



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA**

**CARACTERIZACIÓN ORGANÍSMICA Y GENÉTICA EN
POBLACIONES DE *Morchella* spp. EN BOSQUES DE *Abies*
religiosa DEL CENTRO DE MÉXICO**

ISMAEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México

2012

La presente tesis, titulada: **Caracterización orgánica y genética en poblaciones de *Morchella* spp. en bosques de *Abies religiosa* del centro de México**, realizada por el alumno **Ismael Hernández Hernández**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GENÉTICA

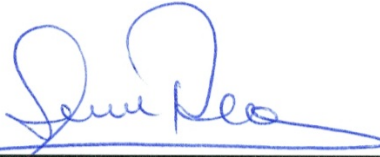
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



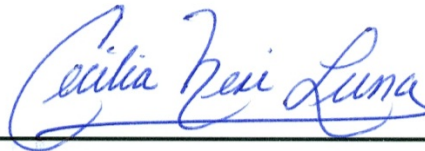
DR. LUIS VILLARREAL RUIZ

ASESOR



DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR



DRA. CECILIA NERI LUNA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, septiembre de 2012

La presente tesis de Maestría, titulada: “Caracterización organísmica y genética en poblaciones de *Morchella* spp. en bosques de *Abies religiosa* del centro de México”, fue realizada en el Laboratorio de Recursos Genéticos en Hongos del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad, Genética del Campus Montecillo, recibiendo financiamiento de la Línea Prioritaria de Investigación Institucional 6: Mejoramiento y Conservación de Recursos Genéticos, a través del Sub-Proyecto Hongos (Gestión 2009-2011) a cargo del Dr. Luis Villarreal Ruiz. Por tal motivo, agradezco el apoyo recibido y manifiesto de conformidad que todo el material biológico y los resultados generados en esta tesis, son propiedad del Colegio de Postgraduados, por lo que su uso y/o reproducción parcial o total la haré con la autorización institucional por escrito, a través del Dr. Luis Villarreal Ruiz.



M. en C. Ismael Hernández Hernández

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 20 de septiembre de 2012

Caracterización organísmica y genética en poblaciones de *Morchella* spp. en bosques de *Abies religiosa* del Centro de México

Ismael Hernández Hernández, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2012

RESUMEN

Se realizó la caracterización organísmica y genética en poblaciones de *Morchella* spp. de bosques puros de *Abies religiosa* de la región Central de México, con niveles contrastantes de contaminación atmosférica. El trabajo se desarrolló en dos fases: la primera en campo y la segunda en el laboratorio. En la fase de campo se emplearon sitios permanentes de tamaño variable en: (1) área de influencia del Parque Nacional Desierto de los Leones, D.F. (DDL); (2) Cerro Tláloc, Edo. Mex. (T); (3) área de influencia del Parque Nacional Izta-Popo, Puebla (IP) y (4) Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca, Mich (MM); para el muestro de ascomas y suelo adyacente con raíces. La fase de laboratorio consistió en: (1) Pruebas de identificación ascomas-raíces de plantas, para determinar la posible interacción simbiótica. (2) caracterización morfo-anatómica de los ascomas de *Morchella* y las micorrizas adyacentes. (3) Aislamientos monospóricos. (4) Aislamiento *in vitro* a partir del contexto. (5) Caracterización molecular y análisis filogenético de las cepas obtenidas en cultivo puro, por el método de máxima parsimonia utilizando 414 pb del Espacio Transcrito Interno (ITS). (6) Caracterización morfológica y velocidad de crecimiento de los aislamientos en tres medios de cultivo (PDA, EMA y CYM) con pH diferenciales (3.5, 5.5 y 7.7). (7) Pruebas de incompatibilidad somática entre poblaciones. (8) Determinación de la capacidad de anastomosis. (9) Cuantificación de número de núcleos en esporas e hifas. En DDL, presumiblemente más contaminado, no se encontraron ascomas, mientras que en MM no se logró el aislamiento. No se halló una asociación micorrícica *in situ* del hongo con especies vegetales. Se encontraron 4 filo-especies del clado *Morchella elata*, del cual: IP-2 resultó ser *M. frustrata* y los otros morfotipos formaron subclados con *Morchella* sp. Mel-12, Mel-18 y Mel-27, previamente reportados en EUA. Las cepas mostraron variabilidad morfológica en los diferentes medios de cultivo y pH empleados, las cepas del IP

crecieron más rápido que las del T. Solo se observó anastomosis en las autocruzas, en el resto de tratamientos se formó una barrera de incompatibilidad somática. Así mismo se observó un mayor un mayor número de núcleos en las esporas que en las hifas y la cantidad fue similar en los cuatro filogrupos.

Palabras clave: *Abies religiosa*, caracterización molecular, incompatibilidad somática, Espacio Transcrito Interno, *Morchella* spp., número de núcleos.

**Organismal and genetic characterization of *Morchella* spp.
Populations in *Abies religiosa* forests of Central Mexico**

**Ismael Hernández Hernández, MC.
Colegio de Postgraduados, 2012**

SUMMARY

An organismal and genetic characterization of *Morchella* spp. populations in *Abies religiosa* forests, with contrasting levels of environmental pollution in the Central region of Mexico, was conducted during 2010-2011. The research was carried out in two phases: the first in field conditions and the second under lab conditions. In the field permanent sites of variable size were used in: (1) area of influence of the National Park Desierto de los Leones, D.F. (DDL), (2) Mount Tlaloc, Estado de Mexico. (T), (3) National Park Ixta-Popo influence area, Puebla (IP) and (4) Biosphere Reserve of the Mariposa Monarca, Michoacan (MM) in order to collect the ascomata and soil adjacent to plant roots. The laboratory phase consisted of the following aims: (1) identification of ascomata-roots associations of plants, to determine the possible mycorrhizal interaction. (2) morpho-anatomical characterization of ascomata of *Morchella* and adjacent ectomycorrhizae. (3) Monosporic isolations. (4) *In Vitro* Isolation from the ascoma's context. (5) Molecular characterization and phylogenetic analysis of the strains obtained in pure culture, by the maximum parsimony method using the Internal Transcribed Spacer (ITS). (6) Morphological characterization and growth rate of the isolates in three culture media (PDA, EMA and CYM) with differential pH (3.5, 5.5 and 7.7). (7) Evaluation of somatic incompatibility between populations. (8) Determination of the capacity of anastomosis. (9) Quantification of nuclei number in spores and hyphae. In DDL, presumably more polluted, it was not possible to find ascomata, while neither spores nor context were isolated from ascomata from MM. It was not possible to detect mycorrhizal association *in situ* between *Morchella* and plant's roots but a structure called sclerotia was found. It was found 4 phylogenetic species of *Morchella elata* clade, whereas IP-2 proved to be *M. frustrata* and the other morphotypes formed subclades with *Morchella* sp. Mel-12, Mel-18 and Mel-27, previously reported in U.S.A. The *Morchella*'s strains showed morphological

variability in different culture media and pH and, IP strains grew faster than those of T. Somatic compatibility only was observed when the same isolated was matched, In the other treatments somatic incompatibility barrier was formed. The number nuclei in spores were greater than the nuclei number of hyphae however the four phylogroups showed the same nuclei number.

Keywords: *Abies religiosa*, molecular characterization, somatic incompatibility, Internal Transcribed Spacer, *Morchella* spp., number of nuclei.

AGRADECIMIENTOS

Al pueblo de México, que a través de su Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Colegio de Postgraduados, hicieron posible mi investigación y grado de Maestro en Ciencias.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT), por otorgarme la Beca para Tesis de Postgrado, Promoción 2011.

A todos los miembros de mi Consejo Particular, por su disposición, apoyo y sugerencias a lo largo de mi investigación.

Al M. en C. (C) Renato Cumplido Ortiz, por sus valiosas observaciones en el análisis estadístico de datos.

A la Ing. Suri Sadey Carrera Pacheco por su apoyo para la elaboración de los mapas.

Agradecimientos personales

A mis padres y hermanos, por su amor y apoyo incondicional... ¡un logro más!

A mis amigos y hermanos en la fe... otra vez os digo: ¡regocijaos!

A la M.en C. Clara Alfaro Maya “Maestra Clarita”, por todo su apoyo cuando me inicié en el estudio de los hongos comestibles.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 LITERATURA CITADA.....	4
CAPÍTULO II. OBJETIVOS.....	8
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DEL HÁBITAT DE <i>Morchella</i> spp. EN BOSQUES DE <i>Abies religiosa</i> Y SU POSIBLE INTERACCIÓN MICORRÍCICA <i>in situ</i>	9
3.1 INTRODUCCIÓN.....	9
3.1.1 Declinación de los bosques de oyamel que albergan morchellas.....	9
3.1.2 Estrategias tróficas del género <i>Morchella</i>	12
3.2 ÁREA DE ESTUDIO.....	15
3.2.1 Sitio Desierto de los Leones (DDL).....	15
3.2.2 Sitio Tláloc (T).....	17
3.2.3 Sitio Izta-Popo (IP).....	17
3.2.4 Sitio Mariposa Monarca (MM).....	17
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.3.1 Muestreo de ascomas.....	18
3.3.2 Pruebas de identificación ascomas-ectomicorrizas.....	20
3.4 RESULTADOS.....	23
3.4.1 Muestreo de ascomas y de suelo con raíces.....	23
3.4.2 Pruebas de identificación ascomas-ectomicorrizas.....	27
3.5 DISCUSIÓN.....	35
3.6 CONCLUSIONES.....	37
3.7 LITERATURA CITADA.....	38
CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE <i>MORCHELLA</i>	43

4.1	INTRODUCCIÓN	43
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS	47
4.2.1	Descripción macro y micro-morfológica de ascomas	47
4.2.2	Caracterización molecular	49
4.3	RESULTADOS.....	53
4.3.1	Descripción macro y micro-morfológica de ascomas	53
	Sitio Tláloc.....	53
	Sitio Izta-Popo	58
	Sitio Mariposa Monarca.....	61
4.3.2	Análisis filogenético	65
4.3.3	Tamaño de esporas.....	69
	4.3.3.1. ANOVA y prueba de hipótesis	69
	4.3.3.2. Prueba de comparación de medias	70
4.4	DISCUSIÓN	71
4.5	CONCLUSIONES	75
4.6	LITERATURA CITADA.....	76
CAPÍTULO V. CUANTIFICACIÓN DE NÚCLEOS EN ASCOSPORAS E HIFAS .		80
5.1	INTRODUCCIÓN	80
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS	81
5.2.1	Preparación de esporas.....	81
5.2.2	Preparación de micelio	82
5.2.3	Cuantificación de núcleos en esporas e hifas	82
5.2.4	Análisis estadístico	82
5.3	RESULTADOS.....	84
	5.3.1. ANOVA y prueba de hipótesis	84
	5.3.2. Prueba de comparación de medias	84
5.4	DISCUSIÓN	86
5.5	CONCLUSIONES	88
5.6	LITERATURA CITADA.....	89
CAPÍTULO VI. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i>		90
6.1	INTRODUCCIÓN	90

6.2	MATERIALES Y MÉTODOS	93
6.2.1	Aislamiento <i>in vitro</i>	93
	Aislamientos monospóricos	93
	Aislamientos del contexto	93
6.2.2	Medios de cultivo y ajuste de pH	94
6.2.3	Siembra de cepas en los medios de cultivo	94
6.2.4	Descripción morfológica	94
6.2.5	Velocidad de crecimiento	95
6.2.6	Definición de variables de estudio	95
6.2.7	Diseño experimental	96
6.2.8	Análisis estadístico	97
6.3	RESULTADOS.....	100
6.3.1	Descripción morfológica	100
6.3.2	Velocidad de crecimiento.....	112
	ANOVA y prueba de hipótesis	112
	Prueba de comparación de medias	113
6.4	DISCUSIÓN	117
6.5	CONCLUSIONES	120
6.6	LITERATURA CITADA.....	121
CAPÍTULO VII. PRUEBAS DE INCOMPATIBILIDAD SOMÁTICA		123
7.1	INTRODUCCIÓN	123
7.2	MATERIALES Y MÉTODOS	126
7.3	RESULTADOS.....	129
7.4	DISCUSIÓN	134
7.5	CONCLUSIONES	136
7.6	LITERATURA CITADA.....	137
CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN GENERAL		139
CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES GENERALES		142
ANEXOS.....		143
	Anexo I. Tipos de manto de ectomicorrizas basados en la anatomía de la superficie	143

Anexo II- Descriptor morfológico de aislamiento <i>in vitro</i> de hongos.	144
Anexo III. Secuencias de 16 cepas de <i>Morchella</i> spp. obtenidas con ITS4 e ITS5, localizadas en bosques de <i>Abies religiosa</i> en el Monte Tláloc, Estado de México y área de influencia del Parque Nacional Izta-Popo, Puebla.....	146

ÍNDICE DE CUADROS

Capítulo III. Caracterización del hábitat de *Morchella* spp. en bosques de *Abies religiosa* y su posible interacción micorrícica *in situ*

Cuadro 1. Muestreo de ascomas en poblaciones de <i>Morchella</i> spp. en cuatro sitios a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal del centro de México.	18
Cuadro 2. Coordenadas de áreas muestreadas en el Desierto de los Leones.	19
Cuadro 3. Coordenadas de ascomas localizados en los sitios Tláloc, Izta-Popo y Mariposa Monarca.	27
Cuadro 4. Distancia de las ectomicorrizas a la base del ascoma de los sitios Mariposa Monarca, Izta-Popo y Tláloc.	30

Capítulo IV. Caracterización morfológica y molecular de *Morchella*

Cuadro 1. Forma del himenóforo de los ascomas de <i>Morchella</i> ajustadas por el cociente Di/Dm	65
Cuadro 2. Comparación de secuencias ITS obtenidas, con las existentes en la base de datos GenBank.	68
Cuadro 3. Análisis de varianza para Largo de Espora.	69
Cuadro 4. Análisis de varianza para Ancho de Espora.	69
Cuadro 5. Análisis de varianza para Cociente Q	69
Cuadro 6. Prueba de comparación de medias para largo, ancho (μm) y Q de esporas por efecto de los tratamientos grupos filogenéticos.	70

Capítulo V. Cuantificación de núcleos en ascosporas e hifas

Cuadro 1. Grupos filogenéticos empleados para el conteo de núcleos en hifas y esporas de <i>Morchella</i> spp.	81
Cuadro 2. Análisis de varianza para número de núcleos en esporas e hifas de <i>Morchella</i> spp.	84
Cuadro 3. Prueba de comparación de medias para número de núcleos en esporas e hifas por efecto de los grupos filogenéticos.	85

Capítulo VI. Aislamiento y caracterización *in vitro*

Cuadro 1. Diseño de tratamientos para la caracterización de cuatro cepas de <i>Morchella</i> cultivadas en tres medios de cultivo a tres pH diferentes.....	96
Cuadro 2. Análisis de varianza para la velocidad de crecimiento.	113
Cuadro 3. Prueba de comparación de medias para velocidad de crecimiento (mm d ⁻¹) por efecto del grupo filogenético, medio de cultivo y pH.	114
Cuadro 4. Prueba de comparación de medias para velocidad de crecimiento (mm d ⁻¹) por efecto de dos factores combinados.....	115
Cuadro 5. Prueba de comparación de medias para velocidad de crecimiento (mm d ⁻¹) por efecto de tres factores combinados.	116

Capítulo VII. Pruebas de incompatibilidad somática

Cuadro 1. Ubicación filogenética, origen geográfico y tipo de aislamiento de las 8 cepas seleccionadas para las pruebas de anastomosis.....	126
Cuadro 2. Arreglos para la prueba de anastomosis de 8 cepas de <i>Morchella</i> spp.	127
Cuadro 3. Tipos de contacto hifal entre pares de cepas.....	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo III. Caracterización del hábitat de *Morchella* spp. en bosques de *Abies religiosa* y su posible interacción micorrícica *in situ*

Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de ascomas de <i>Morchella</i> spp.....	16
Figura 2. Procesamiento de ascomas y muestras de suelo.....	22
Figura 3. Ubicación geográfica del sitio Desierto de los Leones.....	23
Figura 4. Ubicación geográfica del sitio Tláloc, distribución de ascomas y especies forestales.	24
Figura 5. Ubicación geográfica del sitio Izta-Popo y distribución de ascomas.	25
Figura 6. Ubicación geográfica del sitio Mariposa Monarca y distribución de ascomas.	26
Figura 7. Morfotipos ectomicorrícicos detectados en suelo adyacente a los ascomas de <i>Morchella</i> spp. en los sitios Mariposa Monarca e Izta-Popo.	28
Figura 8. Morfo-anatotipos ectomicorrícicos adyacente a los ascomas de <i>Morchella</i> spp. en los sitios Izta-Popo y Tláloc.	34

Capítulo IV. Caracterización morfológica y molecular de *Morchella*

Figura 1. Ascomas de <i>Morchella</i> spp. localizados en el sitio Tláloc.....	55
Figura 2. Ascomas de <i>Morchella</i> spp. localizados en el sitio Izta-Popo.	59
Figura 3. Ascomas de <i>Morchella</i> spp. localizados en el sitio Mariposa Monarca..	62
Figura 4. Filogenia de las morchellas del Centro de México, construida por el método de Máxima Parsimonia	67

Capítulo V. Cuantificación de núcleos en ascosporas e hifas

Figura 1. Número de núcleos en hifas y esporas de <i>Morchella</i> spp.....	85
---	----

Capítulo VI. Aislamiento y caracterización *in vitro*

Figura 1. Morfología de los aislamientos del grupo filogenético 1 de <i>Morchella</i> desarrollados en tres medios de cultivo y tres niveles de pH (20 d después de la siembra).....	102
--	-----

Figura 2. Morfología de los aislamientos del grupo filogenético 2 de <i>Morchella</i> desarrollados en tres medios de cultivo y tres niveles de pH (20 d después de la siembra).....	105
Figura 3. Morfología de los aislamientos del grupo filogenético 3 de <i>Morchella</i> desarrollados en tres medios de cultivo y tres niveles de pH (20 d después de la siembra).....	108
Figura 4. Morfología de los aislamientos del grupo filogenético 4 de <i>Morchella</i> desarrollados en tres medios de cultivo y tres niveles de pH (20 d después de la siembra).....	111
Figura 5. Estructuras distintivas formadas en los aislamientos <i>in vitro</i> de <i>Morchella</i>	112

Capítulo VII. Pruebas de incompatibilidad somática

Figura 1. Detalle macroscópico del pareamiento de 8 cepas de <i>Morchella</i> donde se observa el fenómeno de compatibilidad e incompatibilidad somática.....	132
Figura 2. Detalle microscópico de los tipos de contacto hifal observados en los pareamientos de <i>Morchella</i> empleando NBT y azul de tripano.....	133

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Morchella es un género de hongos ascomicetos comestibles de alto valor comercial en el mundo y conocidas México como “morillas”, “colmenillas”, “pancitas”, “olotitos” y “elotitos” (Pilz *et al.* 2007). En mercados internacionales como en China, el kg en seco alcanza los USD\$ 160.00 (Du *et al.* 2012), mientras que en México se comercializan en mercados locales y regionales del Estado de México, Morelos, Puebla, y el Distrito Federal (Villarreal-Ruiz 1996, Pérez-Moreno *et al.* 2010) a precios que oscilan entre los \$ 24.14 a \$ 25.75 dólares el kg en fresco (“hongueros”, comunicación personal, 31 de agosto de 2011¹). Villarreal-Ruiz y Gómez (1997) señalan que miembros del género *Morchella* forman parte de un número reducido de especies de hongos silvestres comestibles de México, que son exportados a diversos países, entre los que destaca Estados Unidos; a pesar de que el marco legal y la organización para su exportación son incipientes e irregulares.

Las morchellas mexicanas crecen en las regiones montañosas de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y Sierra Madre del Sur, siendo muy comunes en los bosques de *Abies religiosa* del Eje Neovolcánico Transversal que va del Este al Oeste del país, a 20° LN (Pilz *et al.* 2007). En otros países las morchellas pueden encontrarse en praderas restauradas de pastos y bosques dominados por olmos, robles y nogales (Dalglish y Jacobson 2005); en bosques de *Pinus brutia*, *P. nigra*, *Cedrus libani*, *Abies cilicica*, *Quercus coccifera*, *Castanea sativa*, *Juniperus* sp. y *Picea orientalis* (Taskin *et al.* 2010); en bosques de *Pseudotsuga menziesii*, *Tsuga heterophylla* y *Abies grandis*, todos en mezcla con otras coníferas (Pagliaccia *et al.* 2011).

Por otra parte, cabe resaltar que la variabilidad genética del género *Morchella*, así como las condiciones biogeográficas y climáticas que influyen en su desarrollo, resultan en una alta plasticidad fenotípica que ha dificultado su clasificación taxonómica empleando métodos clásicos (Pilz *et al.* 2007, Kanwal *et al.* 2011,

¹ Entrevistados el 27 de agosto de 2011 en la VIII Feria del Hongo. Delegación Cuajimalpa, Distrito Federal.

Pagliaccia *et al.* 2011). Los recientes estudios desarrollados por Taskin *et al.* (2010) y O'Donnell *et al.* (2011) sugieren que los miembros del género *Morchella*, parecen contener especies crípticas y de distribución geográfica restringida, contrastando con el planteamiento de Bunyard (1994, 1995), que lo considera constituido por pocas especies con distribución cosmopolita. En estudios filogenéticos recientes, se han distinguido repetidamente dos clados: (1) *esculenta* (morchellas amarillas) y (2) *elata* (morchellas negras) (Taskin *et al.* 2010, O'Donnell *et al.* 2011, Kanwal *et al.* 2011, Du *et al.* 2012, Kuo *et al.* 2012). Adicionalmente existe un linaje independiente representado por *M. rufobrunnea* (O'Donnell *et al.* 2011, Kuo *et al.* 2012) y *M. anatolica* (Taskin *et al.* 2012). Cabe señalar que actualmente algunas especies están siendo confirmadas y otras están surgiendo como nuevas para la ciencia (Kuo 2008). Por ejemplo, Isiloglu *et al.* (2010) reportan a *M. anatolica* como una nueva especie de un bosque de pino en Turquía; mientras que O'Donnell *et al.* (2011) reportan 41 especies filogenéticas de varias partes del mundo y de las cuales Kuo *et al.* (2012) describen formalmente 19 "endémicas" de Norteamérica, de las cuales 14 son especies nuevas para la ciencia, reforzando la hipótesis de endemismo continental de O'Donnell *et al.* (2011).

Los estudios anteriormente mencionados indican que existen al menos medio centenar de especies en el mundo, por lo que México puede estar albergando una gran riqueza de especies hasta ahora desconocidas y amenazadas por diferentes causas, entre las que destacan la contaminación ambiental y la consecuente declinación de bosques. Sin embargo, a la fecha este género no ha sido estudiado a profundidad y sólo *M. rufobrunnea* ha sido validada taxonómicamente por Guzmán y Tapia (1998). Esto ha generado, de acuerdo con Villarreal y Gómez (1997) entre otras cosas, una regulación oficial sin bases sólidas, tal es el caso de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Además, Villarreal-Ruiz (1996) encuentra contradictorias otras normas oficiales vigentes, tal es el caso de la NOM-059-ECOL-1994 (ratificada como NOM-059-ECOL-2001) que categoriza a *Morchella* spp. como amenazada, y la NOM EM 009-SARH3-1994 (ratificada cómo

NOM-010-RECNAT-1996) que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para su aprovechamiento, transporte y almacenamiento.

En cuanto a su estatus trófico, existen evidencias de su asociación ectomicorrícica *in situ* con *Picea abies* (Buscot y Tottke 1990), *Larix occidentalis*, *Pinus contorta*, *P. ponderosa* y *Pseudotsuga menziesii* en condiciones *in vitro* (Dahlstrom *et al.* 2000). Recientemente se ha reportado una nueva asociación simbiótica no micorrícica de *Morchella* con raíces de la gramínea *Bromus tectorum* (Baynes *et al.* 2012). Por otro lado, se ha encontrado que algunas especies son eficientes degradadoras de desechos agrícolas y medios de cultivo orgánicos (Cavazzoni y Manzoni 1994, Papinutti y Lechner 2008, Zhang *et al.* 2010, Kanwal y Reddy 2011). En relación a las especies mexicanas, a la fecha no existen reportes sobre sus hábitos tróficos, sin embargo, dada su habilidad potencial para degradar lignocelulosa, pudieran ser utilizadas para la producción de ascomas a escala comercial.

Pilz *et al.* (2007) consideran necesarios estudios sobre sistemática, biología, ecología, genética y el estatus micorrícico de este género, ya que permitirán conocer: (1) su complejo ciclo de vida; (2) sus patrones de adaptación debido a los cambios globales y (3) los recursos genéticos potenciales contenidos en ellas. Lo anterior favorecerá su manejo sustentable y la conservación de su biodiversidad. Por tal motivo, en esta investigación se busca aportar información orgánica y genética de las morchellas de México, monitoreadas en cuatro bosques de *Abies religiosa* bajo diferentes condiciones de contaminación ambiental.

1.1 LITERATURA CITADA

Baynes M, Newcombe G, Dixon L, Castlebury L, O'Donnell K. 2012. A novel plant-fungal mutualism associated with fire. *Fungal biology* 116:133-144.

Bunyard BA, Nicholson MS, Royse DJ. 1994. A systematic assessment of *Morchella* using RFLP analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Mycologia* 86:762-772.

Bunyard BA, Nicholson MS, Royse DJ. 1995. Phylogenetic resolution of *Morchella*, *Verpa*, and *Disciotis* [Pezizales: Morchellaceae] based on restriction enzyme analysis of the 28S ribosomal RNA gene. *Experimental Mycology* 19:223-233.

Buscot F, Kottke I. 1990. The association of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier with roots of *Picea abies* (L.) Karst. *New Phytologist* 116:425-430.

Cavazzoni V, Manzoni M. 1994. Extracellular cellulolytic complex from *Morchella conica*: production and purification. *Lebenson Wiss Technology* 27:73.77.

Dahlstrom JL, Smith JE, Weber NS. 2000. Mycorrhiza-like interaction by *Morchella* with species of the Pinaceae in pure culture synthesis. *Mycorrhiza* 9:279-285.

Dalgleish HJ, Jacobson KM. 2005. A first assessment of genetic variation among *Morchella esculenta* (Morel) populations. *Journal of Heredity* 96:396-403.

Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-010-RECNAT-1996, Procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de hongos. Pp. 1-10.

Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Pp. 1-85.

Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Pp. 1-78.

Du XU, Zhao Q, O'Donnell K, Rooney AP, Yang ZL. 2012. Multigene molecular phylogenetics reveals true morels (*Morchella*) are especially species-rich in China. *Fungal Genetics and Biology* 49:455-469.

Guzmán G, Tapia F. 1998. The known morels in Mexico, a description of a new blushing species, *Morchella rufobrunnea*, and new data on *M. guatemalensis*. *Mycologia* 4:705-714.

Isiloglu M, Alli H, Spooner BM, Solak MH. 2010. *Morchella anatolica* (Ascomycota), a new species from southwestern Anatolia, Turkey. *Mycologia* 102:455-458.

Kanwal HK, Acharya K, Ramesh G, Reddy MS. 2011. Molecular characterization of morchella species from the western Himalayan Region of India. *Current Microbiology* 62:1245-1252.

Kanwal HK, Reddy MS. 2011. Effect of carbon, nitrogen sources and inducers on ligninolytic enzyme production by *Morchella crassipes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:687-691.

Kuo M. 2008. *Morchella tomentosa*, a new species from western North America, and notes on *M. rufobrunnea*. *Mycotaxon* 105:441-446.

Kuo M, Dewsbury DR, O'Donnell K, Carter CM, Rehner SA, Moore DJ, Moncalvo JM, Canfield FA, Stephenson SL, Methven AS, Volk TJ. 2012. Taxonomic revision of true morels (*Morchella*) in Canada and the United States. *Mycologia* (In press).

O'Donnell K, Rooney AP, Mills G, Kuo M, Weber NS, Rehner SA. 2011. Phylogeny and historical biogeography of true morels (*Morchella*) reveals an early Cretaceous origin and high continental endemism and provincialism in the Holarctic. *Fungal Genetics and Biology* 48:252-265.

Pagliaccia D, Douhan GW, Douhan L, Peever TL, Carris LM, Kerrigan JL. 2011. Development of molecular markers and preliminary investigation of the population structure and mating system in one lineage of black morel (*Morchella elata*) in the Pacific Northwestern USA. *Mycologia* 103:969-982.

Papinutti L, Lechner B. 2008. Influence of the carbon source on the growth and lignocellulolytic enzyme production by *Morchella esculenta* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:1715–1721

Pérez-Moreno J, Lorenzana-Fernández A, Carrasco-Hernández V, Yescas-Pérez A. 2010. *Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos*. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACyT. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 167 p.

Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz TL, Parks CG, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE. 2007. *Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America*. General

- Technical Report. PNW-GTR-710. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 161 p.
- Taskin H, Buyukalaca S, Dogan HH, Rehner SA, O'Donnell K. 2010. A Multigene Molecular Phylogenetic Assessment of True Morels (*Morchella*) in Turkey. *Fungal Genetics and Biology* 47:672-682.
- Taskin H, Buyukalaca S, Hansen K, O'Donnell K. 2012. Multilocus phylogenetic analysis of true morels (*Morchella*) reveals high levels of endemics in Turkey relative to other regions of Europe. *Mycologia* 104:446-461.
- Villarreal-Ruiz L. (Ed.) 1996. Los Hongos Silvestres: Componentes de la Biodiversidad y Alternativa para la Sustentabilidad de los Bosques Templados de México. Informe Final, Proyecto-CONABIO C066. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Edo. de México.
- Villarreal-Ruiz L, Gómez A. 1997. Inventory and monitoring wild edible mushrooms in Mexico: Challenge and opportunity for sustainable development. *In: Mycology in sustainable development: Expanding concepts, vanishing borders.* (Palm ME, IH Chapela Eds.). Parkway Publishers, Boone. Pp. 99-109.
- Zhang GP, Zhang F, Ru WM, Han JR. 2010. Solid state fermentation of cornmeal with the ascomycete *Morchella esculenta* for degrading starch and upgrading nutritional value. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:15-20.

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la diversidad orgánica y genética de poblaciones de *Morchella* spp. en cuatro bosques de *Abies religiosa* del Centro de México con diferentes grados de exposición a contaminantes atmosféricos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

(1) Estudiar el hábitat de *Morchella* spp. en cuatro bosques de *Abies religiosa* y su posible interacción ectomicorrícica con plantas del estrato arbóreo y herbáceo. (2) Caracterizar morfológica y molecularmente las especies de *Morchella*. (3) Cuantificar los núcleos de ascosporas e hifas obtenidas de cultivos monospóricos. (4) Evaluar su crecimiento *in vitro* de *Morchella* spp. empleando diferentes medios de cultivo y niveles de pH. (5) Determinar la incompatibilidad somática de cepas provenientes de diferentes sitios geográficos.

CAPÍTULO III. CARACTERIZACIÓN DEL HÁBITAT DE *Morchella* spp. EN BOSQUES DE *Abies religiosa* Y SU POSIBLE INTERACCIÓN MICORRÍCICA *in situ*.

3.1 INTRODUCCIÓN

En México, el género *Morchella* se ha reportado en bosques de coníferas y latifoliadas (Villarreal y Pérez-Moreno, 1989). Sin embargo, Villarreal-Ruiz (1996) y Pilz *et al.* (2007) sugieren que está más asociado con *Abies religiosa* de la Región Central de México, encontrándose en micro hábitats umbrosos, húmedos y con alta cobertura arbórea. Estos bosques de oyamel se ubican en altitudes entre los 2,400 a los 3,500 m (Rzedowski (2006); y de acuerdo con Manzanilla (1974), forman masas puras o se asocian con otras coníferas y latifoliadas. Si bien, las morchellas pueden encontrarse en bosques nubosos de montaña o de pino-encino (Pilz *et al.* 2007), en el Parque Nacional Desierto de los Leones, se han localizado sólo en masas puras de oyamel y no en bosques mixtos de *Abies-Pinus-Quercus* (CONANP 2006). Cabe destacar que solo *M. rufobrunnea* se ha localizado en una zona subtropical de bosque mesófilo de montaña en la región de Xalapa, Veracruz, a 1350 m de altitud, con bosque mesófilo de montaña donde predominan *Quercus*, *Liquidambar*, *Clethra* y *Alnus* (Guzmán y Tapia 1998).

3.1.1 Declinación de los bosques de oyamel que albergan morchellas

Los bosques de oyamel, constituyen los sitios de distribución predominante de *Morchella* (Villarreal-Ruiz 1996). En los alrededores del Valle de México muchos de estos bosques han sido perturbados debido a actividades humanas y a la contaminación ambiental proveniente de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (SMA-GDF 2005, 2011). De acuerdo con la Secretaría de Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal, a pesar del mejoramiento de la calidad del aire en los últimos 25 años, siguen presentándose contaminantes con concentraciones

por arriba de los valores establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas de Salud Ambiental. Dado que la La ciudad de México, se localiza en un valle rodeado de montañas la libre circulación del viento se dificulta, propiciando la acumulación de los contaminantes atmosféricos (Villaseñor-González 2011). Adicionalmente, existen dos factores naturales que la hacen propensa a la contaminación: (1) altitud promedio de 2,240 m, que provoca que los procesos de combustión sean menos eficientes debido a que la concentración de oxígeno es ~23 % menor que al nivel del mar. (2) su latitud tropical provoca una intensa radiación solar, favoreciendo la formación de ozono (SMA-GDF 2006). Este fito-oxidante es el resultado de las complejas reacciones que la radiación ultravioleta del sol desencadena entre los óxidos de nitrógeno y los hidrocarburos emitidos a la atmósfera, los cuales son precursores del ozono (SMA-GDF 2006, Villaseñor-González 2011).

El Parque Nacional Desierto de los Leones, D. F. es uno de los bosques de mayor importancia para la Ciudad de México, sin embargo es uno de los más afectados por efecto de contaminantes atmosféricos. En este sitio se han registrado alrededor de 102 especies de hongos macromicetos, de las cuales Morchellaceae la quinta familia con una mayor riqueza de especies (CONANP 2006). En cuanto a especies forestales, *Abies religiosa* en asociación con *Pinus* y *Quercus*, cubren casi la totalidad de la superficie del Parque. Las mejores masas de oyamel se localizan entre los 2,800 y los 3,200 m de altitud (CONANP 2006). Desde la década de 1970, se ha registrado el fenómeno de declinación y muerte masiva de oyamel en estos bosques, atribuido principalmente a la acción de masas de aire contaminado procedentes de la Ciudad de México. Si bien, hay otros factores secundarios que afectan el arbolado, los síntomas se aceleran por la contaminación atmosférica (Alvarado 1989). Recientemente, González-Medina *et al.* (2010) consideran que el ozono troposférico es el principal responsable de la reducción de la vitalidad y la muerte masiva de oyamel en el Parque Nacional Desierto de los Leones. Según estos autores, el ozono troposférico al entrar a las hojas a través de los estomas destruye la clorofila y permite la acumulación inusual de almidón, que atrae insectos defoliadores. Además se ha demostrado

que también reduce la translocación de carbohidratos a la raíz, limitando la distribución de fotoasimilados a las micorrizas (Grant 1996).

Otra zona boscosa importante y afectada por la contaminación ambiental es el Monte Tláloc, ubicado en el noreste del Valle de México y donde predomina el oyamel a partir de los 3,000 m de altitud, presentándose masas puras entre los 3,100-3,500 m s.n.m, y posteriormente inicia la codominancia con *P. hartwegii* a una altitud de 3,600 m (Villaseñor-González *et al.* 2011). Según este autor, el Monte Tláloc solo es afectado durante algunos días por los vientos contaminados provenientes de la Ciudad de México. Esta diferencia con respecto a otros bosques se debe a su ubicación respecto a la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, ya que la entrada principal del viento troposférico al Valle de México se ubica en la zona nor-oriental con transporte dominante hacia el sur. Además, existe una entrada menor del viento en la porción sur-oriental, siendo la dirección prevaleciente con mayor frecuencia del Nor-noreste a Sur-suroeste, aunque a menudo se forman turbulencias con zonas de confluencia y convergencia del viento (SMA-GDF 2005, 2006).

González-Medina *et al.* (2010) observaron que la concentración media de ozono registrada en el Parque Nacional Desierto de los Leones y otros sitios monitoreados como el Monte Tláloc y la Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca en Michoacán, a pesar de ser altas, resultaron sub-tóxicas con respecto al umbral de toxicidad (0.0400 ppm) de la norma internacional. De hecho, no encontraron diferencias importantes en exposición de ozono dentro del Parque, ni entre las otras áreas estudiadas. A pesar de estos resultados, concluyen que en el Parque Desierto de los Leones hay suficiente exposición para causar debilidad en la retención de follaje, densidad de copa y vigor a medida que aumenta la concentración de ozono. Por otro lado, Villaseñor-González (2011) no encontró correlación entre la presencia de ozono y el daño en oyamel en el Monte Tláloc, por lo que sugiere que pueden existir otros factores que expliquen los daños al arbolado este sitio. Finalmente, tampoco encontró una correlación en concentración de ozono y los gradientes altitudinales del mismo sitio, pero si

observó que las concentraciones de ozono con frecuencia llegan a ser tan elevadas como en las montañas del Ajusco y la Sierra de las Cruces en Huixquilucan, Estado México.

