



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN  
CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO  
POSGRADO EN EDAFOLOGÍA

HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES EN UNA ZONA OTOMÍ Y DINÁMICA DE  
COLONIZACIÓN ECTOMICORRÍZICA ENTRE *Pinus pseudostrobus* Y *Hebeloma*  
*mesophaeum*

CRISTINA HEREDIA ACUÑA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

Junio 2011

La presente tesis titulada: “**HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES EN UNA ZONA OTOMÍ Y DINÁMICA DE COLONIZACIÓN ECTOMICORRÍZICA ENTRE *Pinus pseudostrobus* Y *Hebeloma mesophaeum*”**”, realizada por la alumna: Cristina Heredia Acuña bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EDAFOLOGIA

CONSEJO PARTICULAR



**CONSEJERO**

---

DR. JESUS PÉREZ MORENO



**ASESOR**

---

DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUÁREZ



**ASESORA**

---

DRA. BEATRIZ XOCONOSTLE CAZARES

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio del 2011

**“The lamp in my life refused to be snuffed out...**

**...God never let the kerosene of hope run dry”**

**Nasreen Baig.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACyt por la beca otorgada para el desarrollo de la presente investigación.

Al Colegio de Postgraduados, por la oportunidad y confianza brindada en el proceso de mi formación.

Al Dr. Jesús Pérez Moreno, por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por brindarme la oportunidad de conocerle y sobre todo por ser tan paciente con esta alumna que comienza su camino por la senda de la ciencia. Gracias por los consejos y el apoyo.

Al Dr. Juan José Almaraz Suárez, mil gracias por todo el apoyo brindado a lo largo del proyecto, por su paciencia, por compartir sus conocimientos conmigo. Es usted una persona maravillosa.

A la Dra. Beatriz Xoconostle Cázares por el apoyo brindado en la investigación.

Al Dr. Alejandro Alarcón, por las palabras de aliento brindadas en los momentos exactos, por su sencillez, carisma y sobre todo por siempre ser una ser humano con la sensibilidad necesaria para decir “Ya, ya paso”. Gracias.

Al Dr. Ronald Ferrera Cerrato por compartirme su sabiduría y por el préstamo del equipo y materiales del laboratorio de Fijación del Nitrógeno.

Al personal del Laboratorio de Fijación de Nitrógeno: Edmundo Martínez Galán, Manuel Solano Díaz, Lorenzo Viana Monsalvo y Fernando López Santillán por su ayuda y asesoramiento.

A Ma. del Rosario Galicia López por ser siempre tan gentil y estar siempre en disposición para el préstamo de material y los trámites requeridos.

## **DEDICATORIA**

Agradezco a Dios por darme la oportunidad de crecer, madurar, sufrir, sonreír, disfrutar y padecer cada una de las experiencias de las que fui partícipe durante estos dos años. Le agradezco a Dios el haber puesto en mi camino a personas maravillosas, por mostrarme que la vida es más que buenas experiencias, por permitirme ver que aunque a veces tenemos que caer siempre existe la posibilidad de levantarnos nuevamente, que no hay cima ni muralla que no pueda ser movida. Gracias por que en estos dos años te encontré, y aunque aun no comprendo muchas cosas, se que todo pasara y todo sanara.

A mis padres por ser dos personas maravillosas que me han apoyado en cada paso de mi vida, los amo cada día más y le doy gracias al cielo por permitirme ser su hija, espero siempre enorgullecerlos.

A mis hermanas: Rebeca, Carmen, Raquel, Miriam y Stephania por su amor y su paciencia.

A Miriam y Stephania por ser faros de luz en casa, por ser un par de angelitos maravillosos, traviosos y sobre todo por hacerme ver que la vida es bella y nada puede quitarle esa belleza, porque a través de sus ojos veo la pureza del mundo.

A mi hermano Luis Rubén por apoyarme, aconsejarme, escucharme y ser tan paciente ante cada situación.

A Elvia Pérez Rosales y Yessica González Paredes, por todo el apoyo brindado, por secar mis lágrimas, por su calidez, seguridad, confianza y por que entre las tres aprendimos, soñamos y planeamos lo inimaginable. Gracias por su amistad, las quiero.

A la Dr. Magdalena Martínez Reyes, por brindarme sus conocimientos pero sobre todo por ser una mujer maravillosamente fuerte, por enseñarme que en la vida uno debe de tomar decisiones duras, que duelen pero que son necesarias. Te quiero Mac.

A M en C. Yadira Cornejo Silva y a la M en C. Cristina Arteaga León, por las charlas y el apoyo, por guiarme, mil gracias.

A Alfonso Quiroz, Mario Jiménez Ruiz y Claudia Ordoñez, gracias por brindarme su amistad.

A Laura Guadalupe Bolaños Álvarez por ser como es, que a su corta edad es la persona con un grado de madurez impresionante, siempre con una sonrisa, buenos consejos, palabras de aliento y un abrazo reconfortante en cualquier situación, gracias por tu amistad, Te quiero Lauri.

# HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES EN UNA ZONA OTOMÍ Y DINÁMICA DE COLONIZACIÓN ECTOMICORRÍZICA ENTRE *Pinus pseudostrobus* Y *Hebeloma mesophaeum*

**Heredia Acuña Cristina**  
**Colegio de Postgraduados, 2011**

## **RESUMEN**

Dentro de los ecosistemas forestales existe una amplia diversidad de microorganismos que participan en el establecimiento del equilibrio del sistema, dentro de los cuales se encuentran de manera relevante, los hongos ectomicorrízicos. Los hongos ectomicorrízicos forman asociaciones simbióticas con especies forestales, en esta simbiosis existe un intercambio de nutrimentos esenciales para la vida de ambos organismos. Desde el punto de vista antropocéntrico existen hongos ectomicorrízicos que han sido utilizados desde épocas prehispánicas como alimento o medicina, en la actualidad existe un gran interés por validar y ampliar dichos conocimientos desde una perspectiva científica. Diversas especies han sido estudiadas con la finalidad de evaluar su potencial medicinal, nutricional, industrial y biotecnológico. En el estado de México, existen especies que pueden ser utilizadas desde el punto de vista biotecnológico como inóculo forestal. Dentro de ellas se incluye a *Hebeloma mesophaeum*, una especie ectomicorrízica comestible en el estado de México. En la presente investigación se evaluó el potencial de esta especie como inóculo en dos especies de interés forestal (*Pinus pseudostrobus* y *P. ayacahuite*). Se analizó el desarrollo ontogénico de la ectomicorríza formada entre *H. mesophaeum* y *P. pseudostrobus* y la dinámica de colonización durante siete meses y se efectuó una descripción inicial de su morfotipo. En algunos bioensayos se observó la presencia de morfotipos diferentes a *H. mesophaeum*, los cuales fueron caracterizados y fotografiados. El presente trabajo abarca dos áreas de interés, la primera el conocimiento relacionado con el aprovechamiento de especies

ectomicorrízicas que permiten el desarrollo de comunidades indígenas y la segunda el conocimiento dirigido a las poblaciones rurales, desde un enfoque biotecnológico a través del estudio de estos hongos para la creación de inoculantes que ayuden a la supervivencia de pinos con fines de reforestación.

*Palabras Clave:* Etnomicología, Biotecnología, Ectomicorríza, *Hebeloma mesophaeum*, *Pinus ayacahuite*, pinos mexicanos.

WILD EDIBLE MUSHROOMS FROM AN OTOMI AREA AND DYNAMICS OF  
ECTOMYCORRHIZAL COLONIZATION BETWEEN *Pinus pseudostrobus* AND *Hebeloma  
mesophaeum*

ABSTRACT

Forest ecosystems have a wide diversity of microorganisms that are involved in establishing the balance of the system, among these organisms a key component are ectomycorrhizal fungi. Ectomycorrhizal fungi form symbiotic associations with tree species, in this symbiosis exists an exchange of essential nutrients. From the anthropocentric point of view there are ectomycorrhizal mushrooms which have been used since prehispanic times as food or medicine. Currently there is an increasing interest to validate and enlarge these knowledges from a scientific perspective. Several species have been studied in order to assess their potential as medicine, nutritional food, industrial and biotechnological use. In the state of Mexico, there are species that can be biotechnologically used. Among them, it is included *Hebeloma mesophaeum* an edible ectomycorrhizal mushroom in the State of Mexico. In the present research the potential use of this species as inoculum for two forest species (*Pinus pseudostrobus* and *P. ayacahuite*) was evaluated. We examined the ontogenetic development of the ectomycorrhiza formed between *H. mesophaeum* and *P. pseudostrobus* and the dynamics of colonization during seven months and the description of the morphotype was also carried out. In some bioassays it was noted the presence of morphotypes different of *H. mesophaeum*, which were also describe and photographed. This work covers two areas of interest, the first is the knowledge related with the use of ectomycorrhizal species which could enable the development of indigenous communities and the second, also realted to rural populations, from a biotechnological approach, through the study of these fungi for the development of inoculants useful to increase the survival of introduced pine trees for reforestation.

*Keywords:* ethnomycology, Biotechnology, ectomycorrhiza, *Hebeloma mesophaeum*, *Pinus ayacahuite*, Mexican pines.

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA.....	II
RESUMEN.....	i
ABSTRAC .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
CONTENIDO.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
CAPÍTULO I.....	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
1.2 LITERATURA CITADA .....	3
CAPÍTULO II .....	6
OBJETIVOS E HIPÓTESIS. ....	6
2.1 Objetivo General .....	6
2.1.1 Objetivos Particulares.....	6
2.2 Hipótesis Particulares .....	6
CAPÍTULO III .....	7
HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES, UN RECURSO FORESTAL NO MADERABLE EN UNA ZONA OTOMÍ: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO, MEDICINAL, NUTRIMENTAL E INDUSTRIAL .....	7
3.1 RESUMEN.....	7
ABSTRACT .....	8
3.2 INTRODUCCIÓN.....	8
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	9
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	10
3.5 CONCLUSIONES.....	17
3.6 LITERATURA CITADA.....	17
CAPÍTULO IV .....	22
ONTOGENIA DE LA MICORRIZA SINTETIZADA ENTRE <i>Pinus pseudostrobus</i> Y <i>Hebeloma mesophaeum</i> Y MORFOTIPOS “CONTAMINANTES” .....	22
4.1 RESUMEN.....	22
4.1 ABSTRACT .....	23
4.2 INTRODUCCIÓN.....	23

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
4.3.1 Montaje del experimento.....	24
4.3.2 Variables evaluadas .....	26
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	27
4.4.1 Descripción de <i>Hebeloma mesophaeum</i> .....	27
4.4.2 Evaluación del incremento en la dinámica de colonización ectomicorrízica .....	29
4.4.2 Ontogenia de <i>Hebeloma mesophaeum</i> en <i>Pinus pseudostrabus</i> . .....	31
4.4.2.1 Caracterización macromorfológica .....	31
4.4.3 Otros morfotipos detectados en el ensayo .....	37
4.4.3.1 Morfotipo 1. : “Similar a <i>Hebeloma leucosarx</i> ” .....	37
4.4.3.3 Morfotipo 3.....	39
4.4.3.4 Morfortipo 4 .....	39
4.4.3.5 Morfotipo 5: “similar a <i>Boletus</i> ” .....	40
4.5 RECOMENDACIONES .....	45
4.6 CONCLUSIONES.....	45
4.7 LITERATURA CITADA.....	46
Anexo I.....	50
INOCULACIÓN DE <i>Pinus pseudostrabus</i> y <i>Pinus ayacahuite</i> INOCULADOS CON <i>Hebeloma mesophaeum</i> Y UNA BACTERIA SOLUBILIZADORA DE FOSFATO.....	50
RESULTADOS PRELIMINARES .....	53
LITERATURA CITADA.....	57

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
<b>Cuadro 3.1.</b> Nombres comunes, grupos tróficos y uso potencial de los hongos comestibles silvestres identificados en los mercados de Villa del Carbón (VC) y Jilotepec (J), Estado de México.	11
<b>Cuadro 3.2.</b> Propiedades nutritivas de los hongos comestibles silvestres identificados en los mercados estudiados.	15
<b>Cuadro 3.3.</b> Propiedades medicinales de los hongos silvestres comestibles y los compuestos activos identificadas.	17
<b>Cuadro 4.1</b> Número de raíces cortas de <i>Pinus pseudostrobus</i> contabilizadas de acuerdo a su características morfológicas.	30
<b>Cuadro 4.2.</b> Características generales del morfotipo formado por <i>Hebeloma mesophaeum</i> asociado a diferentes fitobiontes.	33
<b>Cuadro 4.3.</b> Características diagnósticas del morfotipo ectomicorrízico sintetizado presente entre <i>Pinus pseudostrobus</i> y <i>Hebeloma mesophaeum</i> .	36
<b>Cuadro 4.4</b> Porcentajes promedio de colonización de los diferentes morfotipos diferentes a <i>Hebeloma mesophaeum</i> encontrados en <i>Pinus pseudostrobus</i> .	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 3.1.</b> <b>a</b> Venta de hongos silvestres en el mercado de Villa del Carbón, Estado de México, <b>b</b> Venta de <i>Ramaria</i> spp. en China, <b>c.</b> <i>Lactarius indigo</i> , especie con potencial biotecnológico , <b>d</b> <i>Lycopendum perlatum</i> especie saprobia que puede ser cultivada a lo largo del año, <b>e</b> <i>Amanita rubescens</i> es una especies comestible rica en aminoácidos esenciales, <b>f</b> <i>Armillaria mellea</i> tiene propiedades antitumorales y antioxidantes.	13
<b>Figura 4.1.</b> Porciones analizadas del cepellón de <i>P. pseudostrobus</i> .	27
<b>Figura 4.2.</b> Porcentajes de colonización de <i>Hebeloma mesophaeum</i> en <i>Pinus pseudostrobus</i> durante ocho meses de evaluación. Barras con distintas letras son diferentes según Tukey p=0.05.	29
<b>Figura 4.3</b> Ontogenia de la ectomicorriza formada entre <i>Pinus pseudostrobus</i> y <i>Hebeloma mesophaeum</i> . <b>a</b> Abundante micelio externo de <i>H. mesophaeum</i> en cepellón, <b>b</b> Vista general de las raíces cortas ectomicorrizadas, <b>c</b> Raíz simple micorrizada, <b>d</b> Raíz micorrizada la cual inicia la bifurcación de la raíz y la aparición de hifas emanantes, <b>e</b> Raíz corta micorrizada dicotómica, <b>f</b> Raíz dicotómica micorrizada de segundo orden, <b>g</b> y <b>h</b> Raíces micorrizadas de tercer orden con hifas emanantes abundantes, <b>i</b> Raíces secundarias micorrizadas senescentes con hifas emanantes muy abundante.	34
<b>Figura 4.4.</b> Micromorfología de las raíces ectomicorrizadas de <i>Pinus pseudostrobus</i> con <i>Hebeloma mesophaeum</i> <b>a</b> Raíz con abundante micelio extrarradical blanco y algodonoso, <b>b-c</b> Red de Hartig presente en raíces cortas penetrando tres capas de células corticales, <b>d</b> Manto externo de <i>H. mesophaeum</i> , <b>e</b> Hifas compuestas por células cortas en el área de interfase del manto y el micelio extrarradical, <b>f</b> Ramificaciones de hifas del micelio externo, <b>g</b> Fíbula semicircular de <i>H. mesophaeum</i> en hifas emanantes.	35
<b>Figura 4.5.</b> Características del morfotipo 1 de <i>Pinus pseudostrobus</i> “similar a <i>Hebeloma leucosarx</i> ” <b>a</b> Raíz ectomicorrizada (0.63x), <b>b</b> Red de Hartig penetrando tres capas de células, <b>c</b> Arreglo plectenquimatoso en manto externo, <b>d</b> Hifa modificada cercana al manto externo, <b>e</b> Hifa emanante que presenta poro, <b>f</b> Fíbula semicircular en hifa emanante, <b>g</b> Hifa emanante que presenta unión en “H”, <b>h</b> Ramificación en “Y” de las hifas emanantes. <b>b-h</b> = objetivos 100x.	38

Figura 4.6. Características del morfotipo 2 de *Pinus pseudostrobus* “similar a *Suillus*” **a** Vista general de raíces ectomicorrizadas, **b** Corte transversal de una raíz corta micorrizada que muestra la red de Hartig, **c** Raíz colonizada en forma coraloide, **d** Raíz dicotómica micorrizada. 43

**Figura 4.7.** Morfotipo 3 de *Pinus pseudostrobus*: **a** Raíces cortas micorrizadas, **b** Raíz corta micorrizada con hifas emanantes abundantes de color blanco, **c** Corte transversal de la raíz micorrizada en donde se observa la red de Hartig y el manto. Morfotipo 4 de *P. pseudostrobus*: **d-f** Raíz micorrizada en los diferentes estadios de modificación morfológica, **f**. Se pueden observar los rizomorfos de color vináceo presentes en la raíz. Morfotipo 5 de *P. pseudostrobus* “similar a *Boletus*.”: **g** Estadio final de la modificación morfológica de la raíz micorrizada, **h** Estado inicial de la formación de la compactación de las hifas emanantes alrededor de la raíz modificada, **i** Rizomorfo emanante cubierto por cristales minerales. 44

