtol.* 116: 669-679.

Southworth, D.; Carrington, E. M.; Frank, J. L.; Gould, P.; Harrington, C. A. and Devine, W. D.  
2009. Mycorrhizas on nursery and field seedlings of *Quercus garryana*. *Mycorrhiza*  
19:14-158.

## CAPITULO VI

### EVALUACIÓN DE BACTERIAS QUE PROMUEVEN EL CRECIMIENTO VEGETAL Y AUXILIAN LA MICORRIZACIÓN

#### 6.1 RESUMEN

Los bosques son reservas de recursos microbianos que pueden utilizarse en viveros forestales. En el presente trabajo, se estudiaron 28 cepas de bacterias de la rizosfera de bosques naturales de pino, oyamel y cedro blanco, en el Cerro Tláloc, al oriente del Estado de México, México. Las cepas se evaluaron por su capacidad para solubilizar fosfato, producir auxinas e inducir crecimiento micelial de *Suillus* aff. *Pseudobrevipes*. Se encontró que el 57% de las cepas evaluadas tienen capacidad de solubilizar fosfatos, 14% producen auxinas y otro 14% de las cepas inducen el crecimiento del hongo ectomicorrízico. No obstante se observó que más del 80% de las cepas probadas inhiben el crecimiento micelial de *Suillus* (9 al 67% de reducción en el diámetro colonial). Las cepas con mayor capacidad de solubilizar fosfato fueron BOS4-F2 y PS1-F4 y la cepa con la mejor producción de auxinas fue CES1-A22. Las cepas que presentaron el mayor efecto positivo en el crecimiento micelial fueron CES1-A28 y BOS4-F6, esta última tiene también moderada capacidad de solubilizar fosfato. Los resultados sugieren que la mayoría de las bacterias de la rizosfera pueden tener un efecto inhibitorio ligero a fuerte en el crecimiento del micelio de los hongos ectomicorrízicos, por lo que es necesario realizar pruebas que permitan seleccionar aquellas cepas bacterianas que no sean antagónicas a estos hongos, con el fin de aprovechar su capacidad de promover crecimiento en viveros forestales.

**Palabras clave:** *hongo ectomicorrízico, solubilización de fosfato, auxinas, rizosfera*

## 6.2 ABSTRACT

The forests are reservoirs of microbial resources that can be used in forest nurseries. In this study, 28 strains of bacteria were isolated from the rhizosphere of natural forests of pine, fir and white cedar in the Mount Tlaloc, at the east of Mexico State, Mexico. The strains were evaluated for their ability to solubilize phosphate, produce auxins and induce mycelial growth of *Suillus* aff. *pseudobrevipes*. It was found that 57% of the strains had capability for solubilizing phosphate, 14% produced auxins and another 14% of the strains induced mycelial growth of the ectomycorrhizal fungi. However, over 80% of the isolates inhibited the mycelial growth of *Suillus* (reduction in colonial diameter from 9 to 67%). The strains with greater ability to solubilize phosphate were BOS4-F2 and PS1-F4 and the strain with the highest auxin production was CES1-A22. The strains that had the greatest positive effect on mycelial growth were CES1-A28 and BOS4-F6, this last also had moderate ability to solubilize phosphate. These results suggest that most of the rhizosphere bacteria may have some or high inhibitory effect on mycelium growth of ectomycorrhizal fungi, so it is necessary to select those bacterial strains that are not antagonistic to the fungi in order to take advantage of its ability to promote growth in forest nurseries.

**Keywords:** *ectomycorrhizal fungi, phosphate solubilizing, auxins, rhizosphere*

## 6.3 INTRODUCCIÓN

Los microorganismos son importantes en el funcionamiento de los ecosistemas porque tienen influencia sobre la fertilidad del suelo y disponibilidad de nutrimentos para las plantas (Van Breemen *et al.*, 2000; Johansson *et al.*, 2004). Los diversos grupos de organismos que

constituyen la comunidad microbiana de la rizosfera, como hongos ectomicorrízicos y bacterias, establecen una gran variedad de interacciones, a nivel metabólico, físico y funcional, entre ellos y con las raíces que influyen el crecimiento de la plantas (Grayston *et al.*, 1996; Frey-Klett y Garbaye, 2005; Calvaruso *et al.*, 2007). Los hongos ectomicorrízicos, asociados simbióticamente a las raíces de los árboles de bosques boreales y templados, están rodeados por una compleja comunidad de bacterias, conocidas como “mycorrhiza helper bacteria” (MHB) que promueven el crecimiento de los árboles al ayudar a mejorar la micorrización (Frey-Klett *et al.*, 2007; Alvez *et al.*, 2010).

Los hongos ectomicorrízicos forman estructuras en la raíz llamadas micorrizas, que están constituidas por tres elementos básicos: i) la red de Hartig; ii) el manto; y iii) el micelio extramatricial (Taylor y Alexander, 2005; Agerer, 2006). Estas estructuras son un conjunto de hifas que interconectan con el cuerpo fructífero del hongo, con la células epidermis y la corteza de la raíz en forma de redes, que ayudan al intercambio de nutrientes en ambas direcciones (Taylor y Alexander, 2005).

Las MHB pertenecen a diferentes grupos bacterianos, tales como: pretobacterias Gram-negativas (*Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* y *Rhizobium*); Firmicutes Gram-positivos (*Bacillus*, *Brevibacillus* y *Paenibacillus*) y actinomicetos Gram-positivos (*Rhodococcus*, *Streptomyces* y *Arthrobacter*) (Frey-Klett *et al.*, 2007).

Las MHB promueven la simbiosis entre los hongos ectomicorrízicos y las raíces, ya que incrementan la extensión del micelio, el contacto entre la raíz y el hongo, y la colonización de las raíces de la plantas (Aspray *et al.*, 2006). Las MHB pueden ayudar a la germinación de esporas y el crecimiento del micelio a través de la producción de factores de crecimientos y por la inhibición de competidores o antagonistas (Bending, 2007; Frey-Klett *et al.*, 2007). Además las

MHB pueden incrementar la biomasa y desarrollo de la raíces de las plantas por secreción de ácido indolacético (Frey-Klett *et al.*, 2005).