3.1.2 Estrategias tróficas del género *Morchella*

(Pilz *et al.* 2007) han sugerido que las estrategias tróficas en el ciclo de vida del género *Morchella*, va del saprofitismo-mutualismo-parasitismo. Se ha reportado evidencia histocitológica de la asociación ectomicorrícica *in situ* de *M. rotunda* con *Picea abies* (Buscot y Tottke 1990), en *in vitro* entre *Morchella* sp. con *Larix occidentalis*, *Pinus contorta*, *P. ponderosa* y *Pseudotsuga menziesii* (Dahlstrom *et al.* 2000). Además existe evidencia de que *M. elata* forma ectomicorrizas (ECM) secundarias al remplazar a otras previamente establecidas (Buscot 1992, citado por Pilz *et al.* 2007). Recientemente Baynes *et al.* (2012) reportaron una nueva asociación endofítica (no micorrícica) de *Morchella* sp. (filotipos Mel-6 y Mel-12) con raíces de la gramínea *Bromus tectorum*, creciendo en tejidos superficiales, ayudando a la planta a incrementar notablemente su biomasa en condiciones de invernadero. Por lo anterior, resulta muy interesante el estudio de las posibles interacciones que se pudieran establecer entre *Abies religiosa* y *Morchella* en nuestro país, ya que esta especie forestal es nativa de México y de acuerdo a la SEMARNAT (2008) tiene un potencial para ocupar 402, 462 ha, a pesar de que su superficie a disminuido al pasar de 164,848 ha en la década de los 70's a 142,269 en el 2002, representando el 0.098 % de la superficie nacional de vegetación.

Por otro lado, se ha encontrado que algunas especies de *Morchella* son eficientes degradadoras de desechos agrícolas y compuestos orgánicos (Cavazzoni y Manzoni 1994, Papinutti y Lechner 2008, Zhang *et al.* 2010, Kanwal y Reddy 2011). Por ejemplo, *M. cónica* produce un complejo extracelular de enzimas celulolíticas en medio mineral con celulosa en polvo como sustrato (Cavazzoni y Manzoni 1994). *M. esculenta* y *M. crassipes* producen la enzima ligninolítica lacasa, pero no registran actividad de manganeso peroxidasa (MnP) ni Lignina

Peroxidasa (LiP) (Papinutti y Lechner 2008, Kanwal y Reddy 2011). Por su parte *M. esculenta* crece en salvado de trigo, almidón de salvado de trigo con maíz, y avena laminada, y muestra actividad de endoglucanasa, β -glucosidasa, amilasa, lacasa y polimetilgalacturonasa (PMG) (Papinutti y Lechner 2008). Así mismo se ha detectado actividad de la enzima α -amilasa que degrada almidón, aumentado cuando es adicionado con glucosa y extracto de levadura (Zhang *et al.* 2010). La manosa y ramnosa son excelentes fuentes de carbono para la producción de lacasa en *M. crassipes*, mientras que fuentes de nitrógeno orgánico (peptona y caseína) aumentan la producción de lacasa comparada con fuentes inorgánicas (Kanwal y Reddy 2011).

Se ha postulado que bajo ciertas condiciones, algunos hongos ectomicorrícicos (EcM) son capaces de adquirir carbono a partir de la materia orgánica del suelo y hojarascas cuando éste es limitado en la planta, e incluso proveerle cuando lo requiere (Courty *et al.* 2007). Esta adaptación implica que el balance de carbono en el suelo está sujeto a factores ecológicos que afectan tanto a la planta como al hongo (Talbot *et al.* 2008). Baldrian (2009) sostiene que no hay evidencia suficiente para confirmar estas funciones, porque los hongos ECM se encuentran en horizontes profundos del suelo, donde la disponibilidad de compuestos de carbono con valor energético es baja. Además sugiere que la capacidad de estos hongos para producir enzimas ligninolíticas y celulasas es baja respecto a la de los saprobios, evidenciada por la poca cantidad de copias de los genes correspondientes en hongos ECM (ejemplo: *Laccaria bicolor* y *Amanita bisporigenes*) comparado con especies saprobias (ejemplo: *Galerina marginata*).

Estas evidencias y las pruebas isotópicas desarrolladas por Hobbie *et al.* (2001) indican que si bien, es difícil que una especie de *Morchella* posea ambos *estatus* tróficos, el género alberga especies saprobias y micorrícicas. Sin embargo, a la fecha no existen reportes de las capacidades tróficas de las especies de morchellas mexicanas, considerando que su habilidad potencial para producir enzimas ligninocelulolíticas puede ser utilizada para la producción de ascomas a

escala comercial. De intensificarse dichos estudios, sería posible recuperar, preservar y propagar este recurso genético con resultados exitosos.

De acuerdo con lo anterior, se plantea como objetivo estudiar el hábitat de *Morchella* spp. en cuatro bosques de *Abies religiosa*, así como sus posibles interacciones simbiótica con plantas del estrato arbóreo y herbáceo.

3.2 ÁREA DE ESTUDIO

Se seleccionaron diversos sitios a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal, con base en trabajos que reportaron diversos grados de exposición a contaminantes atmosféricos, de acuerdo a su cercanía a la Ciudad de México (Alvarado 1989, SMA-GDF 2005, 2006, 2011; González-Medina *et al.* 2010, Villaseñor-González 2011) y la posible presencia de poblaciones de *Morchella* en bosques puros de oyamel, de acuerdo con Pilz *et al.* (2007). Con base en lo anterior, se eligieron los siguientes sitios (Figura 1): (1) Área de influencia del Parque Nacional Desierto de los Leones, D.F. (DDL), con alta contaminación atmosférica; (2) Cerro Tláloc, en el Estado de México (T), con mediana contaminación atmosférica; (3) Área de influencia del Parque Nacional Izta-Popo, Puebla (IP), con escasa contaminación atmosférica y (4) Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca, en Michoacán (MM), sin contaminación atmosférica.

La distancia lineal entre sitios fue determinada mediante el programa ArcGIS V.9.3, siendo de aproximadamente 107 Km entre Mariposa Monarca y Desierto de los Leones; de 186 Km entre Mariposa Monarca e Izta-Popo, de 162 Km entre Mariposa Monarca y Tláloc, de 79 Km entre Desierto de los Leones e Izta-Popo, de 60 Km entre Desierto de los Leones y Tláloc y de 39 Km entre Izta-Popo y Tláloc.

3.2.1 Sitio Desierto de los Leones (DDL)

Se localiza al suroeste de la Cuenca de México y pertenece a la unidad geomorfológica Sierra de las Cruces, con una superficie de 1,529 ha². Su altitud media es de 3,500 m, siendo los extremos 2,700 m en la zona más baja y 3,790 m en la cima del Cerro San Miguel. El clima corresponde a C(W₂) W(b')ig: templado subhúmedo con lluvias en verano, con una precipitación anual de 1,200 mm. La

²Diario Oficial de la Federación. 1917. Decreto para la creación del Parque Nacional Desierto de los Leones. Consultado el 7 de febrero de 2011 en: <http://www.conanp.gob.mx/sig/decretos/parques/Desiertoleones.pdf>

temperatura media anual oscila entre 7 y 15 °C (CONANP 2006). González Medina *et al.* (2010) encontraron en este sitio, una concentración media de 0.0186 ppm por hora de ozono troposférico, donde $4,826 \times 10^{-7}$ ppm fue la mínima y 0.0441 ppm fue la máxima, con un intervalo de medición de 2 a 3 semanas, que si bien es alto, sólo tres lecturas excedieron ligeramente el umbral tóxico de 0.0400 ppm.

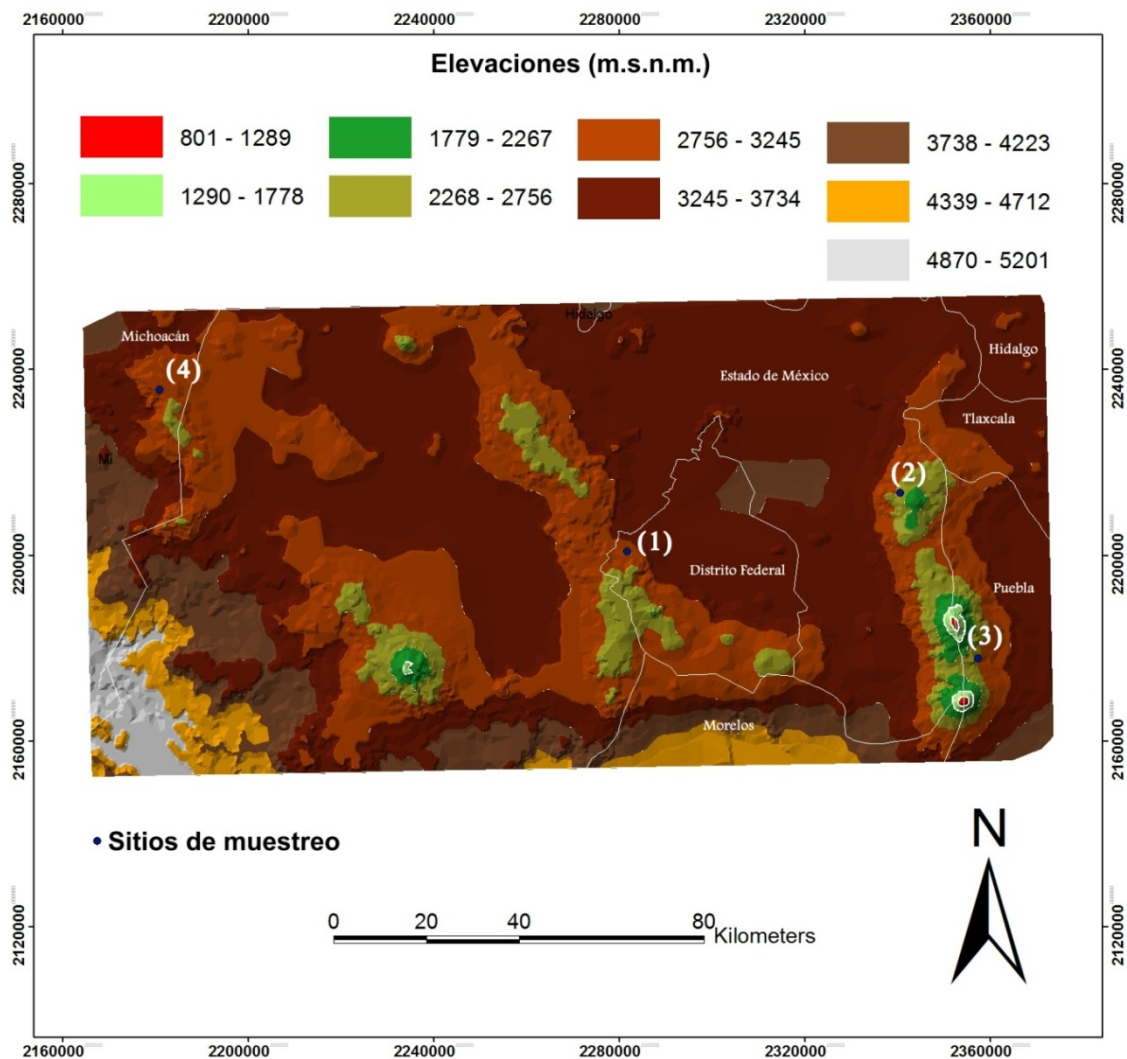


Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo de ascomas de *Morchella* spp.: (1) Desierto de los Leones, (2) Tláloc, (3) Izta-Popo, (4): Mariposa Monarca.

3.2.2 Sitio Tláloc (T)

Se localiza en un bosque de la comunidad San Miguel Tlaixpan, en las faldas del Monte Tláloc, en la región fisiográfica “Sierra Nevada” al oriente del Estado de México. Aunque a lo largo del declive occidental del Cerro se distinguen tres subtipos climáticos, en el área de estudio predomina un clima C (w0) (w) b(i)’: templado subhúmedo con lluvias en verano, con una precipitación anual de 700 mm. La temperatura media anual fluctúa entre 12-18 °C y con una oscilación térmica entre 5 y 7 °C (Ortiz y Cuanalo 1977). El cerro tiene una altitud de 4,120 m. En este sitio, González-Medina *et al.* (2010) ubican los niveles de ozono en 0.0145 ppm, mientras que Villaseñor-González *et al.* (2011) registran niveles entre 0.051 y 0.057 ppm.

3.2.3 Sitio Izta-Popo (IP)

Se localiza en la parte centro-oriental del Eje Volcánico Transversal, en los límites de Amecameca, Estado de México y Huejotzingo, Puebla. El clima en las proximidades de Amecameca donde se realizaron los muestreos es Cb (w₂) (w) gw’: templado subhúmedo, con lluvias de verano, con una precipitación media anual de 928 mm; siendo febrero el mes más seco (6.9 mm) y septiembre el más húmedo (185.6 mm). La temperatura media anual es de 14° C; siendo enero el mes más frío (10.8° C) y mayo el más cálido (16.2° C) (CONANP 2008).

3.2.4 Sitio Mariposa Monarca (MM)

Se localiza en la provincia fisiográfica del Eje Neovolcánico Transversal, entre el Estado de México y Michoacán. Su altitud va de 2,400 a 3,640 m. El clima es del tipo C (W₂) (W) (b’) (i): templado subhúmedo con lluvias en verano, con una precipitación anual de 200 a 1,800 mm. De acuerdo con Arriaga *et al.* (2000), la temperatura media anual oscila entre 12 y 18 °C. El sitio de estudio se ubica en la zona de amortiguamiento de la Sierra Chincua, Angangueo, Michoacán. En este sitio, González-Medina *et al.* (2010) ubican el nivel de ozono en 0.0145 ppm.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Muestreo de ascomas

Se realizaron ocho muestreos de ascomas de *Morchella* spp. durante el periodo de lluvias en 2010 y 2011 (Cuadro 1). Cada sitio fue seleccionado con base en la presencia de oyamel (*Abies religiosa*) como la única especie dominante del estrato arbóreo y se georreferenció empleando un GPS (*Global Positioning System*, por sus siglas en Inglés) Garmin Rino 610. Para realizar la búsqueda y localización de ascomas se emplearon sitios de muestreo rectangulares de tamaño variable, con la finalidad de encontrar el adecuado para conocer la distribución espacial de las poblaciones de *Morchella* spp. Adicionalmente, en el sitio Tláloc se registró la presencia y distribución espacial de las especies forestales dentro del sitio de muestreo.

Cuadro 1. Muestreo de ascomas en poblaciones de *Morchella* spp. en cuatro sitios a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal del centro de México.

Sitio	Fecha
1) Desierto de los Leones, D.F.	17, 22 de noviembre de 2010 22 de septiembre de 2011
2) Tláloc, Texcoco, Edo. De Mex.	7 de septiembre de 2011
3) Izta-Popo, Puebla.	26 de noviembre de 2010 26 de julio, 31 de agosto de 2011
4) Mariposa Monarca, Angangueo Mich.	14 de octubre de 2010

Los ascomas y las muestras de suelo adyacente con raíces de plantas se recolectaron siguiendo el protocolo propuesto por Villarreal-Ruiz (2006), que a continuación se describe brevemente: (1) el ascoma, se mantuvo intacto y se obtuvieron bloques de suelo adyacente de 15x15x15 cm, empleando una pala plana. Los bloques se etiquetaron y envolvieron cuidadosamente con papel

encerado y aluminio. (2) El ascoma se cortó de la base del estípite, se etiquetó y cubrió con papel encerado para su transporte. Posteriormente, se obtuvo una muestra del suelo en la base del ascoma, empleando un tubo de PVC (4 cm en diámetro por 30 cm en largo). Después de la extracción del tubo PVC (con el suelo y las raíces de las plantas), se envolvió con papel aluminio, se etiquetó y colocó en bolsas de polietileno para evitar su desecación. Todos los ascomas y las muestras de suelo adyacente se colocaron en hieleras con bolsas de gel congelante para su transporte y posterior procesamiento en el laboratorio.

(1) *Sitio Desierto de los Leones (DDL)*: Se muestrearon 8 áreas de aproximadamente 0.5 Ha, cuyas coordenadas y altitud se muestran en el Cuadro 2. Los sitios DDL-4, 5 y 6 se ubican dentro del Parque Nacional Desierto de los Leones, mientras que DDL-1, 2, 3, 7 y 8 corresponden al bosque de la Comunidad Agraria San Mateo Tlaltenango, Cuajimalpa, D.F (Figura 3).

Cuadro 2. Coordenadas de áreas muestreadas en el Desierto de los Leones.

Área	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud (m)
DDL-1	19°20'05.9"	99°18'20.7"	2,854
DDL-2	19°19'28.7"	99°18'14.5"	2,836
DDL-3	19°19'57.1"	99°18'17.6"	2,862
DDL-4	19°17'35.4"	99°19'11.9"	3,167
DDL-5	19°17'26.0"	99°19'06.9"	3,180
DDL-6	19°17'15.3"	99°18'58.8"	3,188
DDL-7	19°19'32.0"	99°18'14.5"	2,951
DDL-8	19°19'31.8"	99°18'14.5"	2,814

(2) *Sitio Tláloc (T)*: Se instaló un sitio de muestreo de 60x10 m cuyas coordenadas extremas son: Tláloc 1: 19°25'59.52"N, 98°44'51.43"O; Tláloc 2: 19°25'59.56"N,

98°44'50.88"O; Tláloc 3: 19°25'57.31"N, 98°44'51.03"O; Tláloc 4: 19°25'57.37"N, 98°44'51.51"O; a una altitud promedio de 3,454 m (Figura 4). Dentro del sitio de muestreo se registró el número y distribución espacial de ascomas y de las especies forestales, así como el diámetro a la altura del pecho (DAP).

(3) *Sitio Izta-Popo* (IP): Se instaló un sitio de muestreo de 180x50 m, cuyas coordenadas extremas son: Izta 1: 19° 6'22.49"N y 98°35'43.55"O, Izta 2: 19° 6'20.20"N y 98°35'38.01"O, Izta 3: 19° 6'18.58"N y 98°35'38.77", Izta 4: 19° 6'20.97"N y 98°35'44.07"O; a una altitud promedio de 3,257 m (Figura 5).

(4) *Sitio Mariposa Monarca* (MM): Se instaló un sitio de muestreo de 50x60 m cuyas coordenadas extremas son: 1: 19°39'36.97"N, 100°16'13.51"O; 2: 19°39'37.21"N, 100°16'11.77"O; 3: 19°39'35.22"N, 100°16'11.48"O; 4: 19°39'34.98"N, 100°16'13.13"O; a una altitud promedio de 3,198 m (Figura 6).

3.3.2 Pruebas de identificación ascomas-ectomicorrizas

El trazo de los bloques de suelo se realizó retirando cuidadosamente la hojarasca y el suelo de la base del ascoma para localizar el micelio de *Morchella* y su posible conexión con las ectomicorrizas adyacentes o con las raíces de herbáceas. Los sistemas micorrícicos localizados se cortaron y transfirieron a recipientes de plástico con agua corriente. Se separaron por morfotipos, con base a su color y textura y se clasificaron de acuerdo a la distancia a la que fueron encontrados de la base del ascoma.

En el caso de las muestras de suelo obtenidas con los tubos de PVC, se depositaron en un recipiente con agua corriente durante 1 h. Posteriormente se retiró el suelo del tubo de PVC, separando la capa de mantillo, humus y suelo mineral (cuando estuvieron presentes). Cada porción de suelo se colocó sobre un

tamiz con malla de 1 mm y las ectomicorrizas se separaron empleando un microscopio de disección estereoscópico (Carl Zeiss) y se clasificaron por morfotipos, en pequeños contenedores de plástico con agua corriente.

Los morfotipos ectomicorrícicos previamente etiquetados, se fotografiaron en fresco, empleando un microscopio estereoscópico Olympus Modelo SZX10. Adicionalmente, se obtuvieron los anatotipos de algunos morfotipos selectos mediante el pelado del manto, empleando una aguja fina de disección. Los fragmentos del manto se colocaron sobre un portaobjetos con una gota de agua destilada para su observación y fotodigitalización. Posteriormente, se retiró el exceso de agua y se montaron en ácido láctico (85 %). Algunos fragmentos de manto se acomodaron mostrando el anverso y reverso para observar el manto externo e interno respectivamente. Finalmente se les colocó un cubreobjetos y se identificaron con base al tipo de manto, de acuerdo a la clasificación de Agerer (1987-2006), empleando un microscopio de luz transmitida Olympus BX51. Las observaciones y tomas fotográficas se realizaron con microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC-Nomarski), con el objetivo de 100x. Todas las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Infinity 1 (Lumenera corporation) y las imágenes procesadas y analizadas con el programa Image-Pro Express, versión. 6.3 (Media Cybernetics).

Los ascomas de *Morchella* fueron deshidratados a 35 °C en una deshidratadora de hongos con sistema de aireación y termostato. Los morfotipos estudiados fueron preservados en refrigeración (4 °C) en viales con alcohol (50%) como material de referencia y para su eventual análisis molecular. Los anatotipos estudiados fueron preservados en portaobjetos con ácido láctico (85 %) y sellados con barniz de uñas. Cabe señalar que todos los materiales de referencia (ascomas, morfotipos y anatotipos) están depositados en el Laboratorio de Recursos Genéticos en Hongos del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad/Genética del Campus Montecillo.

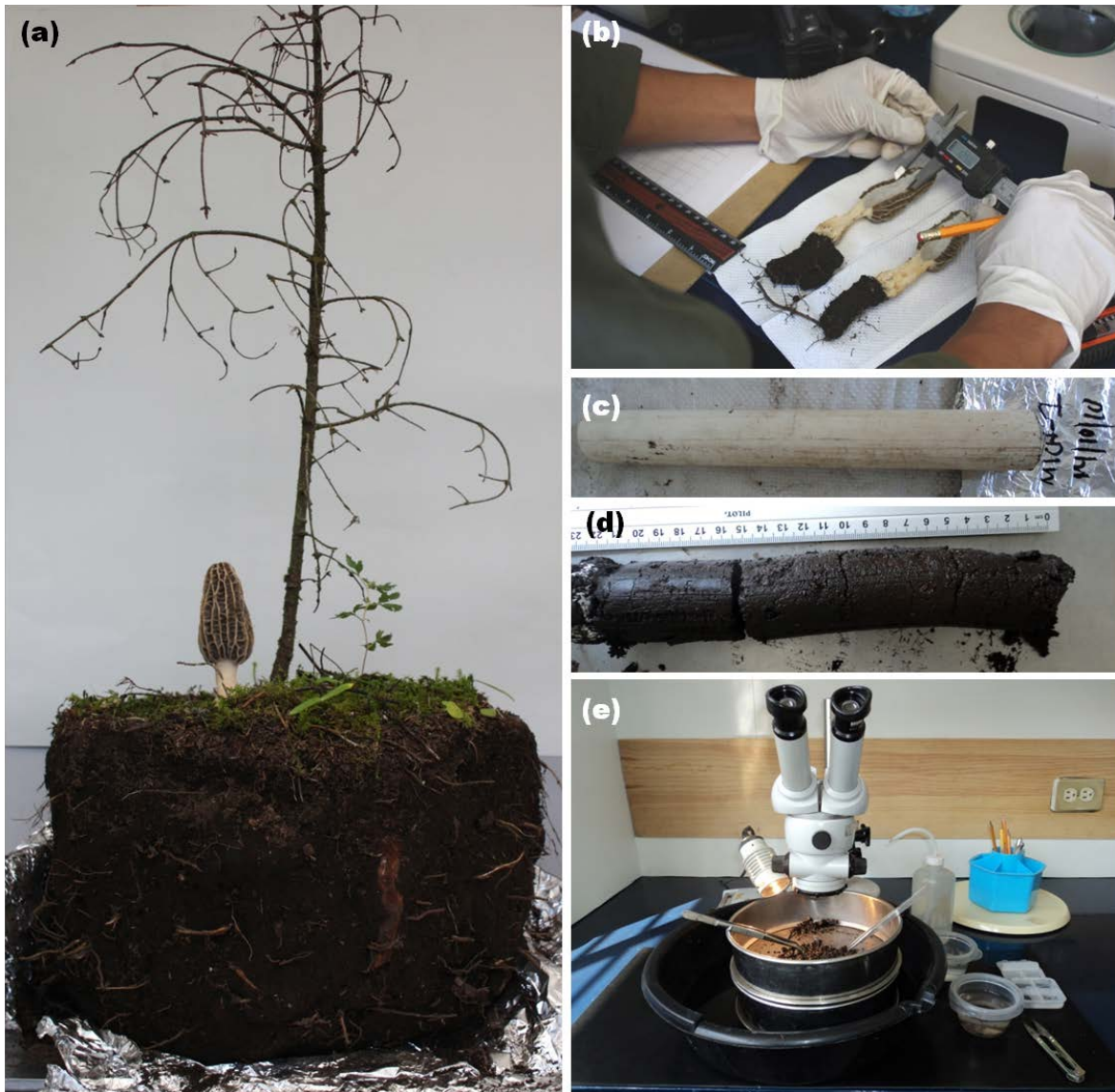


Figura 2. Procesamiento de ascomas y muestras de suelo. (a) Ascoma de *Morchella* sp. cercano a un brinjal muerto de *Abies religiosa*, en un bloque de suelo de 15x15x15 cm (Foto cortesía del Dr. L. Villarreal-Ruiz). (b) Medición morfométrica del ascoma de *Morchella* empleando un vernier digital (Foto cortesía del Dr. L. Villarreal-Ruiz). (c) muestra de suelo debajo de la base del estípite del ascoma en un tubo PVC. (d) Muestra de suelo hidratado y fraccionado conteniendo ectomicorrizas adyacentes al ascoma. (e) Tamizado húmedo de las muestras de suelo, para localizar ectomicorrizas potenciales de *Morchella*.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Muestreo de ascomas y de suelo con raíces

(1) *Sitio Desierto de los Leones*: No se detectó la presencia de ascomas de *Morchella* en ninguno de los sub-sitios muestreados. En opinión de los *hongueros* locales la aparición de ascomas inicia días después de establecerse el periodo de heladas, mismo que a la fecha no había iniciado, además, el periodo de lluvias había concluido.

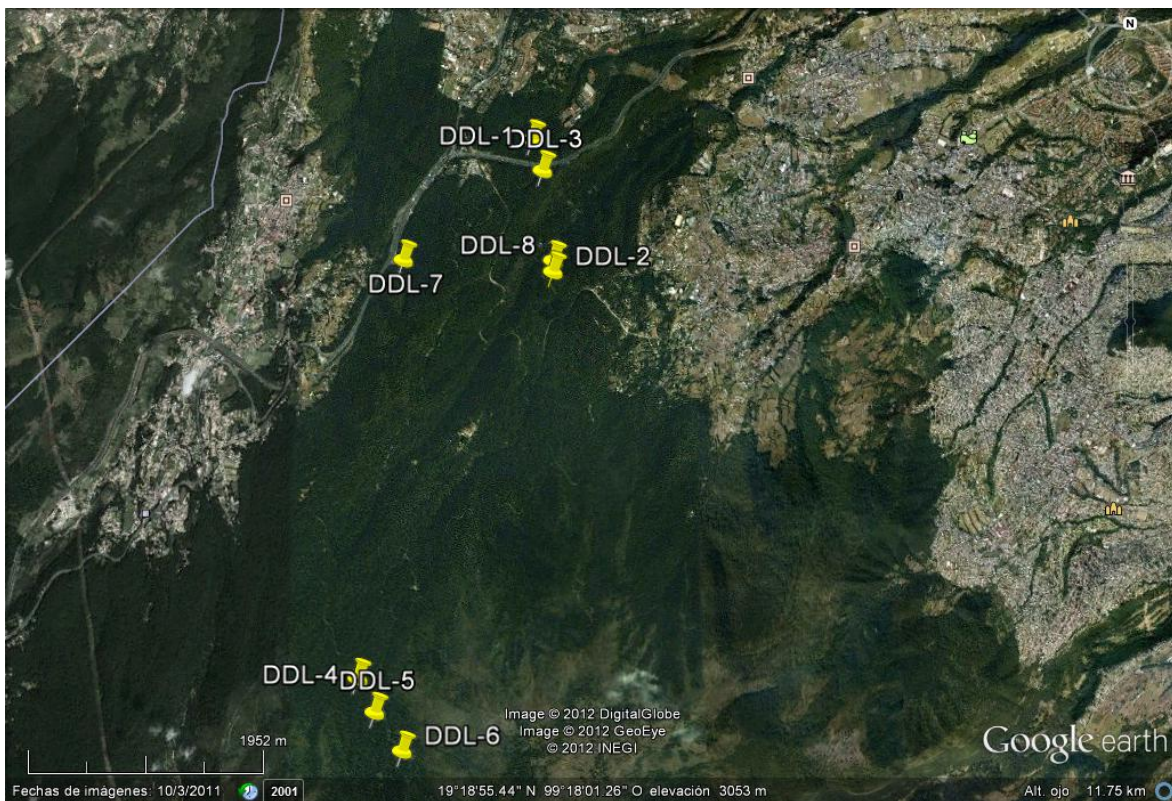


Figura 3. Ubicación geográfica del sitio Desierto de los Leones.

(2) *Sitio Tláloc*: se localizaron y georreferenciaron 12 ascomas (Cuadro 3), de los cuales se recolectaron 10 de la siguiente manera: (T-1 a T-4) con su respectivo bloque de suelo, (T-5 a T-8) en un solo bloque de suelo debido a su cercanía entre ellos y (T-9 y T-10) sin suelo. Dos ascomas no se recolectaron porque estaban senescentes. Se cuantificaron 45 árboles de *Abies religiosa* con DAP de (-4) 25 (+88) cm y 2 árboles de *Pinus* sp. con DAP de (-5) 6 (+7) cm (Figura 4).

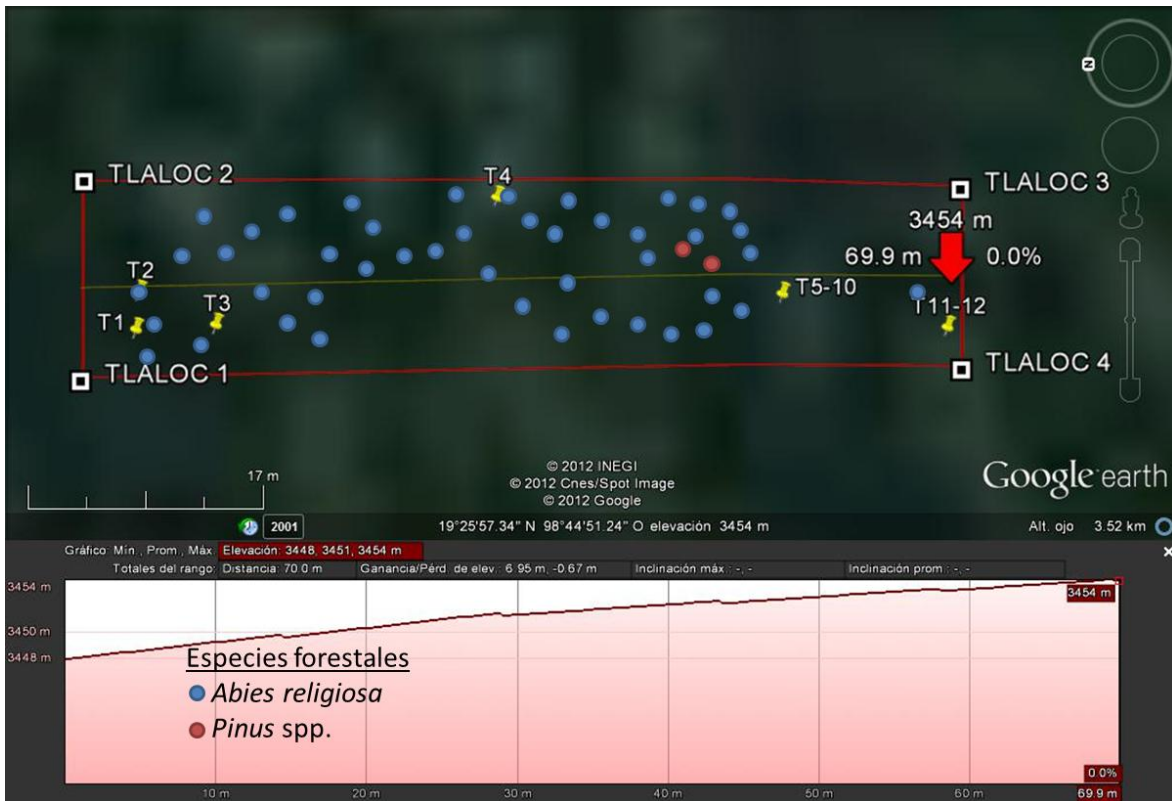


Figura 4. Ubicación geográfica del sitio Tláloc, distribución de ascomas y especies forestales.

(3) *Sitio Izta-Popo*: se localizaron y georreferenciaron cuatro ascomas, recolectados con sus respectivos bloques de suelo (Cuadro 3, Figura 5). El ascoma IP-1 se recolectó en estado avanzado de senescencia.

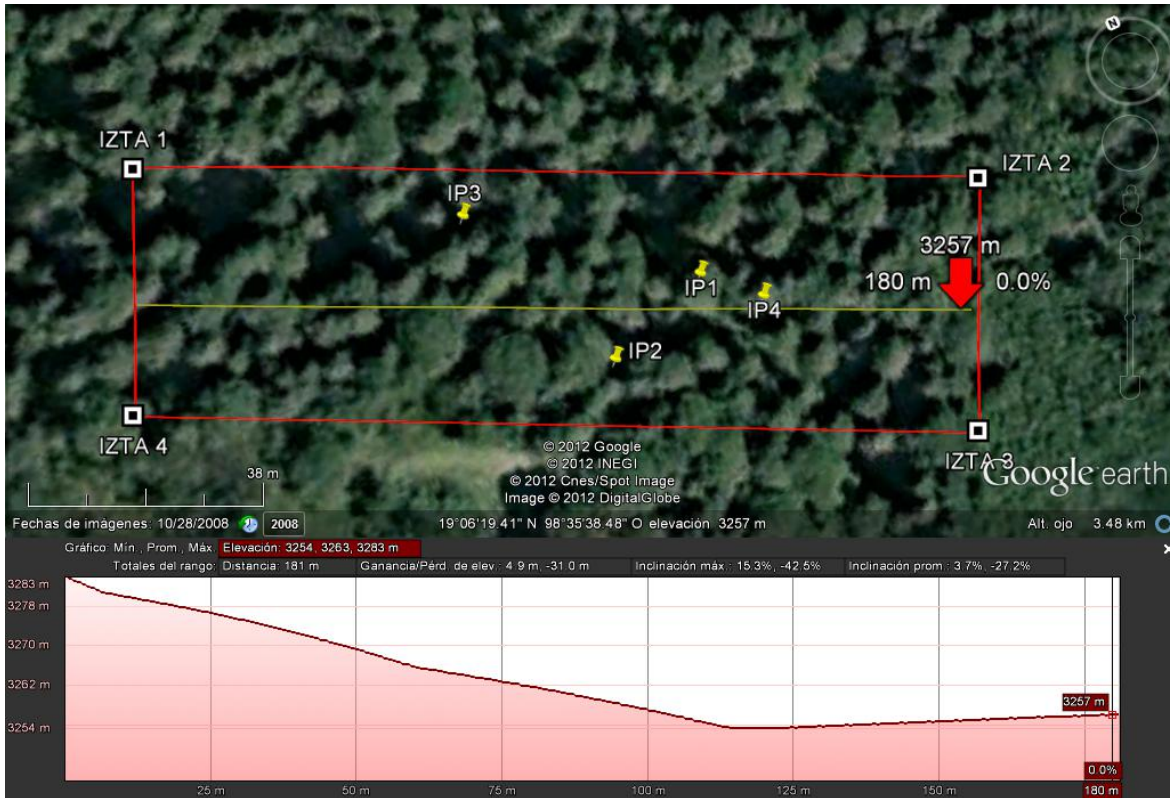


Figura 5. Ubicación geográfica del sitio Izta-Popo y distribución de ascomas.

(4) *Sitio Mariposa Monarca*: se localizaron 7 ascomas cuyas coordenadas se indican en el Cuadro 3 y se colectaron de la siguiente manera: MM-1, MM-2, MM-3 con suelo adyacente en tubos de PVC y MM-4, MM-5, MM-6, MM-7 con bloques de suelo adyacente (Figura 6).



Figura 6. Ubicación geográfica del sitio Mariposa Monarca y distribución de ascomas.

Cuadro 3. Coordenadas de ascomas localizados en los sitios Tlálloc, Izta-Popo y Mariposa Monarca.

Ascoma(año)	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud (m)
T1	19°25'59.4''	98°44'51.3''	3,444
T2	19°25'59.4''	98°44'51.2''	3,427
T3	19°25'59.2''	98°44'51.3''	3,435
T4	19°25'58.5''	98°44'51.0''	3,445
T5-10	19°25'57.8''	98°44'51.3''	3,453
T11-12	19°25'57.4''	98°44'51.4''	3,446
IP-1 (2010)	19°06'18.3''	98°35'40.4''	3,192
IP-2 (2010)	19°06'17.7''	98°35'39.1''	3,279
IP-3 (2011)	19°06'46.3''	98°35'51.4''	3,277
IP-4 (2011)	19°06'47.2''	98°35'19.8''	3,269
MM 1-7	19°39'35.9''	100°16'12.7''	3,198

T= Tlálloc, IP=Izta-Popo, MM=Mariposa Monarca. Ascomas del sitio Tlálloc recolectados en el 2011.

3.4.2 Pruebas de identificación ascomas-ectomicorrizas

Durante las pruebas de identificación, no se detectaron ectomicorrizas relacionadas directamente con el trazo del micelio y los ascomas de *Morchella*. En el sitio Tlálloc (T) se encontraron 16 morfo-anatotipos ectomicorrícicos (Cuadro 4, Figura 8f-t). En el sitio Izta-popo (IP) se encontraron 9 morfo-anatotipos ectomicorrícicos (Cuadro 4); de estos, los correspondientes a los bloques de suelo de los ascomas IP-1 a IP-2, sólo se fotografiaron (Figura 7p-s), mientras que los correspondientes a los bloques de suelo de los ascomas IP-3 e IP-4, adicionalmente se les hizo el pelado de manto (Figura 8a-e). Las ectomicorrizas localizadas en el suelo adyacente a los ascomas del sitio Mariposa Monarca, sólo se fotografiaron, contabilizándose 16 morfotipos (Cuadro 4, Figura 7a-o). En las ectomicorrizas de los bloques de suelo de los ascomas MM-4 y MM-5 sólo se encontraron hifas fibuladas, típicas de basidiomicetos.