## CAPÍTULO I.

### 1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Aualmente se pierden 13 millones de hectáreas de zonas boscosas a causa de las actividades humanas, la tasa de reforestación y regeneración a nivel internacional es de 5.2 millones de hectáreas por año (FAO, 2010), a pesar de los esfuerzos por la recuperación de aquellas zonas que han sido deforestadas la tasa de supervivencia en las reforestaciones es baja. Es por ello que se han buscado alternativas para disminuir el área de desmonte, dentro de estas alternativas se encuentra el aprovechamiento de productos forestales no maderables. En países como Brasil, Nepal y China (Subhrendu y Pattanayak, 2001; Maharjan, 2005, Tong y Zhi-qiang, 20062206) el aprovechamiento de este tipo de productos ha cobrado gran interés. Dentro de estos recursos forestales no maderables, los hongos silvestres han creado una perspectiva de aprovechamiento desde el punto de vista antropocéntrico. Existen especies de hongos silvestres que son apreciadas por sus propiedades nutritivas y medicinales desde épocas ancestrales (Guzmán, 2008; Dai *et al.* 2009), estas especies se encuentran adscritas a diferentes grupos tróficos: saprobios, parásitos y, simbiotes. Dentro de los hongos que forman asociaciones simbióticas se encuentran los hongos ectomicorrízicos cuya importancia ecológica y económica ha despertado interés en diferentes sectores de aprovechamiento (Pilz y Molina, 2002; Allen *et al.*, 2003). Estos hongos se asocian a especies pertenecientes a las Gimnospermas y Angiospermas, formando órganos especializados que permiten la supervivencia de sus fitobiontes en condiciones naturales (Smith, 1999; Smith y Read, 2008). A lo largo del establecimiento de la simbiosis, la raíz corta experimenta cambios morfológicos, iniciando con la supresión del crecimiento de pelos radicales, la raíz comienza a deformarse generando estructuras dicotómicas,

tuberculadas, coraloideas, entre otras, la modificación continua con la formación del manto fúngico que recubre la raíz, las hifas del hongo penetran el cortex de la raíz y avanzan entre los espacios intersticiales formando una intrincada estructura conocida como red de Hartig, y finalmente, la emanación de hifas hacia el exterior generando el micelio externo cuya función radica en la exploración del sustrato (Abuzinadah y Read, 1986; Agerer, 1987-2000). Todo organismo presente en el suelo interactúa con un sin número de organismos (Buscot, 2005), los hongos ectomicorrízicos forman asociaciones sinérgicas y antagónicas con aquellas bacterias que circundan la zona conocida como micorrizósfera. Estas bacterias son denominadas bacterias auxiliares de la micorriza (HMB por sus siglas en inglés), los estudios a este respecto son amplios y generan una expectativa para el uso de estos microorganismos desde el punto de vista biotecnológico (Garbaye, 1994; Barea *et al.*, 2005).

México representa un enorme centro de biodiversidad a nivel internacional, resguarda 72 taxa de *Pinus* y 150 especies de *Quercus* (Pérez-Moreno *et al.*, 2008) lo cual contribuye a su riqueza micológica. Se conocen más de 7 000 especies de hongos en el país (Guzmán, 1998), de los cuales se han reportado diferentes usos, entre ellos son considerados como alimento o como medicina, a través de estudios etnomicológicos dentro de las más de 60 etnias indígenas distribuidas a lo largo del país (Ruan-Soto *et al.*, 2004). El conocimiento tradicional de las etnias estudiadas ha sido modificado a lo largo de los años, en muchos de los casos este conocimiento se ha ido erosionando por la falta de interés de las nuevas generaciones y la migración de estas hacia zona urbanas. El aprovechamiento de los hongos silvestres comestibles se efectúa principalmente en las comunidades aledañas a las zonas boscosas, de las especies recolectadas, algunas presentan propiedades que pueden ser aprovechadas desde un enfoque biotecnológico por las comunidades indígenas (Garibay-Orijel *et al.*, 2009). El presente trabajo aborda tres diferentes

aspectos referentes a los hongos silvestres los cuales son: i) el conocimiento tradicional de los pueblos indígenas principalmente en uno de los grupos menos estudiados el Otomí; ii) el estudio del desarrollo ontogénico de la simbiosis establecida entre el hongo comestible *Hebeloma mesophaeum* y el fitobionte, y finalmente iii) el estudio preliminar de las interacciones que existe entre una bacteria solubilizadora de fosfato asociada a *Hebeloma mesophaeum* y como ésta asociación afecta al fitobionte.

## 1.2 LITERATURA CITADA

- ABUZINADAH, R., FINLAY R. D., READ, D. J. 1986. The role of proteins in the nitrogen nutrition of ectomycorrhizal plants, II. Utilization of protein by mycorrhizal plants of *Pinus contorta*, New Phytologist. 10: 495-506.
- AGERER, R. (1987-2002). Colour Atlas of Ectomycorrhizae, Einhorn-Verlag. Munich.
- ALLEN M. F., SWENSON W., QUEREJETA J. E., EGERTON-WARBUTON L.M., TRESEDER K.K. 2003. Ecology of mycorrhiza a concept framework for complex interactions among plants and fungi. Annual Review Phytopatology 41: 271-303.
- BAREA, M. J., POZO, J. M., AZCÓN R., AZCÓN-AGUILAR, C. 2005, Microbial co-operation in the rhizosphere., Rev. Journal of Experimental Botany, 56 (417): 1761-1778.
- BUSCOT F. 2005. What are soils?. In: Buscot, F. Varma, S. (eds). Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag, pp.3-18.
- DAI Y.-C.; YANG Z.-L.; CUI B.-K.; YU C.-J.; ZHOU L.-W. 2009. Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms 11: 287-302.

FAO, 2010 <http://foris.fao.org/static/data/fra2010/KeyFindings-es.pdf>

GARBAYE, J. 1994. Mycorrhiza helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis.

New Phytol 128:197–210

GARIBAY-ORIJEL R.; CÓRDOVA J.; CIFUENTES J.; VALENZUELA R.; ESTRADA-

TORRES A.; KONG A. 2009. Integrating wild mushrooms into a model of sustainable management for indigenous community foresters. *Forest Ecology and Management* 258: 122-131.

GUZMÁN G. 1998. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation*. 7: 369-

384

GUZMÁN G. 2008. Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review.

*International Journal of medicinal mushroom*. 10: 209-217.

MAHARJAN K.L. 2005. Community participation in forest resource management in Nepal.

*Journal of Mountain Science* 2(1):52-41

PÉREZ-MORENO J.; MARTÍNEZ-REYES M.; YESCAS-PÉREZ A.; DELGADO-

ALVARADO A.; XOCONOSTLE-CÁZARES B. 2008. Wild Mushroom Marquets in central México and a case study at Ozumba. *Economyc Botany* 62(3): 425-436

PILZ D.; MOLINA D. 2002. Commercial harvest of edible mushrooms from the forests of the

Pacific Northwest Unites States: issues, management and monitoring for sustainability. *Forest Ecology and Management* 155: 3-16.

RUAN-SOTO F.; GARIBAY-ORIJEL R.; CIFUENTES J. 2004. Conocimiento micológico

tradicional en la planicie costera del Golfo de México. *Rev Mex Micol* 19:57-70

RUAN-SOTO F.; GARIBAY-ORIJEL R.; CIFUENTES J. 2004. Conocimiento micológico tradicional en la planicie costera del Golfo de México. *Revista Mexicana de Micología* 19:57-70

SMITH S.E.; READ D. J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3a Edition. Elsevier .

SUBHRENDU K, PATTANAYAK S. E.O. 2001. Do tropical forest provide natural insurance? The microeconomics of non-timber forest product collection in the Brazilian Amazon. *Land Economics*. 77(4): 595-612.

TONG L. ZHI-QIANG Z. 2006. Analysis of developing non-timber forest products of Sanjiang Plain, Northeast China. *Journal of Forestry Research*. 17(4): 339-341.

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

#### 2.1 Objetivo General

Identificar los hongos comestibles en dos comunidades otomíes y evaluar aspectos ecofisiológicos de la relación entre un hongo ectomicorrízico comestible y una bacteria promotora de crecimiento vegetal asociados a dos especies de pinos nativos de México.

#### 2.1.1 Objetivos Particulares

- Efectuar una identificación de los hongos comestibles silvestres objeto de comercialización en las comunidades de Villa del Carbón y Jilotepec, estado de México, y analizar sus potenciales de uso medicinal y biotecnológico en un contexto de sustentabilidad.
- Describir la ontogenia de la micorriza formada entre *Pinus pseudostrobus* y *Hebeloma mesophaeum* durante 7 meses.
- Describir los morfotipos encontrados en *Pinus pseudostrobus* diferentes de *Hebeloma mesophaeum*.

#### 2.2 Hipótesis Particulares

- Los hongos comercializados en Villa del Carbón y Jilotepec, estado de México, tienen potencial medicinal y biotecnológico por lo que pueden ser aprovechados por las comunidades de manera sustentable.
- La formación de la ectomicorriza en *P. pseudostrobus* inoculado con *Hebeloma mesophaeum* se completará 7 meses después de la inoculación.
- *P. pseudostrobus* se puede asociar a más de un hongo ectomicorrízico, generando morfotipos diferentes de acuerdo al hongo asociado.

## CAPÍTULO III

### HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES, UN RECURSO FORESTAL NO MADERABLE EN UNA ZONA OTOMÍ: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO, MEDICINAL, NUTRIMENTAL E INDUSTRIAL

#### 3.1 RESUMEN

Actualmente existe a nivel internacional una estrategia de uso de recursos no maderables para disminuir la deforestación, dentro de los cuales se incluyen los hongos silvestres comestibles y medicinales. México es un importantísimo reservorio de dichos hongos a nivel internacional. En el presente trabajo se estudiaron las especies aprovechadas en los municipios de Villa del Carbón y Jilotepec, estado de México, y se analizaron sus diversos usos potenciales. Se identificaron 37 especies de hongos comestibles silvestres las cuales poseen interés medicinal (13%), cultivable (10%), de exportación (14%), biotecnológico e industrial (86%). La mayoría de las especies de hongos identificados tienen un alto valor nutritivo, por ejemplo altos contenidos proteínicos. Se registraron especies como *Cantharellus cibarius*, *Russula delica* y *Tricholoma equestre* en las cuales se han reportado propiedades anticancerígenas. Estos usos potenciales podrían impulsar el desarrollo de la región de estudio a partir de la utilización de los hongos silvestres, un recurso forestal no maderable de gran potencial poco tomado en consideración en el manejo sostenible de los bosques.

*Palabras Clave:* Conservación forestal, sustentabilidad, biotecnología, inoculantes ectomicorrízicos.

## **ABSTRACT**

Currently there is a world-wide use strategy of non-timber products in order to reduce deforestation rates, among which wild edible and medicinal fungi are included. Mexico is an important reservoir of such mushrooms internationally. In the present work, the commercialized wild edible mushrooms in the municipalities of Villa del Carbon and Jilotepec, state of Mexico, were studied. 37 species of wild edible mushrooms were identified among which there were species with medicinal (13%), cultivation (10%), exportation (14%) industrial and biotechnological (86%) potentials. Most of the identified mushrooms had high nutritional value including for example high protein contents. Species such as *Cantharellus cibarius*, *Russula delica* and *Tricholoma equestre* have shown anticarcinogenic effects. These potential uses could boost regional development in the studied area through the use of wild mushrooms, a non-timber forest resource with great potential but in general scarcely considered, in the sustainable management of forests.

*Keywords:* Forest conservation, sustainability, biotechnology, ectomycorrhizal inoculants.

## **3.2 INTRODUCCIÓN**

A nivel internacional la búsqueda de productos forestales no maderables dentro de los que se encuentran los hongos silvestres comestibles, ha cobrado un enorme interés. Se estima que en el mundo existen 1.5 millones de especies de hongos de los cuales solo se han identificado menos de 5% (Hawksworth, 1991). Existen más de 2300 especies que son colectadas, consumidas y comercializadas alrededor del mundo como comestibles y medicinales (Boa, 2004). México constituye uno de los más importantes reservorios de hongos comestibles y medicinales a nivel internacional, con más de 300 especies de hongos consumidos (Boa, 2004) y 70 con propiedades medicinales (Guzmán, 2008). El país tiene más de 60 grupos étnicos dentro de su territorio,

algunos de los cuales han sido poco estudiados etnomicológicamente como la etnia otomí. Dada la profunda y acelerada erosión del conocimiento tradicional que existe actualmente, en el presente trabajo se estudiaron las especies de hongos silvestres comestibles comercializados en los mercados de Villa del Carbón y Jilotepec, estado de México, comunidades de influencia otomí. Adicionalmente, se analizó el valor nutrimental, medicinal, biotecnológico e industrial de las especies registradas con la finalidad de conocer el potencial de dichos hongos en un marco de sustentabilidad forestal.

### **3.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

Los municipios de Villa del Carbón y Jilotepec se encuentran entre 19° 54' 24'' de latitud N, 99° 95' 29'' de longitud W y 19° 95' 29'' de latitud N, 99° 52' 86'' de longitud W, respectivamente. La vegetación está conformada por bosques de *Abies religiosa* (HBK) Schl et Cham, *Pinus ayacahuite* Ehrenb. ex Schltldl., *P. patula* Schiede ex Schltldl. & Cham., *P. teocote* Schltldl. & Cham. y *Quercus* spp. Se realizaron visitas en 2006 y 2010 a los mercados de Jilotepec y Villa del Carbón, respectivamente, con la finalidad de identificar las especies de hongos silvestres comestibles comercializados (Figura 1a). Para su identificación los especímenes fueron analizados macro- y micromorfológicamente, de acuerdo a las técnicas micológicas convencionales (Largent, 1973-1977). Las características micromorfológicas se determinaron con un microscopio Leica modelo MD1000. Los especímenes fueron herborizados y se encuentran depositados en la Colección Micológica del Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados. Para la determinación del carácter ectomicorrízico se utilizaron los criterios de Rinaldi *et al.* (2008) y el uso medicinal se basó en Guzmán (2008), Dai *et al.* (2009) y Sasata (2011).

### 3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se identificaron 37 especies de hongos comestibles silvestres en los mercados estudiados (Cuadro 1), adscritas a tres grupos tróficos: ectomicorrízico (86%), saprobio (10%) y parásito (4%).

*Conocimiento tradicional y potencial de exportación.* Se registraron 21 nombres comunes de las especies comercializadas en Villa del Carbón (Cuadro 1). Algunos nombres comunes son aplicados a un conjunto de especies que comparten características diagnósticas, tal es el caso de *Lactarius* spp. conocidas como “lecheros” debido al látex secretado cuando son cortados los esporomas. *Lycoperdum perlatum* y *Ramaria* spp., son nombradas de acuerdo a su forma como “bolitas de paloma” y “patitas de pájaro”, respectivamente. *Lactarius indigo* es nombrado por su color como “Chuin” palabra de origen otomí que significa “pájaro azul” por la similitud del color del plumaje de un ave de la región (*Aphelocoma ultramarina* Bonaparte). *Russula* spp. son nombrados “honguitos de madroño” ya que crecen cerca de árboles o arbustos de *Arbutus* spp., con los cuales forman micorrizas. *Clitocybe gibba* es nombrado “tejamanil” debido a que al secarse el pilipelis comienza a romperse de manera similar a pequeñas astillas de madera. *Amanita caesarea*, *Cantharellus cibarius*, *Hydnum repandum*, *Ramaria* cf. *holorubella* y *R.* cf. *rubrievanescentes* poseen mercado internacional establecido (Figura 1b), y pueden constituir un factor fundamental de desarrollo social en la región por su potencial de exportación a Norteamérica, Europa y Asia. Tan solo la venta anual de *Cantharellus* a nivel internacional se estima en 1.67 billones de dólares americanos basada en una producción de 150 a 200 mil toneladas métricas (Ehlers y Hobby, 2010).