En años recientes se ha incrementado el interés en el estudio de las bacterias que promueven crecimiento vegetal en plantas forestales, cuyos efectos pueden ser directos sobre las plantas o en el establecimiento de la simbiosis entre hongos ectomicorrízicos y los hospedantes (Probanza *et al.*, 2001; Kataoka y Futai, 2009). No obstante, el conocimiento de las interacciones entre bacterias benéficas y hongos ectomicorrízicos es todavía incipiente. Este conocimiento podría ser muy valioso en la búsqueda de simbiosis más eficientes que puedan permitir un mejor desarrollo de las plantas en vivero y mayor tasa de supervivencia en el campo. El presente trabajo se llevó a cabo con el fin de seleccionar cepas de bacterias solubilizadoras de fosfatos, productoras de auxinas y compatibles con el hongo ectomicorrízico *Suillus* aff. *Pseudobrevipes* que no inhiban o que promuevan el crecimiento hifal a nivel *In Vitro*.

## **6.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.4.1. Material bacteriano**

Las cepas de bacterias utilizadas en el presente trabajo fueron obtenidas del cepario del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados y provienen de la rizosfera de bosques naturales de pino (*Pinus hartwegii* Lindl.), oyamel (*Abies religiosa* (H.B.K) Schl.et Cham), y cedro blanco (*Cupressus lusitánica* Mill.) en el Cerro Tláloc, dentro del municipio de Texcoco, Estado de México. Los sitios de donde fueron aisladas las cepas de bacterias se describen en el Cuadro 6.1.

**Cuadro 6.1.** Características de los sitios donde fueron aisladas las cepas bacterianas

Cepa bacteriana	Bosque	Altitud (m)	pH	% Materia orgánica	Georeferenciación
CES1-A22	cedro	2958	6.1	5.5	19° 26' 56" N 98° 46' 02" W
CES1-A24	cedro	2958	6.1	5.5	19° 26' 56" N 98° 46' 02" W
CES1-A23	Cedro	2958	6.1	5.5	
CES1-A25	cedro	2958	6.1	5.5	19° 26' 56" N 98° 46' 02" W
CES1-A27	cedro	2958	6.1	5.5	19° 26' 56" N 98° 46' 02" W
CES1-A28	cedro	2958	6.1	5.5	19° 26' 56" N 98° 46' 02" W
CES2-A19	cedro	3011	6.2	4.0	19° 26' 46" N 98° 45' 52" W
CES2-A9	cedro	3011	6.2	4.0	19° 26' 46" N 98° 45' 52" W
CES1-F6	cedro	2958	6.1	5.5	19° 26' 56" N 98° 46' 02" W
BOS1-A11G	oyamel	3489	4.9	14.6	19° 25' 36" N 98° 44' 47" W
BOS1-R1	oyamel	3489	4.9	14.6	19° 25' 36" N 98° 44' 47" W
BOS1-R2	oyamel	3489	4.9	14.6	19° 25' 36" N 98° 44' 47" W
BOS4-A2	oyamel	3480	5.5	7.7	19° 25' 59" N 98° 44' 45" W
BOS4-A3	oyamel	3480	5.5	7.7	19° 25' 59" N 98° 44' 45" W
BOS4-F2	oyamel	3480	5.5	7.7	19° 25' 59" N 98° 44' 45" W
BOS4-F6	oyamel	3480	5.5	7.7	19° 25' 59" N 98° 44' 45" W
BOS1-F9	oyamel	3489	4.9	14.6	19° 25' 36" N 98° 44' 47" W
HePg2	Pino	-----	----	----	-----
PS1-F1	Pino	3910	4.5	15.9	19° 24' 24" N 98° 43' 10" W
PS1-F3	Pino	3910	4.5	15.9	19° 24' 24" N 98° 43' 10" W
PS1-F4	Pino	3910	4.5	15.9	19° 24' 24" N 98° 43' 10" W
PS2-A2	Pino	3935	4.3	14.7	19° 24' 44" N 98° 43' 23" W
PS2-A4	Pino	3935	4.3	14.7	19° 24' 44" N 98° 43' 23" W
PS4-A14	Pino	3845	4.6	11.9	19° 25' 07" N 98° 43' 56" W
PS4-A17	Pino	3845	4.6	11.9	19° 25' 07" N 98° 43' 56" W
PS5-F7	Pino	3681	5.1	8.4	19° 25' 07" N 98° 44' 32" W
PS5-A21	Pino	3681	5.1	8.4	19° 25' 07" N 98° 44' 32" W
TrRm1	Pino	-----	-----	-----	-----

#### **6.4.2 Determinación de la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico**

Las cepas se sembraron en cajas de petri con medio Pikovskaya e incubaron por 7 días a 28 °C. El medio contiene (por litro): 10 g de glucosa, 5 g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 0.5 g de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ , 0.2 g de NaCl, 0.1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2 g de KCl, 0.5 g de extracto de levadura, 0.002 g de  $\text{MnSO}_4$  y 0.002 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Pikovskaya, 1948). Se evaluó si las colonias de las cepas bacterianas presentaban una zona clara (halo) alrededor, lo cual indica que la cepa es capaz de solubilizar fosfatos. La amplitud del halo alrededor de las colonias fue estimada en una escala de 0 a 4.

#### **6.4.3 Determinación de la capacidad de producir ácidoindolacético (AIA)**

El análisis cualitativo de la producción de ácido índole-3-acético (AIA) por las cepas de bacterias aisladas, se realizó siguiendo la metodología descrita por Bric *et al.* (1991).

Las cepas se sembraron en cajas de petri con medio de agar Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 28 °C hasta que se tuvieron colonias visibles (diámetro > 0.5 mm), que usualmente fue después de 48 h; el medio contiene los siguientes nutrientes (por litro): 10 g Triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g NaCl, 1 g de Triptófano y 20 g de agar. Después que las bacterias formaron colonias, las placas se cubrieron inmediatamente con una membrana de nitrocelulosa marca Milipore y se incubaron a 28 °C durante 48 h. Las membranas fueron retiradas de las placas y se pusieron en contacto directo con el reactivo de Salkowski (2% de  $\text{FeCl}_3$  0.5 M en ácido perclórico al 35%) en una caja de petri a temperatura ambiente, hasta que se desarrolló el color que caracteriza a las cepas que producen auxinas (Bric *et al.*, 1991). Las cepas bacterianas productoras de AIA se identificaron por la formación de un halo rojo que rodea a las colonias bacterianas, en la membrana de nitrocelulosa. La intensidad de la coloración roja, se estimó cualitativamente en una escala de 1 a 4.