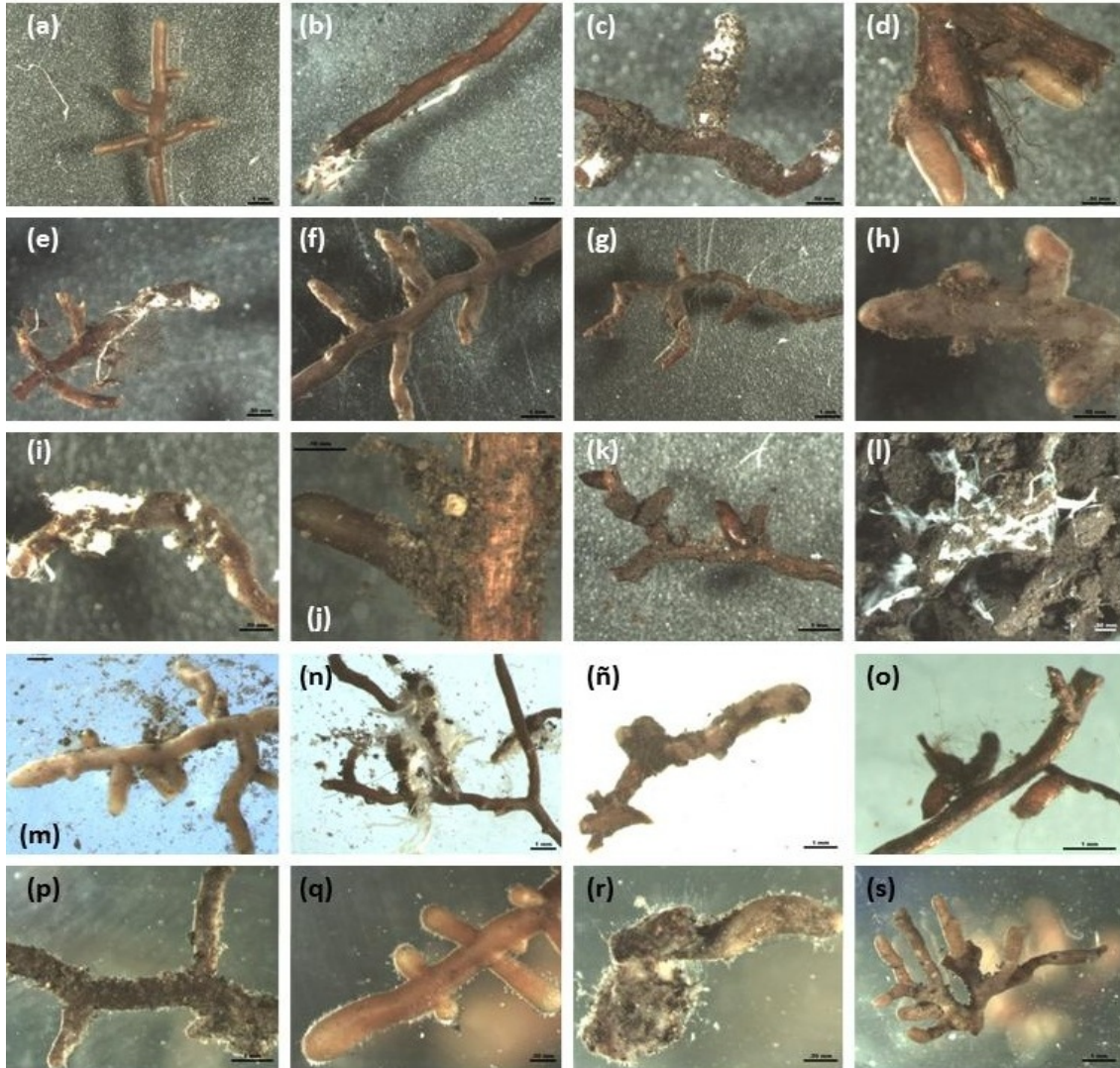


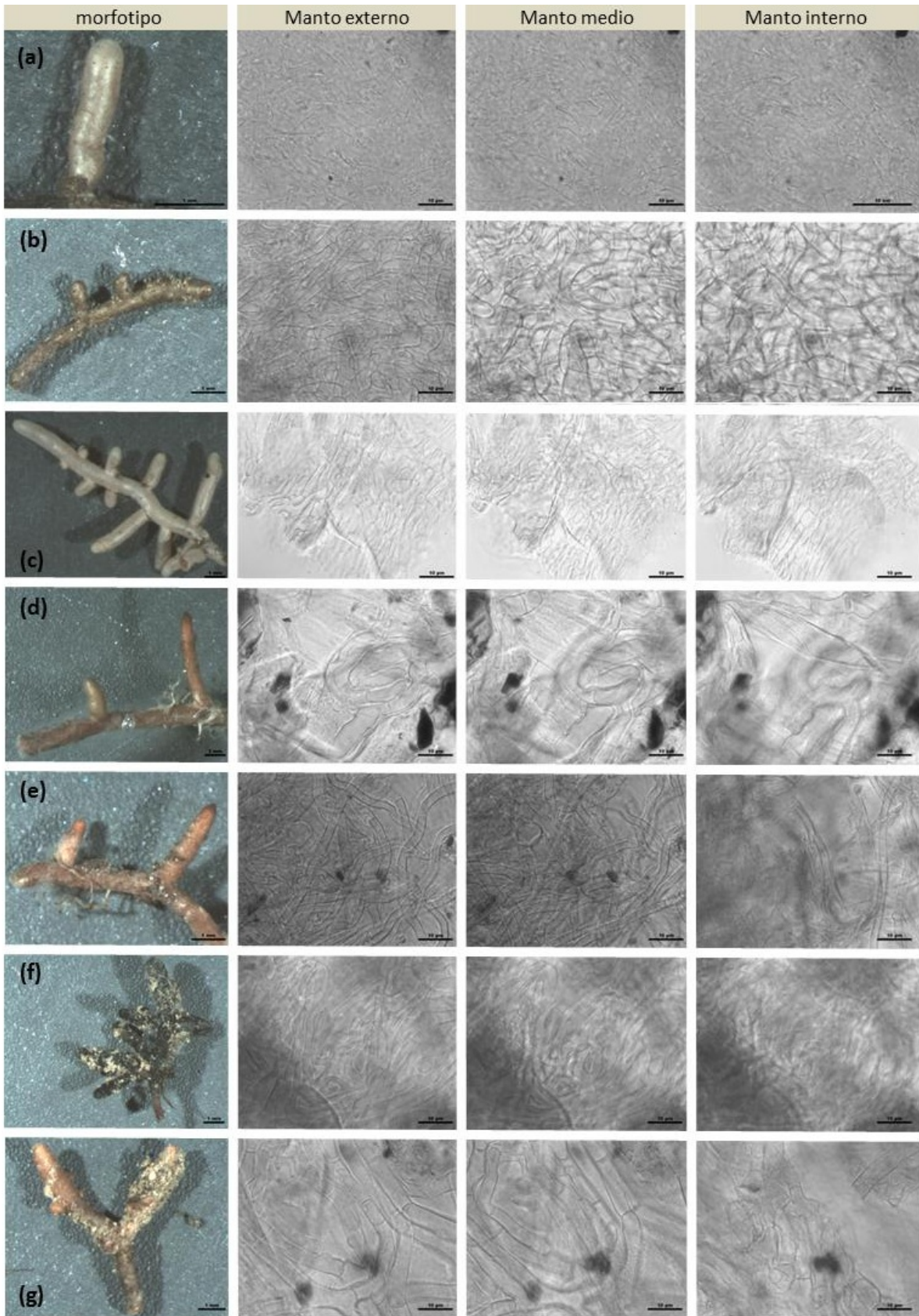
Figura 7. Morfotipos ectomicorrícicos detectados en suelo adyacente a los ascomas de *Morchella* spp. en los sitios Mariposa Monarca e Izta-Popo. (a) EcM 1 de MM-1; (b) EcM 2 de MM-1; (c) EcM 3 de MM-1; (d) EcM 1 de MM-2; (e) EcM 2 de MM-2; (f) EcM 3 de MM-2; (g) EcM 1 de MM-3; (h) EcM 2 de MM-3; (i) EcM 3 de MM-3; (j) EcM 4 de MM-3; (k) EcM 5 de MM-3; (l) EcM 1 de MM-6; (m) EcM 1 de MM-7; (n) EcM 2 de MM-7; (ñ) EcM 3 de MM-7; (o) EcM 4 de MM-7; (p) EcM 1 de IP-1; (q) EcM 2 de IP-1; (r) EcM 1 de IP-2; (s) EcM 2 de IP-2.

Las ectomicorrizas encontradas en los bloques de suelo de los ascomas IP-3, IP-4 y de todos los del sitio Tláloc se clasificaron de acuerdo a la estructura del manto externo en dos grupos: plectenquimatosos (las hifas se distinguen como estructuras individuales) y pseudoparenquimatosos (las hifas individuales no se distinguen y adquieren formas irregulares) (Cuadro 4, Figura 8). Los anatotipos ectomicorrícicos de los morfotipos adyacentes a IP-3 e IP-4 fueron plectenquimatosos; mientras que en el sitio Tláloc se observaron catorce anatotipos plectenquimatosos y dos pseudoparenquimatosos (Figura 8). El manto de la ectomicorriza 1 de T-6 es típico de *Cenococum geophilum* (Figura 8o).

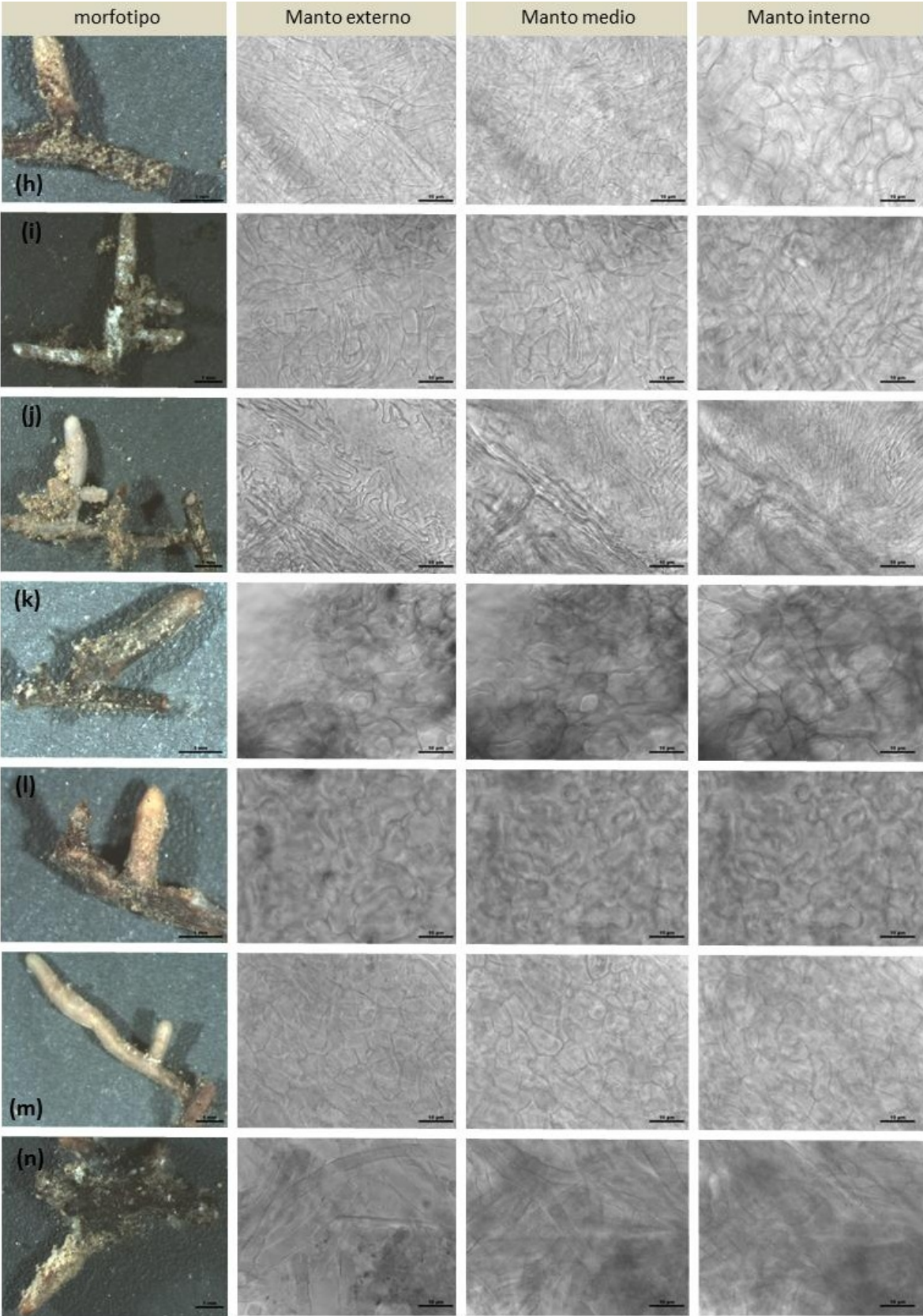
Cuadro 4. Distancia de las ectomicorrizas a la base del ascoma de los sitios Mariposa Monarca, Izta-Popo y Tláloc.

Ectomicorriza	Ascoma	Distancia a la base del ascoma (cm)	Ramificación ¹	Tipo de manto ²
EcM 1	MM-1	< 5	MP	-
EcM 2	MM-1	< 5	S	-
EcM 3	MM-1	< 5	S	-
EcM 1	MM-2	< 16	S	-
EcM 2	MM-2	< 16	MP	-
EcM 3	MM-2	< 16	MP	-
EcM 1	MM-3	< 5	IrP	-
EcM 2	MM-3	< 5	MP	-
EcM 3	MM-3	< 5	S	-
EcM 4	MM-3	5-13.5	S	-
EcM 5	MM-3	5-13.5	S	-
EcM 1	MM-6	<5	S	-
EcM 1	MM-7	< 8	MPi	-
EcM 2	MM-7	< 8	IrP	-
EcM 3	MM-7	< 8	S	-
EcM 4	MM-7	< 8	S	-
EcM 1	IP-1	< 5	S	-
EcM 1	IP-1	< 5	MPi	-
EcM 1	IP-2	< 5	S	-
EcM 2	IP-2	< 5	D	-
EcM 1	IP-3	<8	S	PI (E)
EcM 2	IP-3	<8	S	PI (E)
EcM 1	IP-4	7-10	MPi	PI (B)
EcM 2	IP-4	7-10	S	PI (C)
EcM 3	IP-4	7-10	S	PI (A)
EcM 1	T-1	5-8	IrP	PI (A)
EcM 2	T-1	5-8	D	PI (E)
EcM 1	T-2	<5	S	PI (B)
EcM 2	T-2	<5	MP	PI (A)
EcM 3	T-2	<5	MP	PI (C)
EcM 1	T-3	5-10	S	Ps (M)
EcM 2	T-3	5-10	S	Ps (M)
EcM 1	T-5	4-8	S	PI (H)
EcM 2	T-5	4-8	S	PI (A)
EcM 3	T-5	4-8	S	PI (H)
EcM 1	T-6	<5	S	PI (G)
EcM 2	T-6	<5	S	PI (E)
EcM 3	T-6	<5	S	Ps (N)
EcM 1	T-7	<5	S	PI (B)
EcM 1	T-7, 8	<5	S	PI (C)
EcM 2	T-7, 8	<5	S	PI (D)

¹Ramificación: MP=monopodial pinada, S= simple, IrP= irregularmente pinada, Mpi= monopodial piramidal, D= dicótoma. ²Tipo de manto: PI= plectenquimatoso, Ps= pseudoparenquimatoso (Anexo I).



Continuación



Continuación

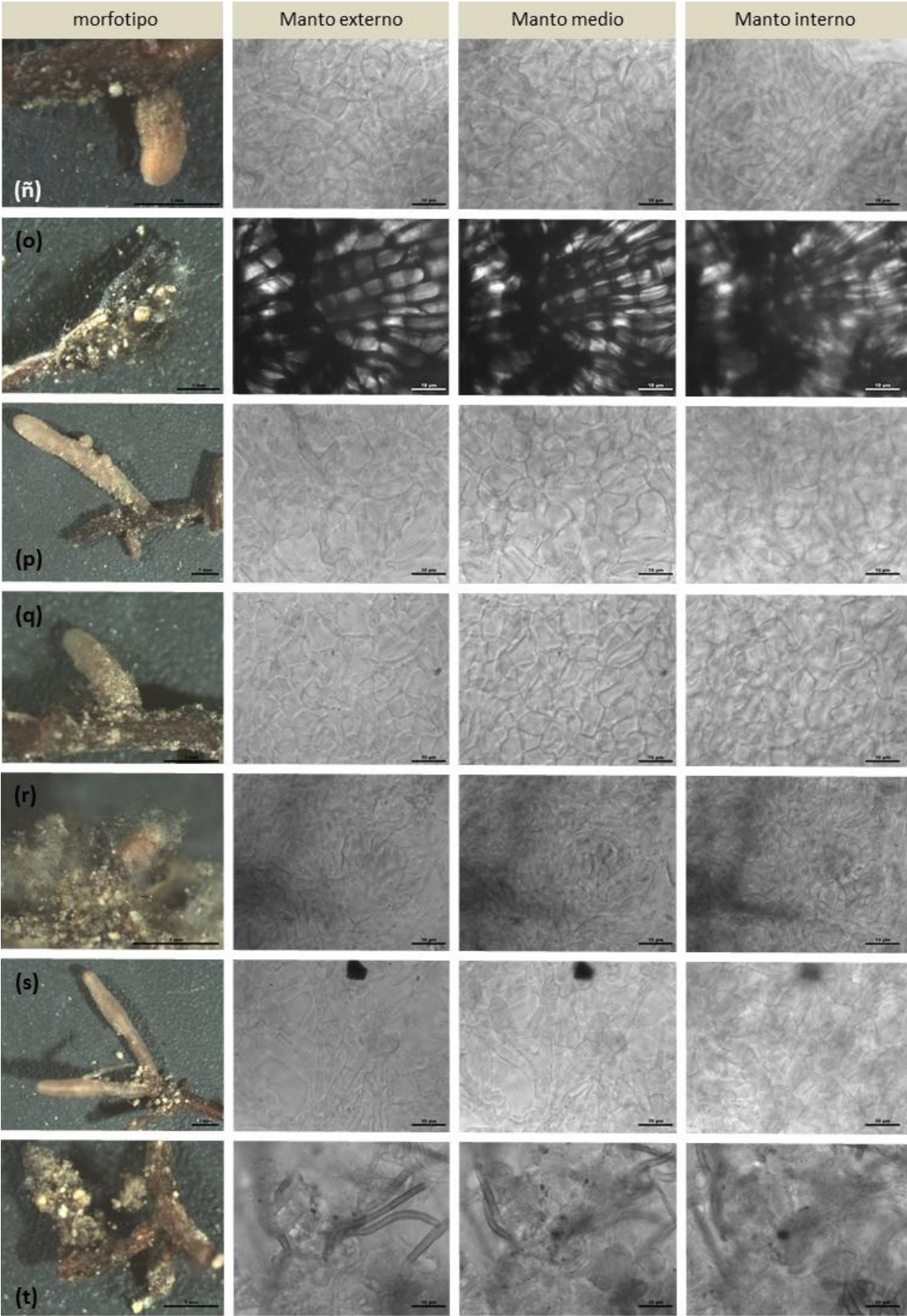


Figura 8. Morfo-anatotipos ectomicorrícicos adyacente a los ascomas de *Morchella* spp. en los sitios Izta-Popo y Tláloc. (a) EcM 1 de IP-3; (b) EcM 2 de IP-3; (c) EcM 1 de IP-4; (d) EcM 2 de IP-4; (e) EcM 3 de IP-4; (f) EcM 1 de T-1; (g) EcM 2 de T-1; (h) EcM 1 de T-2; (i) EcM 2 de T-2; (j) EcM 3 de T-2; (k) EcM 1 de T-3; (l) EcM 2 de T-3; (m) EcM 1 de T-5; (n) EcM 2 de T-5; (ñ) EcM 3 de T-5; (o) EcM 1 de T-6; (p) EcM 2 de T-6; (q) EcM 3 de T-6; (r) EcM 1 de T-7; (s) EcM 1 de T-7, 8; (t) EcM 2 de T-7, 8.

3.5 DISCUSIÓN

Todos los ascomas recolectados en los sitios Mariposa Monarca, Izta-Popo y Tláloc se localizaron en bosques puros de *Abies religiosa* concordando con lo reportado por Villarreal-Ruiz (1996) y Pilz *et al.* (2007), en altitudes que van de los 3,198 m (sitio Mariposa Monarca) a los 3,453 m (sitio Tláloc) y dentro del rango de distribución de esta especie forestal, de acuerdo con Manzanilla (1974).

En el sitio Tláloc fue donde se encontró una mayor abundancia de ascomas, a pesar de que el área muestreada fue la más pequeña; seguido del sitio Mariposa Monarca. A pesar de que los sitios Izta-Popo y Desierto de los Leones fueron los más visitados, en el primero sólo se localizaron 4 ascomas durante 2010 y 2011, mientras que en el último no se observó la presencia de ascomas de *Morchella*. Aunque el Desierto de los Leones es el bosque más afectado por la contaminación atmosférica (González-Medina *et al.* 2010) y que en este estudio no se localizaron ascomas de *Morchella*, no se tienen elementos contundentes para relacionar a la contaminación atmosférica con este hecho. Es importante hacer notar que la ausencia de ascomas en los dos años muestreados, contrasta con lo reportado por la CONANP (2006), donde se considera a la familia Morchellaceae como la quinta con mayor riqueza de especies en el Parque Nacional Desierto de los Leones.

El monte Tláloc presentó una mayor abundancia y riqueza de especies, a pesar de ser el segundo sitio más expuesto a la contaminación atmosférica, dada su cercanía a la Ciudad de México, de acuerdo con Villaseñor-González *et al.* (2011). Cabe mencionar que González-Medina *et al.* (2010) no encontraron diferencias significativas en exposición de ozono entre el Parque Nacional Desierto de los Leones, la Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca y el Monte Tláloc, aunque en el primer sitio sí se encontró suficiente exposición como para causar debilidad en el arbolado.

El muestreo de suelo con tubos de PVC es conveniente por la facilidad para transportar un gran número de muestras, sin embargo contiene bajo volumen de

suelo y la prueba de identificación ascoma-micelio-ectomicorrizas está restringida. El bloque de suelo en cambio, es menos manejable para su transporte, pero durante la prueba de identificación ascoma-micelio-ectomicorrizas se aprecia mejor la distribución del sistema micelial de *Morchella*, las raíces de las plantas y los morfotipos ectomicorrícicos adyacentes, por lo que puede mapearse su localización con respecto a los ascomas. En el presente estudio, los pocos morfotipos ectomicorrícicos observados se ubicaron a no más de 16 cm, por lo que las dimensiones del bloque de suelo empleadas se consideran las adecuadas.

Si bien, la presencia de ascomas estuvo relacionada directamente con *Abies religiosa*, al localizarse en bosques puros de esta especie forestal, en los trazos edáficos no se encontraron evidencias de asociación ectomicorrícica con *Morchella*, a pesar de que la mayoría de los morfotipos se localizaron en un área menor de 5 cm respecto a la base del ascoma. En las muestras de suelo estudiadas, en todos los sitios predominaron los morfotipos de ramificación simple, seguidas de los que presentaron un sistema monopodial pinados. En cuanto a tipo de manto las ectomicorrizas de IP-3 e IP-4 fueron plectenquimatoso, al igual que la mayoría de las de Tláloc, que presentó tres ectomicorrizas con manto externo pseudoparenquimatoso. Sería conveniente llevar a cabo estudios *in situ* más detallados, empleando una combinación de herramientas de caracterización morfo-anatómica y molecular.

3.6 CONCLUSIONES

- Se confirma la presencia de ascomas de *Morchella* spp. en bosques puros de *Abies religiosa*, en tres sitios con diferentes grados de contaminación ambiental, aunque no se localizaron en el sitio presumiblemente más contaminado.
- La mayor abundancia de *Morchella* spp. se encontró en el Monte Tláloc y la Reserva de la Biósfera de la Mariposa Monarca. Al parecer, el grado de contaminación ambiental de los bosques muestreados no tiene una influencia directa sobre la abundancia de ascomas de *Morchella* spp., aunque se requiere mayor investigación al respecto.
- No se encontraron evidencias de asociación ectomicorrícica *in situ* entre *Morchella* spp. y *Abies religiosa*.

3.7 LITERATURA CITADA

- Agerer R (Editor). 1987-2006. *Colour atlas of ectomycorrhizae*. 1st-13th del. Einhorn-Verlag+Druck GmbH. Schwabisch, Germany.
- Alvarado-Rosales D. 1989. Declinación y muerte del bosque de oyamel (*Abies religiosa*) en el sur del Valle de México. Tesis de maestría. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. 78p.
- Arriaga L, Espinoza JM, Aguilar C, Martínez E, Gómez L, Loa E. (Coordinadores). 2000. *Regiones terrestres prioritarias de México: Sierra Chincua RTP-110*. CONABIO. México. (Disponible en línea: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rtp_110.pdf).
- Baldrian P. 2009. Ectomycorrhizal fungi and their enzymes in soils: is there enough evidence for their roles as facultative soil saprotrophs? *Oecologia* 161:657-660.
- Baynes M, Newcombe G, Dixon L, Castlebury L, O'Donnell K. 2012. A novel plant-fungal mutualism associated with fire. *Fungal biology* 116:133-144.
- Buscot F, Kottke I. 1990. The association of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier with roots of *Picea abies* (L.) Karst. *New Phytologist* 116:425-430.
- Cavazzoni V, Manzoni M. 1994. Extracellular cellulolytic complex from *Morchella conica*: production and purification. *Lebenson Wiss Technology* 27:73-77.
- CONANP. 2006. *Programa de Conservación y Manejo Parque Nacional Desierto de los Leones*. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. México DF. 172 p.

CONANP. 2008. Descripción del Área Protegida. (8 de noviembre de 2010).
Consulta en línea: <http://iztapopo.conanp.gob.mx/descripcion.php>

Courty PE, Breda N, Garbaye J. (2007). Relation between oak tree phenology and the secretion of organic matter degrading enzymes by *Lactarius quietus* ectomycorrhizas before and during bud break. *Soil Biology & Biochemistry* 39:1655-1663.

Dahlstrom JL, Smith JE, Weber NS. 2000. Mycorrhiza-like interaction by *Morchella* with species of the Pinaceae in pure culture synthesis. *Mycorrhiza* 9:279-285.

González-Medina RE, Mendoza-Briseño M, Alvarado-Rosales D. 2010. Exposición a ozono en relación a vitalidad en un bosque de oyamel (*Abies religiosa* (Kunth) Schlttdl. & Cham). *Madera y Bosques* 16:7-19.

Grant, William B. 1996. A brief overview of the effects of air pollution (acid deposition and ozone exposure) on trees and forests. Forest List Server, Metla Finland. (<http://www.metla.fi/archive/forest/1996/06/msg00003.html/>)

Guzmán G, Tapia F. 1998. The known morels in Mexico, a description of a new blushing species, *Morchella rufobrunnea*, and new data on *M. guatemalensis*. *Mycologia* 90:705–714.

Hobbie EA, Weber NS, Trappe JM. 2001. Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. *New Phytologist* 150:601-610.

Kanwal HK, Reddy MS. 2011. Effect of carbon, nitrogen sources and inducers on ligninolytic enzyme production by *Morchella crassipes*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:687-691.

Manzanilla H. 1974. *Investigaciones Epidométricas y Silvícolas en Bosques Mexicanos de Abies religiosa*. Dirección General de Información y Relaciones Públicas de la SAG. México, D.F.

Ortiz-Solorio CA, Cuanalo-de la C HE. 1977. Levantamiento fisiográfico del área de influencia de Chapingo. Colegio de Postgraduados, Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, Estado de México. 83 p.

Papinutti L, Lechner B (2008) Influence of the carbon source on the growth and lignocellulolytic enzyme production by *Morchella esculenta* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:1715–1721.

Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz TL, Parks CG, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE. 2007. *Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America*. General Technical Report. PNW-GTR-710. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 161 p.

Rzedowski J. 2006. *Vegetación de México*. 1ra Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, México. 504 pp.

Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal. 2005. Informe climatológico ambiental del Valle de México. 194 p. (disponible en línea: <http://www.sma.df.gob.mx/sma/download/archivos/informeclimatologico/informeclimatologico.pdf>).

Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal. 2006. Gestión ambiental del aire en el Distrito Federal: avances y propuestas 2000-2006. México, D.F. 262 p. (Disponible en línea:

http://www.sma.df.gob.mx/sma/links/download/archivos/gaa/gaa_avances_propuestas_2000_2006.pdf).

Secretaría del Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal. 2011. Quinto informe de trabajo. 193 p. (Disponible en línea: <http://www.sma.df.gob.mx/sma/index.php?opcion=26&id=755>).

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2008. Informe de la situación del medio ambiente en México y Compendio de estadísticas ambientales. México. 375 pp.

Talbot JM, Allison SD, Treseder KK .2008. Decomposers indisguise: mycorrhizal fungi as regulators of soil C dynamics in ecosystems under global change. *Functional Ecology* 22:955–963.

Villarreal-Ruiz L. (Ed.) 1996. Los Hongos Silvestres: Componentes de la Biodiversidad y Alternativa para la Sustentabilidad de los Bosques Templados de México. Informe Final, Proyecto-CONABIO C066. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Edo. de México.

Villarreal-Ruiz L. 2006. Biodiversity and ecology of ectomycorrhizal fungi in a native Scots pine (*Pinus sylvestris*) woodland chronosequence and their *in vitro* interactions with ericaceous plants. Ph.D. thesis. University of Aberdeen, United Kingdom.

Villarreal-Ruiz L, Pérez-Moreno J. 1989. Los hongos comestibles silvestres de México, un enfoque integral. *Micología Neotropical Aplicada* 2:77-114.

Villaseñor-González E. 2011. Caracterización del gradiente altitudinal de ozono y su impacto en bosques aledaños a la ciudad de México. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. 90 p.

Zhang GP, Zhang F, Ru WM, Han JR. 2010. Solid state fermentation of cornmeal with the ascomycete *Morchella esculenta* for degrading starch and upgrading nutritional value. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:15-20.

CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *MORCHELLA*

4.1 INTRODUCCIÓN

El género *Morchella* se distingue con relativa facilidad de otros de la misma familia, siendo *Gyromitra* y *Verpa* los que más se parecen morfológicamente (Wurtz *et al.* 2005). De acuerdo a estos autores, el estípite y el himenóforo de las morchellas (ambos muy delgados) son una sola pieza que se unen en la base del himenóforo formando un hueco; en cambio en *Verpa* y *Gyromitra* el estípite se une al himenóforo en la parte superior de este. Generalmente la confusión y debate entre micólogos se da a nivel de especies, ya que su variabilidad genética, así como las condiciones biogeográficas y climáticas que influyen en su desarrollo dan como resultado una alta plasticidad fenotípica que ha dificultado su clasificación taxonómica por métodos clásicos (Pilz *et al.* 2007, Kanwal *et al.* 2011, Pagliaccia *et al.* 2011).

Tradicionalmente, las especies de *Morchella* se han identificado con base en características macro y micro morfológicas, tales como: tamaño, forma, color y textura de los ascomas (costillas y estípite); tamaño y forma de esporas, forma de la unión himenóforo-estípite, espesor o capas de la pared del estípite, así como los cambios de estas características a lo largo de su maduración (Pilz *et al.* 2007). Guzmán y Tapia (1998) al comparar las ascas, ascosporas y parafisas de *M. guatemalensis*, *M. rufobrunnea* y otras especies, concluyeron que las características relevantes en la taxonomía del género son el ancho y largo de las parafisas, la forma y el color de los ascomas, la posición de las costillas, la longitud de los alveolos y la coloración.

Existen solo pocas especies que son relativamente fáciles de distinguir, tales como *M. rufobrunnea* que se caracteriza por su distribución ecológica en áreas subtropicales en México, por la forma cónica del himenóforo cuando joven, por las

crestas pálidas y valles casi negros (Kuo 2008). Cabe mencionar que esta especie también se ha reportado en la zona costera de California, E.U.A. e Israel (Kuo 2008, Masaphy *et al.* 2009). Por su parte, *M. tomentosa* se distingue porque tiene la superficie del himenio densamente tomentosa, gris y frecuentemente negra (Kuo 2008). Además, recientemente, Stefani *et al.* (2010) encontraron una nueva estructura subterránea denominada “radiesclerocio”, que se presenta como una extensión del estípite que se conjunta con suelo y raíces, y que potencialmente puede ser utilizada para el diagnóstico de esta especie.

En los últimos años, la aplicación de marcadores moleculares y el análisis filogenético basado en secuencias de ADN pueden ayudar en la clasificación taxonómica de *Morchella*, que es esencial para definir mejor su riqueza de especies (Kanwal *et al.* 2011, Pagliaccia *et al.* 2011). Estudios de caracterización molecular basadas en la amplificación de regiones específicas de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), se están llevando a cabo en diversas regiones del mundo. La Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPDs) ha sido utilizada exitosamente para examinar la variación genética en *Morchella esculenta* (Dalglish y Jacobson 2005). Sin embargo, los estudios filogenéticos más comunes que se han empleado en *Morchella* spp. son el grupo de genes del ADNr, entre los que se encuentran: (1) el Espacio Transcrito Interno (ITS, por sus siglas en inglés); (2) las regiones codificantes del gen 18s de la subunidad pequeña del ribosoma (SSU rRNA por sus siglas en inglés); (3) los genes 5.8s y 28s de la subunidad grande (LSU, rRNA por sus siglas en inglés y (4) el espacio intergénico (IGS, por sus siglas en inglés) (Wipf *et al.* 1996; Kellner *et al.* 2005, Masaphy *et al.* 2009, 2010, Kanwal *et al.* 2011). No obstante, a pesar del uso generalizado de secuencias ITS y LSU para análisis filogenéticos de *Morchella*, algunos autores como Masaphy *et al.* (2010), Stefani *et al.* (2010) y Kanwal *et al.* (2011) han reportado que no son suficientes para diferenciar especies. En estudios recientes efectuados por Taskin *et al.* (2010), O'Donnell *et al.* (2011), Pagliaccia *et al.* (2011) y Du *et al.* (2012), ha sido posible la delimitación de especies gracias a la inclusión en los análisis filogenéticos, de genes que codifican para las subunidades 1 y 2 de la ARN

polimerasa II (RPB1 y RPB2) y Factores de Elongación 1-Alpha (EF-1 α) y su análisis bajo Genealogical Concordance Phylogenetics Species Recognition (GCPSR, por sus siglas en inglés). Este es un sistema de reconocimiento filogenético de especies basado en la concordancia genealógica de varios genes nucleares y mitocondriales conservados, funcionales y ortólogos (Taylor *et al.* 2000).

Los resultados de Taskin *et al.* (2010) y O'Donnell *et al.* (2011) indican que el género *Morchella*, en vez de poseer pocas especies con distribución cosmopolita, tiene especies crípticas y de distribución geográfica restringida. En estudios filogenéticos recientes basados en GCPSR se distinguen repetidamente los siguientes clados: (1) Esculenta (morchellas amarillas); (2) Elata (morchellas negras) (Taskin *et al.* 2010, O'Donnell *et al.* 2011, Kanwal *et al.* 2011, Du *et al.* 2012, Kuo *et al.* 2012). Además existe un linaje separado representado por *M. rufobrunnea* (O'Donnell *et al.* 2011, Kuo *et al.* 2012) y *M. anatolica* (Taskin *et al.* 2012). Kanwal *et al.* (2011) en un estudio en la región del Himalaya Occidental en la India, incluyen en el clado elata a los grupos elata, cónica, gigas, tomentosa, costata y angusticeps, mientras que en el clado esculenta ubican los grupos crassipes, spongiola, esculenta y rufobrunnea. Por lo anterior, actualmente algunas especies están siendo reconsideradas y otras están surgiendo como nuevas. Po ejemplo, de acuerdo con Kuo (2008) *M. atrotomentosa* es en realidad *M. tomentosa* y la reportada anteriormente como *M. deliciosa* es *M. rufobrunnea*. Isiloglu *et al.* (2010) reportan la nueva especie *M. anatolica* en un bosque de pino en Turquía. O'Donnell *et al.* (2011) reportan 41 especies filogenéticas de varias partes del mundo (24 del clado elata, 16 del clado esculenta y 1 *M. rufobrunnea*), de las cuales Kuo *et al.* (2012) describen formalmente 19 endémicas de Norte América, en las que 14 son especies nuevas, reforzando con ello la hipótesis de endemismo continental de O'Donnell *et al.* (2011), ya que según estos autores sólo dos de las 41 especies existen también en Europa y Asia (reportadas por Taskin *et al.* 2010, 2012) y al parecer han sido introducidas. A partir de esta información se puede deducir que existen al menos medio centenar de especies en el mundo y México puede estar albergando especies no reportadas, las cuales

podieran estar amenazadas por diferentes causas que van desde el cambio de uso del suelo y la tala indiscriminada, hasta el fenómeno de declinación forestal por efecto de contaminantes atmosféricos y cambio climático.