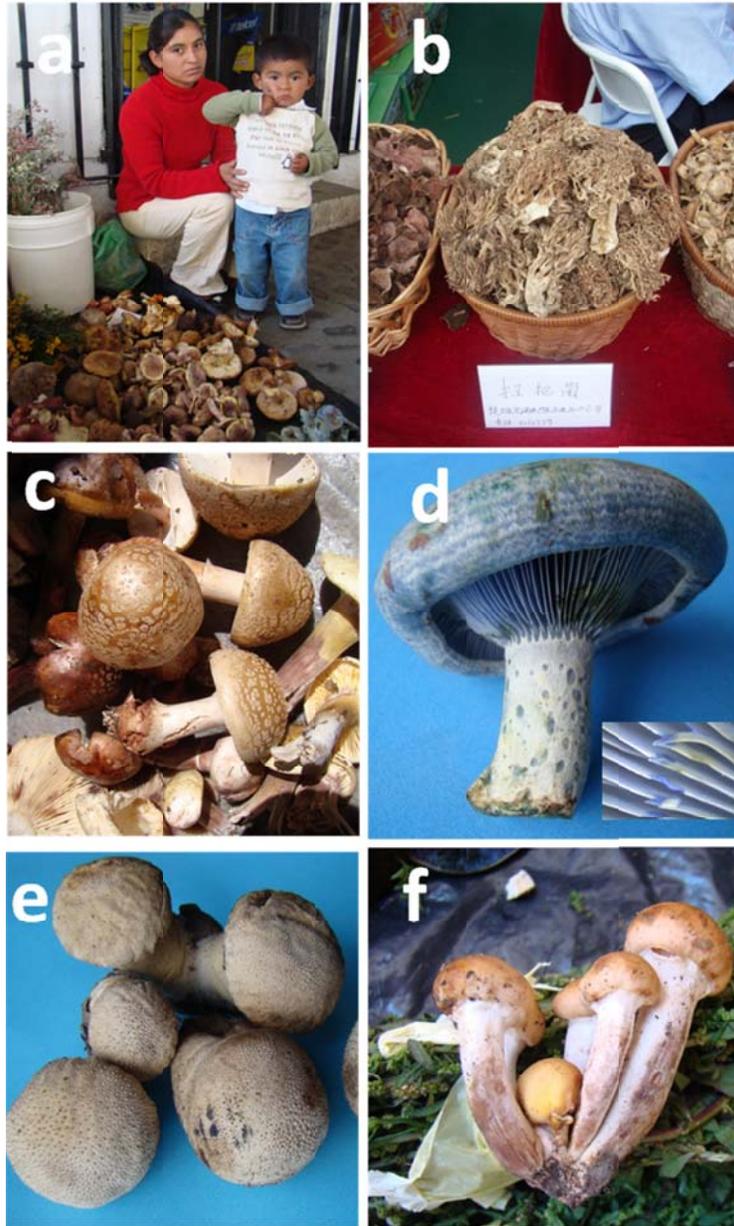
**Cuadro 3.1.** Nombres comunes, grupos tróficos y uso potencial de los hongos comestibles silvestres identificados en los mercados de Villa del Carbón (VC) y Jilotepec (J), Estado de México.

Especies de hongos	Grupo trófico	Uso Potencial	Nombre común
<i>Amanita caesarea</i> (Scop.) Pers. VC	ECM	B, E	kichimonsillo amarillo
<i>Amanita franchetii</i> (Boud.) Fayod. VC	ECM	B	Kichimonsillo
<i>Amanita rubescens</i> Pers. VC	ECM	B, E	Mantequero
<i>Amanita</i> cf. <i>tuza</i> Guzmán VC	ECM	B	kichimon blanca
<i>Armillaria</i> cf. <i>mellea</i> (Vahl) P. Kumm. VC	Parásito	M	nr
<i>Calvatia</i> sp. VC	Saprobio	M, C	Serenos
<i>Cantharellus cibarius</i> L.: Fr. VC, J	ECM	B, M, E	hongito de pericón
<i>Clitocybe gibba</i> (Pers.) P. Kumm. VC	Saprobio	C, M	tejamanil
<i>Cortinarius</i> sp. VC	ECM	B, M	bandejo
<i>Hydnum imbricatum</i> L. VC	ECM	B	cardita
<i>Hydnum repandum</i> L. VC, J	ECM	B, M, E	cardita
<i>Hygrophorus russula</i> (Schaeff.) Kauffman VC	ECM	B, M	nr
<i>Lactarius</i> aff. <i>gerardii</i> Peck. VC	ECM	B	lechero
<i>Lactarius indigo</i> (Schwein.) Fr. VC	ECM	B, M	chuin
<i>Lactarius</i> sp. 1 VC	ECM	B	lechero
<i>Lactarius</i> sp. 2 VC	ECM	B	lechero
<i>Leccinum</i> aff. <i>aurantiacum</i> (Bull.) Gray VC, J	ECM	B	blanca
<i>Leccinum</i> sp. 1 VC	ECM	B	cema morada
<i>Leccinum</i> sp. 2 VC	ECM	B	de escoba
<i>Leccinum</i> sp. 3 VC	ECM	B	cema amargosa
<i>Lycoperdum perlatum</i> Pers. VC	Saprobio	C, M	bolitas de la paloma
<i>Lyophyllum</i> sp. VC	Saprobio	C	clavito
<i>Ramaria</i> aff. <i>flava</i> (Schaeff.) Quél. J	ECM	B, M	nr
<i>Ramaria</i> aff. <i>gelatinosa</i> Holmsk. VC	ECM	B	patita de pájaro
<i>Ramaria araiospora</i> var. <i>araiospora</i> Marr & D.E. Stuntz VC, J	ECM	B	patita de pájaro
<i>Ramaria</i> cf. <i>fennica</i> (P. Karst.) Kicken VC	ECM	B	nr
<i>Ramaria</i> cf. <i>holorubella</i> (G.F. Atk) Corner VC	ECM	B, E	patita de pájaro
<i>Ramaria</i> cf. <i>rasilispora</i> Marr & D.E. Stuntz VC	ECM	B	patita de pájaro
<i>Ramaria</i> cf. <i>rubrievanescens</i> Marr & D.E. Stuntz VC, J	ECM	B, E	patita de pájaro
<i>Ramaria pallida</i> Maire J	ECM	B	nr
<i>Ramaria</i> sp. VC	ECM	B	patita de pájaro, tembloncita
<i>Russula</i> cf. <i>lutea</i> (Huds.) Gray. J	ECM	B	nr
<i>Russula cyanoxantha</i> (Schaeff.) Fr. J	ECM	B, M	nr
<i>Russula delica</i> Fr. J	ECM	B, M	nr
<i>Russula lepida</i> Fr. VC	ECM	B	honguito de madroño
<i>Russula</i> sp. VC	ECM	B	honguito de madroño
<i>Tricholoma equestre</i> (L.) P. Kumm. VC	ECM	B, M	honguito de escorpión

nr= no registrado ,ECM= ectomicorrízico, B= biotecnológico, M= medicinal, E= exportación, C= cultivable

*Propiedades nutritivas y medicinales.* Los hongos comestibles silvestres poseen en general un bajo contenido de grasas, carbohidratos y alto contenido de proteínas (20-30% de peso seco), aminoácidos y minerales. Especies como *A. caesarea*, *R. flava* y *L. perlatum* tienen porcentajes que superan el 30% de contenido proteico (Cuadro 2), en comparación con especies vegetales como el trigo que contiene 13.2% de proteína (Colak *et al.*, 2009a; Ouzouni *et al.*, 2009). *Tricholoma equestre* contiene aminoácidos esenciales como la aspargina, glutamina y serina. *Amanita rubescens* (Figura 1c) contiene principalmente ácido glutámico, lisina y alanina (Ribeiro *et al.*, 2008), mientras que *C. cibarius* tiene treonina y lisina (Beluham y Ranogajec, 2011). *C. cibarius*, *A. mellea* y *L. auratiacum* son ricos en vitamina A, B, C, D<sub>2</sub> y E (Muszyńska *et al.*, 2011). *R. cyanoxantha* tiene altas concentraciones de selenio que pueden cubrir los requerimientos en la dieta humana (Sanmee *et al.*, 2003) (Cuadro 3). Adicionalmente, el selenio tiene efecto anticancerígeno contra cáncer de próstata (Zaidman *et al.*, 2005).

En épocas prehispánicas, en México los pueblos indígenas como los matlatzincas, un grupo relacionado con los otomíes, utilizaban a los hongos silvestres como vehículo para contactar a sus dioses y curar enfermedades. Las comunidades indígenas utilizan hongos para tratar 46 padecimientos en el país. *L. indigo* es usado como purgante por el grupo Tzeltal en Chiapas y *Calvatia* spp. son utilizadas para tratar quemaduras, piquetes de insectos, cortadas o irritaciones de la piel (Guzmán, 2008). Los hongos silvestres contienen compuestos contra enfermedades como el cáncer, Alzheimer, VIH, diabetes e hipertensión (Wasser, 2011). De las especies encontradas algunas son usadas para tratar cáncer colorrectal, Alzheimer y enfermedades crónico degenerativas (Cuadro 3). *Calvatia* spp. inhibe el crecimiento de bacterias *Gram* positivas, mediante la producción de ácido calvático (Coetzee y Van Wyk, 2009) y *C. cibarius* tiene actividad antimicrobiana sobre *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Barros *et al.*, 2008).



**Figura 3.1.** **a** Venta de hongos silvestres en el mercado de Villa del Carbón, Estado de México, **b** Venta de *Ramaria* spp. en China, **c.** *Lactarius indigo*, especie con potencial biotecnológico, **d** *Lycopodium perlatum* especie saprobia que puede ser cultivada a lo largo del año, **e** *Amanita rubescens* es una especie comestible rica en aminoácidos esenciales, **f** *Armillaria mellea* tiene propiedades antitumorales y antioxidantes.

**Cuadro 3.2.** Propiedades nutritivas de los hongos comestibles silvestres identificados en los mercados estudiados.

Especies	Proteína	Grasa	Carbohidratos	Macronutrientos				Micronutrientos					Referencia¶	
				P	K	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu	B		Se
	g/100g			mg/g				µg/g						
<i>Amanita caesarea</i>	34.77	3.5	55.63	10.3	90.2	0.4	833.1	356.9	65.65	47.99	19.32	nr	nr	4
<i>Amanita rubescens</i>	17.5	8.3	nr	8.2	49.3	0.6	0.8	65.4	165	30.5	nr	nr	nr	3, 5
<i>Armillaria mellea</i>	24.47	2.1	65.4	5.98	24.13	0.045	1063.1	499	54.12	55.59	17.38	2.7	3.1	1,4
<i>Cantharellus cibarius</i>	21.57	2.88	66.07	0.64	16.5	0,9	866.3	118.2	54.29	22.09	32.49	nr	nr	2,4
<i>Clitocybe gibba</i>	nr	nr	nr	2.98	19.9	1.09	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	2
<i>Hydnum repandum</i>	3.14	8.8	55	10.44	40.81	7.86	3167	1889.6	46.1	30.4	12.5	2.3	1.6	1
<i>Hygrophorus russula</i>	32.47	6	53.33	nr	nr	nr	758.4	300.7	57.01	34.14	9.44	nr	nr	4
<i>Lycoperdum perlatum</i>	44.93	10.58	42	2.08	13.7	1.02	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	1,2
<i>Ramaria flava</i>	35.55	2.1	65	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	1
<i>Russula delica</i>	26.1	2.88	66.07	2.37	18.7	1.01	688.7	81.8	56.58	16.61	51.71	6.7	2.9	2,4
<i>Russula lepida</i>	18.3	5.6	60.1	4.1	35,3	0.1	0.7	228	108	24.2	52.8	7.1	nr	6

¶ 1) Colak *et al.*, 2009a; 2) Gençcelep *et al.*, 2009; 3) León-Guzmán, 1997; 4) Ozouni *et al.*, 2009; 5) Rudowska y Leski, 2005; 6) Sanmee *et al.*, 2003; nr= no registrado.

**Cuadro 3.3.** Propiedades medicinales de los hongos silvestres comestibles y los compuestos activos identificadas.

<b>Especie</b>	<b>Compuesto activo</b>	<b>Propiedad medicinal</b>	<b>Referencia¶</b>
<i>Amanita caesarea</i>	Ácido ascórbico	Antiinflamatorio, antioxidante	2
<i>Amanita rubescens</i>	Compuestos polifenólicos y ácido ascórbico	Antioxidante	2
<i>Armillaria mellea</i>	Compuestos indólicos y triptamina	Antitumoral, somnífero, antioxidante	2, 3, 5
<i>Cantharellus cibarius</i>	Compuestos polifenólicos, indólicos y flavonoides; ácido ascórbico, tocoferoles y $\beta$ -carotenos.	Antitumoral, antioxidante, antimicrobiano, previene Alzheimer, mejora la vista, la digestión, las infecciones respiratorias y gastrointestinales,	2, 3, 5
<i>Clitocybe gibba</i>	nr	Febrífugo	2
<i>Hydnum repandum</i>	Repandiol	Antitumoral, antioxidante	1,3
<i>Lactarius indigo</i>	nr	Laxante, purgante, antiséptico	2
<i>Lycoperdum perlatum</i>	Compuestos polifenólicos, ácido ascórbico, tocoferoles y $\beta$ -carotenos	Bocio, incontinencia infantil, inflamación, detumescencia, hemostasia, descongestionante, desintoxicación, antioxidante	2,3
<i>Ramaria aff. flava</i>	Compuestos fenólicos y flavonoides	Antitumoral, antioxidante.	4,3
<i>Russula cyanoxantha</i>	Compuesto fenólicos y ácidos orgánicos	Antitumoral, antioxidante.	3
<i>Russula delica</i>	Tocoferoles, $\beta$ -carotenos y compuestos flavonoides	Antitumoral, antioxidante.	3,4
<i>Tricholoma equestre</i>	Triptamina y serotonina	Antioxidante, antitumoral con efecto sobre el adenocarcinoma colorrectal, Alzheimer	5

nr= no registrado; ¶1) Dembitsky, 2006; 2) Guzmán, 2008; 3) Dai *et al.*, 2010; 4) Gursoy *et al.*, 2010; 5) Muszyńska *et al.* 2011.

*Potencial biotecnológico, industrial e insecticida.* Los hongos son organismos fundamentales en el reciclaje nutrimental de ecosistemas forestales. Específicamente los hongos ectomicorrízicos forman una asociación simbiótica mutualista con especies vegetales de importancia forestal y unen a las plantas con el suelo a través de redes miceliarias (Smith y Read, 2008). De las 32 especies ectomicorrízicas identificadas en el presente trabajo, algunas especies pueden ser utilizadas en la producción de inoculantes de interés forestal. *C. cibarius*, *A. caesarea* y *L. indigo* podrían ser utilizadas como inóculo potencial con fines de reforestación utilizando árboles originarios de la región. *L. indigo* a pesar de haber sido poco estudiada de manera biotecnológica (Flores *et al.*, 2005) (Figura 1d), ha sido inoculado exitosamente en *Pinus* spp., *A. caesarea* y *C. cibarius* también han sido inoculadas exitosamente en especies forestales (Meotto *et al.*, 1999; Danell y Camacho, 2003).

*Clitocybe gibba*, *Lycoperdum perlatum* (Figura 1e), *Lyophyllum* sp. y *Calvatia* sp., son especies saprobias que podrían ser cultivadas a lo largo del año y constituir una opción alimenticia para el mercado local. *Armillaria mellea* (Figura 1f) es preservada en aceite de oliva en Sicilia por lo que puede ser consumida a lo largo del año (Lentini y Venza, 2007), y podría ser una conserva atractiva para la comunidad en estudio. La extracción de compuestos enzimáticos como las esterasas a partir de los hongos silvestres comestibles tiene uso potencial en la industria alimenticia y farmacéutica. Por ejemplo, i) extractos de *L. perlatum* poseen capacidad esterolítica, que puede ser aprovechada en la producción de quesos, saborizantes y aceites (Colak *et al.*, 2009b); ii) *Calvatia* spp. presentan lipasas, capaces de disgregar las grasas, útiles para la producción de detergentes y en la industria de leche y quesos (Coetzee y van Wyk, 2009); y iii) *L. aurantiacum*, *R. cyanoxantha*, *A. rubescens*, *C. cibarius* y *T. equestre*, presentan compuestos volátiles como benzaldehído, y alcoholes con olores característicos, con potencial de uso en la

industria de la perfumería (Guedes de Pinho *et al.*, 2008). Finalmente, se han encontrado sustancias como las lectinas y hemolisinas que presentan propiedades insecticidas, por ejemplo, *C. cibarius* contiene un compuesto denominado ácido cibárico, el cual sirve para el control de *Drosophila melanogaster* (Mier *et al.*, 2006). La búsqueda de este último tipo de compuestos representa una línea de investigación de enorme originalidad para el control biológico.

### **3.5 CONCLUSIONES**

El área de estudio posee una amplia diversidad genética micológica, la cual puede ser aprovechada desde enfoques alimenticios, biotecnológicos, medicinales e industriales, usos que permitirían a las comunidades un desarrollo sustentable de su aprovechamiento forestal.

### **3.6 LITERATURA CITADA**

BARROS L.; CRUZ T.; BAPTISTA P.; ESTEVINHO L. M.; FERREIRA C. F. R. I. 2008. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem Toxicol* 46: 2742-2747.

BELUHAM S.; RANOGAJEC A. 2011. Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chem* 124: 1076-1082.

BOA E. 2004. Wild edible fungi: a global overview of their use and importance to people. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. *Fao Technical Paper Non-Wood Forest Products No. 17.*

COETZEE C. J.; VAN WYK A. 2009. The genus *Calvatia* ("Gasteromycetes", Lycoperdaceae): a review of its ethnomycological and biotechnological potential. *African J Biotechnol* 8: 6007-6015.