#### **6.4.4 Efecto de las bacterias sobre el crecimiento del hongo ectomicorrízico *in vitro***

Se usó el hongo ectomicorrízico (*Suillus* aff. *pseudobrevipes*), el cual se sembró previamente en cajas de medio papa dextrosa agar (PDA) y se incubó por 20 días hasta que el cultivo fúngico cubrió la mayor parte de la caja de petri. Se tomaron discos de 9 mm de diámetro de las orillas de la colonia del hongo ectomicorrízico y se colocó cada disco en el centro de una caja Petri conteniendo medio PDA a pH 6.5 (Kataoka *et al.*, 2009). Posteriormente, se sembró en línea recta y a una distancia de 2 cm de la colonia del hongo una muestra de inóculo de cada cepa bacteriana, que con anticipación se cultivó en caldo nutritivo durante 7 días en constante agitación; como testigo sin inoculación se aplicó solo una muestra de caldo nutritivo (Kataoka y Futai, 2009). Las cajas Petri se incubaron a 25 °C durante 2 semanas, posteriormente se midió el diámetro de la colonia ectomicorrízica en los cuatro puntos cardinales y se obtuvo el promedio (mm). Cada cepa bacteriana ensayada en combinación con el hongo ectomicorrízico incluyó tres repeticiones. Los datos fueron procesados con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System) para obtener los análisis de varianzas y realizar la comparación de medias ( $\alpha=0.05$ ).

### **6.5 RESULTADOS**

#### **6.5.1 Determinación de la capacidad de solubilizar fosfato inorgánico**

Se encontró que de las cepas aisladas de los bosques de pino, oyamel y cedro blanco, 16 de ellas tuvieron capacidad de solubilizar fosfato inorgánico, de las cuales, el mayor número de cepas se encontraron en bosque de oyamel con 6, le sigue el bosque de cedro blanco con 5 y bosque de pino con 5 (Cuadro 6.2). Las cepas de bacterias BOS4-F2 y PS1-F4 tienen mayor capacidad como solubilizadores, las cuales presentaron el halo claro más ancho que las otras cepas, que fue

de un valor de 4 en una escala subjetiva. Mientras que las cepas de bacterias CES1-A24, CES1-A25, PS5-A21, CES1-A22 y BOS1-R2, presentaron menor capacidad de solubilizar fosfato, ya que, el ancho del halo tuvo un valor de 1 en la escala utilizada. El resto de las 16 cepas con capacidad de solubilizar fosfatos tuvieron anchos de halos de valores 2-3 en la escala (Cuadro 6.2). Estas cepas solubilizadoras de fosfatos representan el 57% del total de cepas que provienen de los ecosistemas del Cerro Tláloc.

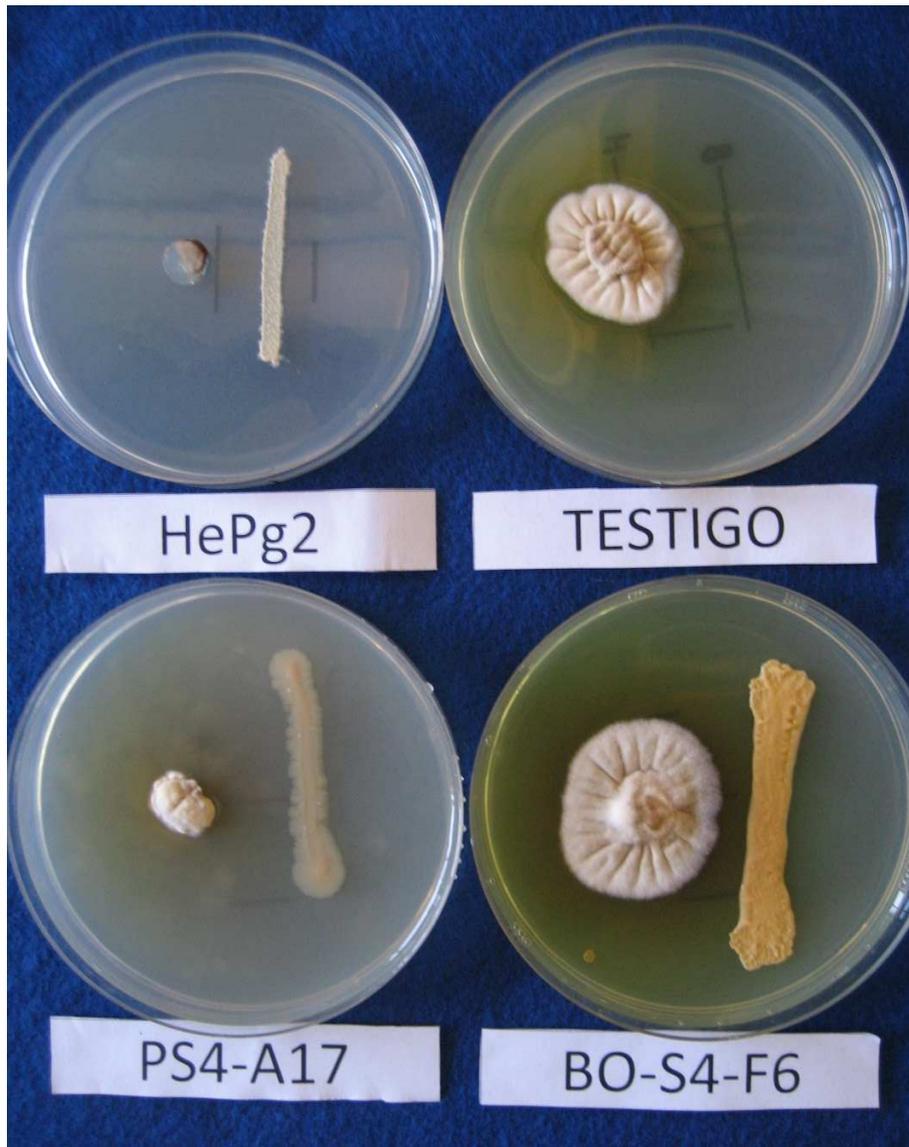
### **6.5.2 Determinación de la capacidad de producir ácidoindolacético (AIA)**

Cualitativamente se evaluó la intensidad de color rojo en las colonias en una escala de 1 a 4, el color más intenso (valor 4 en la escala) indica mayor capacidad de producir AIA. De las 28 cepas aisladas se encontraron solo 4 cepas con capacidad de producir AIA, de las cuales, 2 cepas fueron aisladas de bosque de cedro blanco y 2 cepas de bosque de pino (Cuadro 6.2). La cepa bacteriana CES1-A22 presentó la mayor capacidad de producción de AIA con un valor de 4. Las cepas CES1-F6 y TrRm1 presentaron producción de AIA en escala de 3. La cepa PS5-A21 tuvo la menor capacidad de producción de AIA con un valor de 1 en la escala. El resto de las cepas no presentaron capacidad de producir AIA (Cuadro 6.2). Las 4 cepas que producen auxinas representan el 15% del total de cepas evaluadas, que provienen de los bosques de pino, oyamel y cedro blanco del Cerro Tláloc.