Guzmán y Tapia (1998) aseveran que en México existen siete especies: *M. angusticeps*, *M. costata*, *M. elata*, *M. esculenta* (*M. conica*, *M. crassipes*, *M. rotunda*), *M. guatemalensis*, *M. umbrina* y *M. rufobrunnea*, sin embargo esto ha sido cuestionado por Pilz *et al.* (2007), dado que a la fecha sólo *M. rufobrunnea* ha sido validada taxonómicamente. Por ello, el objetivo del presente trabajo es caracterizar morfológica y molecularmente las morfo-especies de *Morchella* localizadas en bosques de oyamel de diferentes sitios del Eje Neovolcánico Transversal con diferentes grados de exposición a contaminantes atmosféricos.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Descripción macro y micro-morfológica de ascomas

Se basó en el concepto de morfotipo propuesto por Pilz *et al.* (2007), por lo que cada ascoma recolectado, independientemente de su cercanía, se consideró como una morfo-especie diferente, antes de su confirmación molecular. Los colores se asignaron según el Catálogo Universal de Colores de Séguy (1936), donde los tonos se designan con el nombre del color seguido del número de serie entre paréntesis, por ejemplo: anaranjado (173). Las medidas se registraron en mm, empleando un vernier digital (Truper). Se tomaron las siguientes mediciones:

Himenóforo: largo, ancho (diámetro inferior, medio y superior) forma (cilíndrica, cónica y ovoide) y color. Además se propuso determinar la conicidad basado en el índice de conicidad (C) empleado en la caracterización varietal de maíz (Ordas y Ron 1988), dada la similitud morfológica entre ambas estructuras, ya que a las morchellas se les denomina “elotitos” por su similitud con las mazorcas del maíz.

El *Índice de conicidad* se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula propuesta por Ordas y Ron (1988):

$$C = \{[(D_i - D_s)/2]/(L/3)\} * 100$$

Donde: D_i y D_s son los diámetros inferior y superior, respectivamente

L la longitud total del himenóforo

D_i se midió a un tercio de la base del himenóforo, el D_m en su parte central y el D_s a un tercio del ápice del himenóforo.

De acuerdo al índice de conicidad se propuso la siguiente clasificación de formas: cilíndrica (<15%), subcónica (15-20%) y cónica (>20%).

Costillas: número total, distancia entre crestas (promedio de 5 pares de crestas y desviación estándar), profundidad del valle.

Estípite: largo, ancho (base, parte media y superior), color y textura (lisa, granulosa o aterciopelada).

Forma y tamaño de esporas: Una vez realizado el análisis filogenético se midió el largo y ancho (μm) de 53 esporas de cada filo especie, las cuales se tomaron de la esporada obtenida de los esporomas en fresco o del himenio de esporomas secos. Así mismo, se calculó el cociente largo/ancho (Q) propuesto por Hughes *et al.* (2007), donde los valores más cercanos a 1 indican que la spora tiende a ser esférica. Las tomas fotográficas y la medición de esporas se realizó con un microscopio Olympus Modelo BX51, empleando el objetivo de 100X. Para la fotodigitalización se usó una cámara digital Infinity 1 (Lumenera corporation), las imágenes fueron procesadas y analizadas con el programa Image-Pro Express, versión. 6.3 (Media Cybernetics).

Análisis estadístico de tamaño de esporas

Para evaluar las variables largo, ancho y cociente Q (largo/ancho) de esporas, se empleó un diseño experimental completamente al azar con 4 tratamientos (grupos filogenéticos) y 72 repeticiones por tratamiento, mediante el paquete estadístico Statistical Analysis System 9.1 (SAS 9.1), con el procedimiento *Proc anova*, empleando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Valor de la variable respuesta del tratamiento i en la repetición j

μ = Media general

T_i = Efecto del tratamiento i . $i = 1, 2, \dots, 36$

ε_{ij} = Error experimental de la repetición j del tratamiento i . $j = 1, 2, \dots, 5$

La hipótesis a probar empleando el procedimiento ANOVA (SAS 9.1) fue:

Ho: $T_1=T_2=\dots=T_t$ (todos los tratamientos producen el mismo efecto en Y_{ij})

Ha: $\exists i \neq j \ni T_i \neq T_j$ (al menos un tratamiento produce efecto diferente en Y_{ij})

Se rechaza Ho si $F_c > F_t$ y si $P_{\text{-value}} < \alpha$

La prueba de Tukey usando el mismo programa estadístico considero:

$$DMS = (q)(s\bar{y})$$

Donde:

DMS = diferencia mínima significativa

$q = q_{gl(E),t}^{\alpha}$ (valor de tablas de rangos estudentizados)

$$s\bar{y} = \sqrt{\frac{CM(E)}{r}}$$

Si $|\bar{y}_i - \bar{y}_j| > DMS$ $T_i \neq T_j$... se rechaza Ho: $\mu_i = \mu_j$

Si $|\bar{y}_i - \bar{y}_j| \leq DMS$ $T_i = T_j$... se acepta Ho: $\mu_i = \mu_j$

4.2.2 Caracterización molecular

Se basó en los estudios desarrollados por Masaphy *et al.* (2010), Stefani *et al.* (2010), Taskin *et al.* (2010), Kanwal *et al.* (2011), Pagliaccia *et al.* (2011) O'Donnell *et al.* (2011) y Du *et al.* (2012), empleando cultivos puros de *Morchella* spp. desarrollados en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) a partir de ascomas provenientes de los sitios de muestreo Izta-Popo (IP) y Tláloc (T).

Extracción de ADN

Método de lisis. De las cepas IP-2 E, IP-3 E, IP-4 E, T-6 E, T-8 E, T-9 E, T-10 E, T-2 C y T-3 C (IP= Izta-Popo, T= Tlálloc, E= monospóricos, C= contexto), se tomó un fragmento de aproximadamente 2 cm² de micelio cultivado en medio sólido PDA. Posteriormente, se transfirió a un tubo Eppendorf de 200 µL conteniendo 30 µL de solución de lisis. Los tubos se calentaron a baño maría a 95 °C durante 5 min y se centrifugaron a 10,00 rpm durante 5 min (centrífuga Eppendorf 5415 R). Se tomaron 22 µL de sobrenadante y se transfirieron a nuevos tubos Eppendorf. El ADN obtenido fue cuantificado en un espectrofotómetro de ultra-bajo volumen (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) para evaluar la cantidad y calidad del mismo, valorando la concentración y absorbancia a 260/280 nm. Finalmente, las muestras se diluyeron con agua ultrapura mili-Q[®] a una concentración de 20 ng µL⁻¹.

Método CTAB 2%. A partir de las cepas T-1 E, T-4 E, T-5 E, T-7 E, IP-3 C, T1-C, T-6 C, T-9 C, se removió el micelio del hongo con una espátula. Posteriormente, se transfirió a un mortero de porcelana previamente enfriado a -20 °C y se agregó nitrógeno líquido para pulverizarlo. El micelio pulverizado se transfirió a un tubo Eppendorf de 2 mL previamente enfriado. Inmediatamente se le agregó 1 mL de CTAB a 65 °C y se mezcló por inversión, para homogenizar el micelio con la solución de lisis. Las muestras se incubaron a 65°C por 90 min en baño maría, invirtiéndolos cuidadosamente cada 20 min. Luego se agregó 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión durante 10 min a temperatura ambiente. Los tubos con la mezcla se centrifugaron a 3,500 rpm durante 10 min y se recuperó alrededor de 650 µL de la fase superior acuosa, la cual se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A la muestra se le adicionó 0.5 volumen de isopropanol (2-propanol) frío, se mezcló suavemente por inversión, para favorecer la precipitación y se incubó a -20°C por 1 h. Las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm durante 30 min, eliminando el sobrenadante por decantación, posteriormente se agregó 1 mL de etanol al 70%, para llevar la pastilla, se centrifugó a 3,500 rpm por 8 min, posteriormente se eliminó el sobrenadante; este paso se repitió dos veces. La pastilla con el ADN se secó a

temperatura ambiente durante 30 min, luego se resuspendió en 100 μL de buffer de elución. La calidad de ADN se verificó por electroforesis en un gel de agarosa (1.5%, Invitrogen). El ADN fue cuantificado en un espectrofotómetro de ultra-bajo volumen (NanoDrop 1000, Thermo Scientific) para evaluar la cantidad y calidad del mismo, valorando la concentración y absorbancia a 260/280 nm. Finalmente, las muestras se diluyeron con agua ultrapura mili-Q[®] a una concentración de 20 ng μL^{-1} .

Amplificación de Espacio Transcrito Interno (ITS) por PCR

Las mezclas de reacción individuales se dispusieron en un volumen de 20 μL , conteniendo 8.7 μL de H_2O , 5.0 μL de Buffer de reacción GoTaq[®] (Promega), 2.0 μL de dNTPs, 2.0 μL de Primer ITS 4, 2.0 μL de Primer ITS 5 y 0.4 μL de Taq ADN Polimerasa (Promega). Se adicionaron 5 μL de cada muestra a amplificar en los tubos PCR respectivos. La amplificación se llevó a cabo en un ciclo de 4 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 58 °C, 2 min a 72 °C y finalmente una extensión de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (Invitrogen), a 85 voltios por 50 minutos. Posteriormente se visualizaron en un fotodocumentador (Infinity-VX2-3026 WL/LC/26M X-Press), previa tinción con GelRed[™] (Biutium). Las muestras amplificadas fueron limpiadas con el kit de limpieza QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cabe mencionar que hubo cepas, cuya extracción de ADN y amplificación se hicieron en diferente tiempo, para las cuales se usó el kit de limpieza Wisard[®] SV Gel and PCR Clean-Up system (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Secuenciación y análisis filogenético

Las muestras de PCR limpias se cuantificaron en un espectrofotómetro para evaluar la cantidad y calidad del mismo. Posteriormente, se diluyeron a $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ y se secuenciaron en ambas direcciones en un secuenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, USA). Las secuencias obtenidas fueron corregidas manualmente para eliminar las posiciones ambiguas de los nucleótidos. Las secuencias en ambas direcciones se ensamblaron y editaron utilizando el programa BioEdit versión 7.0.5. (Hall 1999), con el cual se creó una secuencia consenso, misma que se comparó con secuencias similares depositadas en GeneBank, empleando el programa BLAST (Altschul *et al.* 1997).

Para realizar el análisis filogenético las secuencias consenso se compilaron en un archivo fasta, luego se alinearon con el Profile mode del Clustal W 1.8.1 del Programa Mega 4.0.2. y se analizaron con el método de Máxima Parsimonia (MP) seleccionando la opción Close Neighbour Interchange (CNI) (level=1), con un árbol inicial por adición al azar (10 reps), considerando los espacios y datos perdidos como completamente eliminados. El análisis de bootstrap se estimó con 1000 repeticiones para determinar los valores de confiabilidad de los agrupamientos dentro del árbol. Para construir el árbol filogenético, se incluyeron como referencias secuencias similares de las especies más cercanas obtenidas del GenBank. Como especie fuera de grupo se asignó *Xylaria multiplex* (GenBank AY909020).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Descripción macro y micro-morfológica de ascomas

Sitio Tlálloc

***Morchella* sp. T-1 (Figura 1a)**

Himenóforo: 58.1 mm de largo y 32.0 mm de ancho. Forma cilíndrica-globosa, *Di* 29.7 mm, *Dm* 32 mm y *Ds* 25 mm. Conicidad del 12%. **Costillas:** 15, crestas horizontales bien marcadas y alveolos irregulares. Distancia promedio entre crestas de 5.2 mm (± 0.58) y profundidad promedio de 7.6 mm. Color de crestas y valles anaranjado (217) y amarillo (315). **Estípite:** 29.2 mm de largo y 15.9 mm de ancho, ligeramente más ancho en la base. Textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340). **Tamaño de esporas:** (-19.5) 21.8 (s=1.43) (+24.4) x (-10.8) 12.2 (s=0.88) (+14.5) μm , Q= (-1.46) 1.79 (s=0.16) (+2.24).

***Morchella* sp. T-2 (Figura 1b)**

Himenóforo: 53.5 mm de largo y 29.5 mm de ancho. Forma subcónica-globosa, *Di* 30.9 mm, *Dm* 29.4 mm y *Ds* 22.3 mm. Conicidad del 24.1%. **Costillas:** 17, crestas horizontales bien marcadas y alveolos irregulares. La distancia promedio entre crestas fue de 4.3 mm (± 0.49) y la profundidad promedio de 6.9 mm. Color de crestas y valles entre amarillo (315) y verde (336). **Estípite:** 27.9 mm de largo y 10.7 mm de ancho. Base engrosada, disminuyendo hacia la unión con el himenóforo. Textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340).

***Morchella* sp. T-3 (Figura 1c)**

Himenóforo: 51.5 mm de largo y 31.2 mm de ancho. Forma cónica, *Di* 32.3 mm, *Dm* 31.2 mm y *Ds* 20.3 mm. Conicidad del 31.9%. **Costillas:** 18, crestas horizontales bien marcadas y alveolos irregulares. Una distancia promedio entre crestas de 4 mm (± 0.86) y una profundidad de 7.4 mm. Color entre anaranjado (223) y amarillo (315). **Estípite:** 25.5 mm de largo y 13.3 mm de ancho. Base engrosada, disminuyendo hacia la unión con el himenóforo. Textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340).

***Morchella* sp. T-4 (Figura 1d)**

Himenóforo: 57.8 mm de largo y 32.1 mm de ancho. Forma cilíndrica, *Di* 32.8 mm, *Dm* 32.1 mm y *Ds* 29 mm. Conicidad del 10.1%. **Costillas:** 17, con alveolos ovalados, bien definidos. Una distancia promedio entre crestas de 5.3 mm (± 1.10) y una profundidad promedio de 7.2 mm. Color anaranjado (208 y 217). **Estípite:** 25.8 mm de largo y 10.1 mm de ancho. Ligeramente más engrosada en el sitio de unión con el himenóforo que en la base. Textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340). **Tamaño de esporas:** $(-17.2) 21.1$ ($s=1.85$) $(+23.8) \times (-10.0) 12.6$ ($s=0.86$) $(+16.8) \mu\text{m}$, $Q = (-1.21) 1.69$ ($s=0.17$) $(+2)$.

Se encontró una estructura subterránea similar al “radiesclerocio”, reportado por Stefani *et al.* (2010) en *Morchella tomentosa*. Es una prolongación del estípite, compacta y dura, formada por raíces de herbáceas, ectomicorrizas muertas de *Abies religiosa*, suelo y tejido miceliar blanco similar al del estípite. La estructura se ramifica en 3 brazos, de 2.5 cm de diámetro y 8 cm de largo (Figura 1h).

***Morchella* sp. T-5 (Figura 1e.1)**

Himenóforo: 44.4 mm de largo y 20.4 mm de ancho. Forma subcónica, *Di* 23.9 mm, *Dm* 20.4 mm y *Ds* 19.3 mm. Conicidad del 15.7%. **Costillas:** 15, con alveolos

ovalados, definidos. Una distancia promedio entre crestas de 3.8 mm (± 0.51) y una profundidad promedio de 5 mm. Color anaranjado (208 y 217). **Estípite:** 12.7 mm de largo y 10.5 mm de ancho. Ligeramente más engrosado en el sitio de unión con el himenóforo que en la base. Textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340). **Tamaño de esporas:** (-18.9) 21.2 (s=1.44) (+23.8) x (-10.2) 11.3 (s=0.50) (+11.9) μm , Q= (-1.68) 1.88 (s=0.12) (+2.10).



Figura 1. Ascomas de *Morchella* spp. localizados en el sitio Tlálóc. (a) T-1; (b) T-2; (c) T-3; (d) T-4; (e) T5-8: (e.1) T-5, (e.2) T-6, (e.3) T-7, (e.4) T-8; (f) T-9; (g) T-10; (h) radiesclerocio de T-4 formado de suelo compacto, (i) raíces y micorrizas muertas (j) tejido similar al estípite que componen el radiesclerocio. ☆= sitio de unión del ascoma

***Morchella* sp. T-6 (Figura 1e.2)**

Himenóforo: 59.8 mm de largo y 25.2 mm de ancho. Forma cilíndrica, *Di* 27.9 mm, *Dm* 25.4 mm y *Ds* 22.8 mm. Conicidad del 12.9%. **Costillas:** 17, alveolos ovalados, definidos. Una distancia promedio entre crestas de 4.5 mm (± 1.39) y una profundidad promedio de 7.6 mm. Color anaranjado (208 y 217). **Estípite:** 31.1 mm de largo y 13.8 mm de ancho. Ligeramente más engrosado en el sitio de unión con el himenóforo que en la base. Textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340). **Tamaño de esporas:** (-18.3) 22.5 (s=1.77) (+26.1) x (-10.9) 12.9 (s=1.10) (+15.8) μm , Q= (-1.52) 1.75 (s=0.12) (+1.96).

***Morchella* sp. T-7 (Figura 1e.3)**

Himenóforo: 46.4 mm de largo y 24.7 mm de ancho. Forma subcónica, *Di* 27.3 mm, *Dm* 24.7 mm y *Ds* 22.1 mm. Conicidad del 17.1%. **Costillas:** 16, con alveolos ovalados, definidas. Una distancia promedio entre crestas de 4 mm (± 0.66) y una profundidad promedio de 5.8 mm. Color anaranjado (208 y 217). **Estípite:** 22.2 mm de largo y 13.3 mm de ancho. Ligeramente más engrosado en la base. Textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340). **Tamaño de esporas:** (-14.6) 21.8 (s=1.93) (+25.5) x (-9.3) 11.5 (s=0.76) (+13.3) μm , Q= (-1.57) 1.89 (s=0.16) (+2.27).

***Morchella* sp. T-8 (Figura 1e.4)**

Himenóforo: 52.4 mm de largo y 21.1 mm de ancho. Forma cónica, *Di* 24 mm, *Dm* 21.1 mm y *Ds* 18.6 mm. Conicidad del 26.4%. **Costillas:** 16, con alveolos ovalados, definidas. Una distancia promedio entre crestas de 3.5 mm (± 0.22) y una profundidad promedio de 4.2 mm. Color anaranjado (208 y 217). **Estípite:** 25.5 mm de largo y 11.8 mm de ancho, cilíndrico. Textura lisa, ligeramente

aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340). **Tamaño de esporas:** (-19.6) 22.0 (s=1.25) (+25.2) x (-10.4) 12.0 (s=0.74) (+13.3) μm , Q= (-1.61) 1.84 (s=0.14) (+2.19).

***Morchella* sp. T-9 (Figura 1f)**

Himenóforo: 57.7 mm de largo y 20.4 mm de ancho. Forma subcónica, *Di* 23.4 mm, *Dm* 20.5 mm y *Ds* 19.5 mm. Conicidad del 10.2%. **Costillas:** 16, con alveolos ovalados, definidas. Una distancia promedio entre crestas de 3 mm (± 0.49) y una profundidad promedio de 5.3 mm. Color anaranjado (208 y 217). **Estípite:** 24.9 mm de largo y 12.9 mm de ancho. Ligeramente más engrosado en el sitio de unión con el himenóforo que en la base. Textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340). **Tamaño de esporas:** (-17.0) 20.7 (s=1.72) (+23.5) x (-10.1) 11.7 (s=1.05) (+13.8) μm , Q= (-1.46) 1.78 (s=0.16) (+2.19).

***Morchella* sp. T-10 (Figura 1g)**

Himenóforo: 44.2 mm de largo y 29.2 mm de ancho. Forma subcónica-globosa, *Di* 28.4 mm, *Dm* 29.3 mm *Ds* 23.6 mm. Conicidad del 16.2%. **Costillas:** 16, con alveolos ovalados, definidas. Una distancia promedio entre crestas de 5.3 mm (± 0.78) y una profundidad promedio de 7 mm. Color entre anaranjado (217) y amarillo (315). **Estípite:** 15.9 mm de largo y 13.2 mm de ancho. Ligeramente más engrosado en el sitio de unión con el himenóforo que en la base. Textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340).

Sitio Izta-Popo

***Morchella* sp. IP-1 (Figura 2a)**

Debido al estado avanzado de senescencia no fue posible hacer una descripción completa. El color de la cresta es amarillo (301) y el del valle amarillo (315). El estípite mide 24.8 mm de largo y 11.2 mm de ancho, engrosado en la base, y disminuyendo ligeramente hacia el sitio de unión con el himenóforo, su textura es lisa, ligeramente aterciopelada, color entre amarillo (320) y verde (340).

***Morchella* sp. IP-2 (Figura 2b)**

El ascoma estaba incompleto, por lo que la descripción es parcial. **Himenóforo:** forma subcónica-globosa, *Di* 27.18 mm y *Dm* 25.6 mm. **Costillas:** 15, gruesas, no muy delimitadas, crestas horizontales poco marcadas y alveolos rectangulares. Una distancia promedio entre crestas de 5.91 mm (± 0.42) y una profundidad promedio de 5.6 mm. El color general es anaranjado (233) y amarillo (249) con crestas marrón 691 en las regiones senescentes. **Estípite:** 36.1 mm de largo, 20.31 mm de ancho en la base, 13.75 mm en la parte media y 11.41 mm en el sitio de unión con el himenóforo, su textura va de lisa a ligeramente aterciopelada, su color está entre amarillo (320) y verde (340). **Tamaño de esporas:** (-15) 20.3 ($s=2.95$) (+26.0) x (-9.7) 13.0 ($s=1.62$) (+16.2) μm , $Q=$ (-1.19) 1.57 ($s=0.17$) (+1.98).

Se encontró una estructura subterránea compacta de aproximadamente 7 cm de longitud, similar al "radiesclerocio" reportado en *M. tomentosa* por Stefani *et al.* (2010), el cual es una extensión del estípite y está compuesto de tejido blanquecino similar al del estípite, suelo endurecido y la raíz de una planta herbácea (*Taraxacum* sp.) que se inserta en la base del ascoma (Figura 2e,f).

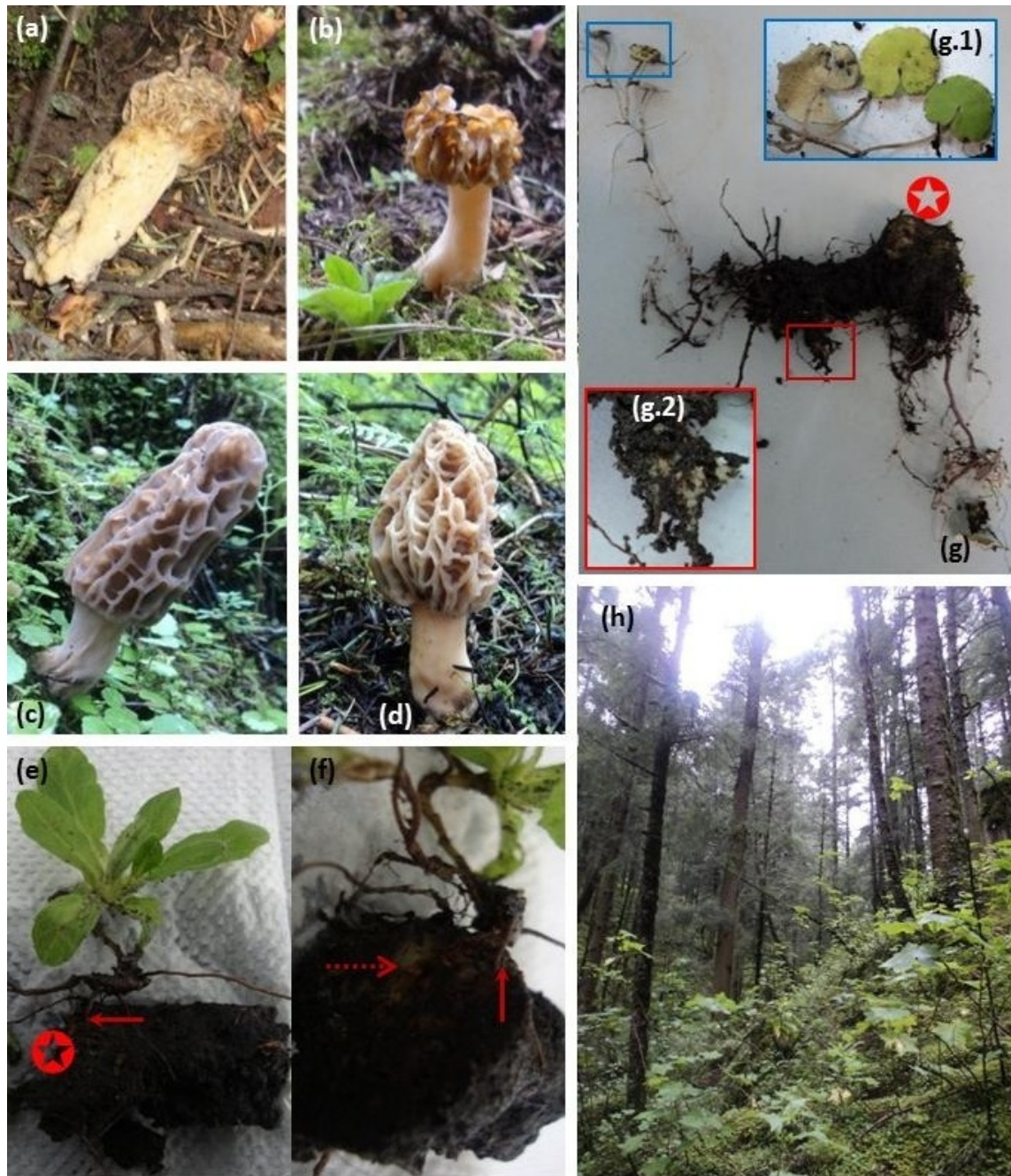


Figura 2. Ascomas de *Morchella* spp. localizados en el sitio Izta-Popo. (a) IP-1. (b) IP-2. (c) IP-3. (d) IP-4. (e , f) radiesclerocio de IP-2 y su asociación física con *Taraxacum* sp., raíces de la planta (flechas continuas) y tejido similar al del estípite (flecha punteada), estrella indica el sitio de unión del ascoma. (g) radiesclerocio de IP-3 y su asociación física con una planta herbácea, (g.1) raíces de la planta y micelio (g.2), estrella indica el sitio de unión del ascoma. (h) bosque de *Abies religiosa*, hábitat de *Morchella* spp. ☆ = sitio de unión del ascoma.

***Morchella* sp. IP-3 (Figura 2c)**

Himenóforo: 77.2 mm de largo y 34.3 mm de ancho. Forma cilíndrica, *Di* 35.4 mm, *Dm* 34.3 mm y *Ds* 31 mm. Conicidad del 10.5%. **Costillas:** 13, bien delimitadas, con crestas horizontales bien marcadas y alveolos irregulares. Una distancia promedio entre crestas de 7.1 mm (± 1.54) y una profundidad promedio de 5.3 mm. Color de crestas y valles es anaranjado (232 y 233). **Estípite:** 49.7 mm de largo y 22.0 mm de ancho. Engrosado en la base y disminuye ligeramente hacia el sitio de unión con el himenóforo. Textura aterciopelada, ligeramente granulosa. Color entre amarillo (320) y verde (340).

Se encontró una estructura subterránea similar al “radiesclerocio”, reportado por Stefani *et al.* (2010) en *M. tomentosa*. Es una prolongación del estípite, compacta y dura, formada por raíces de herbáceas, suelo y concentraciones de micelio (Figura 2.g). Cabe señalar que es menos compacto que el radiesclerocio del ascoma IP-2, mide 8 cm de largo y 2 cm de diámetro.

***Morchella* sp. IP-4 (Figura 2d)**

Himenóforo: 46.4 mm de largo y 34.2 mm de ancho. Forma subcónica, *Di* 34.9 mm, *Dm* 34.2 mm y *Ds* 29.9. Conicidad del 22.4%. **Costillas:** 15, con crestas horizontales bien marcadas y alveolos irregulares. Una distancia promedio entre crestas de 6.3 mm (± 1.14) y una profundidad promedio de 2.4 mm. Color de crestas y valles es anaranjado (219 y 235). **Estípite:** 29.2 mm de largo y 18.0 mm de ancho. Más engrosado en el sitio de unión con el himenóforo que en la base. Textura lisa, ligeramente granulosa. Color entre amarillo (320) y verde (340). **Tamaño de esporas:** (-18.2) 21.6 (s=1.40) (+26.0) x (-9.7) 12.3 (s=1.0.7) (+15.4) μm , Q= (-1.38) 1.76 (s=0.16) (+2.24).

Sitio Mariposa Monarca

***Morchella* sp. MM-1 (Figura 3a)**

Himenóforo: 28.4 mm de largo y 30.23 mm de ancho. Forma subcónica-globosa, *Di* 20.8 mm, *Dm* 23.5 mm y *Ds* 18.8 mm. Conicidad del 10.3%. **Costillas:** 16 costillas verticales, crestas horizontales poco marcadas que desaparecen al llegar al valle y alveolos irregulares. Una distancia promedio entre crestas de 3 mm (± 0.64) y una profundidad promedio de 3.3 mm. Color de cresta entre amarillo (315) y azul (520) y de valle azul (522). **Estípite:** 28.8 mm de largo y 10.7 mm de ancho. Más grueso en la base y disminuye hacia el himenóforo, textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340).

***Morchella* sp. MM-2 (Figura 3b)**

Himenóforo: 16.7 mm de largo y 10.74 mm de ancho. Forma subcónica, *Di* 11.7 mm, *Dm* 10.74 mm y *Ds* 10 mm. Conicidad del 15.2%. **Costillas:** 16 costillas verticales, bien delimitadas, crestas horizontales poco marcadas que desaparecen al llegar al valle y alveolos irregulares. Una distancia promedio entre crestas de 1 mm (± 1.12) y una profundidad promedio de 1.1 mm. Color de cresta entre anaranjado (232) y azul (522), de valle azul (522). **Estípite:** 2.2 mm de largo y 5.26 mm de ancho. Más delgado en la base y engrosa hacia el himenóforo, textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340).

***Morchella* sp. MM-3 (Figura 3c)**

Himenóforo: 47.1 mm de largo y 24.4 mm de ancho. Forma cilíndrica, *Di* 26.6 mm, *Dm* 24.4 mm y *Ds* 22.4 mm. Conicidad del 13.2%. **Costillas:** 16, no muy delimitadas, crestas horizontales poco marcadas que desaparecen al llegar al valle y alveolos irregulares. Una distancia promedio entre crestas de 3.7 mm (± 4.21) y una profundidad promedio de 6.3 mm. El color de la cresta está entre anaranjado

(234) y azul (522) y el del valle amarillo (315). **Estípite:** 33.7 mm de largo y 11.7 mm de ancho. Engrosado en la base, disminuye en la parte media y aumenta ligeramente en el sitio de unión con el himenóforo, de textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340).



Figura 3. Ascomas de *Morchella* spp. localizados en el sitio Mariposa Monarca. (a) MM-1, (b) MM-2, (c) MM-3, (d) MM-4, (e) MM-5, (f) MM-7.

***Morchella* sp. MM-4 (Figura 3d)**

Himenóforo: 63.2 mm de largo y 28 mm de ancho. Forma cilíndrica, *Di* 19.5 mm, *Dm* 28 mm y *Ds* 13.6 mm. Conicidad del 13.9%. **Costillas:** 16, bien delimitadas,

con crestas horizontales bien marcadas y alveolos rectangulares. Una distancia promedio entre crestas de 5.1 mm (± 0.39) y una profundidad promedio de 7.7 mm. El color de la cresta entre anaranjado (173) y amarillo (301), el del valle amarillo 315. **Estípite:** 41.6 mm de largo y 15.8 mm de ancho. Engrosado en la base, disminuye en la parte media y aumenta ligeramente en el sitio de unión con el himenóforo, de textura lisa, ligeramente aterciopelada. Color entre amarillo (320) y verde (340).

***Morchella* sp. MM-5 (Figura 3e)**

Himenóforo: 58.2 mm de largo y 47.3 mm de ancho. Forma subcónica-globosa, *Di* 45.1 mm, *Dm* 47.3 mm y *Ds* 37.7 mm. Conicidad del 19%. **Costillas:** 16, bien delimitadas, con crestas horizontales bien marcadas y alveolos rectangulares. Una distancia promedio entre crestas de 8.2 mm (± 1.21) y una profundidad promedio 7.5 mm. El color de la cresta entre marrón (691) y marrón rojo (706), el del valle anaranjado (233 y 235). **Estípite:** 60.6 mm de largo y 25.2 mm de ancho. Engrosado en la base, y disminuye hacia el sitio de unión con el himenóforo, de textura ligeramente áspera, con gránulos pequeños. El color entre amarillo (320) y verde (340).

***Morchella* sp. MM-6**

Himenóforo: 56.6 mm de largo y 39.9 mm de ancho. Forma cilíndrica-globosa, *Di* de 38.3 mm, *Dm* de 39.9, y *Ds* 34.9 mm. Conicidad del 6.3%. **Costillas:** 16, bien delimitadas, crestas transversales poco marcadas y alveolos irregulares. Una distancia promedio entre crestas 6.8 mm (± 1.06) y una profundidad promedio de 8.1 mm. El color de la cresta y el valle es verde (427). **Estípite:** 32.8 mm de largo y 15.3 mm de ancho. Engrosado en la base y disminuye hacia el sitio de unión con el himenóforo, de textura lisa, ligeramente aterciopelada. El color está entre amarillo (320) y verde (340).

Morchella sp. MM-7 (Figura 3f)

Himenóforo: 44.3 mm de largo y 23.2 mm de ancho. Forma cilíndrica-globosa, D_i 21.6 mm, D_m 23.2 mm y D_s 19.5 mm. Conicidad del 6.8%. **Costillas:** 16, bien delimitadas. Crestas horizontales poco marcadas que desaparecen en el valle. Una distancia promedio entre crestas de 5.1 mm (± 0.66) y una profundidad promedio de 4.6 mm. El color de la cresta es anaranjado (206 y 207) y el del valle es anaranjado (206). **Estípite:** 22.9 mm de largo y 10.9 mm de ancho. Engrosado en la base y disminuye ligeramente hacia el sitio de unión con el himenóforo, textura lisa, ligeramente aterciopelada. El color está entre amarillo (320) y verde (340).

Ajuste en la clasificación de forma del himenóforo de los ascomas

Además de las formas cilíndricas, subcónicas y cónicas que se determinaron con base en el índice de conicidad, se encontraron algunos ascomas con el himenóforo globoso. La particularidad de estas últimas es que el diámetro inferior (D_i) es menor al diámetro medio (D_m), pero la fórmula de Ordas y Ron (1988) no considera el diámetro medio, ya que en mazorcas, el diámetro mayor siempre es el inferior. Con el fin de que la clasificación de formas sea más precisa y tome en cuenta las formas globosas se propone el siguiente cociente:

$$\text{si } \frac{D_i}{D_m} \geq 1 \text{ entonces la forma no es globosa}$$

$$\text{si } \frac{D_i}{D_m} < 1 \text{ entonces la forma es globosa}$$

Dada esta condición, la forma de los ascomas se ajustó como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Forma del himenóforo de los ascomas de *Morchella* ajustadas por el cociente Di/Dm .

Ascoma	L	Di	Dm	Ds	C (%)	Di/Dm	Forma ajustada
IP-1	-	-	-	-	-	-	-
IP-2	-	27.18	25.6	-	-	-	-
IP-3	77.26	35.48	34.38	30.09	10.5	1.03	cilíndrica
IP-4	46.43	34.92	34.29	29.98	16.0	1.02	subcónica
T-1	58.12	29.7	32	25.04	12.0	0.93	Cilíndrica-globosa
T-2	53.55	27.86	29.47	22.27	15.7	0.95	Subcónica-globosa
T-3	51.55	31.26	31.27	20.31	31.9	1.00	cónica
T-4	57.85	32.84	32.11	28.96	10.1	1.02	cilíndrica
T-5	44.45	23.92	20.48	19.27	15.7	1.17	subcónica
T-6	59.83	27.98	25.24	22.84	12.9	1.11	cilíndrica
T-7	46.43	27.38	24.73	22.08	17.1	1.11	subcónica
T-8	53.44	27.03	21.13	17.64	26.4	1.28	cónica
T-9	57.77	24.44	20.49	18.53	15.3	1.19	subcónica
T-10	44.18	28.39	29.29	23.61	16.2	0.97	Subcónica-globosa
MM-1	28.4	20.83	23.58	18.88	10.3	0.88	Cilíndrica-globosa
MM-2	16.79	11.74	10.74	10.04	15.2	1.09	Subcónica
MM-3	47.12	26.6	24.41	22.45	13.2	1.09	Cilíndrica
MM-4	63.25	19.54	28.07	13.66	13.9	0.70	Cilíndrica
MM-5	58.26	45.14	47.3	37.76	19.0	0.95	Subcónica-globosa
MM-6	56.69	38.25	39.95	34.88	8.9	0.96	Cilíndrica-globosa
MM-7	44.37	21.6	23.26	19.58	6.8	0.93	Cilíndrica-globosa

L=longitud, Di=diámetro inferior, Dm= diámetro medio, Ds= diámetro superior, C= conicidad (%).

4.3.2 Análisis filogenético

Se amplificaron y secuenciaron las regiones ITS de 16 aislamientos (10 monospóricos y 6 de contexto) de 12 morfoespecies de *Morchella* spp. (3 de Izta-Popo y 9 de Tlálóc), con tamaño de fragmentos que van de 511 a 737 pb (Cuadro 2). Los aislamientos de los que no fue posible la extracción y secuenciación de ADN fueron los del sitio Mariposa Monarca, debido a la dificultad para obtener cultivos puros de *Morchella* por la contaminación durante el proceso de

aislamiento. Así mismo de la cepa T-10 no fue posible el aislamiento de ADN, pese a los repetidos intentos de extracción vía método CTAB 2% y Lisis. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias alojadas en la base de datos del GenBank (NCBI). Los resultados de BLASTN confirmaron que los aislamientos corresponden al género *Morchella*, revelando identidades de 99% con diferentes especies de dicho género (Cuadro 2).

Se identificaron 4 especies filogenéticas pertenecientes al Clado Elata (morchellas negras) (Figura 4). Cabe destacar que un resultado interesante de este trabajo es que *Morchella* sp. IP-2 resultó ser *Morchella frustrata* (reportada como *Morchella* sp. Mel-2 por O'Donnell *et al.* 2011), una especie de Norte América que se describió recientemente y cuyo nombre refleja la combinación “frustrante” de características tanto del grupo elata como esculenta (Kuo *et al.* 2012). Por otra parte *Morchella* sp. IP-4 se agrupa con *Morchella* sp. Mel18 (Du *et al.* 2012), una especie de República Dominicana; sin embargo, la filogenia muestra que puede tratarse de una nueva especie (Figura 4).