- COLAK A.; CAMEDAN Y.; FAIZ Ö.; SESLI E.; KOLONOĞLLE Y. (b) 2009. An esterolytic activity from a wild edible mushroom *Lycoperdon perlatum*. J Food Biochem 33: 482-499.
- COLAK A.; FAIZ O.; SESLI E. (a) 2009. Nutritional composition of some wild edible mushrooms. Turk J Biochem 34: 25-31.
- DAI Y.-C.; YANG Z.-L.; CUI B.-K.; YU C.-J.; ZHOU L.-W. 2009. Species diversity and utilization of medicinal mushrooms and fungi in China (Review). Int J Med Mushrooms 11: 287-302.
- DANELLE E.; CAMACHO J. F. 2003. Successful cultivation of the golden chanterelle. Nature 385: 303.
- DEMBITSKY M.V. 2006. Anticancer activity of natural and synthetic acetylenic lipids. Lipids 41:883-924.
- EHLERS T.; HOBBY T. 2010. The chanterelle mushroom harvest on northern Vancouver Island, British Columbia: Factors relating to successful commercial development. BC J Ecosys Manag 11:72-83.
- FLORES R.; DÍAZ G.; HONRUBIA M. 2005. Mycorrhizal synthesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. with five Neotropical pine species. Mycorrhiza 15: 563-570.
- GENCCELEP H.; UZUN Y.; TUNCTURK Y.; DEMIREL K. 2009. Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms. Food Chem 113:1033-1036.

- GUEDES DE PINHO P.; RIBEIRO B.; GONZALVES F. R.; BAPTISTA P.; VALENTÃO P.; SEABRA M.; ANDRADE B.P. 2008. Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms. *J Agri Food Chem* 56: 1704-1712.
- GURSOY N.; SARIKURKCU C.; TEPE B.; SOLAK M.H. 2010. Evaluation of antioxidant activities of 3 edible mushrooms: *Ramaria flava* (Schaeff.: Fr.) Quéf., *Rhizopogon roseolus* (Corda) T.M. Fries., and *Russula delica* Fr. *Food Sci Biotechnol* 19: 691-696.
- GUZMÁN G. 2008. Diversity and use of traditional Mexican medicinal fungi. A review. *Inter J Med Mushroom*. 10: 209-217.
- HAWKSWORTH D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycol Res* 13:89-125.
- LARGENT D. L. 1973- 1977. How to identify mushrooms to genus I- III. Mad. River Press Inc. California.
- LENTINI F.; VENZA F. 2007. Wild food plants use in Sicily. *J Ethnobiol Ethnomed* 3:1-12.
- LEÓN-GUZMÁN M. F.; SILVA I.; LÓPEZ M.G. 1997. Proximate Chemical Composition, Free Amino Acid Contents, and Free Fatty Acid Contents of Some Wild Edible Mushrooms from Querétaro, México. *J Agr Food Chem* 45: 4329–4332.
- MEOTTO, F., PELLEGRINO, S. AND BOUNOUS, G. 1999. Evolution of *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Pers. and *Boletus edulis* Bull.: Fr. Synthetic ectomycorrhizae

- on European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Seedlings under field conditions. *Acta Horticulture* 494:201-206.
- MIER N.; CANETE S.; KLAEBE A.; CHAVANT L.; FOURNIER D. 1996. Insecticidal properties of mushrooms and toadstool carpophores. *Phytochem* 41: 1293-1299.
- MUSZYŃSKA B.; SUŁKOWSKA-ZIAJA K.; EKIERT H. 2011. Indole compounds in fruiting bodies of some edible *Basidiomycota* species. *Food Chem* 125:1306-1308.
- OUZOUNI P. K.; PETRIDIS D.; KOLLER W-D.; RIGANAKOS A. K. 2009. Nutritional value and metal content of wild edible mushrooms collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chem* 115: 1575-1580
- RIBEIRO B.; ANDRADE P. B; SILVA B. M.; BAPTISTA P.; SEABRA R. M. VALENTÃO P. 2008. Comparative Study on Free Amino Acid Composition of Wild Edible Mushroom Species. *J Agri Food Chem* 56: 10973–10979.
- RINALDI A. C.; COMANDINI O.; KUYPER T.W. 2008. Ectomycorrhizal fungal diversity : separating the wheat from the chaff. *Fungal Diversity* 33:1-45.
- RUDAWSKA M.; LESKI T. 2005. Macro- and microelement contents in fruiting bodies of wild mushrooms from the Notecka forest in west-central Poland. *Food Chem* 92:499-506.
- SANMEE R.; DELL B.; LUMYONHG P.; IZUMORI Z.; LUMYONG S. 2003. Nutritive value of popular wild edible mushroom from northern Thailand. *Food Chem* 82: 527-532.

SASATA R. 2011. Página Web: <http://healing-mushrooms.net/about-this-website>  
consultada en Enero 2011.

SMITH S.E.; READ D. J. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. 3a Edition. Elsevier .

WASSER S. P. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 1323-1332.

ZAIDMAN B.-Z.; YASSIN M.; MAHAJNA J.; WASSER P. S. 2005. Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 453-46

## CAPÍTULO IV

### ONTOGENIA DE LA MICORRIZA SINTETIZADA ENTRE *Pinus pseudostrobus* Y *Hebeloma mesophaeum* Y MORFOTIPOS “CONTAMINANTES”

#### 4.1 RESUMEN

La caracterización de los morfotipos presentes en las raíces cortas de las especies de interés forestal representa una herramienta taxonómica importante para la identificación de las especies de hongos ectomicorrízicos. *Pinus pseudostrobus* fue inoculado con el hongo comestible ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum*, se evaluó mensualmente el desarrollo y avance de la asociación simbiótica, así mismo se caracterizó el morfotipo generado por este hongo. La colonización de las raíces inició dos meses después de la inoculación y alcanzó un nivel de 61% a los 7 meses. El morfotipo de *Hebeloma mesophaeum* presentó una longitud de 1 a 4 mm, diámetro de la base de 200 a 400  $\mu\text{m}$  y la terminación del ápice fue recto; presentó hifas emanantes abundantes y el manto tuvo un grosor de 16 a 22  $\mu\text{m}$ , en un arreglo plectenquimatoso; las hifas, cilíndricas, penetraron hasta la tercera capa de células corticales formando la red de Hartig. A lo largo de los muestreos se encontraron morfotipos diferentes a *H. mesophaeum* los cuales fueron caracterizados aunque en menor detalle. Es necesario continuar la caracterización de estos morfotipos así como su identificación a nivel molecular y su aislamiento PDA para su posible uso como inoculantes.

*Palabras clave:* Colonización, morfotipos, red de Hartig, manto, hifas emanantes.

#### 4.1 ABSTRACT

The characterization of morphotypes in short roots of species of forestry interest represents an important taxonomic tool for identification of ectomycorrhiza fungal species. *Pinus pseudostrobus* was inoculated with the ectomycorrhizal edible mushroom *Hebeloma mesophaeum*, the development of the symbiosis association was evaluated every month, the morphotype formed between *H. mesophaeum* and *P. pseudostrobus* was characterized. The colonization of the roots began two months after inoculation and reached a level of 61% at 7 months. The morphotype of *Hebeloma mesophaeum* has a length of 1 to 4 mm, base diameter of 200 to 400 microns and the completion of the apex was right; abundant emanating hyphae presented and mantle had a thickness of 16 to 22 microns, an arrangement plectenquimatoso; cylindrical hyphae, penetrated to the third layer of cortical cells forming the Hartig net. Throughout the samples were morphotypes different to *H. mesophaeum* which were characterized in detail. We must continue to characterize these morphotypes and their molecular identification and isolation level PDA for possible use as inoculants.

Keywords: Colonization, morphotypes, Hartig net, mantle, emanating hyphae.

#### 4.2 INTRODUCCIÓN

El término suelo deriva del latín *solum* para referirse a la capa superior de la Tierra que puede ser cavada o arada y en la cual crecen las plantas (Chesworth, 1998). El suelo es un sistema complejo en el cual se desarrollan procesos físicos, químicos y biológicos. Dentro de los ecosistemas naturales existen siete tipos de asociaciones micorrízicas, de las cuales dos son las más abundantes, la micorriza arbuscular y la ectomicorriza (Allen *et al.* 2003). La micorriza arbuscular se asocia con 80% de las plantas vasculares mientras que la ectomicorriza se asocia con 3 % de las familias de plantas vasculares (Gimnospermas y Angiospermas) (Brundrett, 2002). Los hongos que forman dicha asociación pertenecen a los Basidiomycetes y Ascomycetes (Hibbett *et al.*, 2000). Los hongos ectomicorrízicos juegan un papel importante dentro del ecosistema debido a que mantienen la conexión entre los árboles y el suelo (Pérez-Moreno y Read, 2004). Estos hongos conectan e integran a las raíces de múltiples árboles a través de redes miceliales, a lo largo de las cuales son trasladados elementos esenciales para el desarrollo de la planta, como el nitrógeno, fósforo,

hierro, magnesio, azufre y zinc, hasta la raíz del árbol en donde se lleva el intercambio de carbohidratos y minerales (Harrison, 1999). La ectomicorriza está constituida por tres estructuras fundamentales: la red de Hartig, el manto y el micelio extrarradical. Cada una de estas estructuras juega un papel importante para el mantenimiento de la simbiosis ectomicorrízica.

Diversas investigaciones han demostrado (Agerer, 2001; Agerer, 2006; Wei *et al.*, 2009; Wei y Agerer, 2011) que cada hongo ectomicorrízico genera una morfología y anatomía característica independientemente de los fitobiontes asociados. Adicionalmente, al igual que cualquier estructura biológica existe una dinámica variable en la fisiología de la simbiosis la cual puede ser registrada desde el punto de vista morfológico a la cual se le denomina ontogenia. A diferencia de países como Alemania, Canadá y los Estados Unidos de Norteamérica, en México la caracterización macro- y micromorfológica de los morfotipos ectomicorrízico-ectomicorrízicos, así como la ontogenia de los mismos ha sido escasamente estudiada a pesar de la enorme relevancia que representa para la identificación de los micobiontes presentes. En el presente trabajo se describe el morfotipo formado por *Hebeloma mesophaeum* y *Pinus pseudostrobus* así como su ontogenia. Adicionalmente se presentan algunos de los morfotipos “contaminantes” observados al analizar las raíces de las plantas evaluadas y que no coinciden con *H. mesophaeum*, con fines comparativos.

## **4.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***4.3.1 Montaje del experimento***

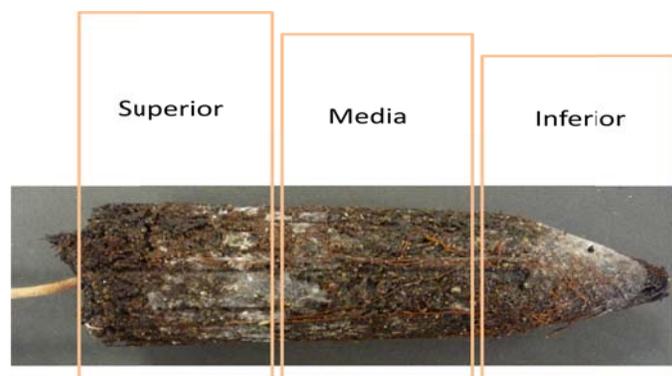
El inóculo de *H. mesophaeum* procedió del mercado de Ozumba localizado en el estado de México. Los esporomas fueron seleccionados y separados de acuerdo a las características

macroscópicas especificadas por Largent (1973). Se identificaron las especies de: *Hebeloma mesophaeum*, *H. leucosarx* y *H. alpinum*. Se eligió *H. mesophaeum* debido a que fue la especie más abundante. Una vez seleccionada se utilizaron únicamente los píleos, estos se deshidrataron a 35°C, se molieron y almacenaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL a una temperatura de 5°C. Paralelamente, se preparó una mezcla de arena: suelo: corteza en proporción 2:2:1. El sustrato fue esterilizado en costales de manta por 6 horas a 120°C. Las semillas fueron seleccionadas por criterios de tamaño (grande, mediana y chica). Una vez separadas por tamaño fueron sumergidas, por separado, en agua corriente por 24 horas, el agua se cambió cada 6 horas. Transcurridas 24 horas se eliminó el agua y se agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% para la escarificación de la semilla. Las semillas se remojaron 20 minutos en peróxido de hidrógeno, con agitación constante. Pasado el tiempo establecido se eliminó el peróxido de hidrógeno y las semillas fueron enjuagadas con agua destilada estéril hasta eliminar el exceso. Las semillas fueron sembradas en charolas de germinación, para esto, se colocó una capa del sustrato y sobre esta se colocaron las semillas que se cubrieron con otra capa de alrededor de 1 cm de sustrato. Las charolas fueron cubiertas con papel manila para evitar contaminación, reducir la iluminación y mantener la humedad para la germinación. Las semillas fueron regadas cada tercer día para mantener la humedad constante. Una vez emergidas, las plántulas se mantuvieron en las charlas por 4 meses y posteriormente se transplantaron a tubetes de plástico de 140 mL de colúmen. Los tubetes previamente se lavaron y desinfectaron con cloro comercial, y luego se secaron y desinfectaron con alcohol, para después se llenados con el sustrato a 80% de su capacidad. De igual manera se usó tezontle esterilizado para cubrir la parte inferior y superior del tubete. Se realizaron dos inoculaciones con *H. mesophaeum*, la concentración de esporas

en cada dosis fue de al menos  $10^7$  a  $10^8$  esporas, la primera se realizó al transplante y la segunda tres meses después del transplante.

#### **4.3.2 Variables evaluadas**

Las plantas fueron cosechadas a 30, 60, 90, 120, 150, 180 y 210 días después de la siembra, se tomaron tres individuos por tratamiento elegidos de manera aleatoria. Los pinos fueron regados con abundante agua un día antes de que fueran muestreados. Se extrajeron los cepellones completos de cada una de las plantas de las cuales la parte radical fue limpiada para eliminar el sustrato, para ello se sumergió en agua agitándose cuidadosamente para obtener la raíz íntegra, la parte aérea se cortó y secó a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. La raíz se examinó en fresco para evaluar la colonización ectomicorrízica. Con un microscopio estereoscópico se contó el número de raíces cortas vivas, micorrizadas y muertas, siguiendo las técnicas propuestas por Grand y Harvey (1982), Castellano y Molina (1989) y Marx *et al.* (1994). El cepellón fue dividido en tres partes, con la finalidad de realizar un conteo más específico (Figura 4.1). Finalmente, los sistemas radicales fueron secados a  $80^{\circ}\text{C}$  y se pesaron. Se eligieron 10 raíces principales con raíces cortas ectomicorrizadas para hacer cortes y corroborar que la simbiosis estaba presente.



**Figura 4.1.** Porciones analizadas del cepellón de *P. pseudostrobus*.

Las raíces colonizadas se conservaron en viales de 1.5 mL en agua destilada a 5 °C, hasta su análisis. Los cortes de los morfotipos se realizaron utilizando un microscopio estereoscópico, se eligieron aquellos morfotipos con poco micelio extraradical, estos se colocaron uno a uno en parafilm y se realizaron cortes finos, se seleccionaron aquellos cortes más delgados para elaborar preparaciones fijas. Para teñir el micelio se utilizó el reactivo de Melzer, azul de algodón (0.5%), azul de Toluidina (1%), fucsina ácida (0.5%) y rosa de bengala (1%). En estos cortes se observaron el manto y la red de Hartig. Para observar el arreglo del manto se desprendió el manto cuidadosamente de la raíz y se tiñó con los colorantes mencionados anteriormente. Las preparaciones se observaron en un microscopio Leica MD 1000, las estructuras observadas se fotografiaron con ayuda de la cámara modelo Leica DFC 290. La descripción de las características micromorfológicas se realizó de acuerdo a los criterios de Agerer (2010). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statistical Analysis System 9.0, el análisis aplicado fue la prueba de comparación de medias Tukey con un  $\alpha=0.05$ .