### **6.5.3 Efecto de las bacterias sobre el crecimiento del hongo ectomicorrízico *in vitro***

El efecto de las 28 cepas bacterianas sobre *Suillus aff. pseudobrevipes* se realizó por ensayo de inducción de crecimiento micelial (Figura 6.1). Las cepas BOS4-F6, CES1-A28, PS2-A2 y PS1-F3 presentaron efecto positivo sobre el crecimiento del hongo ectomicorrízico, cuyo diámetro colonial fue de 30.66, 30.33, 29.33 y 28.66 mm, respectivamente. El hongo ectomicorrízico

incremento su crecimiento colonial en 9.5, 8.32 y 4.7 y 2.4% cuando creció en presencia de las cepas bacterianas BOS4-F6, CES1-A28, PS2-A2 y PS1-F3, respectivamente. En contraste, las cepas BOS1-F9 y HePg2 presentaron efecto negativo sobre el crecimiento del hongo ectomicorrízico, cuyo diámetro colonial fue de solo 9 mm, lo que representa una inhibición del crecimiento de 67.8%. En promedio el testigo obtuvo un crecimiento del diámetro colonial de 28.00 mm, las mejores cepas bacterianas que estimularon el crecimiento del hongo ectomicorrízico fueron BOS4-F6, que fueron estadísticamente diferentes al tratamiento testigo ( $\alpha=0.05$ ) (Cuadro 6.2). Se encontró que más del 80% de las cepas bacterianas tienen algún efecto inhibitorio en el crecimiento de *Suillus* en un rango que va de 9 a 67% de inhibición.



**Figura 6.1.** Ensayo de inducción de crecimiento colonial (micelial) de *Suillus* aff. *pseudobrevipes* por cepas de bacterias en condiciones *in vitro*: HePg2 y PS4-A17son cepas que inhiben el crecimiento del hongo; Testigo es el hongo ectomicorrízico crecido sin la bacteria; BOSA-F6 es una cepa que incrementa el crecimiento del hongo ectomicorrízico.

**Cuadro 6.2.** Cepas bacterianas promotoras de crecimiento vegetal y auxiliaoras de la micorrización a nivel *in vitro*.

Cepa bacteriana	BSF	P-AIA	CC-HECM(mm)	% CC-HCM
Testigo	-----	-----	28.00±1.52 <sup>ab</sup>	-----
CES2-A19	2	0	18.66±2.60 <sup>abcd</sup>	-33.35
PS4-A14	0	0	24.66±3.18 <sup>abc</sup>	-11.92
PS5-F7	0	0	15.00±2.89 <sup>cd</sup>	-46.42
BOS1-R2	1	0	21.66±3.48 <sup>abc</sup>	-22.64
PS1-F3	0	0	28.66±2.40 <sup>ab</sup>	+2.35
CES1-A22	1	4	18.33±1.20 <sup>abcd</sup>	-34.53
CES1-A27	0	0	25.33±1.86 <sup>abc</sup>	-9.53
PS5-A21	1	1	20.00±5.77 <sup>abcd</sup>	-28.57
BOS4-F2	4	0	23.33±1.76 <sup>abc</sup>	-16.67
BOS4-A2	2	0	22.66±1.77 <sup>abc</sup>	-19.07
PS1-F1	0	0	24.33±2.03 <sup>abc</sup>	-13.10
BOS1-A11G	0	0	25.33±2.91 <sup>abc</sup>	-9.53
BOS1-F9	0	0	9.00±0.00 <sup>d</sup>	-67.85
HePg2	3	0	9.00±0.00 <sup>d</sup>	-67.85
CES1-A25	1	0	22.33±2.03 <sup>abc</sup>	-20.25
BOS1-R1	2	0	21.66±5.21 <sup>abc</sup>	-22.64
CES1-F6	0	3	21.66±0.89 <sup>abc</sup>	-22.64
CES1-A23	0	0	23.00±1.53 <sup>abc</sup>	-17.85
TrRm1	3	3	22.33±0.88 <sup>abc</sup>	-20.25
PS4-A17	0	0	15.33±1.20 <sup>cd</sup>	-45.25
PS2-A4	2	0	19.33±1.76 <sup>abcd</sup>	-30.96
CES1-A24	1	0	19.00±2.52 <sup>abcd</sup>	-32.14
CES2-A9	2	0	24.66±0.33 <sup>abc</sup>	-11.92
CES1-A28	0	0	30.33±0.67 <sup>a</sup>	+8.32
BOS4-F6	2	0	30.66±0.33 <sup>a</sup>	+9.50
PS1-F4	4	0	19.33±1.20 <sup>abcd</sup>	-30.90
PS2-A2	0	0	29.33±1.45 <sup>ab</sup>	+4.75
BOS4-A3	3	0	17.66±0.88 <sup>bcd</sup>	-36.9286

BSF: cepas solubilización de fosfato; P-AIA: producción de ácido indolacético; C-HECM: crecimiento radial del hongo ectomicorrízico (diámetro colonial), %IC-HECM: inducción (+) o inhibición (-) del crecimiento del hongo ectomicorrízico en porcentaje con respecto al testigo. Para BSF y P-AIA: 0: negativo; 1-4: positivo. Para el crecimiento de las colonias ectomicorrízicas: medias con la misma letra no son significativamente diferentes, Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

## 6.6 DISCUSIÓN

En el presente estudio, encontramos cepas de bacterias con características de promover el crecimiento vegetal y que posiblemente auxilian la micorrización de plantas forestales, ya que presentan capacidad de solubilizar fosfato inorgánico, producir auxinas y promover el crecimiento colonial de hongos ectomicorrízicos *in vitro* (Cuadro 6.2). Esto se ha demostrado previamente en diversos estudios, donde se ha encontrado que *Pseudomonas fluorescens*, aislada de la micorrizósfera de plantas de *Pseudotsuga menziesii* en simbiosis con *Laccaria bicolor*, presenta capacidad de solubilizar fosfato inorgánico y producir auxinas (Frey-Klett *et al.*, 2005). Además, se han aislado cepas bacterianas de la micorrizósfera de *Pinus sylvestris* y *Suillus luteus*, pertenecientes a los grupos de *Bacillus* spp, *Burkholderias* pp., *Serratias* pp. And *Pseudomonas* spp., de las cuales, los géneros de *Serratia* sp. y *Pseudomona* ssp. promueven el crecimiento de raíces y tejido foliar de *Pinus sylvestris* (Bending *et al.*, 2002). En nuestro estudio, se encontró que el 57% de las cepas tienen capacidad de solubilizar fosfato, lo que posiblemente sea un indicativo que en los bosques del Cerro Tláloc este grupo microbiano es muy común.