T-2, T-3, T-5, T-7, T-8 e IP-3 se agrupan con *Morchella* sp. Mel-12, que ha sido recientemente descrita como *Morchella snyderi* por Kuo *et al.* (2012), aunque la filogenia muestra que podría tratarse de especies diferentes. T4 y T6 se agrupan con *Morchella* sp. Mel-27 y posiblemente también son especies diferentes.

Atención especial merecen T-1 y T-9, cuyos aislamientos de contexto se ubican en el grupo 3, mientras que los aislamientos monospóricos están en el grupo 1. Esta discrepancia se puede atribuir a la contaminación cruzada de las esporas o micelio durante el aislamiento o manejo del mismo.

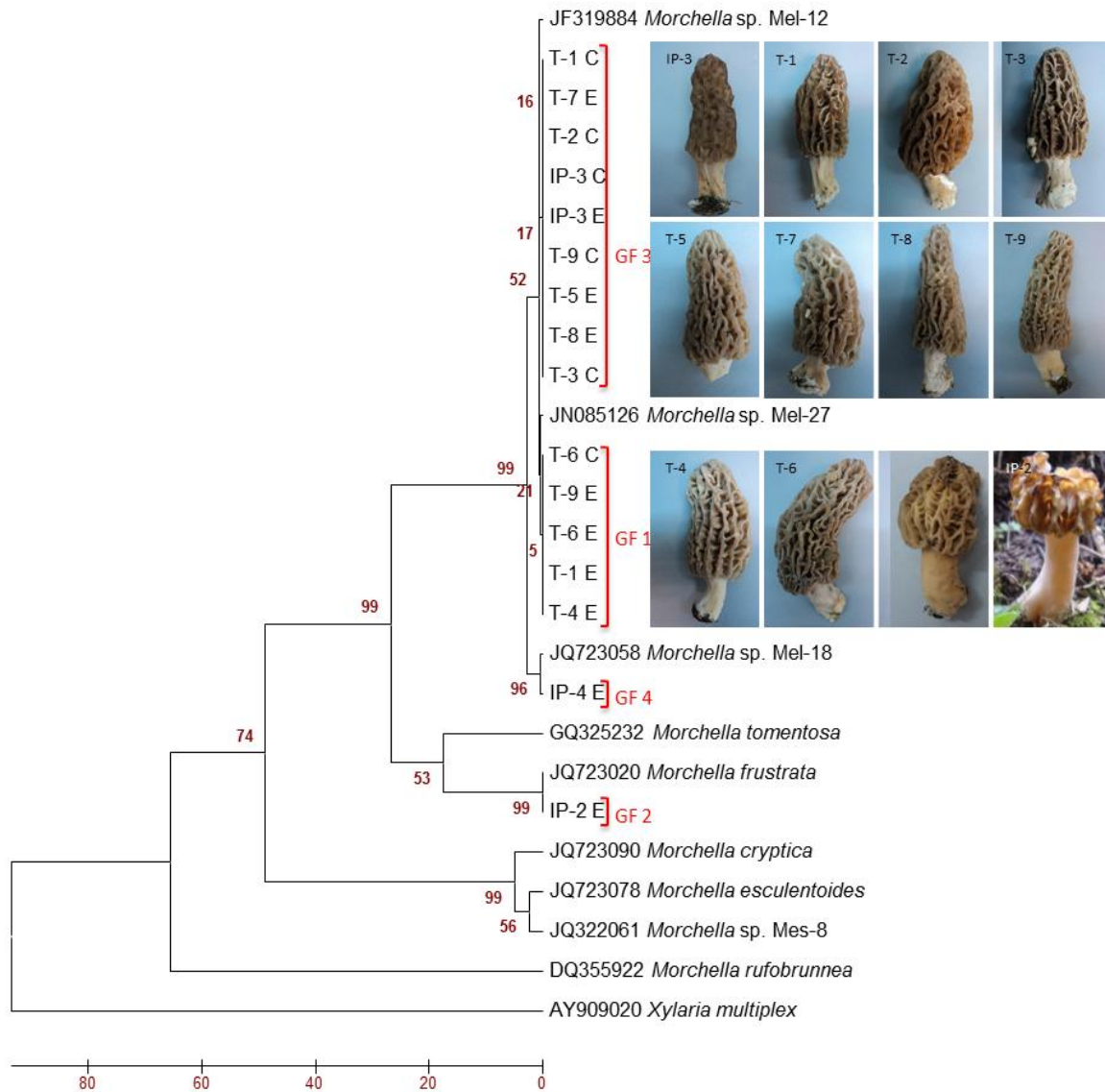


Figura 4. Filogenia de las morchellas del Centro de México, construida por el método de Máxima Parsimonia utilizando 414 pares de bases de la región del Espacio Transcrito Interno (ITS). GF= Grupo filogenético, IP= Izta-Popo, T= Tlálóc, C= contexto, E= espora. Los valores “bootstrap” se presentan en los nodos de las ramas. Los taxones se presentan con su epíteto específico o de colección y el número de acceso en GenBank.

Cuadro 2. Comparación de secuencias ITS obtenidas, con las existentes en la base de datos GenBank.

Cepa ¹	Tamaño de Secuencia (pb)	Especie en GenBank	Tamaño de secuencia (pb)	Número de accesión GenBank	Cobertura (%)	Identidad máxima (%)	País de origen	Número en Herbario ²	Autores
IP-2-E	577	<i>Morchella frustrata</i> ^A	866	JQ723020	100	99	E.U.A.	UC 1860811	Du <i>et al.</i> (2012)
IP-3-E	626	<i>Morchella costata</i>	737	AJ698478	100	99	México	S. Chacón 3703 XAL	Kellner <i>et al.</i> (2007)
		<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1240	JN085134	100	99	Turquía	ANK Taskin 99	Taskin <i>et al.</i> (2012)
IP-3-C	663	<i>Morchella costata</i>	737	AJ698478	98	99	México	S. Chacón 3703 XAL	Kellner <i>et al.</i> (2007)
		<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1279	JN085126	99	99	Turquía	ANK Taskin 98	Taskin <i>et al.</i> (2012)
IP-4-E	577	<i>Morchella</i> sp. Mel-18	651	JQ723058	100	99	R. Dominicana		Du <i>et al.</i> (2012)
T1-E	675	<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1279	JN085126	99	99	Turquía	ANK Taskin 98	Taskin <i>et al.</i> (2012)
T1-C	587	<i>Morchella costata</i>	737	AJ698478	98	99	México	S. Chacón 3703 XAL	Kellner <i>et al.</i> (2007)
		<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1279	JN085126	96	99	Turquía	ANK Taskin 98	Taskin <i>et al.</i> (2012)
T2-C	540	<i>Morchella costata</i>	737	AJ698478	100	99	México	S. Chacón 3703 XAL	Kellner <i>et al.</i> (2007)
		<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1240	JN085134	100	99	Turquía	ANK Taskin 99	Taskin <i>et al.</i> (2012)
T3-C	511	<i>Morchella</i> sp. Mel-12 ^B	1178	JF319884	100	99	E.U.A.	OSC 139277	Pagliaccia <i>et al.</i> (2011)
		<i>Morchella</i> sp. Mel-12 ^B	1303	GU551413	100	99	E.U.A.	OSC 139277	O'Donnell <i>et al.</i> (2011)
T4-E	679	<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1279	JN085126	99	99	Turquía	ANK Taskin 98	Taskin <i>et al.</i> (2012)
T5-E	628	<i>Morchella costata</i>	737	AJ698478	100	99	México	S. Chacón 3703 XAL	Kellner <i>et al.</i> (2007)
		<i>Morchella</i> sp. Mel-12 ^B	1303	GU551413	100	99	E.U.A.	OSC 139277	O'Donnell <i>et al.</i> (2011)
T6-E	558	<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1279	JN085135	100	99	Turquía	ANK Taskin 100	Taskin <i>et al.</i> (2012)
T6-C	648	<i>Morchella costata</i>	737	AJ698478	96	99	México	S. Chacón 3703 XAL	Kellner <i>et al.</i> (2007)
		<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1279	JN085126	96	99	Turquía	ANK Taskin 98	Taskin <i>et al.</i> (2012)
T7-E	602	<i>Morchella costata</i>	737	AJ698478	98	99	México	S. Chacón 3703 XAL	Kellner <i>et al.</i> (2007)
		<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1279	JN085126	96	99	Turquía	ANK Taskin 98	Taskin <i>et al.</i> (2012)
T8-E	690	<i>Morchella costata</i>	737	AJ698478	100	99	México	S. Chacón 3703 XAL	Kellner <i>et al.</i> (2007)
		<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1240	JN085134	100	99	Turquía	ANK Taskin 99	Taskin <i>et al.</i> (2012)
T9-E	581	<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1240	JN085134	100	99	Turquía	ANK Taskin 99	Taskin <i>et al.</i> (2012)
T9-C	737	<i>Morchella costata</i>	737	AJ698478	98	99	México	S. Chacón 3703 XAL	Kellner <i>et al.</i> (2007)
		<i>Morchella</i> sp. Mel-27	1279	JN085126	98	99	Turquía	ANK Taskin 98	Taskin <i>et al.</i> (2012)

¹T= Tláloc, IP= Izta-Popo, E= espora, C= contexto. ²ANK= Ankara University Herbarium, Ankara, Turkey; XAL= Xalapa, Veracruz, México; UC= University of California, Berkeley, U.S.A; OSC= Oregon State University, U.S.A. ^ACorresponde a *Morchella* sp. Mel-2 (O'Donnell *et al.* 2011), ejemplar tipo por Kuo *et al.* (2012). ^BCorresponde a *Morchella snyderi*, ejemplar tipo por Kuo *et al.* (2012).

4.3.3 Tamaño de esporas

4.3.3.1. ANOVA y prueba de hipótesis

Con un nivel de significancia del 5%, los tratamientos “grupos filogenéticos” no producen el mismo efecto sobre las variables dependientes “ancho”, “largo” y “Q (largo/ancho)” de esporas de *Morchella* spp. (Cuadros 3, 4 y 5).

Cuadro 3. Análisis de varianza para Largo de Espora.

FV	GL	SC	CM	<i>P-value</i>
Trat.	3	97.8637	32.621	<.0001
Error	284	1173.9204	4.133	
Total	287	1271.7841		

Cuadro 4. Análisis de varianza para Ancho de Espora.

FV	GL	SC	CM	<i>P-value</i>
Trat.	3	92.7979	30.9326	<.0001
Error	284	435.0952	1.5320	
Total	287	527.8931		

Cuadro 5. Análisis de varianza para Cociente Q.

FV	GL	SC	CM	<i>P-value</i>
Trat.	3	3.5827	1.1942	<.0001
Error	284	6.5106	0.02229	
Total	287	10.0934		

4.3.3.2. Prueba de comparación de medias

En general, el largo de esporas es bastante homogéneo en los cuatro grupos filogenéticos, no obstante el filogrupo 2 representado por *M. frustrata* presenta la menor longitud. El filogrupo 3 presenta el menor ancho de esporas, mientras que para esta característica, *M. frustrata* es igual a los filogrupos 1 y 4 (Cuadro 6).

El cociente Q relaciona las medidas anteriores y refleja mejor la forma de las esporas, ya que los valores que tienden a 1 indican que una forma esférica. *Morchella frustrata* es las que presenta esporas más esféricas al tener el mayor cociente, seguido de los filogrupos 1 y 4, finalmente el filogrupo 3 cuyas esporas son más alargadas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Prueba de comparación de medias para largo, ancho (μm) y Q de esporas por efecto de los tratamientos grupos filogenéticos.

Filoespecie	Largo ¹	Ancho ²	Q (largo/ancho) ³
1	(-17) 21.8278 ^A (+26.1)	(-10) 12.6042 ^A (+16.8)	(-1.21) 1.74250 ^B (+2.24)
4	(-18.6) 21.5806 ^A (+26)	(-9.7) 12.5056 ^A (+15.4)	(-1.38) 1.73472 ^B (+2.24)
3	(-14.6) 21.5653 ^A (+25.5)	(-9.3) 11.4667 ^B (+13.3)	(-1.57) 1.88333 ^A (+2.27)
2	(-15) 20.3333 ^B (+26)	(-9.7) 13.0042 ^A (+16.2)	(-1.19) 1.56847 ^C (+1.98)

Medias en la misma columna con al menos una letra en común no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$). ¹DMS= 0.8757, ²DMS= 0.5331, ³DMS= 0.0652. Entre paréntesis los valores extremos.

4.4 DISCUSIÓN

La clasificación de formas con base en el índice de conicidad empleado en la caracterización varietal de maíz (Ordas y Ron 1988) resultó muy útil al aplicarlo en ascomas de *Morchella* spp., excepto para formas globosas, donde fue necesario emplear el cociente de ajuste Di/Dm . En diversas investigaciones (Guzmán y Tapia 1998, Pilz *et al.* 2007, Kuo 2008, Kuo *et al.* 2012) la forma del himenóforo se determina basada en la experiencia y percepción del investigador, por lo que la propuesta de índice de conicidad y cociente de ajuste Di/Dm pueden ser empleados para tener descripciones más precisas y basadas en datos cuantitativos.

Con relación a la característica número de costillas, esta fue homogénea en los ascomas de todos los sitios muestreados, con un promedio de 15.9 costillas primarias. Kuo *et al.* (2012), en sus descripciones solo contabiliza costillas primarias, reportando para diferentes especies desde 8 (*M. diminutiva*) hasta 30 costillas primarias (*M. esculentoides*) y siendo de 12-22 costillas el rango más común.

El “radiesclerocio” de *Morchella* sp. IP-2, IP-3 y T-4 está presente durante la madurez del ascoma, a diferencia de la agregación micelial llamada *muff* que se forma alrededor de las raíces y que aparece en etapas tempranas de desarrollo de acuerdo con Pilz *et al.* (2007). Cu conformación sólida y compacta llevó Stefani *et al.* (2010) a proponerla como una nueva estructura y sugieren que puede ser utilizada para diagnosticar a *M. tomentosa*. No obstante, en el presente estudio los tres ascomas que presentan esta estructura se ubican en grupos filogenéticos diferentes: *Morchella* sp. IP-2 es *M. frustrata*, mientras que *Morchella* sp. IP-3 y T4 se relacionan con *Morchella* sp. Mel-27. Cabe mencionar que *M. tomentosa* forma un subclado con *M. frustrata* (Figura 4), por lo que el radiesclerocio puede ser típico de este grupo de especies.

Para confirmar o descartar la contaminación como causa de la distribución de los aislamientos monospóricos de T1 y T9 en el filogrupo 1 y de los aislamientos del

contexto en el filogrupo 3, debe hacerse la extracción de ADN, así como la amplificación y secuenciación directamente del contexto del estípite y de aislamientos monospóricos puros evitando la contaminación, para luego ser analizados filogenéticamente. De este modo, se puede también saber si esporas de un mismo ascoma son genéticamente iguales o diferentes, como lo han sugerido Hervey *et al.* (1978).

Morchella frustrata es una especie recientemente descrita por Kuo *et al.* (2012) y corresponde a la especie filogenética *Mel-2* (O'Donnell *et al.* 2011). Anteriormente había sido reportada en la región del Himalaya, India, por Kanwal *et al.* (2011) como una probable nueva especie bajo el nombre de *Morchella* sp. MR-2, sin embargo este trabajo fue criticado por Kuo *et al.* (2012) al indicar que dichos autores no excluyeron las posiciones ambiguas de nucleótidos en su alineamiento y tampoco estudiaron secuencias de ejemplares tipo. A pesar de tratarse de la misma especie filogenética, se detectaron diferencias con las poblaciones reportadas por Kuo *et al.* (2012): (1) el himenóforo de la especie norteamericana es cónica, mientras que la de la mexicana va de subcónica a globosa; (2) mientras las poblaciones norteamericanas forman ascomas en primavera, la especie mexicana fue localizada durante el otoño y (3) en México, *M. frustrata* se encontró en un bosque puro de *Abies religiosa*, mientras que en California y Oregon, E.U.A., aparece en bosques mixtos dominados principalmente por *Arbutus menziesii*, *Quercus* spp., *Pseudotsuga menziesii*, *Pinus ponderosa*, *P. lambertiana* y *Abies concolor*. En Turquía *Morchella* sp. Mel-2 se ha encontrado en bosques donde predominan *Pinus brutia*, *P. nigra*, *Cedrus libani*, *Abies cilicica* y *Quercus coccifera*; aparentemente esta especie fue introducida del oeste de Norte América (Taskin *et al.* 2010) probablemente al transportar especies hortícolas o silvícolas (O'Donnell *et al.* 2011).

6 de los 12 ascomas analizados filogenéticamente se agrupan con *Morchella* sp. Mel-12, que O'Donnell *et al.* (2012) ubica en un subclado rico en especies. Esta especie filogenética corresponde a *Morchella snyderi* y en California, Idaho, Montana, Oregon y Washington, E.U.A., crece en bosques de *P. menziesii*, *P.*

ponderosa y *A. concolor* (Kuo *et al.* 2012), mientras que en México se encontró en bosques puros de *Abies religiosa*. Al pertenecer estos ascomas a un subclado rico en especies, no se puede saber si los 6 ascomas sean la misma especie ya que la filogenia está basada en un análisis de la región ITS, misma que Masaphy *et al.* (2010), Stefani *et al.* (2010) y Kanwal *et al.* (2011) han reportado que no es suficiente para diferenciar las especies, optando recientemente por utilizar genes que codifican para las subunidades 1 y 2 de la ARN polimerasa II (RPB1 y RPB2) y Factores de Elongación 1-Alpha (EF-1 α) (Taskin *et al.* 2010, O'Donnell *et al.* 2011, Pagliaccia *et al.* 2011, Du *et al.* 2012), analizados bajo el sistema de análisis GCPSR.

Tanto *M. frustrata* como *M. snyderi* tienen colores amarillos cercanos al clado esculenta, pero se agrupan dentro de *elata* (Kuo *et al.* 2012). Según estos autores *M. frustrata* se caracteriza por tener el himenóforo cónico y unido al estípite con un seno notable y alveolos orientados verticalmente, ascosporas más pequeñas que las de *Morchella snyderi*; además podría tratarse de la morchella rubia de montaña reportada por Pilz *et al.* (2007). Las principales diferencias son el "radiosclerocio" y la asociación física con *Taraxacum* sp. que presenta la *M. frustrata* de México y que no ha sido reportada en las especies norteamericanas.

Morchella sp. Mel-27 que forma un subclado con T4 y T6 ha sido encontrado en Turquía en bosques de *Pinus brutia*, *Juniperus* sp., *Picea orientalis*, *Cedrus libani* y *Abies cíclica* (Taskin *et al.* 2010). Se ha planteado que esta especie es endémica del este de Turquía (Taskin *et al.* 2012), sin embargo, el presente estudio indica que en México existen especies cercanas filogenéticamente que crecen en bosques de *Abies religiosa*.

Aunque en ambos sitios se encontraron dos grupos filogenéticos, los únicos tres ascomas de Izta-Popo están en grupos diferentes, mientras que los nueve ascomas de Tláloc sólo se distribuyen en dos grupos muy cercanos.

A la fecha, no se tienen reportes que empleen el tamaño de esporas como parámetro para la diferenciación de especies. Si bien se encontraron diferencias

entre los cocientes Q de los 4 filogrupos, son necesarios estudios comparativos de poblaciones más grandes para determinar si el tamaño de esporas es un parámetro válido para la diferenciación de especies. La especie *M. frustrata* mexicana presenta un tamaño de esporas menor a la reportada en California y Oregon E.U.A. por Kuo *et al.* (2012) donde el intervalo es de 20-29 x 14-19 μm .

4.5 CONCLUSIONES

- El índice de conicidad y el cociente D_i/D_m se pueden emplear para establecer una clasificación objetiva de la forma del himenóforo en ascomas del género *Morchella*.
- Las descripciones macro y micro-morfológicas de ascomas de *Morchella* deben ir acompañadas de análisis moleculares que permitan establecer diferencias entre especies.
- Con base en el análisis filogenético se identificaron 4 filoespecies pertenecientes al clado elata, de las cuales *Morchella frustrata* ha sido recientemente descrita y las tres restantes probablemente sean especies nuevas.
- Los sitios con mayor abundancia de ascomas fueron Mariposa Monarca y Tláloc, mientras que en el sitio Izta-Popo se encontró un mayor número de filoespecies.

4.6 LITERATURA CITADA

- Altschul S, Madden T, Schäffer A, Zhang Z, Miller W, Lipman D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Dalgleish HJ, Jacobson KM. 2005. A first assessment of genetic variation among *Morchella esculenta* (Morel) populations. *Journal of Heredity* 96:396-403.
- Du XU, Zhao Q, O'Donnell K, Rooney AP, Yang ZL. 2012. Multigene molecular phylogenetics reveals true morels (*Morchella*) are especially species-rich in China. *Fungal Genetics and Biology* 49:455-469.
- Guzmán G, Tapia F. 1998. The known morels in Mexico, a description of a new blushing species, *Morchella rufobrunnea*, and new data on *M. guatemalensis*. *Mycologia* 90: 705-714.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hervey A, Bistis G, Leong I, 1978. Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta*. *Mycologia* 70: 1269–1274.
- Hughes KW, Petersen RH, Mata JL, Psurtseva NV, Kovalenko AE, Morozova OV, Lickey OV, Blanco JC, Lewis DP, Nagasawa E, Halling RE, Takehashi S, Aime MC, Bau T, Henkel T. 2007. Megacollybia (Agaricales). *Reports of the Tottori Mycological Institute* 45:1-57.

- Isiloglu M, Alli H, Spooner BM, Solak MH. 2010. *Morchella anatolica* (Ascomycota), a new species from southwestern Anatolia, Turkey. *Mycologia* 102:455-458.
- Kanwal HK, Acharya K, Ramesh G, Reddy MS. 2011. Molecular characterization of morchella species from the western Himalayan Region of India. *Current Microbiology* 62:1245-1252.
- Kellner H, Renker C, Buscot F. 2005. Species diversity within the *Morchella esculenta* group (Ascomycota: Morchellaceae) in Germany and France. *Organisms diversity & Evolution* 5:101-107.
- Kellner H, Luis P, Buscot F. 2007. Diversity of laccase-like multicopper oxidase genes in Morchellaceae: identification of genes potentially involved in extracellular activities related to plant litter decay. *FEMS Microbiology Ecology* 61:153-163.
- Kuo M. 2008. *Morchella tomentosa*, a new species from western North America, and notes on *M. rufobrunnea*. *Mycotaxon* 105:441-446.
- Kuo M, Dewsbury DR, O'Donnell K, Carter CM, Rehner SA, Moore DJ, Moncalvo JM, Canfield FA, Stephenson SL, Methven AS, Volk TJ. 2012. Taxonomic revision of true morels (*Morchella*) in Canada and the United States. *Mycologia* (In press).
- Masaphy S, Zabari L, Goldberg D. 2009. New long season ecotype of *Morchella rufobrunnea* from Northern Israel. *Micología Aplicada Internacional* 21:45-55.
- Masaphy S, Zabari L, Goldberg D, Jander-Shagug G. 2010. The complexity of *Morchella* systematics: A Case of the Yellow Morel from Israel. *Fungi* 3:14-18.

- O'Donnell K, Rooney AP, Mills G, Kuo M, Weber NS, Rehner SA. 2011. Phylogeny and historical biogeography of true morels (*Morchella*) reveals an early Cretaceous origin and high continental endemism and provincialism in the Holarctic. *Fungal Genetics and Biology* 48:252-265.
- Ordas A, Ron AM. 1988. A method to measure comicalness in maize. *Maydica* 33:261-267.
- Pagliaccia D, Douhan GW, Douhan L, Peever TL, Carris LM, Kerrigan JL. 2011. Development of molecular markers and preliminary investigation of the population structure and mating system in one lineage of black morel (*Morchella elata*) in the Pacific Northwestern USA. *Mycologia* 103:969-982.
- Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz TL, Parks CG, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE. 2007. *Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America*. General Technical Report. PNW-GTR-710. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 161 p.
- Séguy E. 1936. XXX Code universal des couleurs. Paul Lechevalier P. (Editeur). Librairie pour les sciences naturelles. Paris, France.
- Stefani OPF, Sokolski S, Wurtz T, Piche Y, Hamelin R, Fortin A, Berube JA. 2010. *Morchella tomentosa*: a unique belowground structure and a new clade of morels. *Mycologia* 102:1082-1088.
- Taskin H, Buyukalaca S, Dogan HH, Rehner SA, O'Donnell K. 2010. A Multigene Molecular Phylogenetic Assessment of True Morels (*Morchella*) in Turkey. *Fungal Genetics and Biology* 47:672-682.

- Taskin H, Buyukalaca S, Hansen K, O'Donnell K. 2012. Multilocus phylogenetic analysis of true morels (*Morchella*) reveals high levels of endemics in Turkey relative to other regions of Europe. *Mycologia* 104:446-461
- Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 31:21-32.
- Wipf D, Munch JC, Botton B, Buscot F. 1996. DNA polymorphism in morels: complete sequences of the internal transcribed spacer of genes coding for rRNA in *Morchella esculenta* (yellow morel) and *Morchella conica* (black morel). *Applied and Environmental Microbiology* 62:3541-3543.
- Wurtz TL, Wiita AL, Weber NS, Pilz D. 2005. Harvesting morels after wildfire in Alaska. Res. Note PNW-RN-546. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 31 p.

CAPÍTULO V. CUANTIFICACIÓN DE NÚCLEOS EN ASCOSPORAS E HIFAS

5.1 INTRODUCCIÓN

La condición nuclear de las hifas y esporas de *Morchella* spp. es uno de los aspectos citogenéticos menos estudiados (Pilz *et al.* 2007, Pagliaccia *et al.* 2011). Las células hifales en *Morchella* son septadas y multinucleadas (Hervey *et al.* 1978), con 10 a 15 núcleos por célula, aunque en algunos casos llega a tener de 1 a 2 hasta 40-50 e inclusive hasta 65 núcleos (Volk y Leonard 1990). En el orden pezizales la familia Morchellaceae se caracteriza por presentar muchos núcleos por espora (Hansen y Pfister 2006). Las ascosporas en cambio tienen de 15 a 30 núcleos haploides (Weber 1988, citado por Pilz *et al.* 2007) producto de la replicación de un solo núcleo haploide recombinante originado en la meiosis por dos núcleos haploides compatibles (Pilz *et al.* 2007). Según estos autores, las esporas producen hifas multinucleadas, que a su vez pueden fusionarse con otras hifas compatibles dando origen al micelio heterocariótico donde pueden coexistir diferentes núcleos haploides en la misma hifa. De acuerdo con Horton (2006), la producción de esporas heterocarióticas podría representar ventajas adaptativas a las condiciones ambientales favoreciendo con ello el establecimiento de nuevos individuos después de su dispersión a largas distancias.

En hongos del complejo *Rhizoctonia*, la condición nuclear en las células somáticas hifales ha sido un criterio taxonómico importante que ha permitido separar las especies en uninucleadas, binucleadas y multinucleadas (Parameter 1967). En el caso de *Morchella*, los estudios sobre el número de núcleos en esporas e hifas son escasos, por lo que no se ha podido confirmar que esta característica sea un indicador útil para delimitar especies. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo determinar si el número de núcleos en las esporas e hifas de morchellas localizadas en bosques puros de *Abies religiosa* en el centro de México está relacionado con las posibles especies a la que pertenecen.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó el conteo de núcleos en esporas e hifas (n=100) de cada uno de los cuatro grupos filogenéticos detectados a través del análisis molecular (Cuadro 1).

Cuadro 1. Grupos filogenéticos empleados para el conteo de núcleos en hifas y esporas de *Morchella* spp.

GF	Esporada	Aislamientos
1	T-1, T-4, T-6	T-1 E, T-4 E, T-6 E, T-6 C, T-9 E
2	IP-2	IP-2 E
3	T-5, T-7, T-8	T-1 C, T-2 C, T-3 C, IP-3 E, IP-3 C, T-5 E, T-7 E, T-8 E, T-9 C
4	IP-4	IP-4 E

GF= grupo filogenético, T= Tlálloc, IP= Izta-Popo, E= espora, C= contexto.

5.2.1 Preparación de esporas

Se efectuó un raspado de la esporada obtenida sobre papel aluminio de cada ascocarpo fresco, empleando una espátula y las esporas recolectadas se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 mL (previamente esterilizado) al cual se le agregó 500 μ L de etanol (70%). Enseguida, el tubo con las esporas se homogeneizó utilizando un vortex y se dejó reposar durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm (Centrífuga *Mini spin Plus*, Eppendorf) durante 1 min, y se eliminó el etanol. La pastilla con esporas se distribuyó sobre un portaobjeto y se dejó secar en una campana de extracción de humos por 5 min. Se le agregó una gota de 4', 6-Diamino-2-fenilindol (DAPI, marca Sigma, 0.5 μ g/mL de agua ultrapura Milli-Q), se le colocó un cubreobjetos y se selló con esmalte transparente (Horton 2006). Durante este proceso, existieron algunas variaciones que se detallan a continuación: (1) las esporas de IP-4 se tomaron de fragmentos del himenio congelado, el cual se cortó

en secciones finas que se distribuyeron sobre un portaobjeto; (2) las esporas de IP-2 se obtuvieron del ascoma deshidratado mediante secciones finas del himenio, empleando una navaja de afeitar y se colocaron sobre un portaobjeto con una gota de agua destilada para su rehidratación. En ambos casos, una vez obtenidas las esporas se siguió el procedimiento previamente descrito.

5.2.2 Preparación de micelio

El micelio se obtuvo de los cultivos puros de las cepas sembradas en PDA (39 g L⁻¹). A cada una de las cepas se les realizó un raspado, utilizando una pequeña espátula y la muestra se extendió sobre un portaobjeto. A continuación se le agregó una gota de DAPI, se colocó un cubreobjeto y se selló con esmalte transparente.

5.2.3 Cuantificación de núcleos en esporas e hifas

Una hora después de la adición del DAPI se cuantificaron los núcleos empleando microscopía de fluorescencia. Todas las observaciones microscópicas de este trabajo se efectuaron en un microscopio Olympus Modelo BX51, empleando microscopía de campo claro, contraste de fases y contraste de interferencia diferencial (DIC-Nomarski) y fluorescencia, con un filtro de excitación U-MWU2. Para la fotodigitalización de imágenes se empleó una cámara Infinity 1 (Lumenera corporation). Las imágenes se procesaron y analizaron con el programa Image-Pro Express, versión. 6.3 (Media Cybernetics).

5.2.4 Análisis estadístico

Para evaluar el número de núcleos en esporas e hifas se empleó un diseño experimental completamente al azar con 4 tratamientos (grupos filogenéticos). Sin

embargo, el análisis estadístico se ajustó en el caso de las esporas, a 53 repeticiones por tratamiento debido a que en el ascoma IP-2 sólo se pudieron cuantificar 53 esporas y a 100 repeticiones por tratamiento para hifas. El análisis se efectuó mediante el paquete estadístico Statistical Analysis System 9.1 (SAS 9.1), con el procedimiento *Proc anova*, empleando el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Valor de la variable respuesta del tratamiento i en la repetición j

μ = Media general

T_i = Efecto del tratamiento i . $i = 1, 2, \dots, 36$

ε_{ij} = Error experimental de la repetición j del tratamiento i . $j = 1, 2, \dots, 5$

La hipótesis a probar empleando el procedimiento ANOVA (SAS 9.1) fue:

Ho: $T_1 = T_2 = \dots = T_t$ (todos los tratamientos producen el mismo efecto en Y_{ij})

Ha: $\exists i \neq j \ni T_i \neq T_j$ (al menos un tratamiento produce efecto diferente en Y_{ij})

Se rechaza Ho si $F_c > F_t$ y si $P_{\text{-value}} < \alpha$

La prueba de Tukey usando el mismo programa estadístico consideró:

$$DMS = (q)(s\bar{y})$$

Donde:

DMS = diferencia mínima significativa

$q = q_{gl(E),t}^\alpha$ (valor de tablas de rangos estudentizados)

$$s\bar{y} = \sqrt{\frac{CM(E)}{r}}$$

Si $|\bar{y}_i - \bar{y}_j| > DMS$ $T_i \neq T_j$... se rechaza Ho: $\mu_i = \mu_j$

Si $|\bar{y}_i - \bar{y}_j| \leq DMS$ $T_i = T_j$... se acepta Ho: $\mu_i = \mu_j$

5.3 RESULTADOS

5.3.1. ANOVA y prueba de hipótesis

Con un nivel de significancia de 5%, los tratamientos “grupos filogenéticos” no producen el mismo efecto sobre las variables “número de núcleos en esporas e hifas” de *Morchella* spp. (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza para número de núcleos en esporas e hifas de *Morchella* spp.

FV	Número de núcleos en esporas				Número de núcleos en hifas			
	GL	SC	CM	<i>P-value</i>	GL	SC	CM	<i>P-value</i>
Trat.	3	66.2075	22.0691	0.0184	3	80.7800	26.9266	0.0188
Error	208	1344.9811	6.4662		396	3170.8600		
Total	211	1411.1886			399	3251.6400		

5.3.2. Prueba de comparación de medias

Los grupos filogenéticos 3 y 4, que corresponden a los sitios Tláloc e Izta-Popo respectivamente, poseen el mayor número de núcleos en esporas, siendo estadísticamente iguales. Por otro lado, los grupos filogenéticos 1 y 2, que corresponden a los sitios Tláloc e Izta-Popo respectivamente presentaron el menor número de núcleos, siendo estadísticamente iguales entre sí. En el caso de las hifas, los filogrupos 2 y 3 presentaron el mayor número de esporas con respecto a los filogrupos 1 y 4 (Cuadro 3).

En todos los filogrupos de *Morchella* las esporas poseen más del doble de núcleos que en las hifas provenientes de aislamientos monospóricos o de contexto (Cuadro 3, Figura 1). Para ser más precisos, en las hifas el valor mínimo de núcleos fue de 1 y el máximo de 25, mientras que en esporas, la cantidad mínima

fue de 4 y la máxima de 19 (Cuadro 3). Por otro lado, las hifas emergentes presentaron 1 o 2 núcleos (Figura 1.a) y las más gruesas tuvieron hasta 25 núcleos (Figura 1.b).

Cuadro 3. Prueba de comparación de medias para número de núcleos en esporas e hifas por efecto de los grupos filogenéticos.

Grupo filogenético	No. núcleos en esporas ¹	No. de núcleos en hifas ²
4	(-8) 13.0943 ^A (+19)	(-2) 4.73 ^B (+15)
3	(-8) 12.1698 ^{AB} (+19)	(-1) 4.88 ^{AB} (+15)
1	(-7) 11.7547 ^B (+18)	(-1) 4.71 ^B (+22)
2	(-4) 11.6981 ^B (+17)	(-2) 5.80 ^A (+25)

Medias en la misma columna con al menos una letra en común no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$). ¹DMS= 1.2794, ²DMS= 1.0325. Entre paréntesis los valores extremos.

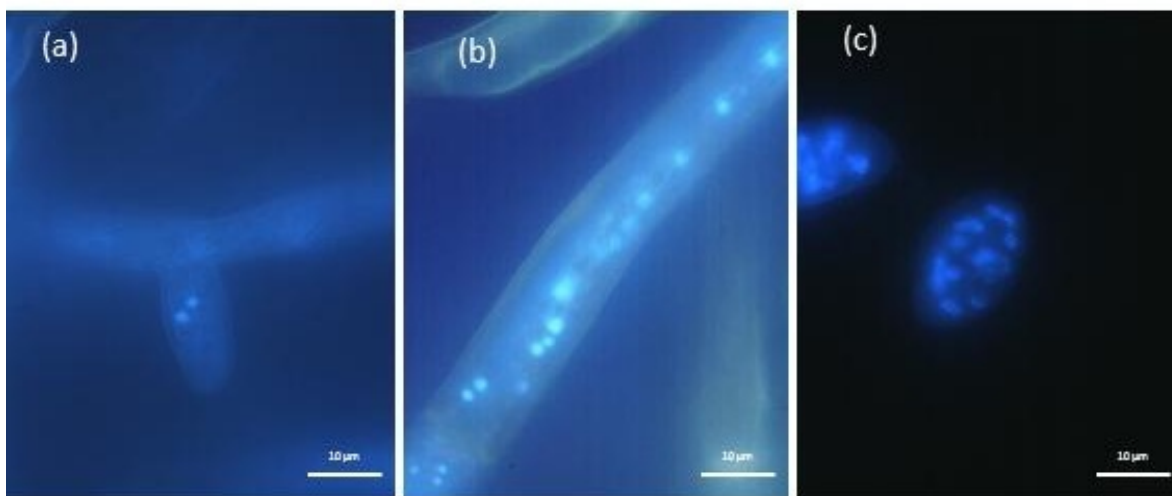


Figura 1. Número de núcleos en hifas y esporas de *Morchella* spp. (a) hifas emergentes, (b) hifas gruesas y (c) ascosporas. Las fotografías fueron tomadas empleando microscopía de epifluorescencia, previa tinción con DAPI.