#### **4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### **4.4.1 Descripción de *Hebeloma mesophaeum***

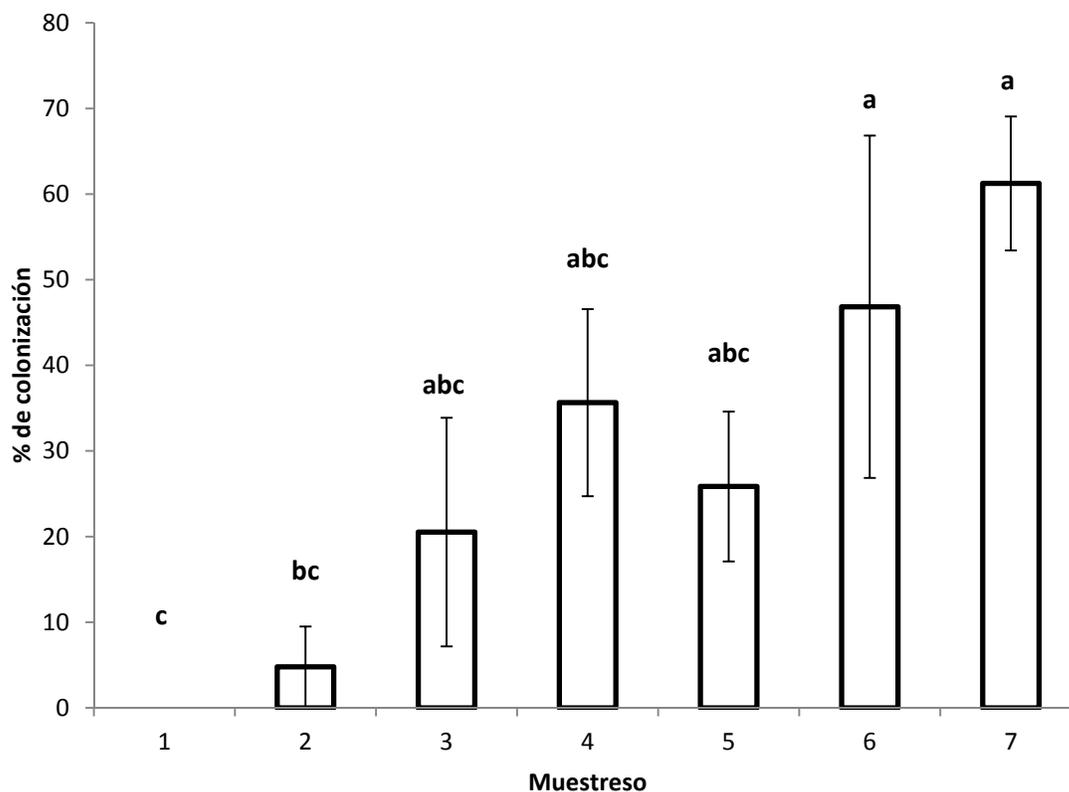
Píleo convexo de 30-60 mm, de color café claro tendiendo a crema. Láminas libres más o menos separadas, de color café ligeramente oscuro sobre todo en ejemplares de estadio maduro. Estípite cilíndrico de 2-6 mm de ancho y una longitud de 35-42 mm, color crema. Esporas amigdaliformes, de color café, con ornamentación punteada y longitud de 8.6  $\mu\text{m}$  y 4.6  $\mu\text{m}$  de ancho (Carrasco-Hernández, 2010). *H. mesophaeum* forma asociaciones ectomicorrízicas con *Pinus* spp., *Picea* spp., *Betula pendula*, *Fagus sylvatica*, *Quercus robur*, *Populus nigra* y *Pseudotsuga menziesii*. En países europeos es considerada como

una especie tóxica (Valenzuela *et al.*, 1996), sin embargo, en México es considerada por grupos indígenas como un alimento saludable (Pérez-Moreno *et al.*, 2010).

Por su parte, la distribución de *Pinus pseudostrobus* Lindl. se extiende desde el sur de Guatemala hasta el noroeste de México, entre las coordenadas 16° 20' y 19° 58' N y 92° 20' a 100° 35' O. *P. pseudostrobus* está adaptado a climas de templado-frío a templado-cálido; se localiza en elevaciones de 1900 a 3000 m (Farjon y Styles 1997), con precipitación anual entre 800 y 1500 mm. Sus mejores calidades se presentan a altitudes de 2000 a 2400 m, en suelos volcánicos profundos con precipitación anual de aproximadamente 1500 mm (Perry, 1991). Los sitios donde se encuentra *P. pseudostrobus* se caracterizan por presentar un intervalo de temperatura anual de -9 a 40 °C (López-Upton, 2002). Es una especie versátil, forma masas puras extensas o se asocia con *Pinus montezumae* Lamb., *P. douglasiana* Mart., *P. michoacana* Mart., *P. maximinoi* Moore, *P. leiophylla* Schl. et Cham., *P. ayacahuite* Ehrenb., *P. patula* Schl. Et Cham., *P. cembroides* Zucc., *P. rudis* Endl., *P. pringlei* Shaw., *Abies religiosa* (Kunth) Schltr. & Cham., *Juniperus* sp. y con algunas hojosas de los géneros *Quercus* sp. y *Arbutus* sp., *Buddleia* sp. y *Dasylyrion* sp. Cuando *P. pseudostrobus* se encuentra asociado con otras especies, en las partes bajas con frecuencia es dominante y a medida que asciende su distribución tiende a ser más escaso (Perry, 1991; López-Upton, 2002). El crecimiento de éste pino es relativamente rápido, tiene buena forma de tronco y excelente calidad de la madera (López-Upton, 2002), por lo que es muy apropiado en el establecimiento de plantaciones comerciales.

#### **4.4.2 Evaluación del incremento en la dinámica de colonización ectomicorrízica**

La colonización del sistema de *P. pseudostrobus* inició dos meses después de la inoculación, la tendencia de la colonización fue aumentando constantemente a lo largo de los siete meses muestreados (Figura 4.2) existiendo diferencias significativas solo entre los muestreos 1, 6 y 7 (Cuadro 1). La disparidad de los datos pudo deberse a que el número de réplicas no fue más apropiada para esta clase de análisis. La colonización de *P. pseudostrobus* efectuada por *H. mesophaeum* pudo verse disminuida por la viabilidad del inóculo; se ha reportado que el porcentaje de germinación e infección de *Hebeloma mesophaeum* disminuye después de treinta días y raramente germina después de un año (Ishida *et al.*, 2008). La infectividad de *H. mesophaeum* podría haberse visto afectada por el tiempo de almacenamiento dado que el inóculo utilizado en el presente ensayo fue elaborado en 2009. A pesar de esto el porcentaje de colonización fue alto (61%) de acuerdo con los criterios de Obase *et al.*, (2009) quienes reportaron que 38% de colonización es un valor aceptable. La presencia marcada de raíces micorrizadas muertas se presentó hasta el sexto mes de muestreo, mientras que las raíces muertas sin micorrizar comenzaron a verse en el segundo muestreo de acuerdo con Marshall y Perry (1987) la longevidad de las raíces se ve incrementada en raíces micorrizadas debido a que el micelio al envolver la raíz disminuye la respiración de esta e incrementando el lapso de vida.



**Figura 4.2.** Porcentajes de colonización de *Hebeloma mesophaeum* en *Pinus pseudostrobus* durante ocho meses de evaluación. Barras con distintas letras son diferentes según Tukey  $p=0.05$ .

**Cuadro 4.1** Número de raíces cortas de *Pinus pseudostrobus* contabilizadas de acuerdo a su características morfológicas.

Tiempo <sup>¶</sup>	Raíces Vivas		Raíces muertas		
	NRCMV	NRCnoMV	NRCMM	NRCnoMM	NRCtotales
1	0a	533a	0b	8a	541b
2	1a	1400.3a	1.67ab	97.33a	1500.3ab
3	164.3a	1041.7a	7.33ab	29.67a	1243b
4	756a	1636a	11.33ab	62.67a	2466a
5	586a	1591.3a	5ab	9.33a	2192a
6	1348a	1244.7a	58.67a	48.67a	2700a
7	1585a	780a	27b	33.67a	2466.7a

¶ Meses muestreados. Letras iguales significan que no hay diferencias estadísticas significativas. Tukey  $p=0.05$   $n=3$ . NR= número de raíces; MV= micorrizadas vivas, noMV= no micorrizadas vivas, MM= micorrizadas muertas, noMM= no micorrizadas muertas.

#### **4.4.2 Ontogenia de *Hebeloma mesophaeum* en *Pinus pseudostrobus*.**

##### **4.4.2.1 Caracterización macromorfológica**

Una vez establecida la simbiosis, las raíces cortas comenzaron a modificarse (Figura 1a), la iniciación de la simbiosis comenzó con la inhibición del crecimiento de pelos radicales, posterior a esto la raíz se bifurcó hasta generar una estructura dicotómica con tres grados de bifurcación (Figura 4.3 c-h) lo cual concuerda con lo señalado por Aspray (2006). La raíz corta micorrizada tuvo una longitud de 1 a 4 mm, el diámetro de la base fue de 400  $\mu\text{m}$  y hacia las puntas de 200  $\mu\text{m}$ . La forma de la terminación del ápice fue recta y disminuyó en la parte distal; el ápice fue blanco en raíces jóvenes y café en raíces maduras o senescentes. Presenta hifas emanantes abundantes, de distribución aleatoria, son densas y de apariencia algodonosa, el manto era visible, la superficie fue lisa y no transparente. Las raíces senescentes presentaron una coloración de café oscuro a negruzco, con presencia de una abundancia de hifas emanantes las cuales cubren gran extensión de la raíz.

##### **4.4.2.2 Caracterización micromorfológica del morfotipo de *Hebeloma mesophaeum***

Las hifas de *H. mesophaeum* penetran la raíz hasta la tercera capa de células corticales, las hifas que las rodean son cilíndricas formando la red de Hartig (Figura 4.4b). El manto externo presenta un grosor de 16 a 22  $\mu\text{m}$ , el arreglo es plectenquimatoso (Figura 4.4 d), la apariencia del tejido es liso, las hifas que emanan del manto tienen un arreglo irregular, no presentan un patrón específico de distribución. El micelio extrarradical comienza a aparecer en el primer estadio aunque es incipiente (Figura 4.3 d). Una vez bien establecida la simbiosis el micelio extrarradical presenta un aspecto algodonoso denso, se encuentra conformado por hifas que en su conjunto dan una coloración blanca, no presenta rizomorfos

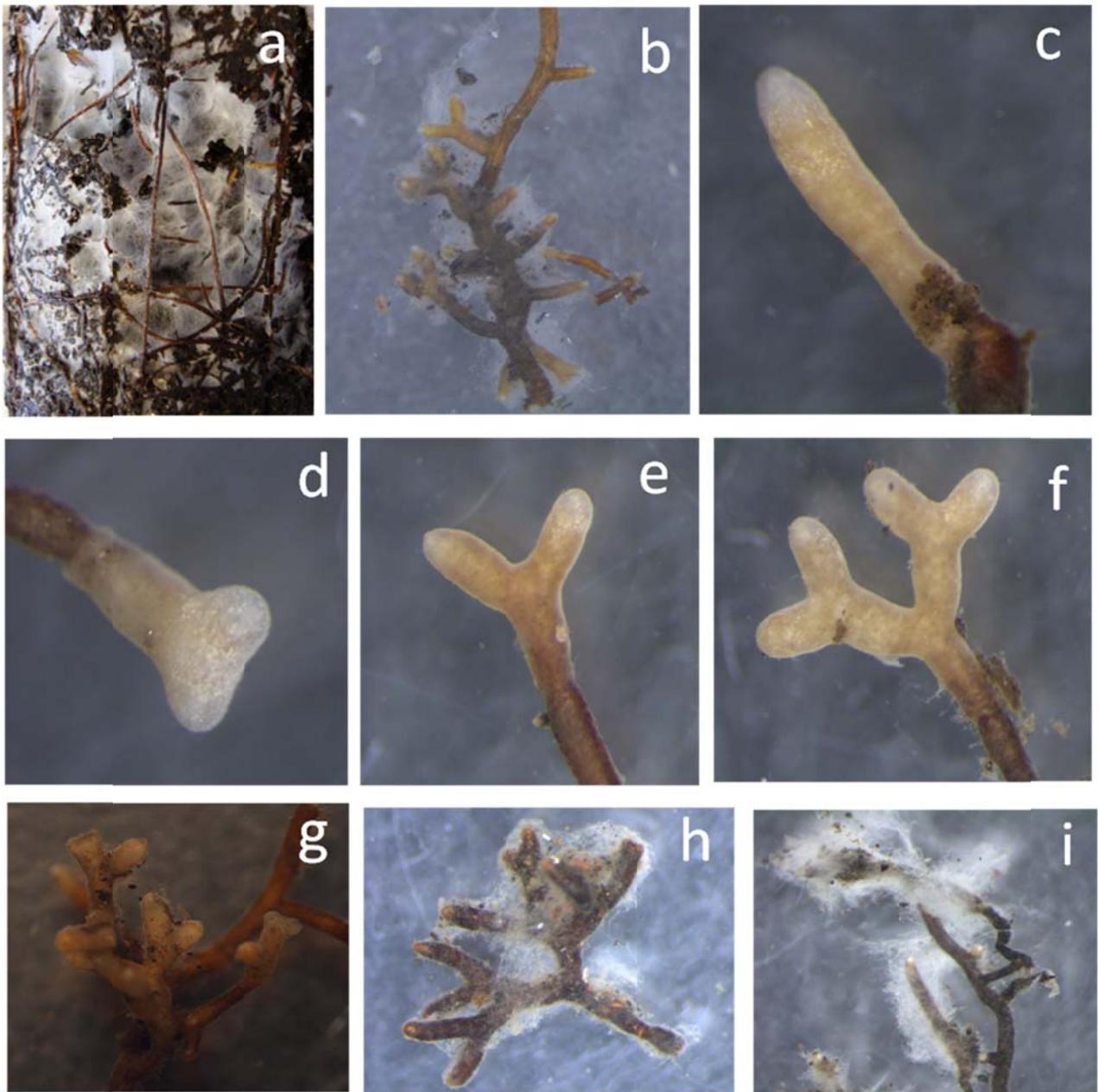
(Figura 4.4 a). Las hifas presentaron una superficie lisa, no son completamente rectas ni rígidas, carecen de células de pigmento siendo hialinas, presentó ramificaciones de tipo sutil con una sola ramificación (Figura 4.4 f), hubo presencia de fíbulas las cuales son muy abundantes (Figura 4.4 g), las fíbulas son en semicírculo, no presentaron poro. Hay unión en H entre las hifas aunque este tipo de uniones fue poco frecuente. El tipo de exploración del micelio extrarradical fue de distancia corta, ya que está caracterizada por la presencia de hifas emanantes envolventes y carece de rizomórfos (Agerer, 2001). Las hifas que conforman las estructuras se tiñeron al hacer contacto con el colorante de azul de Toluidina (Agerer y Rambold, 2011) y azul de algodón.

Se han reportado diferentes caracterizaciones de *H. mesophaeum*, dichas caracterizaciones han sido de morfotipos encontrados en campo (Agerer y Rambold, 2009; Obase *et al.*, 2007), y de un morfotipo sintetizado (Carrasco-Hernández, 2010). Dentro de las descripciones presentes en la literatura algunas de las características reportadas coincidieron con el morfotipo sintetizado en el presente trabajo como la longitud y el diámetro, el arreglo del manto, color, textura y tipo de ramificación (Cuadro 4.2), sin embargo, las caracterizaciones no siempre son completas debido a que se utilizan herramientas moleculares por lo que la descripción morfológica queda restringida a la descripción de características básicas (Obase *et al.*, 2007); en el presente trabajo se describen las características diagnósticas encontradas en forma resumida en el Cuadro 4.3. La variación de las características morfológicas no fueron significativas entre las diferentes descripciones por lo que se infiere que no son dependientes del fitobionte con el que se asocia el micobionte, sin embargo, las características pueden verse afectadas por las condiciones edáficas (Obase *et al.*, 2007).

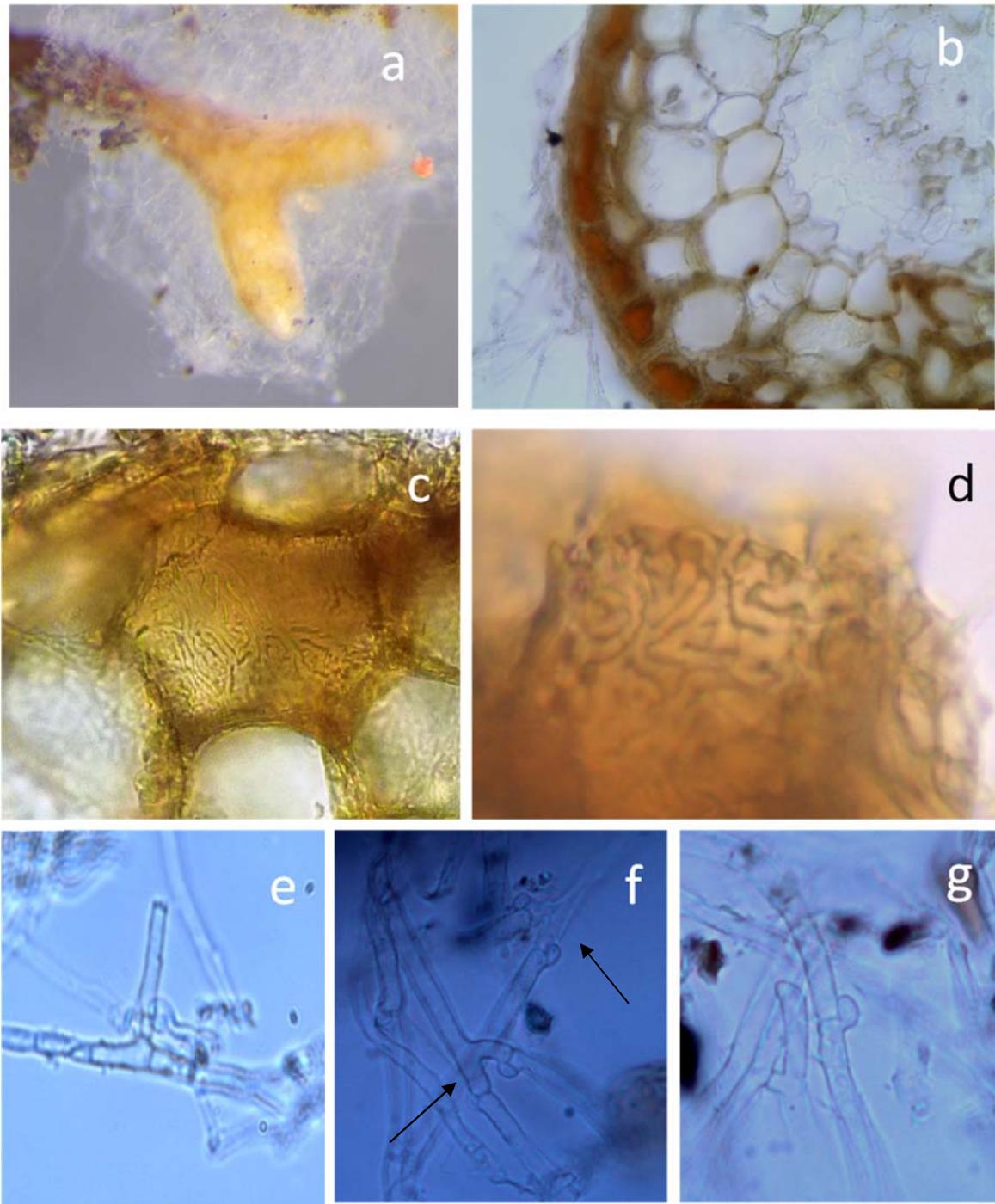
**Cuadro 4.2.** Características generales del morfotipo formado por *Hebeloma mesophaeum* asociado a diferentes fitobiontes.