Los trabajos realizados respecto al crecimiento de micelio por influencia de bacterias, han sido positivos y negativos, ya que en la naturaleza se encuentran bacterias que inducen y otras inhiben el crecimiento de los hongos ectomicorrízicos. El mayor número de bacterias que promueven el crecimiento del hongo ectomicorrízico podrían encontrarse en la micorrizósfera de plantas forestales (Frey-Klett *et al.*, 2005). En nuestro caso, las cepas bacterianas fueron aisladas de la rizosfera y se encontró que el 80% tiene algún efecto inhibitorio en el crecimiento micelial del hongo ectomicorrízico *Suillus* Aff. *Pseudobrevipes*, con casos extremos de hasta 67% de inhibición con las cepas BOS1-F9 y HePg2. Esto sugiere que para poder aprovechar la capacidad

de las bacterias rizosféricas de promover crecimiento vegetal de especies arbóreas en viveros forestales, estas tienen que pasar por un proceso de evaluación de compatibilidad con los hongos ectomicorrízicos, al menos a nivel de inducción del crecimiento del micelio.

En otros estudios, se ha demostrado que *Bacillus subtilis* y *Ralstonia basilensis* aislados de la micorrizósfera de *Pinus thunbergii* en simbiosis con *Suillus granulatus* incrementan el crecimiento del micelio de *Rhizopogon* sp., *Pisolithus tinctorius* y *S. granulatus in vitro* (Kataoka *et al.*, 2009). También, se han aislado cepas bacterianas en suelo micorrizósferico de *Pinus thunbergii*, donde se encontró que *Ralstonia* sp. y *Mycobacterium* sp. inducen el crecimiento de las hifas de *Suillus granulatus* a nivel *in vitro* (Kataoka y Futai, 2009). Incluso, en ensayos de inducción de crecimiento se observó que *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia* sp., *Paenibacillus* sp., estimularon la extensión del micelio y modificaron las características morfológicas miceliales de *Laccaria bicolor* en condiciones *in vitro* (Deveau *et al.*, 2007).

Sin embargo, se ha determinado que no todas las bacterias tienen capacidad de inducir el crecimiento del micelio ectomicorrízico, ya que existen bacterias como *Collimonas fungivorans* y *Paenibacillus* sp. que inhiben el crecimiento micelial de *Laccaria bicolor in vitro* (Deveau *et al.*, 2007). Además, *Burkholderia* sp. y *Serratia* sp. inhiben la formación ectomicorrízica de 97 a 41% respectivamente en plántulas de *Pinus sylvestris* y *Suillus luteus* en condiciones *in vitro* (Bending *et al.*, 2002). En el presente estudio solo un número muy reducido de cepas estimuló el crecimiento del hongo, que representó el 14% del total de cepas evaluadas. Estas cepas fueron aisladas de la rizosfera, lo que posiblemente indica que hay pocas cepas que estimulan el crecimiento de los hongos micorrízicos en esta zona de la raíz en comparación a lo que podría encontrarse en la micósfera como lo sugiere Frey-Klett *et al.* (2005), además se encontró que las mejores cepas solo incrementaron el crecimiento micelial en 9%.

En la selección de microorganismos benéficos, lo ideal es encontrar cepas que tengan múltiples características que permitan promover el crecimiento de las plantas, pero pocas veces puede lograrse. En nuestro caso, la cepa BOS4-F6 presentó dos características benéficas: estimula crecimiento del micelio del hongo ectomicorrízico en 9%, y tiene moderada capacidad de solubilizar fosfato; también se encontraron tres cepas que solubilizan fosfatos y producen auxinas (CES1-A22, PS5-A21 y TrRm1), pero tienen un efecto inhibitorio de ligero a moderado en el crecimiento del micelio del hongo ectomicorrízico (Cuadro 6.2). Es muy probable que al menos una de estas cepas podría promover el crecimiento vegetal y aumentar la micorrización en condiciones de plántulas forestales a nivel vivero, esto ya se ha demostrado con *Pseudomonas fluorescens* aisladas de basidiomas de *Suillus grevillei* y *Laccaria laccata* (Gamalero *et al.*, 2003). Las mejores cepas que en el presente trabajo se seleccionaron deben evaluarse a nivel de planta con el fin de seleccionar la más sobresaliente que estimule el crecimiento y promueva la micorrización. También es necesario identificarlas a nivel de especie a través de técnicas moleculares. Este es un trabajo pionero en México, ya que no hay estudios para aprovechar el efecto combinado de hongos ectomicorrízicos y bacterias promotoras del crecimiento en plantas forestales. Para lo cual es esencial buscar compatibilidad entre cepas microbianas a través de ensayos de inducción de crecimiento micelial.

## 6.7 CONCLUSIONES

En los bosques hay comunidades de bacterias que pueden promover crecimiento vegetal a través de diferentes vías; en nuestro estudio se encontró que el 57% de las cepas presentan capacidad de solubilizar fosfato y 14% tienen capacidad de producir auxinas. Más del 80% de las cepas evaluadas inhibieron el crecimiento micelial del hongo ectomicorrízico *Suillus* (9 a 67% de inhibición). La cepa BOS4-F6 estimuló el crecimiento del micelio del hongo en 9% y tuvo moderada capacidad de solubilizar fosfato; Se encontró que tres cepas que solubilizaban fosfatos también tenían capacidad de producir auxinas (CES1-A22, PS5-A21 y TrRm1), pero estas presentaron un efecto inhibitorio de ligero a moderado en el crecimiento del micelio de *Suillus*. Las cepas bacterias que presentaron características positivas respecto a las variables evaluadas son candidatas que pueden estudiarse en ensayos de inoculación con hongos ectomicorrízicos en plantas forestales a nivel de invernadero.

## 6.8 BIBLIOGRAFÍA

- Agerer, R. 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol. Progress*. 5: 67-107.
- Alves, R. T.; Satler, P. V. y Frois D. G. 2010. The role of mycorrhization helper bacteria in the establishment and action of ectomycorrhizae associations. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 832-840.
- Aspray, T. J.; Frey-Klett, P.; Jones, J. E.; Whipps, J. M.; Garbaye, J. and Bending, G. D. 2006. Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza* 16:533-54.