5.4 DISCUSIÓN

Como han indicado Volk y Leonard (1990) y Weber (1988, citado por Pilz *et al.* 2007) las esporas tienen alrededor del doble de número de núcleos que las hifas, lo cual concuerda con lo que se encontró en el presente estudio. Cabe mencionar que las cantidades extremas de núcleos por célula (1 y 25) se presentaron en hifas, mientras que en esporas la variación fue menor (4 y 19 núcleos) (Cuadro 3) Por su parte, Volk y Leonard (1990) reportan de valores extremos de 1-2 y hasta 65 núcleos en células hifales, mientras que en ascosporas Weber (1988, citado por Pilz *et al.* (2007) reporta un rango de 15 a 30 núcleos. Las células hifales, al ser de mayor tamaño que las esporas, pueden albergar un mayor número de núcleos

En las diferentes filo especies, el número de núcleos en esporas no es proporcional al de hifas, por ejemplo, la filo especie 2 (*Morchella frustrata*) presentó la menor cantidad en esporas, mientras que en hifas tuvo el mayor número en promedio. Si bien el rango reportado en hifas es de 10-15 núcleos (Volk y Leonard 1990) y en esporas es de 15-30 (Weber 1988, citado por Pilz *et al.* 2007), en general las 4 filo especies estudiadas presentaron de 4 a 6 núcleos en hifas y de 11 a 13 núcleos en esporas. Se ha hipotetizado que un gran número de núcleos por célula puede facilitar la producción de enzimas y proteínas, permitiendo una mayor tasa de crecimiento inicial respecto a esporas con pocos núcleos, y aunque esto no ha sido probado, se ha observado que el micelio de *Morchella* spp. recién germinado crece rápidamente en cultivos puros (Pilz *et al.* 2007). Adicionalmente, hifas con un alto número de núcleos, pueden ser más competitivas en términos de estrategias adaptativas a cambios ambientales, como la contaminación de bosques por ozono atmosférico.

Por otro lado, si las hifas contienen una mezcla de núcleos genéticamente diferentes, entonces el micelio no siempre producirá ascomas genéticamente idénticos, lo que hace que en un espacio pequeño se localicen filo especies diferentes (Pilz *et al.* 2007). Tal es el caso de los ascomas T-5, T-6, T-7 y T-8, que se localizaron en un bloque de 24x14x9 cm (Figura 1.e, Capítulo IV), que siendo

morfológicamente similares, el análisis filogenético arrojó que T-6 pertenece al filogrupo 1, mientras que el resto pertenecen al filogrupo 3.

Finalmente, existen pocos estudios que aporten información al respecto. Es probable que el número de núcleos en esporas e hifas de *Morchella*, pueda ayudar a clarificar su taxonomía, fortaleciendo el método de caracterización clásica. Si bien, este trabajo aporta información importante, se recomienda un estudio más detallado con poblaciones más grandes y representativas de diferentes clados filogenéticos.

5.5 CONCLUSIONES

- Las esporas de las cuatro filoespecies estudiadas poseen aproximadamente el doble de núcleos que las hifas.
- Las cuatro filoespecies de morchellas mexicanas en cuestión tienen un menor número de núcleos en esporas e hifas respecto a las especies de morchellas reportadas en Estados Unidos.
- No se observó una variación en el número de núcleos de esporas e hifas en función de la agrupación filogenética.
- El origen geográfico de las filoespecies no influyó en el número de núcleos de esporas e hifas.

5.6 LITERATURA CITADA

Hansen K, Pfister DH. 2006. Systematics of the pezizomycetes-the operculate discomycetes. *Mycologia* 6:1029-1040.

Hervey A, Bistis G, Leong I, 1978. Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta*. *Mycologia* 6: 1269–1274.

Horton RT. 2006. The number of nuclei in basidiospores of 63 species of ectomycorrhizal Homobasidiomycetes. *Mycologia* 2:233-238.

Pagliaccia D, Douhan GW, Douhan L, Peever TL, Carris LM, Kerrigan JL. 2011. Development of molecular markers and preliminary investigation of the population structure and mating system in one lineage of black morel (*Morchella elata*) in the Pacific Northwestern USA. *Mycologia* 103:969-982.

Parameter JR Jr, Whitney HS, Platt WD. 1967. Affinities of some *Rhizoctonia* species that resemble mycelium of *Thanatephorus cucumeris*. *Phytopathology* 57:218-223

Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz TL, Parks CG, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE. 2007. *Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America*. General Technical Report. PNW-GTR-710. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 161 p.

Volk TJ, Leonard TJ. 1990. Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research* 94:399-406.

CAPÍTULO VI. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO*

6.1 INTRODUCCIÓN

Se ha observado que en condiciones *in vitro*, el desarrollo de *Morchella* se ve influenciado por el tipo de sustrato, forma de aislamiento, estado de desarrollo del ascoma, temperatura y pH del medio de cultivo, variando notablemente la morfología del micelio, así como la tasa de crecimiento (Guler y Arkan 2000, Winder 2006).

De acuerdo con Tariq (2011) la cinética de crecimiento radial en hongos tiene las siguientes fases: (1) *letargo*, cuando las esporas comienzan a germinar o las hifas de un explante empiezan a ramificarse; (2) *crecimiento exponencial*, caracterizado por un crecimiento acelerado; (3) *crecimiento lineal*, se presenta un crecimiento constante, por lo que la pendiente de esta región representa la tasa de crecimiento y ; (4) *desaceleración*, donde hay una disminución del crecimiento y aumenta la presencia de hifas sumergidas en el medio de cultivo). Sin embargo, en algunos hongos como *Aspergillus nidulans* la cinética varía, ya que el crecimiento exponencial es seguido por una fase de desaceleración y luego una de crecimiento constante (Trinci 1969). Este último tipo de cinética es menos real, ya que el crecimiento constante no puede ser permanente y en algún momento tenderá a disminuir. Por otro lado, al ser *A. nidulans* de crecimiento muy rápido, el área de una caja Petri de 9cm no es suficiente para registrar todo el crecimiento.

En estudios sobre el desarrollo *in vitro* de *Morchella*, se ha observado que el tiempo necesario para obtener una colonización del 100% va de 4 a 12 días (d); además el micelio presenta una gran variedad de coloraciones, dependiendo del medio de cultivo empleado (Hervey *et al.* 1978, Guzmán y Tapia 1998, Guler y Arkan 2000, Winder 2006, Guler y Ozkaya 2009). Por ejemplo, en algunos aislamientos monospóricos crecidos en papa-dextrosa-agar (PDA) se ha registrado que a partir del día 11, el crecimiento del micelio se detiene o se vuelve

muy lento (Hervey *et al.* 1978). Guzmán y Tapia (1998) indican que *M. rufobrunnea* invadió en un periodo de 10-12 d las cajas Petri de 9 cm de diámetro, siendo el micelio poco denso en extracto de malta-agar (EMA) y PDA; mientras que en cajas Petri de 9 cm la invasión total se produce en 4 d en EMA (2%) y en 5 d en PDA y medio completo de levadura (CYM, por sus siglas en inglés). Además, el micelio presenta colores que van de amarillo a marrón (Guler y Arkan 2000). Por otro lado, Guler y Ozkaya (2009) registraron periodos de colonización de 5 d en medios de cultivo EMA y CYM y de 7 d en PDA. En este último medio el micelio fue circular, inicialmente blanco, tornándose marrón oscuro con la edad y presentándose la formación de esclerocios e hifas aéreas en el centro de la colonia. En el medio de cultivo EMA la colonia adquirió una pigmentación amarilla, formándose rizomorfos y esclerocios y en CYM el micelio fue muy denso, pero sin hifas aéreas, donde formó rizomorfos y esclerocios. De acuerdo con Pilz *et al.* (2007), los rizomorfos son agregaciones de hifas especializadas en el transporte de nutrimentos y agua, y al igual que los esclerocios, son esenciales en la formación de ascomas.

Hervey *et al.* (1978) distinguieron en aislamientos a partir de esporas de *Morchella*, dos tipos de micelio: (1) con presencia de abundantes hifas aéreas; (2) caracterizado por una textura granular y con pocas hifas aéreas. Guler y Arkan (2000) reportaron que en agar, generalmente las cepas son circulares, incrementando su densidad a medida que se producen las hifas aéreas. Winder (2006), reporta que en los medios con presencia de maltosa (M), el micelio adquiere una pigmentación negra, mientras que en PDA, el margen del micelio se vuelve plumoso.

En relación con la influencia del pH sobre el crecimiento *in vitro* de *Morchella*, se ha reportado que en medio líquido, un pH de 7.0 ajustado con KOH es el más adecuado. En cambio cuando el medio se ajustó con CaCO₃ el pH óptimo fue \geq a 7.7 (Winder 2006). Derivado de esto, dicho autor sugiere que la ceniza de la madera y otros compuestos con calcio, además de estimular el crecimiento, también alteran el pH óptimo de crecimiento. En contraste, bajo condiciones

naturales, Pérez-Moreno (2009) reportan que en un bosque de oyamel, el pH del suelo adyacente a los ascomas de las morchellas mexicanas es de 5.9.

Por lo tanto, el objetivo de este experimento es evaluar el desarrollo de aislamientos de *Morchella* spp. en medios de cultivo y pH contrastantes.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Aislamiento *in vitro*

En este trabajo, el aislamiento de las cepas mexicanas se efectuó, hasta donde fue posible, a partir de esporas y contexto de cada ascoma recolectado.

Aislamientos monospóricos. Se llevó a cabo bajo condiciones axénicas en una cámara de flujo laminar (Terlab, Cam-Hor). En cada ascoma fresco, se cortó un fragmento de ~0.5 cm del himenio, empleando un escalpelo estéril. La porción estéril del fragmento se adhirió a la parte interna de la tapa de la caja Petri, con vaselina estéril, dejando el himenio expuesto al medio de cultivo. Las cajas se inclinaron levemente durante 30 s para obtener la esporada. Empleando un microscopio estereoscópico se seleccionaron esporas individuales, mismas que se transfirieron a cajas Petri de 9 cm con PDA (39 g L⁻¹) fresco, obteniendo los cultivos monospóricos.

Aislamientos del contexto. El procedimiento se realizó en una cámara de flujo laminar donde los ascomas se colocaron sobre una caja Petri de vidrio de 90x14 mm y con un escalpelo estéril, se les hizo un corte longitudinal para exponer el contexto del ascoma. Con un escalpelo estéril, se tomó un fragmento de ~0.5 cm de la parte interna más gruesa del estípite, localizada generalmente en la base de este. Posteriormente se transfirieron 4 fragmentos en cada caja Petri (9cm) con medio PDA (39 g L⁻¹). Las cajas se etiquetaron y sellaron con Parafilm®, incubándose en la oscuridad, a temperatura ambiente durante 24 h. Cuando comenzaron a aparecer las hifas emanantes del fragmento de contexto, se tomaron fragmentos de la periferia de la colonia empleando un sacabocados, de los cuales se transfirió uno de ellos al centro de cada caja Petri con medio PDA (39 g L⁻¹) fresco, para obtener cultivos puros.

6.2.2 Medios de cultivo y ajuste de pH

Para realizar los aislamientos se emplearon los siguientes medios de cultivo: (1) PDA (39 g L^{-1}), (2) Extracto de Malta-Agar (EMA, $20:20 \text{ g L}^{-1}$) y (3) medio completo de levadura-agar (CYM, por sus siglas en inglés) que contiene por litro: 0.5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.46 g de KH_2PO_4 , 1.0 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 20 g de glucosa, 2.0 g de BactoTM-Peptona, 2 g de extracto de levadura y 20 g de agar-agar (Perkins, 1969). Los medios de cultivo se esterilizaron a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 min en una autoclave LABTEC/LAC-5060S. Cada medio de cultivo se ajustó a un pH de 3.5, 5.5 y 7.7, empleando HCl y NaOH (J.T.Baker) 1 y 0.1N. Cabe indicar que los valores de pH se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios: (a) 3.5 que se consideró como la acidez extrema y limitante del crecimiento de *Morchella*; (b) 5.5 corresponde al valor cercano encontrado en condiciones naturales por Pérez-Moreno *et al.* (2009); y (c) 7.7 el cual ha sido reportado como óptimo en *Morchella* (Winder 2006.)

6.2.3 Siembra de cepas en los medios de cultivo

Se seleccionó al azar una cepa monospórica de cada grupo filogenético y se sembró en los tres medios de cultivo a tres niveles de pH cada uno, ($n= 5$ repeticiones), empleándose 180 cajas Petri (Cuadro 1). La siembra se efectuó transfiriendo al centro de cada caja Petri un fragmento circular de 5 mm en diámetro del micelio periférico. Las cajas se etiquetaron y sellaron con Parafilm®, posteriormente se incubaron en oscuridad en el laboratorio a $\sim 22 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.2.4 Descripción morfológica

A los 20 días después de la siembra, se registró el color del centro, parte media y periferia de la cepa, tanto del anverso como del reverso de la colonia empleando el Catálogo Universal de Colores (Séguy 1936). Para el registro de la forma del

borde y elevación de la colonia, se utilizó como referencia el catálogo de la “Society of General Microbiology” (Anexo II). Para caracterizar textura, densidad, presencia de hifas aéreas, rizomorfos, hifas sumergidas, y micro-esclerocios, se elaboró una guía de dichos descriptores, con base en las cepas de estudio (Anexo II).

6.2.5 Velocidad de crecimiento

Se determinó empleando la fórmula de Sinclair y Cantero (1989):

$$VC = \frac{Df - Di}{Tf - Ti}$$

Dónde:

Vc = velocidad de crecimiento (mm día⁻¹)

Df = diámetro final de crecimiento (mm)

Di = diámetro inicial de crecimiento (mm)

Tf= tiempo final de crecimiento (días) -

Ti= tiempo inicial de crecimiento (días)

6.2.6 Definición de variables de estudio

Se evaluaron las siguientes variables dependientes: (1) velocidad de crecimiento (mm día⁻¹); (2) color de la cepa; (3) forma de la cepa: circular, irregular, filamentosa y rizoide; (4) forma del borde: entero, ondulado, filiforme, rizado y lobulado; (5) elevación de la cepa: Gruesa, convexa, delgada, umbonada, crateriforme; (6) textura de la cepa: acanalada, lanosa, granulosa, aterciopelada, lisa y algodonosa; (7) densidad de la cepa: baja, media, alta; (8) hifas aéreas:

ausente, poco, regular, abundante; (9) hifas sumergidas en el medio de cultivo: presencia, ausencia; (10) micro-esclerocios: presencia, ausencia.

6.2.7 Diseño experimental

Para evaluar las variables de estudio se empleó un diseño experimental con tres factores en completamente al azar. Los factores fueron: (1) grupo filogenético; (2) medio de cultivo; y (3) pH. El primero con cuatro niveles (grupo 1, 2, 3 y 4), el segundo con tres niveles (PDA, EMA y CYM) y el tercero con tres niveles (pH 3.5, 5.5 y 7.7), obteniendo un total de 36 tratamientos con 5 repeticiones cada uno (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño de tratamientos para la caracterización de cuatro cepas de *Morchella* cultivadas en tres medios de cultivo a tres pH diferentes.

Grupo filogenético	pH			Medio
	3.5	5.5	7.7	
1 (T-1)	T1	T2	T3	PDA
	T4	T5	T6	EMA
	T7	T8	T9	CYM
2 (IP-2)	T10	T11	T12	PDA
	T13	T14	T15	EMA
	T16	T17	T18	CYM
3 (T-8)	T19	T20	T21	PDA
	T22	T23	T24	EMA
	T25	T26	T27	CYM
4 (IP-4)	T28	T29	T30	PDA
	T31	T32	T33	EMA
	T34	T35	T36	CYM

T-1 y T-8= aislamientos de ascomas 1 y 8 del sitio Tlálloc respectivamente; IP-2 e IP-4= aislamientos de ascomas 2 y 4 del sitio Izta-Popo respectivamente; T1- T36= Tratamientos.

6.2.8 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de tres factores en completamente al azar, empleando el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + B_j + C_k + (AB)_{ij} + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

$\mu =$ Media general

$A_i =$ Efecto del nivel i del factor A

$B_j =$ Efecto del nivel j del factor B

$C_k =$ Efecto del nivel k del factor B

$(AB)_{ij} =$ Efecto de la interacción de los niveles i y j de los factores A y B

$(AC)_{ik} =$ Efecto de la interacción de los niveles i y k de los factores A y C

$(BC)_{jk} =$ Efecto de la interacción de los niveles j y k de los factores B y C

$(ABC)_{ijk} =$ Efecto de la interacción de los niveles i, j, k de los factores A, B y C

$\varepsilon_{ijkl} =$ Error experimental

Análisis de varianza y prueba de hipótesis

Las hipótesis a probar empleando el procedimiento ANOVA (SAS 9.1) fueron:

a) para niveles del factor A

Ho: $A_1 = A_2 = \dots = A_a$

Ha: $\exists i \neq j$ tales que $A_i \neq A_j$

Rechazamos Ho si $P\text{-value} < \alpha$

Ha: $\exists i \neq j$ tales que $B_i \neq B_j$

Rechazamos Ho si $P\text{-value} < \alpha$

b) Para niveles del factor B

Ho: $B_1 = B_2 = \dots = B_b$

c) Para niveles del factor C

Ho: $C_1 = C_2 = \dots = C_b$

Ha: $\exists i \neq j$ tales que $C_i \neq C_j$

Rechazamos Ho si $P\text{-value} < \alpha$

d) Para la interacción A*B

Ho: No \exists interacción A*B

Ha: \exists interacción A*B

Rechazamos Ho si $P-value < \alpha$

f) Para la interacción B*C

Ho: No \exists interacción B*C

Ha: \exists interacción B*C

Rechazamos Ho si $P-value < \alpha$

e) Para la interacción A*C

Ho: No \exists interacción A*C

Ha: \exists interacción A*C

Rechazamos Ho si $P-value < \alpha$

g) Para la interacción A*B*C

Ho: No \exists interacción A*B*C

Ha: \exists interacción A*B*C

Rechazamos Ho si $P-value < \alpha$

Prueba de comparación de medias

La prueba de Tukey usando el mismo programa estadístico considero:

a) Para el factor A

Hallamos la DHS= Sy^*q ; Donde:

$$Sy = \sqrt{\frac{CM(E)}{ar}} \text{ y } q = q_{g.l.(E),a,\alpha}$$

Comparación y decisión

$$\text{Si } |\bar{y}_i - \bar{y}_j| > DHS \longrightarrow A_i \neq A_j$$

c) Para el factor C

Hallamos la DHS= Sy^*q ; Donde:

$$Sy = \sqrt{\frac{CM(E)}{cr}} \text{ y } q = q_{g.l.(E),c,\alpha}$$

Comparación y decisión

$$\text{Si } |\bar{y}_i - \bar{y}_j| > DHS \longrightarrow C_i \neq C_j$$

b) Para el factor B

Hallamos la DHS= Sy^*q ; Donde:

$$Sy = \sqrt{\frac{CM(E)}{br}} \text{ y } q = q_{g.l.(E),b,\alpha}$$

Comparación y decisión

$$\text{Si } |\bar{y}_i - \bar{y}_j| > DHS \longrightarrow B_i \neq B_j$$

d) Para combinaciones A*B

a. Hallamos la DHS = Sy^*q ; Donde:

$$Sy = \sqrt{\frac{CM(E)}{r}} \text{ y } q = q_{g.l.(E),ab,\alpha}$$

b. Comparación y decisión

$$\text{Si } |\bar{y}_i - \bar{y}_j| > DHS \longrightarrow AB_i \neq AB_j$$

e) Para combinaciones B*C

a. Hallamos la DHS =Sy*q; Donde:

$$Sy = \sqrt{\frac{CM(E)}{r}} \quad \text{y } q = q_{g.l.(E),bc,\alpha}$$

b. Comparación y decisión

$$\text{Si } |\bar{y}_i - \bar{y}_j| > DHS \longrightarrow BC_i \neq BC_j$$

f) Para combinaciones A*C

a. Hallamos la DHS =Sy*q; Donde:

$$Sy = \sqrt{\frac{CM(E)}{r}} \quad \text{y } q = q_{g.l.(E),ac,\alpha}$$

b. Comparación y decisión

$$\text{Si } |\bar{y}_i - \bar{y}_j| > DHS \longrightarrow AC_i \neq AC_j$$

g) Para combinaciones A*B*C

a. Hallamos la DHS =Sy*q; Donde:

$$Sy = \sqrt{\frac{CM(E)}{r}} \quad \text{y } q = q_{g.l.(E),abc,\alpha}$$

b. Comparación y decisión

$$\text{Si } |\bar{y}_i - \bar{y}_j| > DHS \longrightarrow ABC_i \neq ABC_j$$

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Descripción morfológica

El grupo filogenético 1 (GF1) no presentó desarrollo en PDA a un pH 3.5 (Tratamiento 1), así como los cuatro grupos filogenéticos en EMA a pH 3.5 (tratamientos 4, 13, 22 y 31).

Tratamiento 2 (GF1, PDA, pH 5.5): Textura lanosa, con densidad media y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde ondulado, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: de verde (338, 339) a amarillo (261) en el centro; de violeta (680) a verde (340) en la parte media; violeta (680) en periferia. Color del reverso: rojo (112) en el centro y la parte media; verde (331) en la periferia. (Figura 1b).

Tratamiento 3 (GF1, PDA, pH 7.7): Textura lanosa en el centro y la periferia, acanalada en la parte media, con densidad media y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde ondulado, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: anaranjado (191, 192, 193) a verde (337) en el centro; anaranjado (199) en la parte media y violeta (680) en la periferia. Color del Reverso: anaranjado (192, 193) en el centro; anaranjado (203) en la parte media y anaranjado (220) en la periferia. (Figura 1c).

Tratamiento 5 (GF1, EMA, pH 5.5): Textura algodonosa, densidad baja y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación delgada, forma irregular, borde lobulado, sin rizomorfos y con micelio sumergido. Color del anverso: anaranjado (199) en el centro y translúcido en la parte media y periferia. Color del reverso: translúcido en el centro, parte media y periferia. (Figura 1e).

Tratamiento 6 (GF1, EMA, pH 7.7): Textura acanalada, densidad baja y sin hifas aéreas. Cepa de elevación delgada, forma rizoide, borde filiforme, sin rizomorfos y con micelio sumergido. Color del anverso y reverso: hifas translúcidas con pequeños puntos aislados de micelio color anaranjado (220) y verde (340). (Figura 1f).

Tratamiento 7 (GF1, CYM, pH 3.5): Textura lanosa en el centro y parte media y aterciopelada en la periferia, o completamente aterciopelada, densidad media y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde ondulado, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: amarillo (262, 263) en el centro, verde (340) en la parte media y verde (320), violeta (680) en la periferia. Color del reverso: rojo (131, 136) en el centro y la parte media; verde (339) en la periferia. (Figura 1g).

Tratamiento 8 (GF1, CYM, pH 5.5): Textura lanosa, densidad media y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma circular, borde filiforme, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: amarillo (261, 265) o verde (340) en el centro; amarillo (290) o verde (340) en la parte media; verde (340) en la periferia. Color del reverso: amarillo (263) en el centro, parte media y periferia. (Figura 1h).

Tratamiento 9 (GF1, CYM, pH 7.7): Textura lanosa, densidad media y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma circular, borde entero, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: amarillo (261) en el centro, amarillo (290) o verde (340) en el centro y la parte media; anaranjado (225) o amarillo (261) en la periferia. Color en el reverso: verde (338, 340) en el centro y la parte media, verde (339, 340) en la periferia. (Figura 1i).

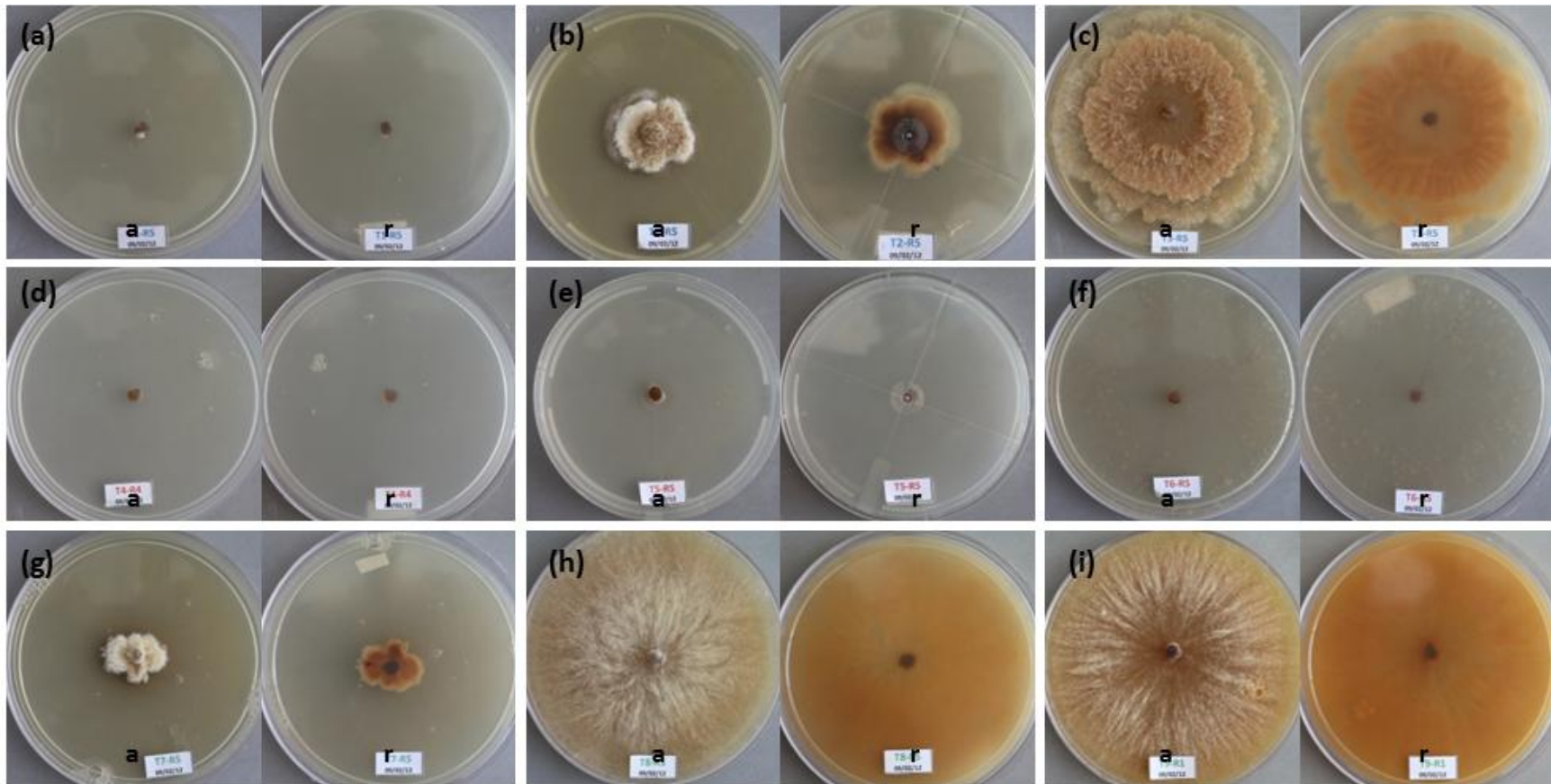


Figura 1. Morfología de los aislamientos del grupo filogenético 1 de *Morchella* desarrollados en tres medios de cultivo y tres niveles de pH (20 d después de la siembra). (a) Trat. 1: pH 3.5/PDA; (b) Trat. 2: pH 5.5/PDA; (c) Trat. 3: pH 7.7/PDA; (d) Trat. 4: pH 3.5/EMA; (e) Trat. 5: pH 5.5/EMA; (f) Trat. 6: pH 7.7/EMA; (g) Trat. 7: pH 3.5/CYM; (h) Trat. 8: pH 5.5/CYM; (i) Trat. 9: pH 7.7/CYM. a= anverso, r= reverso. (Fotos cortesía del Dr. L. Villarreal-Ruiz).

Tratamiento 10 (GF2, PDA, pH 3.5): Textura aterciopelada, densidad media y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde ondulado, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: anaranjado (219) en el centro, parte media y la periferia. Color en el reverso: anaranjado (220) en el centro, parte media y la periferia. (Figura 2a).

Tratamiento 11 (GF2, PDA, pH 5.5): Textura granulosa, densidad media y sin hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde ondulado, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: anaranjado (210, 217), verde (423, 427) en el centro; anaranjado (210, 217) o amarillo (262) en la parte media y la periferia. Color del reverso: verde (336) en el centro y parte media y verde (338) en la periferia. (Figura 2b).

Tratamiento 12 (GF2, PDA, pH 7.7): Textura lisa en el centro, lanosa en la parte media y periferia, densidad media e hifas aéreas regular en forma de anillo. Cepa de elevación crateriforme, forma circular, borde entero, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: verde (427) en el centro, anaranjado (218, 219) en la parte media; amarillo (207, 208, 210) en la periferia. Color del reverso: verde (427) en el centro, amarillo (315) en la parte media; anaranjado (206, 207) en la periferia. (Figura 2c).

Tratamiento 14 (GF2, EMA, pH 5.5): Textura lanosa, densidad baja y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación plana, forma irregular, borde ondulado, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: verde (340), violeta (680) en el centro, parte media y periferia. Color del reverso: anaranjado (235) en el centro, parte media y periferia. (Figura 2e).

Tratamiento 15 (GF2, EMA, pH 7.7): Textura acanalada con puntos aislados de micelio de textura lanosa, densidad baja y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación plana, forma rizoide, borde filiforme, sin rizomorfos y con micelio sumergido. Color

del anverso y reverso: hifas translúcidas con puntos aislados de micelio color verde (339). (Figura 2f).

Tratamiento 16 (GF2, CYM, pH 3.5): Textura lanosa en el centro y la periferia, aterciopelada en la parte media, densidad media y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde ondulado, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: anaranjado (210) o (235) en el centro; anaranjado (210), amarillo (315) o violeta (680) en la parte media; violeta (680) en la periferia. Color del reverso: amarillo (306) en el centro, amarillo (315) en la parte media y anaranjado (208) en la periferia. (Figura 2g).

Tratamiento 17 (GF2, CYM, pH 5.5): Textura lanosa, densidad alta e hifas aéreas regular. Cepa de elevación gruesa, forma circular, borde entero, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: anaranjado (220), verde (340) o violeta (680) en el centro; anaranjado (220), verde (340), violeta (677, 680) en la parte media; anaranjado (220) o verde (340) en la periferia. Color del reverso: anaranjado (215), amarillo (336, 337) en el centro; anaranjado (215), amarillo (336), violeta (677, 681) o marrón (701) en la parte media; anaranjado (215), amarillo (336) o violeta (681) en la periferia. (Figura 2h).

Tratamiento 18 (GF2, CYM, pH 7.7): Textura lanosa, densidad media e hifas aéreas regular. Cepa de elevación gruesa, forma circular, borde filiforme, con rizomorfos y micelio sumergido. Una de cinco cepas presentó un microesclerocio. Color del anverso: amarillo (315) en el centro; amarillo (315), verde (340) en la parte media; verde (340) en la periferia. Color del reverso: verde (337, 338) en el centro; rojo (131), verde (337), (338, 339) o marrón (701) en la parte media; rojo (131), verde (337, 338, 339), violeta (681) o marrón (701) en la periferia. (Figura 2i).

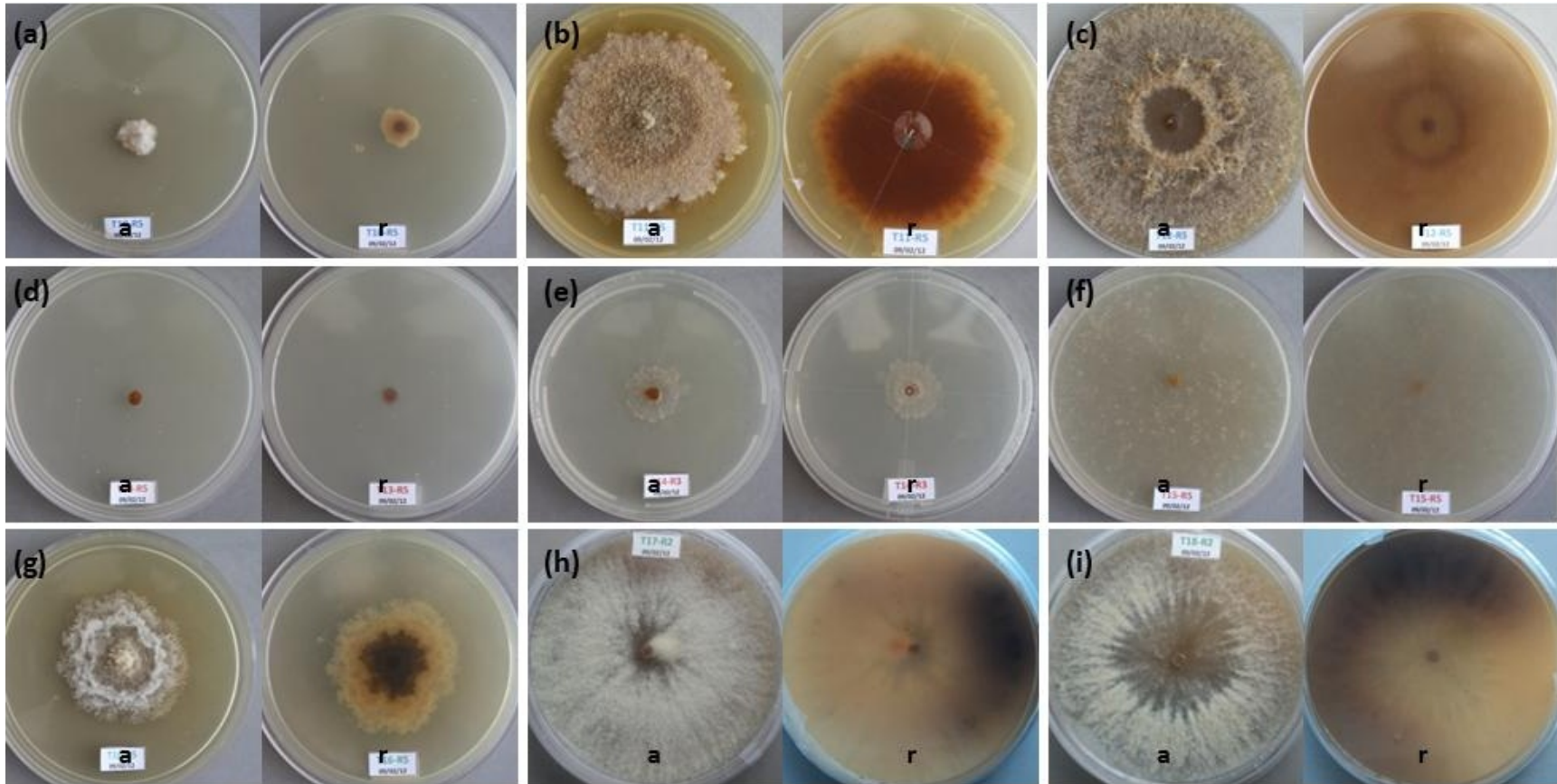


Figura 2. Morfología de los aislamientos del grupo filogenético 2 de *Morchella* desarrollados en tres medios de cultivo y tres niveles de pH (20 d después de la siembra). (a) Trat. 10: pH 3.5/PDA; (b) Trat. 11: pH 5.5/PDA; (c) Trat. 12: pH 7.7/PDA; (d) Trat. 13: pH 3.5/EMA; (e) Trat. 14: pH 5.5/EMA; (f) Trat. 15: pH 7.7/EMA; (g) Trat. 16: pH 3.5/CYM; (h) Trat. 17: pH 5.5/CYM; (i) Trat. 18: pH 7.7/CYM. a= anverso, r= reverso. (Fotos cortesía del Dr. L. Villarreal-Ruiz).

Tratamiento 19 (GF3, PDA, pH 3.5): Textura aterciopelada, densidad regular y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde ondulado, sin rizomorfos ni micelio sumergido. Color del anverso: verde (340) en el centro, parte media y periferia. Color del reverso: verde (339) en el centro, parte media y periferia. (Figura 3a).

Tratamiento 20 (GF3, PDA, pH 5.5): Textura lanosa, densidad regular y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde lobulado, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: amarillo (262) en el centro; rojo (131), anaranjado (218) o amarillo (262) en la parte media; anaranjado (235), verde (339) o violeta (680) en la periferia. Color del reverso: rojo (116) en el centro, verde (131) en la parte media y verde (339) en la periferia. (Figura 3b).

Tratamiento 21 (GF3, PDA, pH 7.7): Textura lanosa, densidad regular e hifas aéreas regular. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde ondulado, con rizomorfos y micelio sumergido. Color del anverso: verde (337, 338) en el centro, verde (338, 339) en la parte media y verde (339, 340) en la periferia. Color del reverso: anaranjado (191) en el centro, rojo (193) en la parte media y verde (339) en la periferia. (Figura 3c).

Tratamiento 23 (GF3, EMA, pH 5.5): Textura lanosa, densidad baja y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación plana, forma irregular, borde lobulado, sin rizomorfos y con hifas sumergidas. Color del anverso: anaranjado (250) o verde (340) en el centro y parte media, verde (340) en la periferia. Color del reverso: verde (339) en el centro y parte media, verde (340) en la periferia. (Figura 3e).

Tratamiento 24 (GF3, EMA, pH 7.7): Textura acanalada, densidad baja y sin hifas aéreas. Cepa de elevación plana, forma rizoide, borde filiforme, sin rizomorfos, con hifas y puntos aislados de micelio concentrado sumergidos. Color del anverso y reverso: hifas traslúcidas con puntos aislados de micelio concentrado color verde (339). (Figura 3f).

Tratamiento 25 (GF3, CYM, pH 3.5): Textura lanosa, densidad media y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde lobulado, con rizomorfos e hifas sumergidas. Color del anverso: verde (338) en el centro y parte media, violeta (680) en la periferia. Color del reverso: rojo (131) en el centro y parte media, verde (340) en la periferia. (Figura 3g).

Tratamiento 26 (GF3, CYM, pH 5.5): Textura acanalada en el centro y parte media, lanosa en la periferia, densidad media y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde filiforme, con rizomorfos e hifas sumergidas. Color del anverso: anaranjado (176), verde (338, 339) en el centro; rojo (131), verde (338, 339) en la parte media; verde (339, 340) en la periferia. Color del reverso: rojo (131) o verde (338) en el centro, rojo (131) o verde (139) en la parte media; verde (338, 340) en la periferia. (Figura 3h).