Características	Caracterizaciones reportadas		
	Carrasco-Hernández, 2010 <sup>¶</sup>	Agerer y Rambold, 2009 <sup>β</sup>	Obase <i>et al.</i> , 2007 <sup>β</sup>
Longitud (mm)	1-4	10	nr
Diámetro(mm)	0.2	0.3-0.5	nr
Proporción base-ápice (mm)	2-1.4	nr	nr
Tipo de ramificación	dicotómica o ausente	dicotómica	simple, sin ramificaciones
Forma de las puntas no ramificadas	recta con ramificaciones cilíndricas	recta a inclinada	nr
Textura del manto	algodonoso	liso y plateado	nr
Color del ápice (estadio juvenil)	café	de blanco a café	nr
Color del ápice (estadio maduro)	blanco	café	nr
Color	blanco	blanco	blanco a café
Textura	algodonoso	algodonoso	algodonoso
Manto	plectenquimatoso	plectenquimatoso	sinenquimatoso, compuesto por hifas en arreglo paralelo abundante, 2-4µm de ancho,
Hifas emanantes	abundantes	abundantes	lisas a verrugosas, presencia de fibulas
Fitobionte	<i>Pinus patula</i> y <i>P. pseudostrobus</i>	<i>Pinus spp.</i>	<i>Populus maximowezii.</i>

<sup>¶</sup> Caracterización del morfotipo sintetizado , <sup>β</sup> caracterización del morfotipo encontrado en condiciones naturales.



**Figura 4.3** Ontogenia de la ectomicorriza formada entre *Pinus pseudostrobus* y *Hebeloma mesophaeum*. **a** Abundante micelio externo de *H. mesophaeum* en cepellón, **b** Vista general de las raíces cortas ectomicorrizadas, **c** Raíz simple micorrizada, **d** Raíz micorrizada la cual inicia la bifurcación de la raíz y la aparición de hifas emanantes, **e** Raíz corta micorrizada dicotómica, **f** Raíz dicotómica micorrizada de segundo orden, **g** y **h** Raíces micorrizadas de tercer orden con hifas emanantes abundantes, **i** Raíces secundarias micorrizadas senescentes con hifas emanantes muy abundante.



**Figura 4.4.** Micromorfología de las raíces ectomicorrizadas de *Pinus pseudostrobus* con *Hebeloma mesophaeum* **a** Raíz con abundante micelio extraradical blanco y algodonoso, **b-c** Red de Hartig presente en raíces cortas penetrando tres capas de células corticales, **d** Manto externo de *H. mesophaeum*, **e** Hifas compuestas por células cortas en el área de interfase del manto y el micelio extraradical, **f** Ramificaciones de hifas del micelio externo, **g** Fíbula semicircular de *H. mesophaeum* en hifas emanantes.

**Cuadro 4.3.** Características diagnósticas del morfotipo ectomicorrízico sintetizado presente entre *Pinus pseudostrobus* y *Hebeloma mesophaeum*.<sup>¶</sup>

<b>Características</b>	<b>Descripción</b>
Longitud	1-4 mm
Diámetro	200- 400 $\mu$ m
<b>Sistema micorrízico</b>	
tipo de ramificación	dicotómica
Ordenes de ramificación	tres
Abundancia	frecuente
Rizomorfos	no presenta
<b>Puntas sin ramificación</b>	
Forma	cilíndrica
Color	traslúcido a café
visibilidad de las células corticales	sí
<b>Manto</b>	
Grado de transparencia	no presenta transparencia
Superficie general	algodonosa
superficie específica	algodonosa
Hifas emanantes	lisas
Abundancia de hifas	abundantes
Distribución	no específica
Externo	plectenquimatoso
<b>Red de Hartig</b>	
Presencia	tercera capa de células corticales
Forma de la hifa	cilíndrica
Apariencia de la hifa	lisa
<b>Micelio extrarradical</b>	
Longitud de alcance	al menos de 1 mm
Diámetro	2-3 $\mu$ m
Apariencia	algodonosa
Color	blanco
Fíbulas	presentes
Poros en fíbulas	ausente
Tipo de fíbula	semicircular
Grosor de la fíbula	igual al del a hifa
Tipo de ramificación	sutil
Unión en H	presente aunque poco frecuente
Septos	no son visibles
Rizomorfos	ausentes
Tipo de exploración	distancia corta

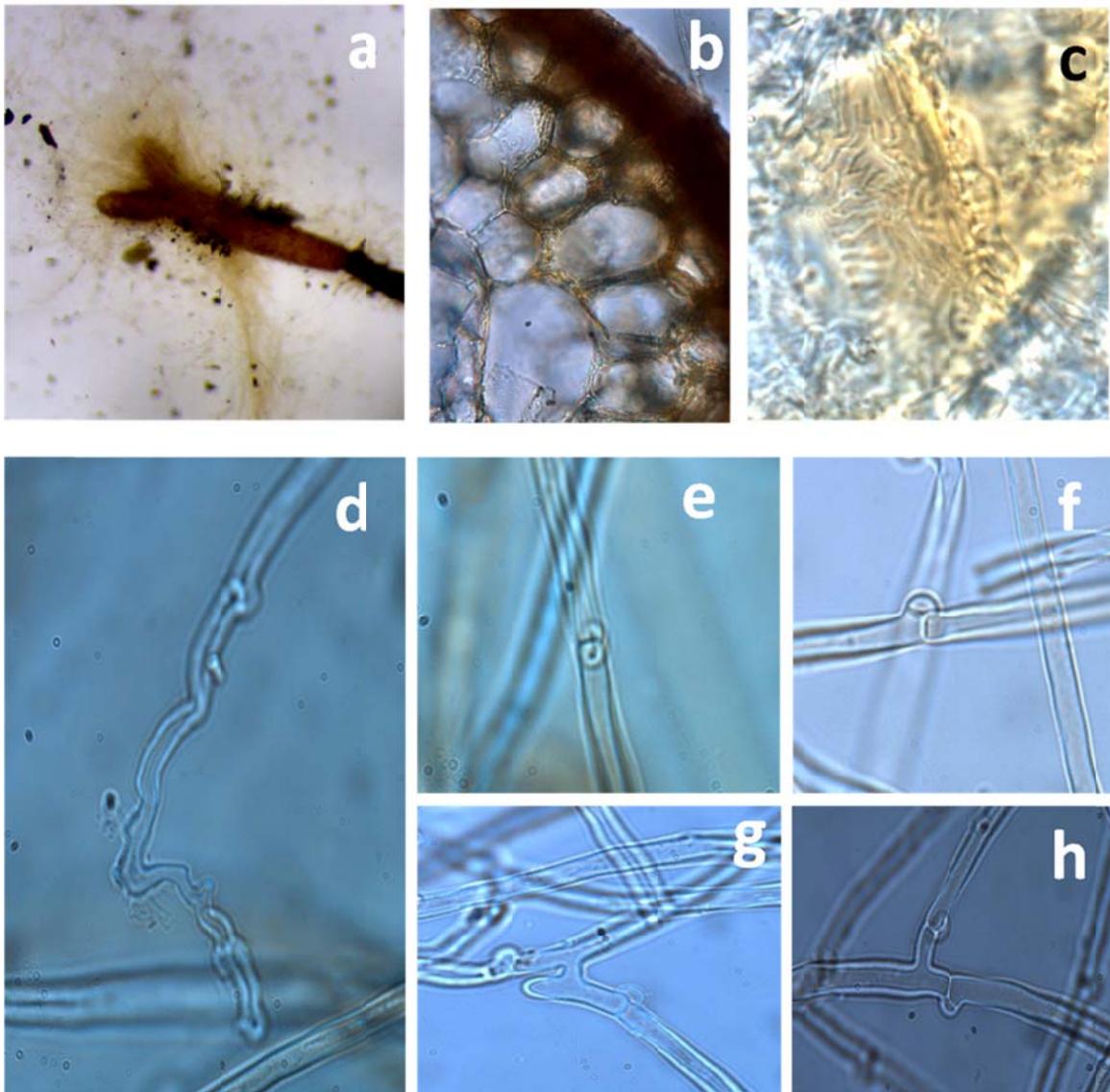
<sup>¶</sup>El sistema descriptivo considera las características propuestas en Deemy (2011).

#### **4.4.3 Otros morfotipos detectados en el ensayo**

La diversidad de hongos ectomicorrízicos y sus interacciones, es igualmente variable, por ello, la diversidad morfológica y anatómica de las estructuras es influenciada por los requerimientos funcionales tanto del micobionte como del fitobionte (Agerer, 2006). Adicionalmente al morfotipo de *H. mesophaeum* se identificaron otros morfotipos “contaminantes” en el ensayo los cuales se describen brevemente.

##### **4.4.3.1 Morfotipo 1. : “Similar a *Hebeloma leucosarx*”**

La raíz corta micorrizada fue de simple a raramente dicotómica, en su etapa juvenil presenta una coloración ocre (Figura 4.5 a), una vez madura la raíz el manto comenzó a tomar una coloración plateada con tonalidades ocre, con una longitud de 2 a 4 mm y diámetro de 200 a 300  $\mu\text{m}$ . Las hifas penetraron hasta la tercera capa de células corticales, las hifas que la conforman fueron cilíndricas y lisas (Figura 4.5b). El manto externo presentó un arreglo plectenquimatoso con tonos ocres, las hifas emanantes fueron de forma irregular las cuales se ensanchaban o constreñían en algunas secciones (Figura 4.5d). El micelio extrarradical estuvo conformado por hifas emanantes las cuales tuvieron un diámetro de 2 a 3  $\mu\text{m}$ , fueron de color ocre, ocasionalmente se presentaron estructuras en forma de poro a lo largo de la hifa entre fibula y fibula (Figura 4.5 e), presentó fibulas abundantes, sin poro, semicirculares (Figura 4.6 f) y el ancho de estas fue igual al diámetro de las hifas emanantes (2-3  $\mu\text{m}$ ), presentó uniones en “H” (Figura 4.5g) y bifurcaciones en “Y” las cuales poseen dos fibulas paralelas en cada bifurcación (Figura 4.5h).



**Figura 4.5.** Características del morfotipo 1 de *Pinus pseudostrobus* “similar a *Hebeloma leucosarx*” **a** Raíz ectomicorrizada (0.63x), **b** Red de Hartig penetrando tres capas de células, **c** Arreglo plectenquimatoso en manto externo, **d** Hifa modificada cercana al manto externo, **e** Hifa emanante que presenta poro, **f** Fíbula semicircular en hifa emanante, **g** Hifa emanante que presenta unión en “H”, **h** Ramificación en “Y” de las hifas emanantes. b-h= objetivos 100x.

#### 4.4.3.2 Morfotipo 2. “similar a *Suillus*”

El morfotipo midió de 2 a 4 mm de largo, puede ser dicotómico o coraloide (Figura 4.6), presentó un aspecto “gomoso”, las puntas son cilíndricas casi translúcidas, el morfotipo se va oscureciendo hacia el nacimiento de la raíz tornándose café claro. Las hifas penetraron hasta la segunda capa de células corticales, las hifas que circundaban a las células fueron cilíndricas y de aspecto liso. El manto externo fue hialino, presentó un arreglo pseudoparenquimatoso. No hubo presencia de hifas emanantes independientes, presentó rizomorfos de color café oscuro, frecuentes y oblicuos, sin ubicación específica en la raíz micorrizada, la superficie del rizomorfo presentó hifas emanantes ocasionalmente.

#### 4.4.3.3 Morfotipo 3.

La raíz modificada tuvo una longitud de 1 a 2 mm (Figura 4.7a), la morfología que presentó es dicotómica, los ápices fueron translucidos, generalmente bifurcados (Figura 4.7b), se alcanzan a ver las células corticales de los ápices radicales. El arreglo del manto fue pseudoparenquimatoso, hifas hialinas y lisas. El micelio extrarradical estuvo compuesto por hifas emanantes que en conjunto formaban una masa compacta de hifas de color blanco, presenta rizomorfos de color blanco de 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, las hifas emanantes fueron hialinas, con fibulas en semicírculo poco abundantes, la superficie tenía cristales minerales adheridos ocasionalmente. Las hifas penetraron hasta la segunda capa de células corticales formando la red de Hartig, presentaron superficie lisa y de forma cilíndrica (Figura 4.7c).

#### 4.4.3.4 Morfortipo 4

La raíz colonizada midió de 1 a 3 mm de largo, 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentó coloración blanca cuando estaba en el cepellón, una vez que se cortó la raíz para la extracción del

morfotipo el color viró a lila comenzando por la parte basal y finalmente hasta el ápice de la raíz, el tipo de ramificación fue dicotómica con tres órdenes de bifurcación (Figura 4.7 d-f). El manto presentó un arreglo pseudoparenquimatoso, constituido por hifas hialinas, de superficie lisa. Las hifas emanantes se encontraban compactadas alrededor de la raíz generando una estructura esponjosa con múltiples compartimientos que guardan aire, lo que generó que al ser colocadas las raíces modificadas flotaran, las hifas emanantes fue escasa presentando una coloración lila en algunas ocasiones de color vináceo oscuro, hay presencia de rizomorfos, poco abundantes de color morado, la superficie presenta partículas de minerales adheridos. Hay presencia de fibulas poco abundantes en las hifas emanantes.

#### **4.4.3.5 Morfotipo 5: “similar a *Boletus*”**

La raíz modificada midió de 1 a 4mm de largo, 200  $\mu\text{m}$  de diámetro, el tipo de bifurcación es dicotómico con tres órdenes de ramificación (Figura 4.7 g-h). Los ápices fueron de color café claro, las células corticales no eran visibles. Las hifas emanantes formaban un tejido esponjoso poco denso alrededor de la raíz modificada, de color blanco en el cual las partículas de suelo tendían a aglutinarse. Huvo presencia de rizomorfos con 20 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, de color blanco, su superficie presentó cristales minerales adheridos de forma abundante a las hifas y en algunas ocasiones pequeños agregados de suelo lo que le da una textura granular (Figura 4.7 i).

Dada la diversidad genética de los hongos ectomicorrízicos, las características morfológicas de las tres estructuras que conforman a la ectomicorrízica son diferentes entre cada especie. El manto funciona como barrera física y química contra agentes patógenos que afectan a la raíz del fitobionte, así como aumentar la longevidad de la raíz. En los morfotipos encontrados el grosor del manto fue variable, siendo los morfotipos 3, 4 y 5 los que

presentan mantos más gruesos, los morfotipos 4 y 5 presentaron mantos con múltiples espacios porosos, mientras que los morfotipos 1, 2, y 3, formaron mantos son más delgados, similares a *H. mesophaeum*. El por qué de la variación que existe entre mantos se desconoce, pero se sabe que las condiciones edáficas y la función biológica de cada especie ectomicorrízica juegan un papel importante. La red de Hartig es la zona en donde se lleva a cabo el intercambio bidireccional de nutrientes, nunca penetra la pared celular de las células corticales. Dependiendo de la especie es el número de capas colonizadas por dicha red, generalmente coloniza la segunda o tercera capa de células corticales tanto en los morfotipos descritos en la literatura como en los caracterizados en el presente trabajo.

Los morfotipos 1, 4 y 5 presentan estructuras conocidas como rizomorfos, los cuales tienen tres características esenciales: i) están constituidos por hifas de rápido crecimiento y pocas ramificaciones que permiten la exploración de mayor distancia, ii) forma bifurcaciones hifales que facilitan el transporte en su interior, iii) con hifas de mayor diámetro de las hifas, así como la disolución de los septos, lo que permite una reducción en la resistencia al transporte de las soluciones. Son estructuras hidrofóbicas lo que impide la pérdida de agua en su trayecto hacia la zona de intercambio, e hidrofílicas en las hifas libres (Agerer, 1999; Warren, 2008). Los rizomorfos presentes en los morfotipos 4 y 5 presentan cristales adheridos a lo largo de estos, estas estructuras cristalinas pueden estar dentro o fuera de las hifas, se ha reportado que las vacuolas de los rizomorfos contienen grandes cantidades de polifosfatos con  $K^+$  como el ion (Ashford *et al.*, 1999). Además de esto, se ha encontrado que la interacción de los hongos ectomicorrízicos con los minerales del suelo pueden liberar elementos como el fósforo, calcio, fosfatos de aluminio y hierro a través de la exudación de ácidos oxálicos. La producción de dichos ácidos genera la producción de

cristales de oxalato de calcio en la superficie de las hifas y de los rizomorfos (Griffiths *et al.*, 1994; Landeweert *et al.*, 2001; Wallander *et al.*, 2002). Se ha sugerido que la presencia de los cristales de oxalato funcionan como protección ante el ataque microbiano y la predación de animales edáficos, así como para la prevención de toxicidad por calcio u oxalatos (Wallander *et al.*, 2003). Este tipo de cristales se presentan en los rizomorfos formados por especies de los géneros *Suillus*, *Boletus* y *Rhizopogon*.