- Bending, G. D.; Poole, E. J.; Whipps, J. M. and Read, D. J. 2002. Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth. *FEMS Microbiology Ecology* 39: 219-227.
- Bending, D. G. 2007. What are the mechanisms and specificity of mycorrhization helper bacteria? *New Phytologist* 174: 705-707.
- Bric, J. M.; Bostock, R. M. y Silverstone, S. E. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 535-538.
- Calvaruso, C.; Turpault, M. P.; Leclerc, E. and Frey-Klett, P. 2007. Impact of ectomycorrhizosphere on the functional diversity of soil bacterial and fungal communities from a forest stand in relation to nutrient mobilization processes. *Microbial Ecology* 54: 567-577.
- Deveau, A.; Palin, B.; Delaruelle, C.; Peter, M.; Kohler, A.; Pierrat, J. C.; Sarniguet, A.; Garbaye, J.; Martin, F. and Frey-Klett, P. 2007. The mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytologist* 175: 743-755.
- Frey-Klett, P. y Garbaye, J. 2005. Mycorrhiza helper bacteria: a promising model for the genomic analysis of fungal-bacterial interactions. *New Phytologist* 168: 4-8.
- Frey-Klett, P.; Chavatte, M.; Clause, M. L.; Courier, S.; Le, R. C.; Raaijmakers, J.; Martinotti, M. G.; Pierrat, J. C. y Garbaye, J. 2005. Ectomycorrhizal symbiosis affects functional diversity of rhizosphere fluorescent pseudomonads. *New Phytologist* 165: 317-328.
- Frey-Klett, P.; Garbaye, J. y Tarkka, M. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist* 176: 22-36.

- Gamalero, E.; Fracchia, L.; Cavaletto, M.; Garbaye, J.; Frey-Klett, P.; Varese, G. C. and Martinotti, M.G. 2003. Characterization of functional traits of two fluorescent pseudomonads isolated from basidiomes of ectomycorrhizal fungi. *Soil Biology y Biochemistry* 35: 55-65.
- Grayston, S. J.; Vaughan, D. y Jones, D. 1996. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with annual plants: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. *Applied Soil Ecology* 5: 29-56.
- Johansson, J. F.; Paul L. R. and Finlay, R. D. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology* 48 1-13.
- Kataoka, R.; Taniguchi, T. y Futai, K. 2009. Fungal selectivity of two mycorrhiza helper bacteria on five mycorrhizal fungi associated with *Pinus thunbergii*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 25:1815-1819.
- Kataoka, R. y Futai, K. 2009. A new mycorrhizal helper bacterium, *Ralstonia* species, in the ectomycorrhizal symbiosis between *Pinus thunbergii* and *Suillus granulatus*. *BiolFertilSoils* 45: 315-320.
- Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 363-370.
- Probanza, A.; Mateos, J. L.; Lucas-García, J. A.; Ramos B. and De Felipe, M. R. 2001. Effects of inoculation with PGPR *Bacillus* and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. growth, bacterial rhizosphere colonization and mycorrhizal infection. *Microb. Ecol.* 41: 140-148.
- Taylor, A. F. S. and Alexander, I. 2005. The ectomycorrhizal symbiosis: life in the real world. *Mycologist* 19:102-112.

Van Breemen, N.; Finlay, R.; Lundström, U.; Jongmans, A. G.; Giesler R. and Olsson, M. 2000.

Mycorrhizal weathering: A true case of mineral plant nutrition? *Biogeochemistry*49: 53-67.

## ANEXO 1

### COINOCULACIÓN ECTOMICORRÍZICA CON *Laccaria proxima* Y UNA BACTERIA SOLUBILIZADORA DE FOSFATO EN *Pinus pseudostrobus*

#### Preparación del inoculante bacteriano

Se evaluaron 29 cepas de bacterias solubilizadoras de fosforo (BSF) de la colección del Área de Microbiología de Suelos del COLPOS. Las cepas bacterianas se sembraron en cajas Petri con agar nutritivo y se incubaron a 28 °C durante 3 días, para recuperar su actividad y evaluar su crecimiento. Una vez reactivadas las bacterias, se sembraron en cajas Petri con medio de Pikosvkaya a 28 °C durante 7 días. Mediante la determinación de formación de halo que indica solubilización de fosfato fue seccionada la cepa TrRm1, por su mayor crecimiento en el medio Pikosvkaya. Una vez seleccionada la bacteria solubilizadora de fosfato, se incubó en caldo nutritivo a 30 °C durante siete días en constante agitación para un rápido crecimiento, alcanzando  $10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, 2 mL de esta suspensión fueron aplicados a plantas de *Pinus pseudostrobus* con el medio donde crecieron las bacterias.

#### Establecimiento del experimento

La preparación del inoculante ectomicorrízico, la desinfección de semillas y tubetes se realizó de la misma manera que se señala en el capítulo 5. El sustrato utilizado para la germinación de las semillas de *Pinus pseudostrobus* fue tezontle (5 mm). Previo a su utilización, dicho tezontle se depositó en costales de manta para su esterilización en autoclave con vapor de agua durante 2 h en dos ocasiones. Las semillas desinfectadas se depositaron en una charola con el tezontle estéril y se cubrieron con papel manila para impedir la entrada de la luz solar y acelerar su germinación.

Los riegos para la germinación se efectuaron cada tres días con agua destilada-esterilizada aplicando Captan  $2\text{g L}^{-1}$  para evitar enfermedades por hongos patógenos. Las plántulas germinaron 10 días después de la siembra y permanecieron 10 días después de la germinación cubiertas con el papel manila, dichas plantas presentaban síntomas de etiolación. El trasplante se realizó 10 días después de la germinación en tubetes previamente desinfectados con capacidad de 140 mL, estos fueron llenados con el sustrato hasta 80% del total del volumen. El sustrato utilizado para el crecimiento de las plantas fue arena:corteza:suelo en proporción 2:2:1, el cual también fue esterilizado a 18 lb en autoclave con vapor de agua durante 2 h en dos ocasiones. Se aplicó 1.5 g del inóculo ectomicorrízico disperso a 2 cm de profundidad, mientras que del inóculo bacteriano se aplicaron 2 mL por plántula tres días después del trasplante. Las bases con los tubetes conteniendo las plántulas del experimento fueron colocadas sobre charolas de  $45\text{ cm}^2$  con un orificio conectado con una manguera para drenar el agua hacia contenedores de 2 L de almacenamiento. Posteriormente dichas unidades experimentales fueron cubiertas con cubos de polietileno de 60x60 cm, dejando descubierto un lado del cubo para los riegos. La charola que tenía de base y de almacenamiento de agua, tenían un orificio conectado con una manguera hacia un recipiente donde se almacenaba el agua del riego. Este procedimiento se realizó con la finalidad de evitar la contaminación bacteriana y ectomicorrízica entre tratamientos y del ambiente del invernadero.