Tratamiento 27 (GF3, CYM, pH 7.7): Textura lanosa, densidad media e hifas aéreas regular. Cepa de elevación gruesa, forma circular, borde filiforme, con rizomorfos e hifas sumergidas. Color del anverso: verde (337, 338, 340) en el centro; amarillo (264) o verde (339) en la parte media; verde (339, 340) en la periferia. Color del reverso: verde (337, 338) en el centro; verde (338) en la parte media y periferia. (Figura 3i).

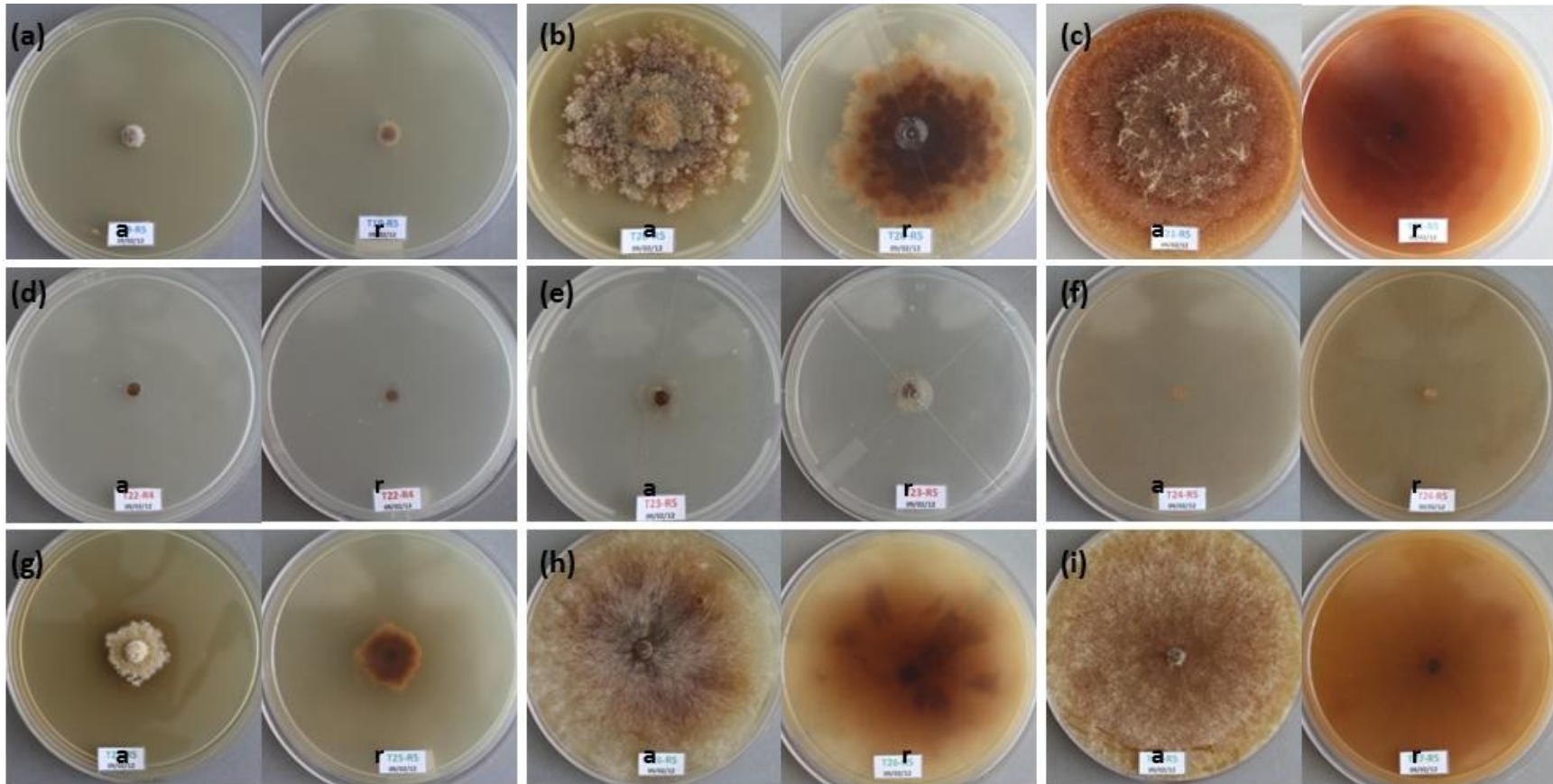


Figura 3. Morfología de los aislamientos del grupo filogenético 3 de *Morchella* desarrollados en tres medios de cultivo y tres niveles de pH (20 d después de la siembra). (a) Trat. 19: pH 3.5/PDA; (b) Trat. 20: pH 5.5/PDA; (c) Trat. 21: pH 7.7/PDA; (d) Trat. 22: pH 3.5/EMA; (e) Trat. 23: pH 5.5/EMA; (f) Trat. 24: pH 7.7/EMA; (g) Trat. 25: pH 3.5/CYM; (h) Trat. 26: pH 5.5/CYM; (i) Trat. 27: pH 7.7/CYM. a= anverso, r= reverso. (Fotos cortesía del Dr. L. Villarreal-Ruiz).

Tratamiento 28 (GF4, PDA, pH 3.5): Textura aterciopelada, densidad alta y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación gruesa, forma irregular, borde ondulado, sin rizomorfos ni hifas sumergidas. Color del anverso y reverso: anaranjado (235) en el centro, parte media y periferia. (Figura 4a).

Tratamiento 29 (GF4, PDA, pH 5.5): Textura lanosa, densidad media e hifas aéreas regular. Cepa de elevación convexa, forma irregular, borde lobulado, con rizomorfos e hifas sumergidas. Algunos aislamientos pueden presentar de 1 a 3 micro esclerocios. Color del anverso: anaranjado (218, 219), amarillo (262, 264), verde (339, 340) en el centro; anaranjado (216, 218, 220), amarillo (262), verde (339, 340) en la parte media; anaranjado (218, 220, 235), amarillo (262, 265) en la periferia. Color del reverso: rojo (131) en el centro y parte media, amarillo (338) en la periferia. (Figura 4b).

Tratamiento 30 (GF4, PDA, pH 7.7): Textura lanosa, densidad media y abundantes hifas aéreas. Cepa de elevación crateriforme, forma circular, borde entero, con rizomorfos e hifas sumergidas. Color del anverso: verde (336, 337) en el centro y la parte media, con las hifas aéreas verde (339, 340); verde (336, 340) en la periferia con las hifas aéreas verde (339). Color del reverso: rojo (191) en el centro, parte media y periferia. (Figura 4c).

Tratamiento 32 (GF4, EMA, pH 5.5): Textura lanosa, densidad baja y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación plana, forma rizoide, borde lobulado, con rizomorfos e hifas sumergidas. Color del anverso: verde (340) en el centro y traslúcidas en la parte media y periferia. Color del reverso: verde (339) en el centro y traslúcidas en la parte media y periferia. (Figura 4e).

Tratamiento 33 (GF4, EMA, pH 7.7): Textura acanalada con puntos aislados de micelio de textura lanosa, densidad baja y pocas hifas aéreas. Cepa de elevación plana, forma rizoide, borde filiforme, sin rizomorfos y con hifas sumergidas. Color del anverso y reverso: hifas traslúcidas con puntos aislados de micelio color verde (339). (Figura 4f).

Tratamiento 34 (GF4, CYM, pH 3.5): Textura lanosa, densidad alta e hifas aéreas regular. Cepa de elevación convexa, forma irregular, borde ondulado, con rizomorfos e hifas sumergidas. Color del anverso: anaranjado (220) o verde (338) en el centro, verde (338, 340) en la parte media, anaranjado (262) en la periferia. Color del reverso: verde (337) en el centro y parte media, verde (338) en la periferia. (Figura 4g).

Tratamiento 35 (GF4, CYM, pH 5.5): Textura lanosa, densidad media e hifas aéreas regular. Cepa de elevación gruesa, forma circular, borde entero, con rizomorfos e hifas sumergidas. Color del anverso: verde (337, 338, 339) en el centro; verde (336, 339, 340) o violeta (680) en la parte media; verde (339, 340) en la periferia. Color del reverso: rojo (131) en el centro, verde (337, 338) en el centro y la periferia. (Figura 4h).

Tratamiento 36 (GF4, CYM, pH 7.7): Textura lanosa, densidad media e hifas aéreas regular. Cepa de elevación gruesa, forma circular, borde entero, con rizomorfos e hifas sumergidas. Color del anverso: verde (337, 338) en el centro, verde (339, 340) en la parte media y verde (338, 339, 340) en la periferia. Color del reverso: rojo (191) en el centro, anaranjado (193) en la parte media y periferia. (Figura 4i).

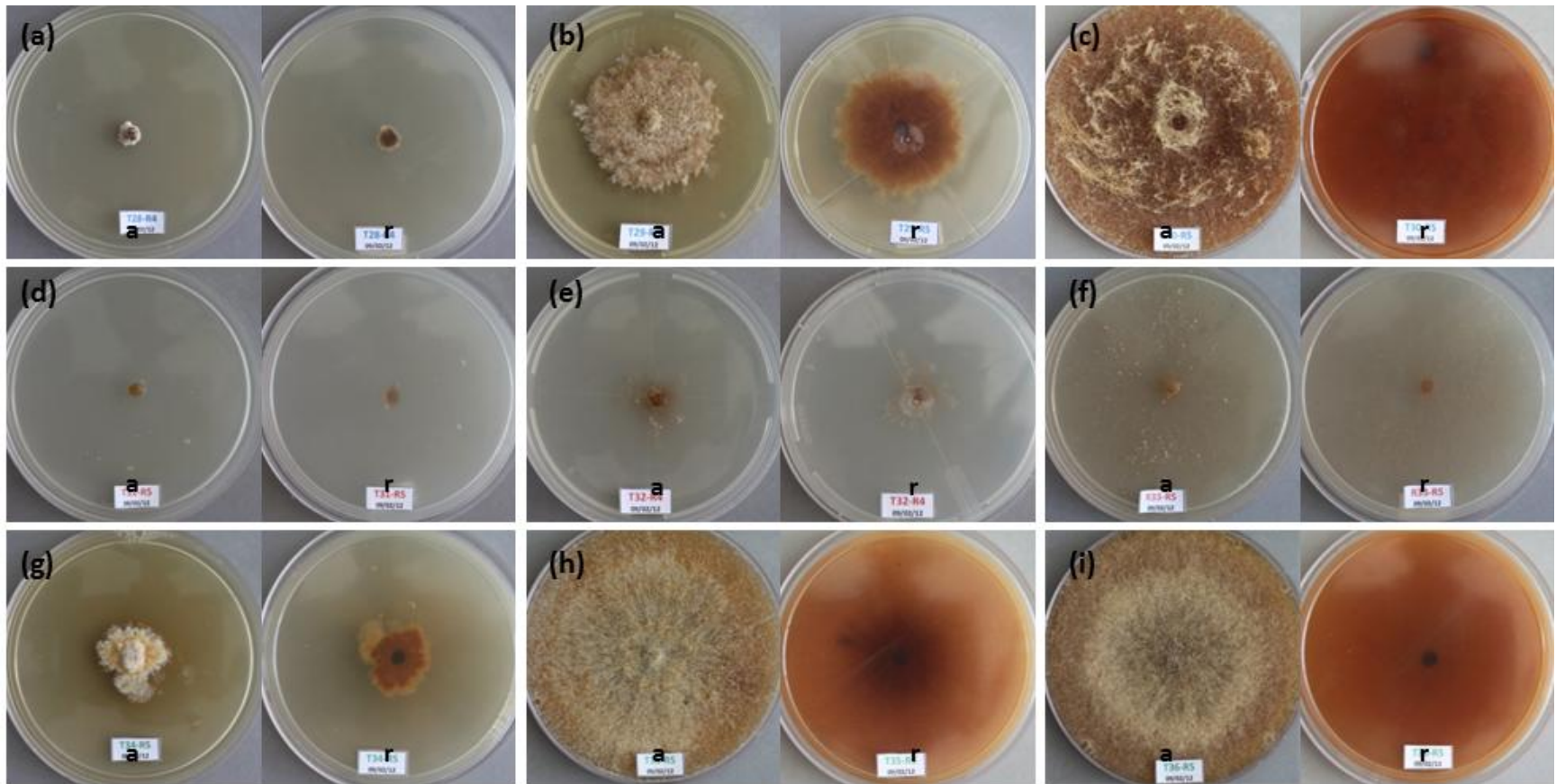


Figura 4. Morfología de los aislamientos del grupo filogenético 4 de *Morchella* desarrollados en tres medios de cultivo y tres niveles de pH (20 d después de la siembra). (a) Trat. 28: pH 3.5/PDA; (b) Trat. 29: pH 5.5/PDA; (c) Trat. 30: pH 7.7/PDA; (d) Trat. 31: pH 3.5/EMA; (e) Trat. 32: pH 5.5/EMA; (f) Trat. 33: pH 7.7/EMA; (g) Trat. 34: pH 3.5/CYM; (h) Trat. 35: pH 5.5/CYM; (i) Trat. 36: pH 7.7/CYM. a= anverso, r= reverso. (Fotos cortesía del Dr. L. Villarreal-Ruiz).

Las estructuras microscópicas distintivas observadas en los aislamientos *in vitro* de *Morchella* se presentan en la Figura 5.

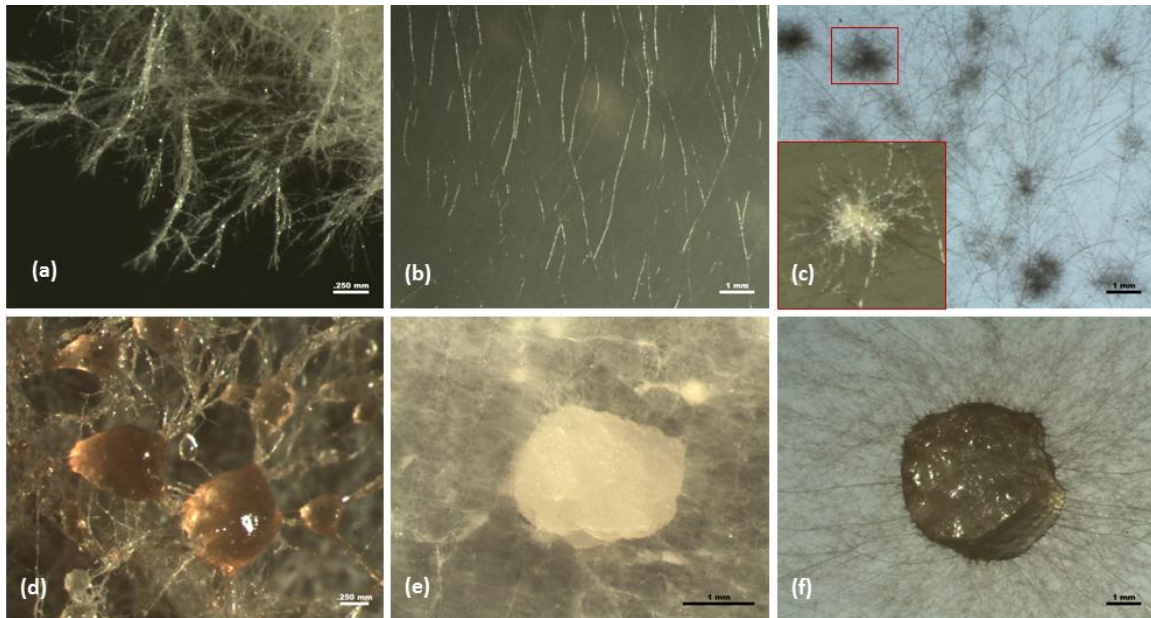


Figura 5. Estructuras distintivas formadas en los aislamientos *in vitro* de *Morchella*: (a) rizomorfos, (b) micelio adherido a la superficie del medio, (c) micelio sumergido en el medio con agregaciones miceliales, (d) excrecencias hifales gutulares, presentes en todos los tratamientos que crecimiento miceliar (e) micro esclerocio, (f) micelio emanante con hifas ramificadas típicas de *Morchella*.

6.3.2 Velocidad de crecimiento

ANOVA y prueba de hipótesis

Con un nivel de significancia de 5%, los factores grupo filogenético, medio de cultivo y pH con cada uno de sus niveles respectivos (1, 2, 3, 4; PDA, EMA, CYM; 3.5, 5.5 y 7.7; respectivamente) no producen el mismo efecto sobre la velocidad de crecimiento. En el caso de todas las interacciones, con un nivel de significancia de 5%, se determina que si existen; es decir, al menos un nivel de cada factor no

sigue la misma tendencia en cada nivel de su factor de interacción correspondiente (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza para la velocidad de crecimiento.

FV	GL	SC	CM	<i>P-value</i>
Grupo	3	103.856078	34.618693	<.0001
Medio	2	525.920920	262.960460	<.0001
pH	2	2874.176643	1437.088322	<.0001
Grupo*medio	6	36.431516	6.071919	<.0001
Grupo*pH	6	71.493672	11.915612	<.0001
Medio*pH	4	663.338367	165.834592	<.0001
Grupo*medio*pH	12	44.038584	3.669882	<.0001
Error	144	71.942040		
Total	179	4391.197820		

Prueba de comparación de medias

El filogrupos 2 presentó la mayor velocidad de crecimiento, siendo estadísticamente diferente al filogrupos 4 que fue el segundo en velocidad. Los filogrupos 1 y 3 presentaron la menor velocidad de crecimiento (Cuadro 3). Los ascomas correspondientes a los filogrupos 2 y 4 fueron recolectados en el sitio Izta-popo, mientras que los ascomas de los filogrupos 1 y 3 en el sitio Tláloc. Esto significa que los aislamientos del sitio Izta-Popo crecen más rápido respecto a los del sitio Tláloc.

En cuanto a la influencia del medio de cultivo sobre la velocidad de crecimiento, esta fue mayor en CYM, seguido de EMA y PDA, siendo estadísticamente diferente entre sí. Así mismo el pH influyó sobre la velocidad de crecimiento, siendo estadísticamente diferente en los tres niveles: a 7.7 la velocidad fue mayor,

disminuyendo a medida que el medio se acidificó (Cuadro 3). Incluso en EMA a un pH 3.5 el crecimiento se inhibió completamente.

Cuadro 3. Prueba de comparación de medias para velocidad de crecimiento (mm d⁻¹) por efecto del grupo filogenético, medio de cultivo y pH.

Grupo filogenético ¹	Media	Medio de cultivo ²	Media	pH ³	Media
2	5.7178 ^A	CYM	7.0473 ^A	7.7	10.0708 ^A
4	5.2827 ^B	EMA	4.3163 ^B	5.5	3.7992 ^B
3	4.1969 ^C	PDA	2.9333 ^C	3.5	0.4270 ^C
1	3.8653 ^C				

Medias en la misma columna con al menos una letra en común no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$). ¹DMS= 0.3873, ²DMS= 0.3056, ³DMS= 0.3056.

En la combinación de los factores grupo filogenético y medio de cultivo, la mayor velocidad de crecimiento la presentó el filogrupos 2, seguido del 4, 3 y 1, todos en CYM; mientras que el menor crecimiento se da en los filogrupos 2, 3 y 1 en PDA (Cuadro 4).

Para el caso de los factores grupo filogenético y pH, la mayor velocidad de crecimiento se observó en el filogrupos 2, seguido del 4, 3 y 1, todos en pH 7.7; mientras que el menor crecimiento se da a un pH 3.5 en los 4 filogrupos (Cuadro 4).

En cuanto a los factores medio de cultivo y pH, la mayor velocidad de crecimiento se observó en los medios EMA y CYM a pH 7.7, seguido de CYM a pH 5.5. Finalmente, en el medio EMA a pH 3.5 no se observó crecimiento (Cuadro 4).

Cuadro 4. Prueba de comparación de medias para velocidad de crecimiento (mm d⁻¹) por efecto de dos factores combinados.

CO GM ¹	Media	CO GP ²	Media	CO MP ³	Media
23	8.9220 ^A	23	12.0620 ^A	23	12.3970 ^A
43	7.1247 ^B	43	11.1453 ^B	33	11.8985 ^A
33	6.2573 ^C	33	8.9047 ^C	32	8.3595 ^B
13	5.8853 ^{CD}	13	8.1713 ^C	13	5.9170 ^C
22	5.2913 ^{DE}	22	4.5107 ^D	12	2.4860 ^D
42	4.8513 ^E	42	4.3253 ^D	31	0.8840 ^E
41	3.8720 ^F	32	3.2813 ^E	22	0.5520 ^{EF}
32	3.5987 ^{FG}	12	3.0793 ^E	11	0.3970 ^{EF}
12	3.5240 ^{FGH}	21	0.5807 ^F	21	0.0000 ^F
21	2.9400 ^{GHI}	31	0.4047 ^F		
31	2.7347 ^{HI}	41	0.3773 ^F		
11	2.1867 ^I	11	0.3453 ^F		

CO GM= combinación grupo filogenético-medio de cultivo; CO GP= combinación grupo filogenético-pH; CO MP= Combinación medio de cultivo-pH. Para G: 1, 2, 3, 4 corresponden a los grupos filogenéticos. Para M: 1=PDA, 2=EMA, 3=CYM. Para P: 1= pH 3.5, 2= pH 5.5, 3= pH 7.7 Medias en la misma columna con al menos una letra en común no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$). ¹DMS= 0.8575, ²DMS=0.8575, ³DMS= 0.704.

El efecto de los tres factores combinados fue el siguiente: la mayor velocidad de crecimiento la presentaron los filogrupos: 2 a pH 7.7 en EMA y CYM, y 4 a pH 7.7 y EMA. Ningún filogrupo creció en EMA a pH 3.5, ni el filogrupo 1 en PDA a 3.5 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Prueba de comparación de medias para velocidad de crecimiento (mm d⁻¹) por efecto de tres factores combinados.

CO GMP	Media	CO GMP	Media	CO GMP	Media
223	15.2540 ^A	332	7.0980 ^{HI}	431	0.6780 ^{NO}
233	15.1100 ^A	213	5.8220 ^{IJ}	222	0.6200 ^O
423	13.7900 ^{AB}	113	5.2560 ^{JK}	331	0.5300 ^O
433	12.1960 ^{BC}	313	5.1400 ^{JK}	122	0.4580 ^O
333	11.1440 ^{CD}	412	3.7120 ^{KL}	411	0.4540 ^O
323	10.4300 ^{DE}	212	2.5480 ^{LM}	211	0.4500 ^O
232	10.3640 ^{DE}	312	2.3800 ^{LMN}	322	0.3660 ^O
123	10.1140 ^{DEF}	112	1.3040 ^{MNO}	221	0.0000 ^O
133	9.1440 ^{EFG}	231	1.2920 ^{MNO}	111	0.0000 ^O
432	8.5000 ^{FGH}	131	1.0360 ^{MNO}	321	0.0000 ^O
132	7.4760 ^{GHI}	322	0.7640 ^{NO}	421	0.0000 ^O
413	7.4500 ^{GHI}	311	0.6840 ^{NO}	121	0.0000 ^O

CO GMP= combinación grupo filogenético-medio de cultivo-pH. Medias con al menos una letra en común no son significativamente diferentes ($\alpha=0.05$). DMS= 1.7525.

6.4 DISCUSIÓN

Forma de las cepas. Las cepas de los cuatro grupos filogenéticos desarrollados en un pH de 3.5 presentaron forma irregular (excepto los tratamientos que no presentaron crecimiento), y tendieron a adoptar formas circulares a medida que el pH aumentó. La forma rizoide sólo se observó en cepas desarrolladas en medio EMA, concordando con Guler y Ozkaya (2009) quienes tampoco detectaron la forma rizomórfica en PDA, sin embargo difiere en cuanto a la cepa en CYM, ya que ellos la reportan como rizoide en este medio. Las cepas de los diferentes grupos filogenéticos presentan forma irregular a pH 3.5 donde los nutrientes están poco disponibles, pero tienden a ser rizoides o circulares a medida que crecen en un pH óptimo, coincidiendo con lo señalado por Guler y Arkan (2000).

Coloración. Los tratamientos presentaron una amplia gama de colores, con tonos cercanos a los reportados por Guler y Arkan (2000) y Guler y Ozkaya (2009) que van de blanco, amarillo a marrón. Las cepas 1 y 3, provenientes del sitio Tlálloc presentaron tonos más claros respecto a las cepas 2 y 4 provenientes del sitio Izta-Popo (Figura 1). Las cuatro cepas en EMA a pH 5.5 y 7.7 se caracterizaron por presentar baja densidad de micelio, por consiguiente los colores que presentaron fueron más tenues respecto a cepas con densidad alta.

Textura. La mayoría de los tratamientos presentaron una sola textura en el centro, medio y periferia, excepto T3, T7, T12, T16, y T26. La textura lanosa fue la predominante. La textura granular reportada por Hervey *et al* (1978) sólo se observó en el tratamiento T11. Cabe mencionar que la caracterización tanto de texturas como otras características morfológicas hasta la fecha se hace al criterio y experiencia del investigador (Hervey *et al.* 1978, Guler y Arkan 2000, Winder 2006), no se han propuesto descriptores específicos para el crecimiento *in vitro* del género *Morchella*, los cuales son necesarios, ya que los aislamientos presentan también un alto polimorfismo de acuerdo al medio de cultivo y pH en el que se desarrollan.

Rizomorfos. Se confirma la presencia de rizomorfos en 26 de los 36 tratamientos generados (72.2 %). Los tratamientos 5, 6, 19, 23 y 24 no presentaron rizomorfos y a excepción de T19 observado en PDA, el resto se registraron en EMA. Cabe mencionar que estos tratamientos corresponden a los GF1 y GF3, del sitio Tlálloc.

Esclerocios. Sólo se observaron en una réplica de tratamiento T18 (CYM pH 7.7) que corresponde al filogrupo 2 y en cuatro réplicas de T29 (PDA pH 5.5) que corresponde al filogrupo 4, ambos del sitio Izta-Popo. Guler y Ozkaya (2009) reportan esclerocios en PDA, EMA y CYM en mayor frecuencia que los observados en el presente experimento, aunque no dan detalles de sus características. El tamaño de los microesclerocios fue de ~ 2 mm de diámetro (Figura 5e.2), concordando con lo reportado por Volk y Leonard (1990) quienes observaron esclerocios de 1-2 mm de tamaño en micelio de *Morchella* desarrollado en CYM adicionado con 2% de estiércol de oveja. Masaphy (2010) indica que la formación de esclerocios es la primera de las cinco etapas para la obtención de ascomas. Amir *et al.* (1992) al evaluar la producción de esclerocios en un sistema con dos medios de cultivo en una misma caja Petri: la mitad con un medio pobre (agar) y la otra mitad con un medio rico (PDA), observaron mayor cantidad de esclerocios en el medio pobre. Dentro de este medio las sales inhibieron la producción de esclerocios y la hexosa y hexitol la promovieron. Esto refuerza la concepción del esclerocio como una estructura de resistencia formada como consecuencia de un severo estrés ambiental (Pilz *et al.* 2007).

Tiempo de colonización. A pesar de que los sitios Izta-Popo y Tlálloc están separados sólo por 40 Km y dado que sus condiciones climáticas son muy similares, las cepas del Izta-Popo presentan una mayor velocidad de crecimiento que las de Tlálloc. A nivel de microclima si pueden detectarse algunas variaciones, ya que el sitio Izta-Popo tiene una pendiente muy pronunciada hacia el sur, mientras que en el sitio Tlálloc la pendiente es menor y orientada hacia el oeste, provocando que en este último la radiación solar sea más directa y por lo tanto haya menos humedad. Dado que los aislamientos se sometieron a las mismas condiciones *in vitro*, la diferencia en el tiempo de colonización es mejor explicado

por su constitución genética, ya que los grupos filogenéticos 1 y 3 (ambos de Tlálloc) son muy cercanos entre sí, en cambio los grupos 2 y 4 (ambos de Izta-Popo) se separan claramente de los anteriores pero se agrupan en subclados cercanos entre sí.

En cuanto a medio de cultivo, la mayor velocidad de crecimiento se dio en CYM, seguido de EMA y PDA (Cuadro 3). Esto difiere de lo registrado por Guler y Arkan (2000) donde EMA fue mejor respecto a PDA y CYM, y por Guler y Ozkaya (2009) donde EMA y CYM fueron mejores respecto a PDA. En ambos casos, en medio PDA el crecimiento es más lento. Por otra parte, CYM, al ser el medio más completo provee más nutrimentos para el crecimiento del hongo.

Cabe señalar que en CYM y PDA los nutrimentos están disponibles aún a un pH de 3.5, ya que las cepas fueron capaces de sobrevivir y desarrollarse, aunque a velocidades muy bajas (Cuadro 4). Winder (2006) ubica el rango óptimo de pH para el desarrollo *in vitro* entre 7 y 7.7 y los resultados del presente estudio comprobaron dicha información, ya que el pH óptimo fue de 7.7 donde las cepas se desarrollaron 3 veces más rápido que a un pH de 5.5. Sin embargo, lo anterior resulta contrastante a lo reportado bajo condiciones naturales en bosques de oyamel por Pérez-Moreno *et al.* (2009), por lo que se pone en duda que el pH del suelo adyacente a los ascomas sea el mismo al de las colonias miceliales de *Morchella*. La plasticidad de *Morchella* para crecer en un amplio intervalo de pH puede ser explicada por la presencia de micelios heterocariones, que son considerados por algunos genetistas como poblaciones de núcleos o incluso de genes, lo cual puede conferir una mayor capacidad adaptativa bajo una amplia gama de condiciones ecológicas y de cambios ambientales súbitos (Pilz *et al.* 2007).

6.5 CONCLUSIONES

- Los aislamientos monospóricos de *Morchella* spp. establecidos en diferentes medios de cultivo (PDA, EMA y CYM) y condiciones de pH (3.5, 5.5 y 7.7) presentaron una amplia variación morfológica.
- La mayor velocidad de crecimiento se dio en condiciones óptimas de pH (7.7) y en medios de cultivo ricos en nutrimentos como es el caso de CYM y EMA. Sin embargo, a medida que el pH se acidificó el medio de cultivo CYM resultó ser el más adecuado para el desarrollo de *Morchella*.
- A un pH de 3.5 ninguna cepa creció en medio de cultivo EMA, en el caso de cepas del filogrupo 1 tampoco se desarrollaron en el medio de cultivo PDA.
- Aislamientos de Izta-Popo (filoespecies 2 y 4) crecieron a mayor velocidad respecto a los de Tláloc (filoespecies 1 y 3) bajo las condiciones experimentales.
- Los medios de cultivo PDA y CYM a un pH de 7.7 son adecuados para la preservación *in vitro* de *Morchella*.

6.6 LITERATURA CITADA

- Amir R, Levanon D, Hadar Y, Chet I. 1992. Formation of sclerotia by *Morchella esculenta*: relationship between media composition and turgor potencial in the mycelium. *Mycological Research* 96:943-948.
- Guler P, Arkan O. 2000. Cultural characteristics of *Morchella esculenta* mycelium on some nutrients. *Turkish Journal of Biology* 24:783-794.
- Guler P, Ozkaya GE. 2009. Morphological development of *Morchella conica* mycelium on different agar media. *Journal of Environmental Biology* 30:601-604.
- Guzmán G, Tapia F. 1998. The known morels in Mexico, a description of a new blushing species, *Morchella rufobrunnea*, and new data on *M. guatemalensis*. *Mycologia* 90:705–714.
- Hervey A, Bistis G, Leong I, 1978. Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta*. *Mycologia* 70: 1269–1274.
- Masaphy S. 2010. Biotechnology of morel mushrooms: successful fruiting body formation and development in a soilless system. *Biotechnology Letters* 32:1523-7.
- Pérez-Moreno J, Lorenzana-Fernández A, Carrasco-Hernández V, Yescas-Pérez A. 2010. *Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexos*. Colegio de Postgraduados, SEMARNAT, CONACyT. Montecillo, Texcoco, Estado de México.167 p.
- Perkins HJ. 1969. Morphogenesis in *Schizophyllum commune*. I. Effects of white light. *Plant Physiology* 44:1706-1711.

Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz TL, Parks CG, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE. 2007. *Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America*. General Technical Report. PNW-GTR-710. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 161 p.

Séguy E. 1936. XXX Code universal des couleurs. Paul Lechevalier P. (Editeur). Librairie pour les sciences naturelles. Paris, France.

Sinclair CG, Cantero D. 1989. Fermentation modelling. In: McNeil, B. L. M Harvey (eds.) *Fermentation a practical approach*. IRL Press, New York. pp. 65-112.

Tariq V. 2011. Introduction to fungal growth kinetics: growth kinetics in solid media. Disponible en http://www.fungionline.org.uk/5kinetics/4solid_media.html (revisado el 5 de abril de 2012).

Trinci APJ. 1969. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and the other fungi. *Journal General of Microbiology* 56:11-24.

Volk TJ, Leonard TJ. 1990. Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research* 94:399-406.

Winder RS. 2006. Cultural studies of *Morchella elata*. *Mycological Research* 110:612-623.

CAPÍTULO VII. PRUEBAS DE INCOMPATIBILIDAD SOMÁTICA

7.1 INTRODUCCIÓN

A través de la fusión de hifas de diferentes individuos frecuentemente se forman heterocariones, sin embargo, existen mecanismos genéticos que llegan a restringirla, a través de un fenómeno se conoce como incompatibilidad somática (Glass *et al.* 2000). Estos autores mencionan que las cepas que son capaces de tener anastomosis, son designadas como miembros de un mismo grupo. Por otra parte se considera que las bases de la incompatibilidad se deben a diferencias entre alelos de loci *het* (heterokaryon incompatibility, por sus siglas en inglés); de tal forma que aunque en un inicio exista fusión hifal, durante la formación del heterocarión se puede producir un rechazo que a menudo resulta en muerte celular (Glass *et al.* 2000, Glass y Kaneko 2003).

Los sistemas de apareamiento de hongos (hibridación y autocruzas) son importantes en la conformación de la estructura genética de las poblaciones locales (Pagliaccia *et al.* 2011). Así mismo, tanto la tolerancia al intercambio como la recombinación de núcleos entre cepas de hongos multinucleados, aun cuando haya heterogeneidad genética, constituyen factores importantes para su diversificación y evolución (Roper *et al.* 2011). De tal manera, que el intercambio genético mitótico resulta en un incremento en la variabilidad genética, mientras que la incompatibilidad somática puede servir como un mecanismo de regulación a la entrada de nuevo material genético y como defensa en contra de infección genética, ya que al impedir la fusión de citoplasmas reduce el riesgo de transmisiones de elementos infecciosos como virus (Caten 1972, Glass *et al.* 2000).

El fenómeno de compatibilidad/incompatibilidad ocurre frecuentemente en hongos ascomicetos y en las especies estudiadas se han encontrado un gran número de grupos de compatibilidad somática (Vegetative Compatibility Groups, por sus

siglas en inglés) (Nauta y Hoekstra 1996). En el caso particular del género *Morchella*, no se conocen patrones de incompatibilidad, y si se dan, se desconoce que tan frecuentes son tanto a nivel intra e interespecífico (Pilz *et al.* 2007). Hervey *et al.* (1978) registran compatibilidad de micelios de *Morchella* generados a partir de la misma espora, sin embargo, al aparear dos esporas del mismo o diferente ascoma, observaron una barrera similar a la acumulación de hifas aéreas en la línea de contacto, indicando que: (1) los núcleos fusionados en el asca son heterocigotos para ciertos factores genéticos o, (2) no todas las ascas de un ascoma surgen de un mismo par de núcleos. Gessner *et al.* (1987) encontraron variación alélica entre aislamientos monospóricos de ascomas individuales, indicando que existen genes de genomas parentales diferentes en la descendencia de un solo ascoma. Estos estudios llevaron a Pagliaccia *et al.* (2011) a sugerir que la formación de ascomas de *Morchella* está controlada por genes *mating type* similar a otros ascomicetos.

Ainsworth y Rayner (1989), basados en pruebas de anastomosis en *Sterum* spp., encontraron 3 fases: (1) proximidad hifal; (2) contacto hifal y (3) fusión hifal. Durante la aproximación hifal, si no existe anastomosis, entonces se mantiene la distancia entre las puntas de hifas (repulsión) y es posible que el crecimiento se detenga. Si se inicia el contacto hifal, la extensión de las mismas continúa o la fusión falla. Además, durante el contacto hifal es posible que se inicie la fusión, que a su vez puede derivar en: (1) no reconocimiento, inhibición del crecimiento, compartimentación y finalmente muerte celular programada; o (2) regeneración, división nuclear, septación y crecimiento (Glass *et al.* 2000, Glass y Kaneko 2003).

Croll *et al.* (2008) reportan dos estadios intermedios de incompatibilidad entre el contacto hifal y la anastomosis exitosa: (1) incompatibilidad pre-fusión, cuando ocurren cambios morfológicos entre las dos hifas, indicando el primer estado de la anastomosis, pero el protoplasma de una hifa se retrae; (2) incompatibilidad post-fusión, cuando ocurre la anastomosis pero en seguida el protoplasma de una hifa se retrae y se forma un septo entre las dos hifas.

Actualmente, se han desarrollado marcadores de Polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) y regiones amplificadas de secuencias caracterizadas (SCARs, por sus siglas en inglés) por clonación y secuenciación de amplicones AFLP para estudiar los sistemas de apareamiento en *Morchella*. La segregación de los marcadores AFLP, el análisis por división de la descomposición de dos marcadores SCAR y el análisis genético de poblaciones de los marcadores SNP, SCAR y AFLP indican que al menos el linaje filogenético de *Morchella* sp Mel-12 (grupo elata) son heterotálicas y de fecundación cruzada en la naturaleza similar al grupo de morchellas amarillas (Pagliaccia *et al.* 2011).

Derivado de lo anterior, en el presente estudio se busca determinar incompatibilidad somática entre cepas de cuatro filo especies de morchellas mexicanas provenientes de dos localidades diferentes (Tlálloc e Izta-Popo).

7.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 8 aislamientos a partir de espora y contexto, pertenecientes a 4 grupos filogenéticos obtenidos del análisis molecular, provenientes de los sitios de muestreo Izta-Popo y Tláloc (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ubicación filogenética, origen geográfico y tipo de aislamiento de las 8 cepas seleccionadas para las pruebas de anastomosis.