Los morfotipos antes descritos fueron encontrados a lo largo de los muestreos de *P. pseudostrobilus* inoculados con *H. mesophaeum*, los porcentajes en los que se presentaron son bajos dependiendo del morfotipo (Cuadro 4.4). El morfotipo 1 fue el más abundante con un 27% de presencia, mientras que el morfotipo 5 se presentó con menor frecuencia con 1%. La “contaminación” de otros hongos ectomicorrízicos pudo deberse a las condiciones de no esterilidad en el invernadero o a que el inoculo no es completamente puro a pesar de la selección cuidadosa de los esporomas, por ejemplo en el caso de *Hebeloma cf. leucosarx*.

**Cuadro 4.4** Porcentajes promedio de colonización de los diferentes morfotipos diferentes a *Hebeloma mesophaeum* encontrados en *P. pseudostrobilus*.

Morfotipo	% colonización
1	27.0
2	1.4
3	3.6
4	3.0
5	1.0

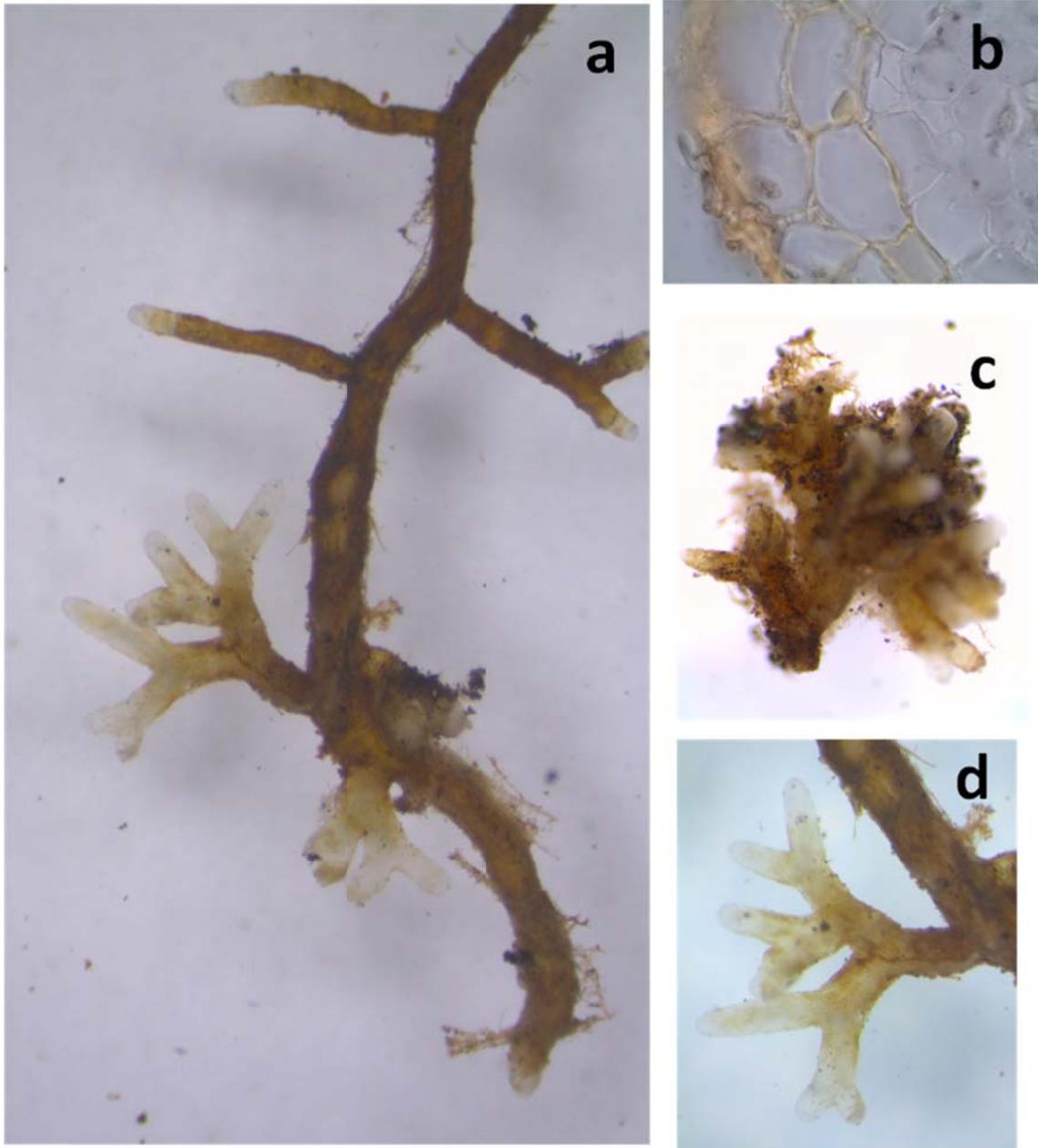
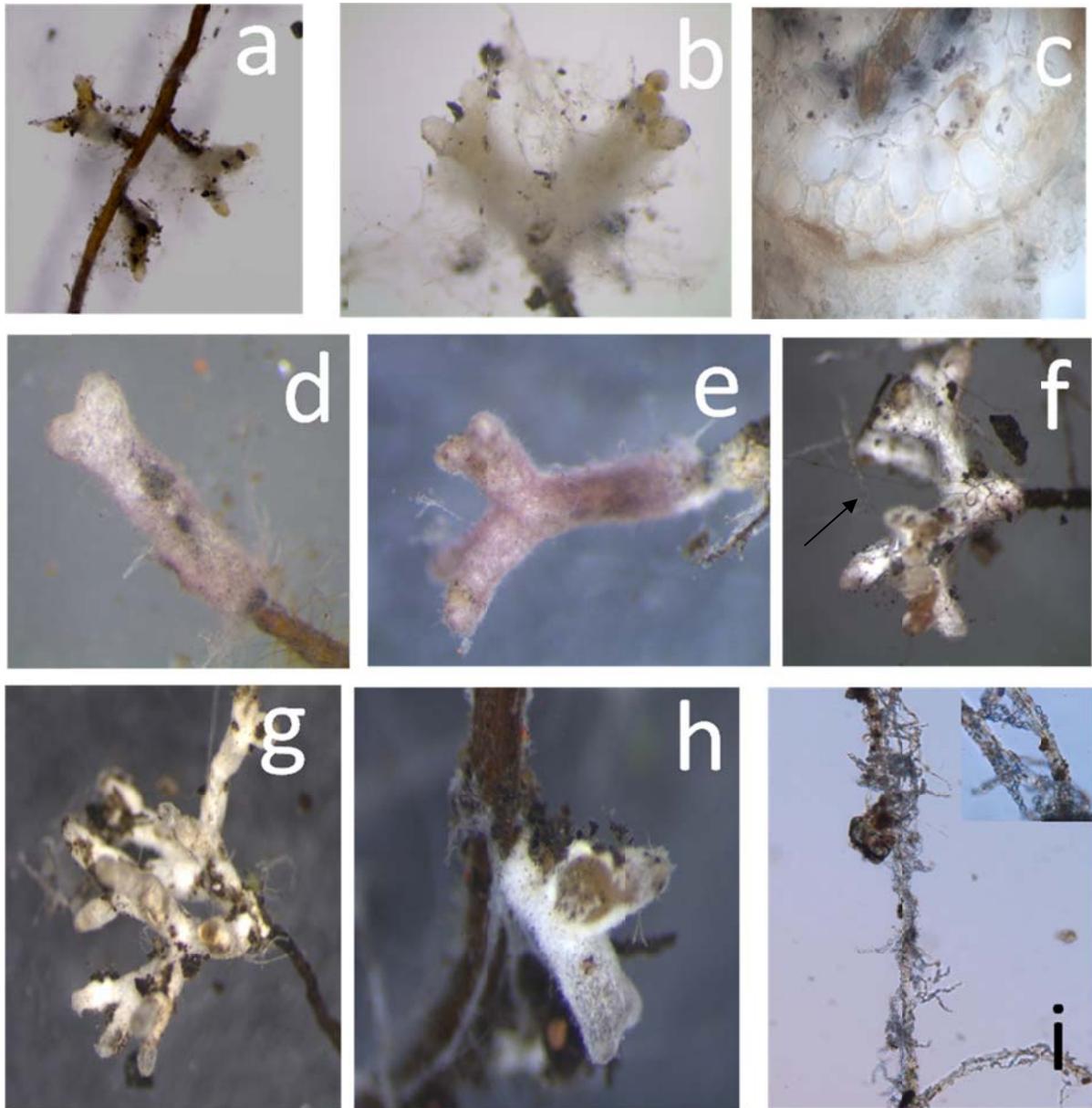


Figura 4.6. Características del morfotipo 2 de *Pinus pseudostrobus* “similar a *Suillus*” a Vista general de raíces ectomicorrizadas, b Corte transversal de una raíz corta micorrizada que muestra la red de Hartig, c Raíz colonizada en forma coraloide, d Raíz dicotómica micorrizada.



**Figura 4.7.** Morfotipo 3 de *Pinus pseudostrobus*: **a** Raíces cortas micorrizadas, **b** Raíz corta micorrizada con hifas emanantes abundantes de color blanco, **c** Corte transversal de la raíz micorrizada en donde se observa la red de Hartig y el manto. Morfotipo 4 de *P. pseudostrobus*: **d-f** Raíz micorrizada en los diferentes estadios de modificación morfológica, **f**. Se pueden observar los rizomorfos (flecha) de color vináceo presentes en la raíz. Morfotipo 5 de *P. pseudostrobus* “similar a *Boletus*.”: **g** Estadio final de la modificación morfológica de la raíz micorrizada, **h** Estado inicial de la formación de la compactación de las hifas emanantes alrededor de la raíz modificada, **i** Rizomorfo emanante cubierto por cristales minerales.

#### 4.5 RECOMENDACIONES

Se presentan las siguientes recomendaciones con la finalidad de ampliar la descripción de la ontogenia de *H. mesophaeum* en *P. pseudostrobus*.

- i) Se recomienda realizar ensayos que tengan un controlado mayor para evitar la presencia de hongos ectomicorrízicos no deseados.
- ii) Sería deseable caracterizar el morfotipo formado por *H. mesophaeum* en condiciones naturales, con el objetivo de determinar si existen características que cambien o si éstas se mantienen igual.
- iii) Sería conveniente caracterizar con mayor detalle los morfotipos encontrados en el presente trabajo, la caracterización debe ser tanto morfoanatómica así como la identificación a partir de biología molecular para determinar la especie ectomicorrízica involucrada.
- i) Sería idóneo efectuar el aislamiento de los hongos ectomicorrízicos presentes en los morfotipos en PDA para su utilización en futuras pruebas de su uso potencial como inóculo ectomicorrízico.

#### 4.6 CONCLUSIONES

El hongo ectomicorrízico *Hebeloma mesophaeum* alcanza su máximo porcentaje de colonización a los 7 meses después de la inoculación, es persistente una vez que ha establecido la simbiosis con el fitobionte, ya que no es desplazado por otros hongos ectomicorrízicos. Las características del morfotipo formado entre *P. pseudostrobus* y *H. mesophaeum* son en general similares a los morfotipos descritos por otros autores, aunque algunas características son distintas tales como la longitud, el color.

#### 4.7 LITERATURA CITADA

- AGERER R. 1999. Never change a functionally successful principle: the evolution of Boletales s. l. (Hymenomycetes, Basidiomycota) as seen from below-ground features. *Sendtnera* 6:5–91
- AGERER R. 2001. Exploration types of ectomycorrhizae: a proposal to classify ectomycorrhizal mycelia 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. *Mycological Progress* 5: 67-107
- AGERER R., RAMBOLD G. 2011. DEEMY- An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. München, Germany (<http://www.deemy.de/>) /consultada Febrero del 2011
- ALLEN M.F.; SWENSON W.; QUEREJETA J.I.; EGERTON-WARBURTON L.M.; TRESEDER K.K. 2003. Ecology of mycorrhizae: A conceptual framework for complex interactions among plants and fungi. *Annual Review of Phytopathology* 41: 271-303
- ASHFORD A., VESK P.A., ORLOVICH D.A., MARKOVINA A.L., ALLAWAY W.G. 1999. Dispersed polyphosphate in fungal vacuoles in *Eucalyptus pilularis*-*Pisolithus tinctorius* ectomycorrhizas. *Fung. Genet. Biol.* 28: 21-33
- ASPRAY T.J., FREY-KLETT P., JONES E.J., WHIPPS J.M., GARBAYE J., BENDING G.D. 2006. Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza* 16: 533-541

- BRUNDRETT M.C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* 154: 275–304
- CARRASCO-HERNÁNDEZ V. 2010. Aspectos ecofisiológicos de la raíz de *Pinus pseudostrobus* y *P. patula* y especies ectomicorrízicas comestibles de *Hebeloma* spp. y *Laccaria* spp. Tesis de maestría, Colegios de Postgradiados. 89 pp
- CASTELLANO M, MOLINA R. 1989. Mycorrhiza. In: Landis TR., Tinus S. Mc Donald. Barnett J. The Container tree Nursery Manual. Vol 5. Agric. Handbk. 674. Washington, DC: US. Department of Agriculture, Forest Service: 101-167 pp
- CHESWORTH W. 2008. Encyclopedia of soil science. Canada. Springer. pp. 629-634.
- FARJON A., STYLES B.T. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotrópica. Monograph 75. New York Botanical Garden, New York. 291p
- GRAND LF, HARVEY AE. 1982. Quantitative measurement of ectomycorrhizae on plant roots. *In*: Schenck NC, ed. Methods and principles of mycorrhizal research. St Paul: American Phytopathological Society 157-174 pp
- GRIFFITHS R.P., BAHAM J.E., CALDWELL B.A. 1994. Soil solution chemistry of ectomycorrhizal mats in forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 26: 331-337
- HARRISON M.J. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 361-389
- HIBBETT D.S.; GILBERT L.B.; DONOGHUE M.J. 2000. Evolutionary instability of ectomycorrhizal symbioses in basidiomycetes. *Nature* 407: 506–508

- ISHIDA A. T., NARA K., TANAK M., KINOSHITA A., HOGETSU T. 2008. Germination and infectivity of ectomycorrhizal fungal spores in relation to their ecological traits during primary succession. *New Phytologist* 180: 491-500
- LANDEWEERT R., HOFAND E., FINLAY R., VAN BREEMEN N. 2001. Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol. Evol.* 16: 248-254
- LÓPEZ-UPTON J. 2002. *Pinus pseudostrobus Lindl.* Species descriptions, Part. II. Colegio de Postgraduados. 636-638 pp
- MARSHALL J.D, PERRY D.A. 1987. Basal and maintenance respiration of mycorrhizal and nonmycorrhizal root systems of conifers. *Can. J. For. Res.* 17: 872-877
- MARX D. H., RUEHLE J.L., CORDELL C.E. 1994. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. *In*: J.R. Norris, D. Read, and A. K. Verma, editors. *Techniques for mycorrhizal research.* Academic Press, London
- OBASE K., TAMAI Y., YAJIMA T., MIYAMOTO T. 2007. Morphological characteristics of ectomycorrhizas found in willow and poplar seedlings established in the Area devastated by the volcanic eruption of Mt. Usu, Hokkaido, Japan in 2000. *Eurasian Journal of Forest Research* 10(2): 173-178
- OBASE K., TAMAI Y., YAJIMA T., MIYAMOTO T. 2009. Mycorrhizal synthesis of four ectomycorrhizal fungi in potted *Populus maximowiczii* seedlings. *Mycoscience* 50:143-145

- PÉREZ-MORENO J, A LORENZANA, V CARRASCO, A YESCAS. 2010. Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. CP, CONACyT, SEMARNAT. 167 p
- PEREZ-MORENO J., READ D. J. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. INCI, 29(5): 239-247
- PERRY Jr. J.P. 1991. The Pines of Mexico and Central America. Timber Press. Portland Oregon. 231p
- VALENZUELA E., RAMÍREZ C., MORENO G., POLETTE M., GARNICA S., PEREDO H., GRINBERGS J. 1996. *Agaricales* más comunes recolectados en el Campus Isla Teja de la Universidad Austral de Chile. Bosque 17(1):51-63
- WALLANDER H., MAHMOOD S., HAGERBERG D., JOHANSSON L., PALLON J. 2003. Elemental composition of ectomycorrhizal mycelia identified by PCR-RFLP analysis and grown in contact with apatite or wood ash in forest soil. FEMS Microbiology Ecology 44(3): 57-65
- WALLANDER H., JOHANSSON L., PALLON J. 2002. PIXE analysis to estimate the elemental composition of ectomycorrhizal rhizomorphs grown in contact with different mineral in forest soil. FEMS Microbiology Ecology 39: 147-156
- WARREN JM., BROOKS RJ., MEINZER F.C, EBERHART LJ. 2008. Hydraulic redistribution of water from *Pinus ponderosa* trees to seedlings: evidence for an ectomycorrhizal pathway. New Phytologist 178: 382-394