### **Diseño experimental**

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 30 repeticiones por tratamiento, estableciendo cuatro tratamientos en condiciones de invernadero (Cuadro 1).

Tratamientos establecidos en el bioensayo.

Tratamiento	Descripción
Testigo	Plantas sin aplicación de microorganismos
Medio Líquido (ML)	Plantas únicamente con caldo nutritivo estéril
Ectomicorriza (ECM)	Plantas inoculadas con <i>Laccaria proxima</i>
Bacteria (BSF)	Plantas inoculadas con una bacteria solubilizadora de fosfato (TrRm1) contenida en caldo nutritivo
ECM+ML	Planta inoculada con <i>Laccaria proxima</i> y con la bacteria solubilizadora de fosfato
ECM+BSF	Planta inoculada con el hongo ectomicorrízico y la bacteria solubilizadora de fosfato

### **Evaluación del experimento**

En el presente trabajo únicamente se evaluó el número de plantas vivas en un periodo de 90 días con el sistema establecido (charolas de plántulas cubiertas con cubos de polietileno conectados). Durante un periodo de 60 días se realizaron tres trasplantes, porque la mortalidad de plántulas fue alta. Posteriormente, se sembraron semillas en los tubetes para recuperar los ejemplares muertos, sin embargo las plántulas de las semillas germinadas continuaron muriendo paulatinamente. Después de 90 días, la mortalidad de las plántulas continuaba siendo alta, entonces se tomó la decisión de retirar los cubos de polietileno utilizado en el sistema.

Una vez retirados los cubos de polietileno la mortalidad de plántulas disminuyó, pero prácticamente el experimento no era factible para su evaluación, el número de plántulas vivas por tratamiento fue bajo, como se muestra en el siguiente cuadro.

Supervivencia de plantas evaluadas de un total de 30 réplicas por tratamiento.

Tratamientos	Plantas vivas
Testigo	16
Medio Líquido (ML)	13
Ectomicorriza (ECM)	6
Bacteria (BSF)	5
ECM+ML	13
ECM+BSF	6

### Conclusiones y recomendaciones

El objetivo establecido en el presente trabajo propuesto, no se cumplió, porque diversos factores no permitieron la supervivencia de las plántulas. Se determinó que cuatro factores principales afectaron el desarrollo de las plantas de *Pinus pseudostrobus*: i) plantas con problemas de etiolación a la hora del trasplante; ii) utilización de sistema semi-cerrado como protector de la contaminación entre tratamientos (cubos de polietileno), este sistema aumentó la humedad relativa y la temperatura del sistema; iii) cantidades altas de fuente de carbono mediante la aplicación de los inoculantes fúngico y bacteriano; presencia de *damping-off* (provocados por diversos hongos patógenos como: *Botrytis*, *Pythium*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium*, *Thielaviopsis*, *Macrophomina phaseoli*) que provoca la pudrición del cuello de la raíz y proliferación de la mosquita negra conocida como mosquito de hongo (Sciaridae); iv) el aumento de la humedad relativa y la temperatura por causa de los cubos de polietileno y el alto contenido

de carbono de los inóculos, ayudan la proliferación del *damping-off* y la mosquita negra, permitiendo alta mortalidad de plántulas en el sistema establecido.

Para el establecimiento de tipos de ensayos donde se utilizan bacterias y esporomas de hongos ectomicorrízicos, se recomienda lo siguiente: i) utilización de plántulas sanas germinadas en sustratos (peat moss) donde retenga la humedad necesaria para la germinación, si las charolas de germinación se cubren para evitar la entrada de luz y acelerar la germinación, la cubierta se debe retirar para evitar la etiolación de las plantas; ii) no establecer sistemas cerrados de polietileno, ya que aumenta la proliferación de plagas y enfermedades; iii) el inóculo fúngico se debe aplicar cuando las plantas presenten lignificación en el tallo (60 días aproximadamente después de la germinación), mientras que el inóculo bacteriano previo a su aplicación, es necesario centrifugarlo a 5000 rpm durante 15 minutos para separar el *Pellet* (concentrado de bacterias) del medio de cultivo, y así eliminar la fuente de carbono, el *Pellet* debe ser suspendido en agua destilada-estéril, usando el mismo volumen que cuando estuvo en cultivo; iv) de preferencia cubrir con papel manila la superficie del tubete para evitar la contaminación entre tratamientos.

## ANEXO 2

### SUPERVIVENCIA DE *Pinus pseudostrobus* INOCULADO CON SEIS ESPECIES DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS EN CONDICIONES DE CAMPO

#### Establecimiento de la plantación

El 28 de agosto de 2010 se llevaron a campo plantas de 10 tratamientos de *Pinus pseudostrobus* inoculadas con tres especies de hongos ectomicorrízicos por separado y combinados, las plantas de *Pinus pseudostrobus* tenían 2.5 años de edad. Los tratamientos tenían 7 réplicas pertenecientes a los géneros *Laccaria* sp. y *Hebeloma* sp. con un total de 70 unidades experimentales, las cuales fueron distribuidas por bloques al azar, como se muestra en el siguiente cuadro.

Combinaciones de las especies de hongos ectomicorrízicos inoculadas en *Pinus pseudostrobus*.

Número de tratamiento	Especie ectomicorrízica	Clave de referencia
1	Testigo (sin hongo)	T
2	<i>Laccaria laccata</i>	Ll
3	<i>Laccaria bicolor</i>	Lb
4	<i>Laccaria proxima</i>	Lp
5	<i>Hebeloma mesophaeum</i>	Hm
6	<i>Hebeloma alpinum</i>	Ha
7	<i>Hebeloma leucosarx</i>	Hl
8	Ll+Lb+Lp	3L
9	Hm+Ha+Hl	3H
10	Ll+Lb+Lp+ Hm+Ha+Hl	3L+3H

Ll+Lb+Lp: combinación de tres especies de *Laccaria*; Hm+Ha+Hl: combinación de tres especies de *Hebeloma*; Ll+Lb+Lp+ Hm+Ha+Hl: combinación simultanea de tres especies de *Laccaria* y tres especies de *Hebeloma*.



## **Evaluación de supervivencia**

Se realizaron evaluaciones de supervivencia de *Pinus pseudostrobus* inoculada con los hongos ectomicorrízicos durante los dos primeros meses 28 de septiembre y 28 de octubre, posteriormente a los cuatro meses en el 5 de diciembre y por último a los seis meses en el 28 de febrero de 2011. Adicionalmente, se tomaron datos pero no con la precisión suficiente, ya que no se estableció un patrón para la toma de datos, en ocasiones el tallo quedaba muy profundo y en otros casos quedaba por arriba del nivel del cajete, por lo tanto, no se realizaron análisis estadísticos. Durante los cuatro primeros meses de evaluación la mayoría de los tratamientos alcanzaron 100% de supervivencia, excepto las plantas inoculadas con *L. proxima* y *H. mesophaeum* con 85.7% ambos tratamientos. En la última evaluación realizada durante el sexto mes se encontró que *Laccaria bicolor*, *Hebeloma mesophaeum*, *Hebeloma leucosarx* y la combinación simultánea de las tres especies de *Hebelomas* más las tres especies de *Laccaria* fueron los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de supervivencia con 42.8%, como se muestra en el siguiente cuadro. Mientras, que el menor porcentaje de supervivencia se presentó en la combinación de las tres especies de *Laccaria* con 0%.

Supervivencia de *Pinus pseudostrobus* inoculadas con seis especies de hongos ectomicorrízicos separados y combinados.

Tratamiento	Supervivencia después de la siembra (%)			
	1 mes	2 meses	4 meses	6 meses
Testigo (sin hongo)	100	100	100	28.5
<i>Laccaria laccata</i>	100	100	100	42.8
<i>Laccaria bicolor</i>	100	100	100	28.5
<i>Laccaria proxima</i>	100	100	85.7	14.2
<i>Hebeloma mesophaeum</i>	100	100	85.7	42.8
<i>Hebeloma alpinum</i>	100	100	100	28.5
<i>Hebeloma leucosarx</i>	100	100	100	42.8
Ll+Lb+Lp	100	100	100	0
Hm+Ha+Hl	100	100	100	28.5
Ll+Lb+Lp+ Hm+Ha+Hl	100	100	100	42.85

Ll+Lb+Lp: combinación de tres especies de *Laccarian*; Hm+Ha+Hl: combinación de tres especies de *Hebeloma*; Ll+Lb+Lp+ Hm+Ha+Hl: combinación simultanea de tres especies de *Laccaria* y tres especies de *Hebeloma*.

Al finalizar la sexta evaluación solo quedaron 22 plantas vivas de un total de 70. Los tratamientos que permitieron mayor porcentaje de supervivencia de las plantas fueron las inoculadas con las especies de *Hebelomas*, ya que en los tratamientos donde estaba presentes las especies de este género se encontraron plantas vivas, mientras que en el tratamiento donde se combinaron las tres especies de *Laccaria* todas las plantas murieron, como se muestra en la siguiente figura.

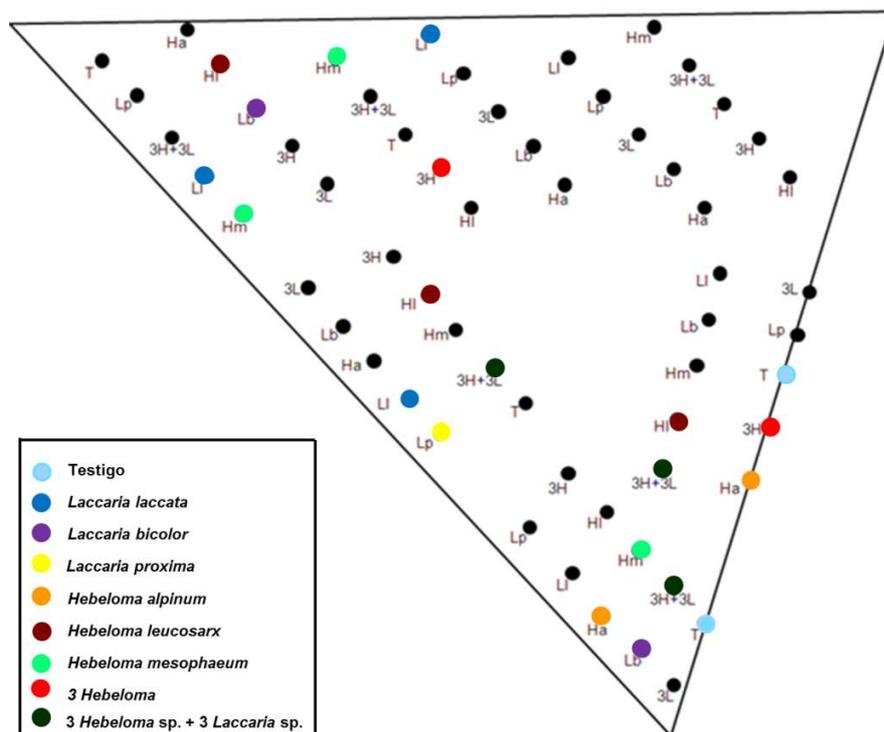


Figura 2.2. Distribución de la supervivencias de *Pinus pseudostrobus* inoculadas con especies de hongos ectomicorrízicos al finalizar la evaluación. Los puntos grandes y coloreados son plantas vivas y los puntos pequeños y negros son plantas muertas.

## Conclusión y recomendación

La supervivencia de plantas de *Pinus pseudostrobus* en campo no fue exitosa como se esperaba, ya que el 31% del total de las plantas fueron las que sobrevivieron. La alta mortalidad de plantas se debe posiblemente a diversos factores como: i) la fecha de siembra un poco tardío, ya que el estudio se realizó a mediados de la temporada de lluvias; ii) una prolongada sequía por falta de lluvias de octubre a febrero y aumento de la temperatura; de acuerdo con los pobladores de la localidad, existieron más de 90 días sin ninguna lluvia, lo cual es una condición muy inusual en el área de estudio ii) plantas con tiempo prolongado en vivero (plantas con 2.5 años de edad),

posiblemente efecto de domesticación. En las plantas que sobrevivieron en el periodo de seis meses no mostraron efecto en el crecimiento.

Para este tipo de trabajos recomienda sembrar las plantas cuando inicia el periodo de lluvias, de esta manera se prolonga el periodo de la humedad del suelo para su crecimiento, desarrollo y adaptabilidad. Aunque el hongo ectomicorrízico tiene capacidad de incrementar la supervivencia en lugares con poca humedad, es necesario conocer que tipos de hongos son los más resistentes a las sequías, a la competencia entre otros hongos y al estrés por cambios de temperatura.