## Anexo I.

### **INOCULACIÓN DE *Pinus pseudostrobus* y *Pinus ayacahuite* INOCULADOS CON *Hebeloma mesophaeum* Y UNA BACTERIA SOLUBILIZADORA DE FOSFATO**

En el sistema suelo la diversidad de microorganismos es amplia y por lo tanto las interacciones entre estos son inevitables, los hongos ectomicorrízicos forman asociaciones sinérgicas o antagónicas con bacterias conocidas como “bacterias auxilidoras de la micorriza” (Mycorrhizal helper bacteria o MHB, por sus siglas en inglés) (Gazzanelli *et al.*, 1999). Estos grupos bacterianos realizan un rango amplio de actividades en la rizosfera y micosfera algunas especies bacterianas tienen capacidad para solubilizar fosfatos, fijar nitrógenos, otras son productoras de auxinas o antibióticos que contra patógenos (Barea *et al.*, 2005). Dentro de los grupos microbianos capaces de solubilizar el fósforo edáfico se encuentran las bacterias de los géneros *Bacillus*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas*. Bacterias como *Pseudomonas putida* actúan sinérgicamente cuando interactúan con hongos micorrízicos arbusculares, ya que se ha observado un incremento en la producción de esporas, lo cual útil para la producción de inoculo (Sieverding, 1991). En raíces ectomicorrízicas colectadas en campo se ha reportado la presencia de bacterias entre el manto fúngico y se ha observado que la población de bacterias en raíces micorrizadas de *Pinus* sp. es distinta de aquellas que crecen en asociación con raíces no micorrizadas o sin colonización. La posibilidad de que las bacterias estén directamente relacionadas con la dinámica de formación de la micorriza fue sugerida en los estudios de Bowen y Theodorou (1979) y Garbaye y Bowen (1987). Especies bacterianas auxiliares de la micorriza estimulan el crecimiento de

hongos ectomicorrizicos es las especies *Laccaria laccata* y *L. bicolor* mientras que inhiben el crecimiento de otros hongos a nivel *in vitro*. (Schelkle, 1996). La búsqueda de organismos que incrementen la supervivencia de especies forestales en campo, comienza a tener relevancia, es por ello que en el presente trabajo se evaluó si la especie bacteriana inoculada era capaz de generar una acción sinérgica con *Hebeloma mesophaeum* al ser inoculadas en dos especies de interés forestal *Pinus pseudostrobus* y *Pinus ayacahuite*.

Se aplicaron seis tratamientos (**Cuadro 1**) a las especies forestales utilizadas (*P. pseudostrobus* y *P. ayacahuite*). El hongo ectomicorrízico utilizado fue colectado en el mercado de Ozumba, *Hebeloma mesophaeum* es una especie ectomicorrízica comestible en México (Pérez-Moreno *et al.*, 2010) por ello surgió el interés de utilizar esta especie como inoculante ectomicorrízico. La bacteria solubilizadora de fosfatos empleada pertenece a la colección bacteriana del área de microbiología del Colegio de Postgraduados. Está fue aislada de *P. greggii* inoculado con *Hebeloma mesophaeum* en estudios anteriores (Reyes, inédito).

**Cuadro 1.** Combinaciones de los tratamientos para *P. pseudostrobus* y *P. ayacahuite*.

No. Tratamiento	Especies	Clave de referencia
1	Sin hongo o bacteria	Testigo
2	Con caldo nutritivo	CN
3	<i>Hebeloma mesophaeum</i> estéril	HmE
4	<i>Hebeloma mesophaeum</i>	Hm
5	Bacteria solubilizadora de fosfato (HePg2)	BSF
6	<i>H. mesophaeum</i> + BSF	Hm+BSF

Las plantas inoculadas y no-inoculadas fueron aisladas del ambiente circundante a través de la elaboración de cajas; para ello se utilizaron charolas de soporte para los tubetes de color negro de 50 x 50 cm. En la parte inferior de la charola se colocó un recipiente para la captación de agua de riego, dicho recipiente fue perforado en uno de los extremos y se colocó una manguera conectada al recipiente en un extremo y en el otro a una botella que fungió como contenedor. En la parte superior se colocó un cubo forrado de plástico transparente. Para la elaboración del cubo se utilizaron ocho varillas de madera, cuatro de 40 cm y cuatro de 20 cm., que se unieron para formar la estructura; después se forro con hule cristal, dejando una cara del cubo abierta, en el extremo de hule suelto se colocó contactel para sellar el dispositivo, y en la parte superior del dispositivo se colocó tela para permitir la entrada de aire (Figura 1a). Cada tratamiento constó de treinta unidades experimentales las cuales fueron inoculadas con al menos  $10^7$  y  $10^8$  esporas de inoculante ectomicorrízico en polvo por planta, se aplicaron dos dosis de inoculante a diferentes tiempos. En los tratamientos con la bacteria HePg2 se inocularon  $7.6 \times 10^7$  UFC por planta; se realizó solo una inoculación a los dos meses de haber germinado las semillas. Los tratamientos de caldo nutritivo y *Hebeloma mesophaeum* estéril se establecieron con el objetivo de evaluar si el efecto de la simbiosis ectomicorrízica y la bacteria estuvo influenciado por la cantidad de nutrimentos contenidos en el caldo nutritivo y el inóculo ectomicorrízico. A los 4 meses de inoculadas las plantas con ambos inoculantes se realizaron muestreos iniciales con la finalidad de corroborar si la simbiosis ectomicorrízica ya se había establecido y definir si la bacteria inoculada se aún se encontraba presente.

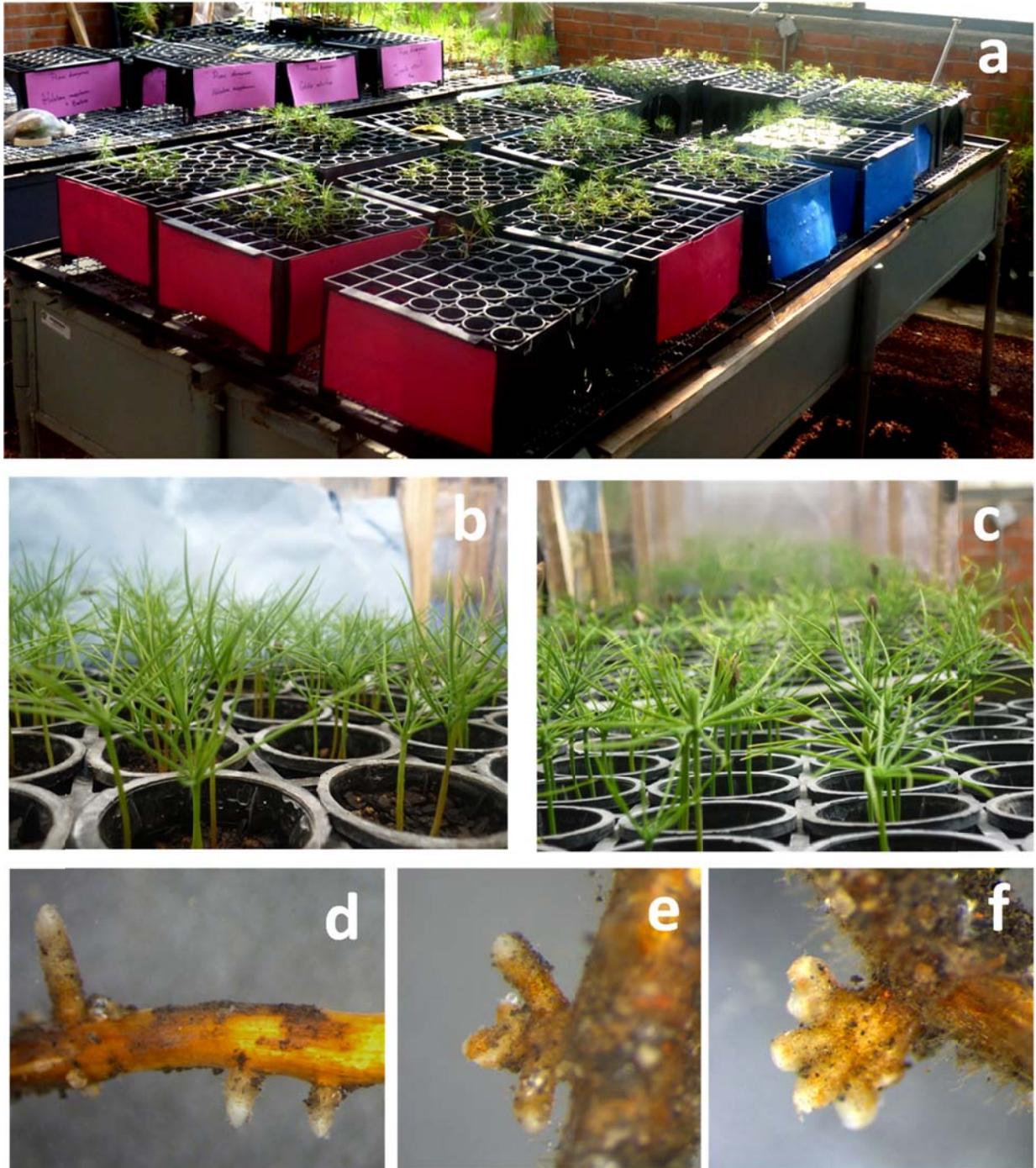
La presencia de la ectomicorriza se realizó a través de la observación de la raíz en el microscopio estereoscópico Leica EZ4, se contaron las raíces cortas presentes en la raíz

(micorrizadas vivas, micorrizadas muertas, no micorrizadas vivas y no micorrizadas muertas), se tomaron las alturas y los diámetros de la parte aérea de los pinos muestreados a si como las longitud de la raíz de cada individuo. La persistencia de la bacteria en los tubetes se evaluó utilizando el método de diluciones y cuenta viable en caja petri con medio sólido Pickoskaya, las cajas se incubaron por 7 días a 28 °C.

## **RESULTADOS PRELIMINARES**

Las plantas muestreadas cinco meses después de la germinación, mostraban desarrollo temprano de las raíces secundarias y en algunos casos de raíces terciarias. Las alturas de los individuos a analizados fue de 5 a 7 cm. El sistema radical presentó longitudes variables dado que en los meses anteriores se presentó una plaga de mosquita negra. La larva de esta mosca se alimenta principalmente de raíces jóvenes pues a un no están lignificadas. La proliferación de la mosca se atribuye al uso de los dispositivos de aislamiento pues crearon condiciones de humedad, temperatura y luz apropiadas para el desarrollo y reproducción de las mismas. Dada la presencia de este organismo se perdió 70% de unidades experimentales tanto de *P. ayacahuite* y *P. pseudostrobus* (Figura 2a). Los tratamientos menos afectados por la mosquita negra fueron el testigo con 66% y 90% de supervivencia para *P. ayacahuite* y *P. pseudostrobus* , respectivamente, y los inoculados solo con la bacteria HePg2 con una supervivencia del 56% en *P. ayacahuite* y 100% en *P. pseudostrobus*; los tratamientos inoculados con *H. mesophaeum* tuvieron la mortalidad más alta, ya que la supervivencia fue 26% y 30% para *P. ayacahuite* y *P. pseudostrobus* inoculados solo con *H. mesophaeum*, mientras que para los tratamientos inoculados con ambos microorganismos la supervivencia fue 23% y 50%. Los pinos inoculados con la bacteria HePg2 y aquellos con ambos simbioses, presentaron modificaciones en el sistema radical (Figura 2b), se

observó la presencia de estructuras similares a nódulos y en algunas ocasiones se encontró micelio de aspecto algodonoso (similar al micelio de *H. mesophaeum*) alrededor de las raíces, sin embargo, no se observó la presencia de red de Hartig en los cortes realizados (Figura 2c). La modificación de las raíces cortas por efecto de las MHB ha sido reportada anteriormente, estas modificaciones son atribuidas a la acción de fitohormonas tales como las auxinas, citoquininas y etileno, aun cuando la dicotomía en raíces de *Pinus* spp. puede ocurrir espontáneamente, la regulación de la concentración de las fitohormonas parece ser importante en la inducción de la dicotomía de las raíces cortas, debido a que muchas bacterias producen auxinas que pueden modificar las raíces ( Gay *et al.*, 1994; Costacurta y Vanderleyden, 1995; Karka *et al.*, 1999). No hubo diferencias en el crecimiento en ninguna de las especies de *Pinus* entre tratamiento debido a que aun no existe una influencia ocasionada por el *Hebeloma mesophaeum* o la bacteria HePg2 sobre dichas especies forestales. La concentración de bacterias contabilizadas tres meses después de aplicado el inoculante en los cuatro tratamientos de bacterias fue para *P. pseudostrobus* fue de  $5 \times 10^5$  y de  $12.3 \times 10^5$ , para el tratamiento BSF y HmBSF, respectivamente. En el caso de *P. ayacahuite* la concentración de bacterias para el tratamiento BSF fue de  $4.5 \times 10^5$  y para el tratamiento de HmBSF fue de  $2 \times 10^5$ . Las concentraciones de la bacteria HePg2 encontradas en cada tratamiento se encuentran en el rango óptimo para ejercer un efecto en el crecimiento de las plantas.



**Figura 2.** **a** Ensayo de *Pinus ayacahuite* y *P. pseudostrobus* en invernadero. **b** Plántulas de *P. pseudostrobus*, **c** Plántulas de *P. ayacahuite*, **d** Raíces secundaria de *P. ayacahuite*, **e-f** Raíz secundaria modificadas encontradas en tratamiento inoculado con *Hebeloma mesophaeum* y la bacteria HePg2 (0.63X).



Figura 1a. Dispositivos utilizados para el aislamiento de tratamientos.

Los resultados presentados anteriormente son preliminares por lo que se recomienda que se lleven a cabo ensayos que cuenten con más tiempo para ser analizados. Es importante tener en consideración los siguientes puntos:

1. En caso de utilizar dispositivos de aislamiento entre tratamientos como en el presente ensayo, las condiciones de humedad, aireación, temperatura y luz deben ser bien controladas o bien usar los dispositivos por un periodo de tiempo determinado dependiendo de la época del año.
2. Realizar la caracterización de las cepas usadas a si como establecer la curva de crecimiento de manera que el inóculo bacteriano contenga la carga máxima posible.

3. El establecimiento de la simbiosis ectomicorrízica, en el caso de *H. mesophaeum*, como mínimo requiere de 2 meses, si se pretende trabajar con dicho simbiote.
4. El control oportuno de plagas o enfermedades como el “damping off” y el crecimiento acelerado de la mosquita negra, es necesario para evitar la pérdida de unidades experimentales.
5. La observación de efectos puede observarse a partir de los 6 meses después de la inoculación.

#### **LITERATURA CITADA**

- BAREA M. J., POZO J. M., AZCÓN R., AZCÓN-AGUILAR C. 2005, *Microbial co-operation in the rhizosphere.*, Rev. J Expe Bot 56(417):1761-1778
- BOWEN G.D., THEODOROU C. 1979. Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. Soil Biol Biochem 11:119–126
- COSTACURTA A, VANDERLEYDEN J. 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. Crit Rev Microbiol 21:1–18
- GARBAYE J., BOWEN G.D. 1987. Effect of different microflora on ectomycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. Can J For Res 17, 941-943
- GAY G, NORMAND L, MARMEISSE R, SOTTA B, DEBAUD JC. 1994. Auxin overproducer mutants of *Hebeloma cylindrosporum romagnesi* have increased mycorrhizal activity. New Phytologist 128:645–657
- GAZZANELLI G, MALATESTA M, PIANETTI A, BAFFONE W, STOCCHI V, CITTERIO B. 1999. Bacteria associated to fruit bodies of the ectomycorrhizal fungi *Tuber borchii* Vittad. Symbiosis 26:211–222

- KASKA D.D., MYLLYLA R., COOPER J.B. 1999. Auxin transport inhibitors act through ethylene to regulate dichotomous branching of lateral root meristems in pine. *New Phytologist* 142:49–58
- MARTÍNEZ-REYES M. 2010. Micorrización, crecimiento y contenido nutrimental de *Pinus greggi* y *P. montezumae* inoculados con tres hongos comestibles. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados. Edafología. 130 pp
- PÉREZ-MORENO J, A LORENZANA, V CARRASCO, A YESCAS. 2010. Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos. CP, CONACyT, SEMARNAT. 167 p
- SCHELKLE M., PETERSON R.L. 1996. Suppression of common root pathogens by helper bacteria and ectomycorrhizal fungi in vitro. *Mycorrhiza* 6: 481-485
- SIERVERDING E. 1991. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Management in Tropical Agrosystems. Technical Cooperation, Federal Republic of Germany, 371p