Grupo filogenético	Origen geográfico			
	Izta-Popo		Tláloc	
1			T6-E	T6-C
2	IP-2-E			
3	IP-3-E	IP-3-C	T5-E	T3-C
4	IP-4-E			
	Espora	Contexto	Espora	Contexto
	Tipo de aislamiento			

T= Tláloc, IP= Izta-Popo, E= espora, C= contexto.

La prueba de anastomosis se llevó a cabo en pares con todas las combinaciones posibles, obteniendo en total 36 tratamientos (8 entre el mismo aislamiento y 28 entre los diferentes aislamientos) (Cuadro 2).

El experimento se estableció probando dos sistemas de siembra en cajas Petri (9 cm) con PDA (39 g L⁻¹):

1) *Siembra sobre portaobjetos*: Se emplearon aislamientos que se habían conservado en refrigeración (4 °C). En el centro cada caja Petri se colocó un portaobjeto estéril, luego se adicionó el PDA hasta que lo cubrió ~1mm y se dejó solidificar. Con un sacabocado se tomaron los fragmentos de las cepas a parrear y

se colocaron a la mitad del lado más largo del portaobjeto, fuera del área del rectángulo que forma. Se sembraron tres réplicas por tratamiento. Adicionalmente se hizo la siembra en dos cajas Petri con PDA sin portaobjetos.

2) *Siembra clásica*: Consistió en colocar los fragmentos de las cepas a aparear separados a una distancia de 2 cm en cajas Petri con PDA. Se sembraron 5 réplicas por tratamiento. Se emplearon aislamientos reactivados a partir de las cepas conservadas en refrigeración a 4 °C.

Las cajas Petri se sellaron con Parafilm© y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente (~22 °C).

Cuadro 2. Arreglos para la prueba de anastomosis de 8 cepas de *Morchella* spp.

Grupos	T-6 E	T- 6 C	IP-2 E	IP-3 E	IP-3 C	T-5 E	T-3 C	IP-4 E
T-6 E	Trat. 1	Trat. 2	Trat. 3	Trat. 4	Trat. 5	Trat. 6	Trat. 7	Trat. 8
T-6 C		Trat. 9	Trat. 10	Trat. 11	Trat. 12	Trat. 13	Trat. 14	Trat. 15
IP-2 E			Trat. 16	Trat. 17	Trat. 18	Trat. 19	Trat. 20	Trat. 21
IP-3 E				Trat. 22	Trat. 23	Trat. 24	Trat. 25	Trat. 26
IP-3 C					Trat. 27	Trat. 28	Trat. 29	Trat. 30
T-5 E						Trat. 31	Trat. 32	Trat. 33
T-3 C							Trat. 34	Trat. 35
IP-4 E								Trat. 36

T=Tiálloc, IP= Izta-Popo; E=espora; C=Contexto; Trat.=Tratamiento.

Confirmación de anastomosis. Se hicieron observaciones directamente en las cajas Petri empleando un microscopio estereoscópico para determinar el momento de inicio del contacto hifal de las cepas apareadas. Después de 24 h de haberse iniciado el contacto hifal, se seleccionó al azar una réplica de cada tratamiento para la prueba. En el caso del sistema de siembra en portaobjeto, este se retiró de

la caja Petri, mientras que en el sistema de siembra clásica el fragmento de PDA con el pareamiento de cepas se recortó y se colocó sobre un portaobjeto. Enseguida, a las preparaciones se les agregó una gota de cloruro de nitrotetrazolio azul (NBT) (Sigma-Aldrich) en la línea de contacto hifal para la prueba de actividad de la Succinato Deshidrogenasa (SDH, por sus siglas en inglés) (Smith y Gianinazzi-Pearson 1990). La preparación se monitoreó cada hora durante las primeras 6 h y posteriormente cada 12 h hasta que se detectó una coloración azul por efecto del NBT. La deposición de sales de formazán obtenida por la reducción del NBT permitió valorar la viabilidad de las hifas en la zona de contacto (Croll *et al.* 2008). En cada preparación se fotografiaron 5 áreas de contacto hifal a 10 y 40x en un microscopio de luz transmitida (Olympus BX51) empleando microscopía de campo claro. Posteriormente, se les adicionó una gota de azul de tripano (marca Hycel) en ácido láctico (0.05%) y se fotodigitalizaron. Cabe mencionar que las hifas con la membrana intacta (células viables) no fueron coloreadas debido a su capacidad de excluir colorantes como el azul de tripano (Strober 2001). Por otra parte, el contacto entre dos hifas se consideró sin interacción cuando se tocaron pero no hubo ni cambios morfológicos ni fusión. Se confirmó la fusión hifal cuando la anastomosis fue completa (fusión de protoplasma entre las dos hifas y actividad metabólica en la hifa puente, a través de la prueba SDH) (Croll *et al.* 2008). La ocurrencia y frecuencia de contactos hifales se registró a partir de las observaciones de las 5 áreas analizadas (Giovannetti *et al.* 2004) a 10x y confirmadas a 40 y 100x, mediante fotodigitalización empleando una cámara digital Infinity 1 (Lumenera corporation) y procesadas con el programa Image-Pro Express, versión. 6.3 (Media Cybernetics).

7.3 RESULTADOS

(1) *Siembra sobre portaobjetos*. Este sistema no fue de utilidad, debido a las siguientes fallas operativas: (a) las cepas se habían mantenido en refrigeración y al sembrarlas no se les dio el tiempo adecuado para el proceso de reactivación, por lo que crecieron a diferente velocidad y algunas no presentaron crecimiento; (b) debido al crecimiento de las cepas a diferente velocidad, el contacto hifal en algunos tratamientos no ocurrió en el centro del portaobjeto; (c) durante el vaciado de PDA, en algunas cajas Petri el recubrimiento del portaobjeto fue irregular, ya que al solidificarse este quedó descubierto, impidiendo el crecimiento hifal en algunas áreas.

2) *Siembra clásica*. Las fallas del sistema de siembra sobre portaobjetos fueron corregidas mediante la repetición del experimento bajo el sistema clásico de siembra directa sobre el medio de cultivo y, dándole un mayor tiempo de reactivación a las cepas previamente refrigeradas. En este procedimiento se tuvieron que hacer algunos ajustes como son: en los Trat. 6, Trat. 8 y Trat. 18, uno de los dos explantes a parrear creció a mayor velocidad e inhibió al otro, por lo que la siembra se repitió. En esta ocasión el Trat. 18 presentó el mismo problema, así que se optó por una siembra desfasada colocando primero el explante de crecimiento lento y a los 3 días el de crecimiento rápido.

Después de una serie de pruebas a diferentes intervalos de tiempo (cada h durante las primeras 6 h y cada 12 h posteriormente), se observó que la reducción del NBT a sales de formazán fue lento y comenzó a visualizarse a partir de las 48 h de exposición.

Al inferir la incompatibilidad somática por presencia/ausencia de la barrera de incompatibilidad, se encontró lo siguiente: (1) todas las cepas fueron capaces de tener anastomosis consigo mismas; (2) las cepas de un mismo grupo filogenético pero de diferente sitio geográfico tuvieron anastomosis cuando el aislamiento fue monospórico (Trat. 24), sin embargo, fueron incompatibles cuando el aislamiento provino del contexto (Trat. 29); (3) en el resto de las combinaciones se formó la

barrera de incompatibilidad, es decir, diferentes especies filogenéticas o aislamientos de espora y contexto de una misma especie filogenética no forman anastomosis (Figura 1).

En las observaciones microscópicas del fenómeno sólo se observó con certeza un evento de fusión perfecta en el tratamiento 1, mientras que en el resto se detectaron contactos hifales sin interacción e incompatibilidad pre-fusión (Figura 2). Los tipos de contacto hifal registrados en cada tratamiento (Cuadro 3) provienen de las observaciones de las 5 áreas analizadas a 10x (Cuadro 3). En dicho cuadro se indica que aún cuando las autocruzas y el Trat. 24 no presentaron barrera de incompatibilidad, a nivel microscópico si se detectó algún tipo de incompatibilidad, por lo que las observaciones macroscópicas, deben acompañarse del análisis microscópico de las zonas de contacto hifal.

Se detectaron 3 tipos de contacto hifal (Figura 2), a su vez, se observaron 5 tipos de incompatibilidad pre-fusión (Figura 2c1-5). Del total de contactos hifales, el 73.4 % fueron de incompatibilidad pre-fusión, el 26.3 % sin interacción y sólo el 0.2 presentó fusión perfecta. Los 5 tipos de incompatibilidad pre-fusión se distribuyeron como sigue: c.1) 1.2%; c.2) 41.1%; c.3) 28.4%; c.4) 0.8% y C.5) 1.9%. Cabe destacar que el tipo de incompatibilidad pre-fusión c.4 es particular debido a que se refiere a eventos donde el crecimiento se detiene o es muy lento y generalmente no existe contacto hifal; se presentó sólo en los Trat. 5 y 23, donde se pareó IP-3-C con T6-E e IP-3-E respectivamente.

Cuadro 3. Tipos de contacto hifal entre pares de cepas.

Trat.	TC	NI	FP	IPrF	Tipo de incompatibilidad Pre-fusión				
		(A)	(B)	(C.1-5)	C.1	C.2	C.3	C.4*	C.5
T1	9	2	1	6	2	2	2	0	0
T2	8	3	0	5	0	4	1	0	0
T3	10	1	0	9	0	7	2	0	0
T4	19	3	0	16	0	13	3	0	0
T5	5	2	0	3	0	1	0	1	1
T6	16	9	0	7	0	6	1	0	0
T7	10	5	0	5	0	5	0	0	0
T8	16	8	0	8	0	6	2	0	0
T9	18	15	0	3	0	1	1	0	1
T10	13	7	0	6	0	5	1	0	0
T11	21	5	0	16	1	9	2	0	4
T12	16	2	0	14	0	7	7	0	0
T13	18	3	0	15	0	5	10	0	0
T14	17	7	0	10	0	7	3	0	0
T15	19	5	0	14	0	5	9	0	0
T16	15	9	0	6	0	0	6	0	0
T17	22	1	0	21	1	6	14	0	0
T18	7	1	0	6	0	4	2	0	0
T19	14	2	0	12	1	10	0	0	1
T20	16	0	0	16	0	10	6	0	0
T21	12	0	0	12	0	3	9	0	0
T22	19	0	0	19	0	5	14	0	0
T23	11	7	0	4	0	1	0	3	0
T24	10	5	0	5	0	3	2	0	0
T25	11	0	0	11	1	7	3	0	0
T26	18	1	0	17	0	7	8	0	2
T27	9	1	0	8	0	7	1	0	0
T28	9	3	0	6	0	4	2	0	0
T29	16	4	0	12	0	9	3	0	0
T30	12	4	0	8	0	6	2	0	0
T31	11	0	0	11	0	2	9	0	0
T32	10	0	0	10	0	5	5	0	0
T33	12	0	0	12	0	11	1	0	0
T34	7	6	0	1	0	1	0	0	0
T35	14	1	0	13	0	12	1	0	0
T36	12	5	0	7	0	2	5	0	0
Total	482	127	1	354	6	198	137	4	9
%	100	26.3	0.2	73.4	1.2	41.1	28.4	0.8	1.9

TC= total de contactos hifales en 5 áreas a 10x, NI= contactos hifales sin interacción, FP= contactos con fusión perfecta, IPrF= incompatibilidad pre-fusión, IPsF= incompatibilidad post-fusión, c.1-5= tipos de incompatibilidad pre-fusión (ver Figura 2). *Debido a que en este tipo de

incompatibilidad no es posible contar la cantidad de contactos hifales debido al alto grado de repulsión (ver Figura 2.c.4), el número se refiere a las áreas en las que se presentó.

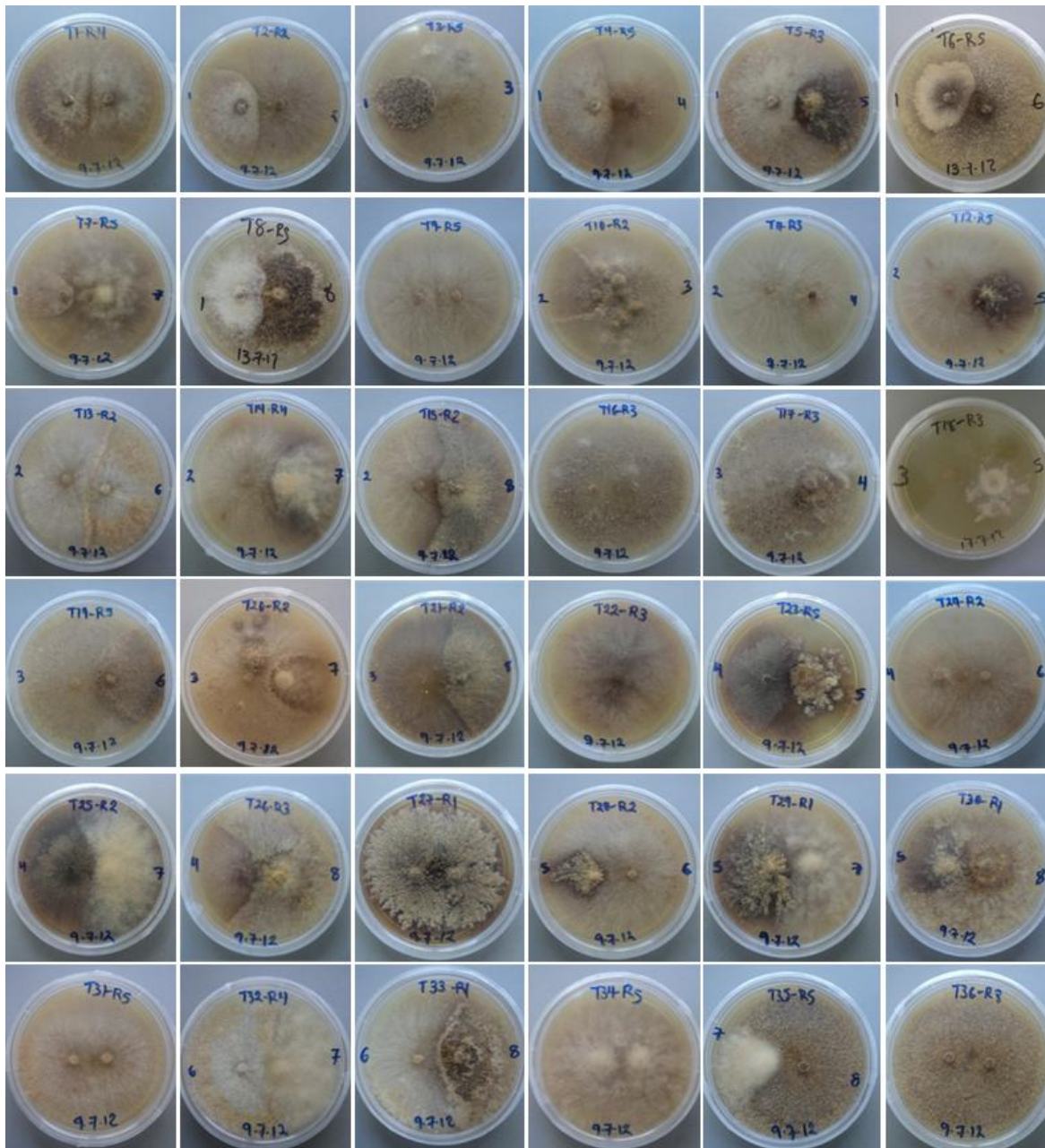


Figura 1. Detalle macroscópico del pareamiento de 8 cepas de *Morchella* donde se observa el fenómeno de compatibilidad e incompatibilidad somática. T6 y T8 a 15 d, T18 a 11 d, el resto de cepas a 19 d. d= días después de la siembra.

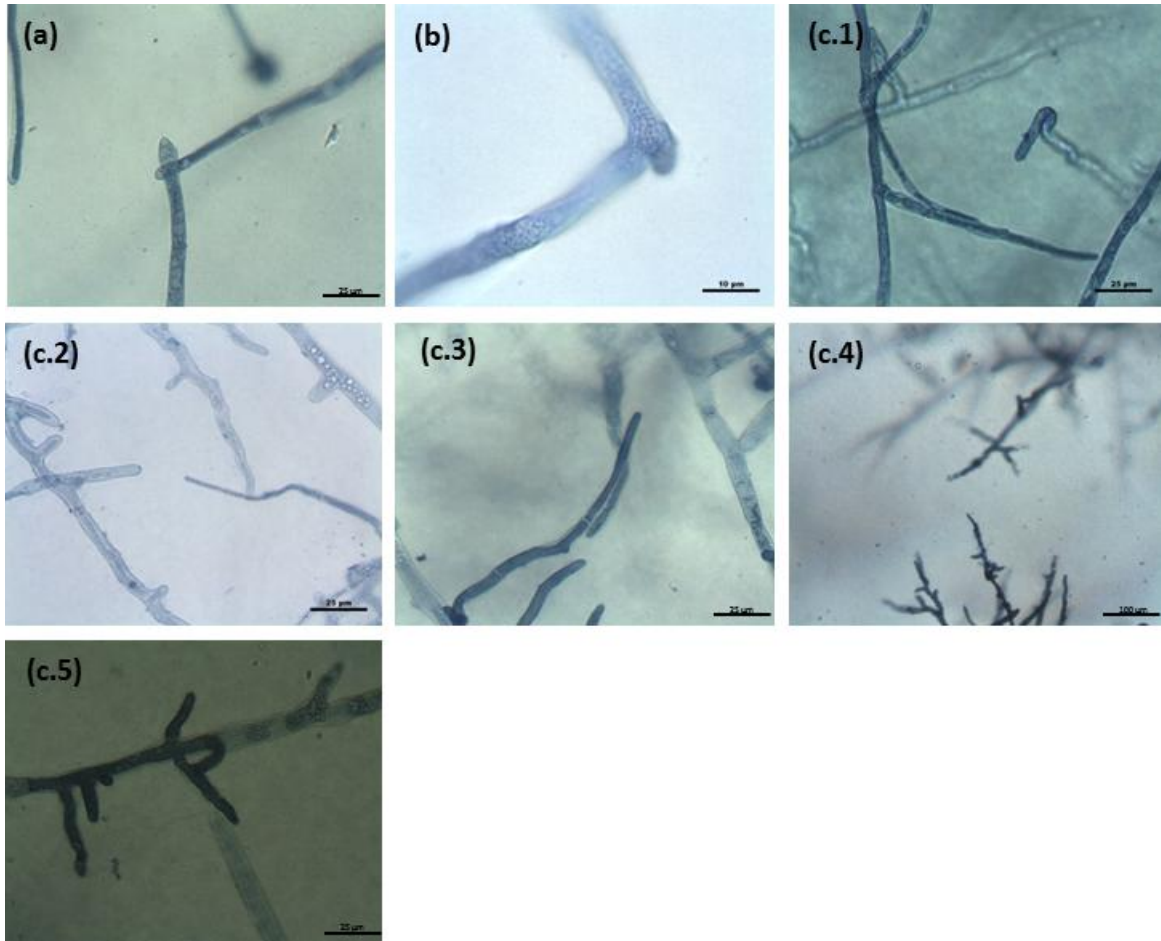


Figura 2. Detalle microscópico de los tipos de contacto hifal observados en los pareamientos de *Morchella* empleando NBT y azul de tripano: (a) Sin interacción. (b) Fusión perfecta. (c.1-5) incompatibilidad pre-fusión: (c.1) se da el contacto físico pero una punta hifal cambia de dirección; (c.2) una punta de la hifa muere; (c.3) las dos puntas hifales mueren; (c.4) se detiene el crecimiento antes del contacto de las puntas de las hifas; (c.5) se presenta muerte celular sólo en el segmento de la hifa donde se da el cruce.

7.4 DISCUSIÓN

El micelio de *Morchella* es autocompatible, en concordancia con lo reportado por Hervey *et al.* (1978). Dichos autores también indican que los aislamientos provenientes de diferentes esporas, pero de un mismo ascoma no son compatibles; sin embargo este tipo de prueba no se realizó en este estudio.

Volk y Leonard (1990) observaron fusión hifal entre las especies *M. esculenta*, *M. crassipes* y *M. deliciosa*, pero no con *M. semilibera* y *M. angusticeps*, lo que atribuyen a que *M. esculenta*, *M. crassipes* y *M. deliciosa* en realidad pueden ser ecotipos de la misma especie y *M. semilibera* y *M. angusticeps* son especies diferentes.

En la cruce de aislamientos monospóricos de la filo especie 3 provenientes de Izta-Popo y Tláloc no hubo barrera de incompatibilidad, sin embargo se observó cuando se cruzaron aislamientos provenientes del contexto de ascomas. Si bien, las hifas de los cultivos monospóricos pueden ser multicariones; las hifas del contexto pueden ser heterocariones y es posible que los complementos contengan genes de incompatibilidad (loci *het*) (Glass *et al.* 2000).

Si bien, a nivel macroscópico las 8 autocruzas no presentaron barrera de incompatibilidad, en las observaciones microscópicas realizadas sólo se detectó un evento de fusión perfecta en el Trat. 1, mientras que en el resto se presentaron contactos hifales sin interacción e incompatibilidad pre-fusión. Volk y Leonard (1990) también reportan que el apareamiento en micelio monospórico no ocurre con frecuencia. Se hipotetiza que la fusión se da con las primeras hifas que entran en contacto y que se aproximan frontalmente y posteriormente la densidad hifal aumenta, lo que podría generar contactos sin que exista interacción. Adicionalmente, se destaca que los mejores conteos se hicieron en los extremos de la línea de contacto hifal donde la densidad es menor y los eventos se distinguen con mayor precisión, sin embargo, en esta zona, las hifas convergen en forma diagonal, por lo que es posible que exista menos probabilidad de fusiones.

También es posible que bajo condiciones nutrimentales óptimas, *Morchella* crece sin buscar hifas compatibles para formar anastomosis y completar su ciclo de vida.

El hecho de que en un mismo tratamiento se observen contactos hifales sin interacción e incompatibilidad pre-fusión, es posible si dichos tipos de contacto hifal se explican como etapas de un mismo proceso, es decir: dos hifas, al entrar en contacto pueden permanecer por un tiempo sin aparentar repulsión (Figura 2.a), posteriormente puede manifestarse la repulsión causando la muerte celular de una hifas, las dos hifas o sólo la región de contacto (Figura 2.c.2, c.3 y c.5 respectivamente).

El hecho de que el tipo de incompatibilidad c.4 se presente sólo en los Trat. 5 (IP-3 C x T-6 E) y 23 (IP-3 C x IP-3 E), puede deberse a que IP-3 C es de crecimiento lento (Figura 4) y la repulsión se manifiesta antes de que las hifas entren en contacto.

7.5 CONCLUSIONES

- Con base en la presencia/ausencia de la barrera de incompatibilidad se determinó que las 4 filoespecies de *Morchella* son autocompatibles.
- Aislamientos monospóricos del filogrupo 3 de ascomas provenientes de Izta-Popo y Tláloc son compatibles, mientras que sus respectivos aislamientos del contexto no lo son.
- Las morchellas estudiadas presentan incompatibilidad somática cuando se parean aislamientos de esporas y contexto del mismo ascoma, o aislamientos de diferentes ascomas.

7.6 LITERATURA CITADA

- Ainsworth AM, Rayner ADM. 1989. Hyphal and mycelial responses associated with genetic exchange within and between species of the basidiomycete genus *Stereum*. *Journal of General Microbiology* 135:1643-59.
- Caten CE. 1972. Vegetative incompatibility and cytoplasmic infection in fungi. *Journal of General Microbiology* 72:221-29.
- Croll D, Giovannetti M, Koch AM, Sbrana C, Ehinger M, Lammers PJ, Sanders IR. 2008. Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* 181:924–937.
- Gessner RV, Romano MA, Schultz RW. 1987. Allelic variation and segregation in *Morchella deliciosa* and *M. esculenta*. *Mycologia* 79:683–687.
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Strani P. 2004. Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular Mycorrhizal networks. *New Phytologist* 164:175-181.
- Glass NL, Jacobson DJ, Shiu PKT. 2000. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics* 34:165-186.
- Glass NL, Kaneko I. 2003. Fatal Attraction: Nonsself Recognition and Heterokaryon Incompatibility in Filamentous Fungi. *Eukaryotic cell* 1:1-8.
- Hervey A, Bistis G, Leong I. 1978. Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta*. *Mycologia* 70: 1269–1274.

- Nauta MJ, Hoekstra RF. 1996. Vegetative incompatibility in ascomycetes: Highly polymorphic but selectively neutral? *Journal of Theoretical Biology* 183:56-65.
- Pagliaccia D, Douhan GW, Douhan L, Peever TL, Carris LM, Kerrigan JL. 2011. Development of molecular markers and preliminary investigation of the population structure and mating system in one lineage of black morel (*Morchella elata*) in the Pacific Northwestern USA. *Mycologia* 103:969-982.
- Pilz D, McLain R, Alexander S, Villarreal-Ruiz L, Berch S, Wurtz TL, Parks CG, McFarlane E, Baker B, Molina R, Smith JE. 2007. *Ecology and management of morels harvested from the forests of western North America*. General Technical Report. PNW-GTR-710. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 161 p.
- Roper M, Ellison C, Taylor JW, Glass NL. 2011. Nuclear and genome dynamics in multinucleate ascomycetes fungi. *Current Biology* 21:786-793.
- Smith SE, Gianinazzi-Pearson V. 1990. Phosphate uptake and arbuscular activity in mycorrhizal *Allium cepa* L.: effects of photon irradiance and phosphate nutrition. *Australian Journal of Plant Physiology* 17:177-188.
- Strober W. 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology* 21:A.3B.1-A.3B.2.
- Volk TJ, Leonard TJ. 1990. Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycological Research* 94:399-406.

CAPÍTULO VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Los bosques puros de *Abies religiosa* del centro de México albergan poblaciones de *Morchella* spp., concordando con lo reportado por Villarreal-Ruiz (1996) y Pilz *et al.* (2007). Aunque no se pudo relacionar el efecto de la contaminación atmosférica en los bosques, con la abundancia de ascomas de *Morchella*, sí se encontró una mayor cantidad de ascomas en el sitio más alejado de los focos de contaminación atmosférica, como es la Reserva de la biósfera de la Mariposa Monarca, Michoacán. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el sitio Tláloc estaba en segundo lugar por su cercanía a la Ciudad de México, presentó abundantes ascomas; en contraste con el área de influencia del Parque Nacional Desierto de los Leones, Distrito Federal donde se muestreó durante dos años consecutivos (2010 y 2011) sin localizar ascoma alguno. En el Sitio Izta-Popo que se ubica en un punto intermedio se encontraron sólo cuatro ascomas durante los mismos años de muestreo.

En las pruebas de identificación ascoma-ectomicorriza no se detectaron ectomicorizas relacionadas directamente con el trazo del micelio y los ascomas de *Morchella*, sin embargo, en *Morchella* sp. IP-2, *Morchella* sp. IP-3 y *Morchella* sp. T-4 se encontraron estructuras subterráneas formadas por suelo compacto, tejido similar al del estípite, ectomicorizas muertas y raíces de plantas herbáceas (entre ellas *Taraxacum* sp.). Estructuras similares han sido observadas en *M. tomentosa*, y denominadas como “radiesclerocio” por Stefani *et al.* (2010).

Actualmente, algunas características consideradas en la clasificación tradicional como color y forma del ascoma se basan en apreciaciones del investigador (Guzmán y Tapia 1998, Pilz *et al.* 2007, Kuo 2008, Kuo *et al.* 2012), pero estas son hasta cierto grado subjetivas, de tal modo que se vuelve necesaria la descripción basada en parámetros confiables, tales como el uso de códigos de colores (Séguy, 1936). Por otra parte, en el caso del índice de conicidad (Ordas y Ron 1988) y cociente Di/Dm propuestos en esta investigación, se obtuvieron resultados cuya aplicación puede ser de utilidad para tener descripciones precisas y basadas en datos cuantitativos.

A pesar de que en el Área de influencia del Parque Nacional Izta-Popo sólo se encontraron cuatro ascomas en dos años de muestreo, el análisis filogenético reveló que tres de ellos son especies diferentes. Uno de los resultados más importantes de este trabajo es que una de las especies *Morchella* sp. IP-2 resultó ser *Morchella frustrata*, que es especie recientemente descrita por Kuo *et al.* (2012) y que corresponde a la especie filogenética *Morchella* sp. Mel-2 (O'Donnell *et al.* 2011), misma que ha sido reportada en el oeste de la región Himalaya en la India por Kanwal *et al.* (2010). Además, los morfotipos *Morchella* sp. IP-3 y *Morchella* sp. IP-4 se agruparon con *Morchella* sp. Mel-12 y *Morchella* sp. Mel-18, sin embargo, la filogenia muestra que pueden tratarse de especies diferentes y potencialmente pueden ser nuevas.

El sitio Izta-Popo fue el que presentó el mayor número de especies, sin embargo la presencia de ascomas es escasa en comparación con el sitio Tláloc, donde se recolectaron 10 ascomas en un área pequeña, mismas que se distribuyeron en sólo dos grupos filogenéticos cercanos entre sí.

A pesar de que se muestreó una población pequeña (12 ascomas en total) se encontraron 4 filo-especies con al menos una especie potencialmente nueva (*Morchella* sp. IP-4) y una descrita recientemente (*Morchella* sp. IP-2, que es *Morchella frustrata*), por lo que se confirma que México alberga especies no reportadas, de las cuales algunas pueden ser endémicas, ya que algunos autores (Taskin *et al.* 2010, O'Donnell *et al.* 2011, Kuo *et al.* 2012) han indicado que este género tiene especies crípticas y de distribución restringida.

Los aislamientos de las cuatro filo-especies de *Morchella* son autocompatibles, en concordancia con lo reportado por Hervey *et al.* (1978), ya sea que provengan de esporas o del contexto, o aún en aislamientos monospóricos de la misma especie pero diferente sitio geográfico. En el resto de combinaciones se observó la presencia de barrera de incompatibilidad. Así mismo a nivel microscópico, sólo se observó un evento de fusión hifal, detectándose principalmente incompatibilidad pre-fusión o contactos sin interacción. Se hipotetiza que bajo condiciones

nutrimentales óptimas, las cepas tienden a desarrollarse sin buscar hifas compatibles para formar anastomosis y completar su ciclo de vida.

La condición nuclear de hifas y esporas juega un papel importante en la adaptación de especies de *Morchella* (Pilz *et al.* 2007). Se encontró que las hifas poseen menos núcleos que las esporas, aunque ambas en cantidades bajas en comparación con las reportadas por Volk y Leonard (1990) y Weber (1988, citado por Pilz *et al.* 2007).

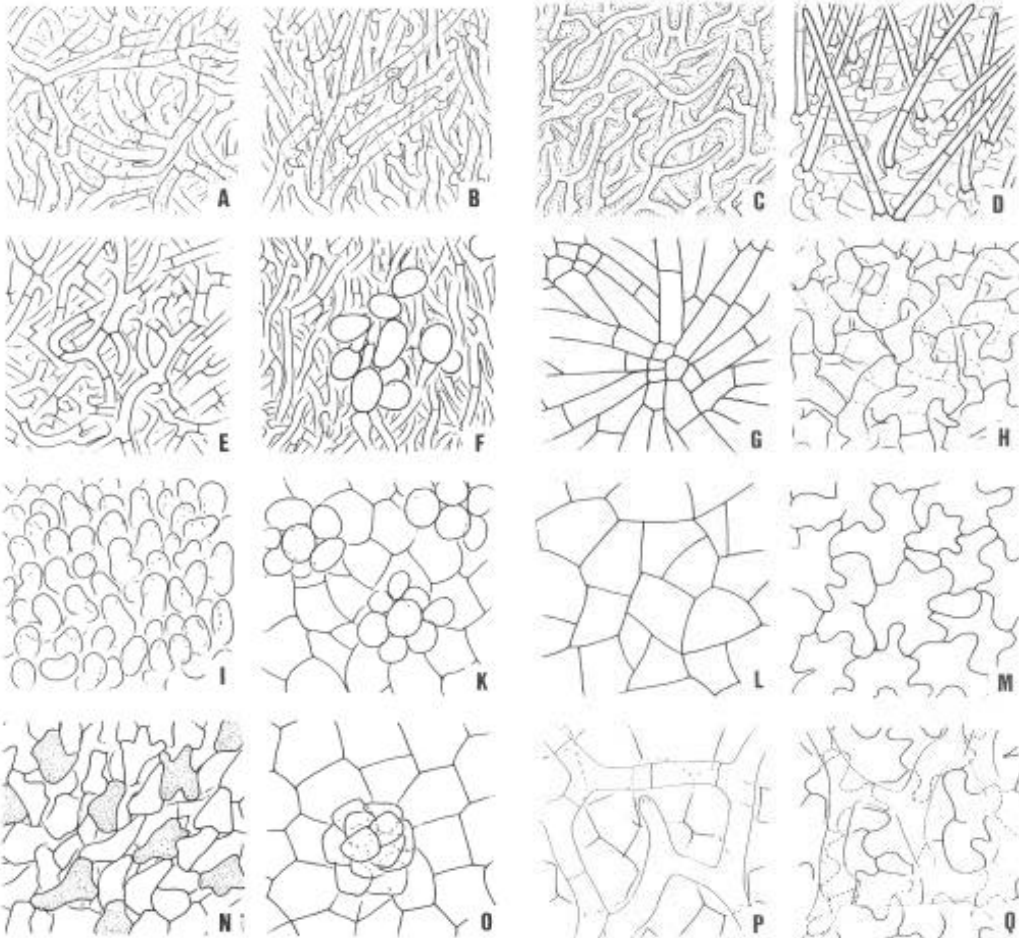
La variabilidad morfológica no se limita a los ascomas, en el presente estudio también se observó en aislamientos monospóricos de las 4 filoespecies en tres niveles de pH (3.5, 5.5 y 7.7) y medios de cultivo (PDA, EMA y CYM), factores que resultan determinantes en la velocidad de crecimiento de las cepas. A excepción de algunos tratamientos, la mayoría de las cepas crecieron en el pH más bajo, lo que refleja la plasticidad de *Morchella* sp. a sobrevivir en ambientes adversos, presentando mayor desarrollo cuando hay nutrientes disponibles en el sustrato.

CAPÍTULO IX. CONCLUSIONES GENERALES

- No se encontraron evidencias de asociación ectomicorrícica *in situ* entre *Morchella* spp. y *Abies religiosa*, sin embargo, en algunos ascomas se observó una estructura recientemente reportada como “radiesclerocio”.
- Se identificaron cuatro filoespecies de *Morchella* pertenecientes al clado elata, todas en bosques puros de *Abies religiosa* del Monte Tláloc y el área de influencia del Parque Nacional Izta-Popo.
- Las filoespecies 1 y 3 son cercanas entre sí, morfológicamente similares y provienen en su mayoría del sitio Tláloc, así mismo, se distinguen fácilmente de las filoespecies 2 (*Morchella frustrata*) y 4 que provienen del sitio Izta-Popo. Ninguna ha sido reportada previamente en México.
- El número de núcleos en esporas e hifas de *Morchella* no está influida por el origen geográfico ni por la filoespecie a la que pertenecen. Así mismo las esporas poseen mayor cantidad de núcleos que las células hifales.
- Los aislamientos monospóricos de las cuatro filoespecies de *Morchella* establecidos en tres niveles de pH y medios de cultivo presentaron variación morfológica. A medida que el pH disminuyó, CYM resultó ser el mejor medio, así mismo, ninguna cepa creció en EMA a pH 3.5. Por otra parte, los aislamientos del sitio Izta-Popo (filoespecies 2 y 4) crecieron más rápido respecto a los del sitio Tláloc (filoespecies 1 y 3).
- La incompatibilidad somática se basó en la presencia de barrera de incompatibilidad, observándose que todos los aislamientos son autocompatibles, pero incompatibles cuando se porean aislamientos de esporas y contexto del mismo ascoma, o aislamientos de diferentes ascomas.

ANEXOS

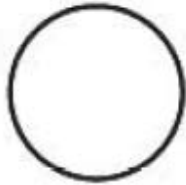
Anexo I. Tipos de manto de ectomicorrizas basados en la anatomía de la superficie.



(A-I) Mantos plectenquimatosos. (K-Q) mantos pseudoparenquimatosos. (A) con hifas en un arreglo en forma de anillo. (B) con hifas dispuestas irregularmente, sin un patrón definido, pero a menudo crecen en sentido longitudinal con respecto a la orientación de la raíz. (C) con una matriz gelatinosa entre las hifas. (D) con hifas dispuestas en forma de red, con cistidios prominentes. (E) con hifas dispuestas en forma de red, rugosa y ramificada. (F) con parches ocasionales de células redondeadas sobre el manto. (G) plectenquimatoso, con hifas dispuestas en forma de estrella y firmemente pegadas. (H) tipo transicional entre plectenquimatoso y pseudoparenquimatoso, hifas de forma irregular formando una malla gruesa. (I) plectenquimatoso, manto himeniforme, sobresaliendo casi perpendicularmente, corpulento y con frecuencia con células hifales curvadas al final, las cuales se llenan de gotitas aceitosas. (K) compuesto de células angulares, con montículos de células redondeadas. (L) manto con células angulares. (M) manto con células epidermoides. (N) manto con algunas células conteniendo gotas, tinción en sulfo-vainillina, células con forma variable. (O) manto con células angulares y montones de células aplanadas. (P) manto con células angulares, y una red de hifas delicadas. (Q) con células epidérmicas que llevan una red delicada de hifas. (Tomado de Agerer 1987-2006).

Anexo II- Descriptor morfológico de aislamiento *in vitro* de hongos.

FORM



Circular



Irregular



Filamentous



Rhizoid

ELEVATION



Raised



Convex



Flat



umbonate



Crateriform

MARGIN



Entire



Undulate



Filiform



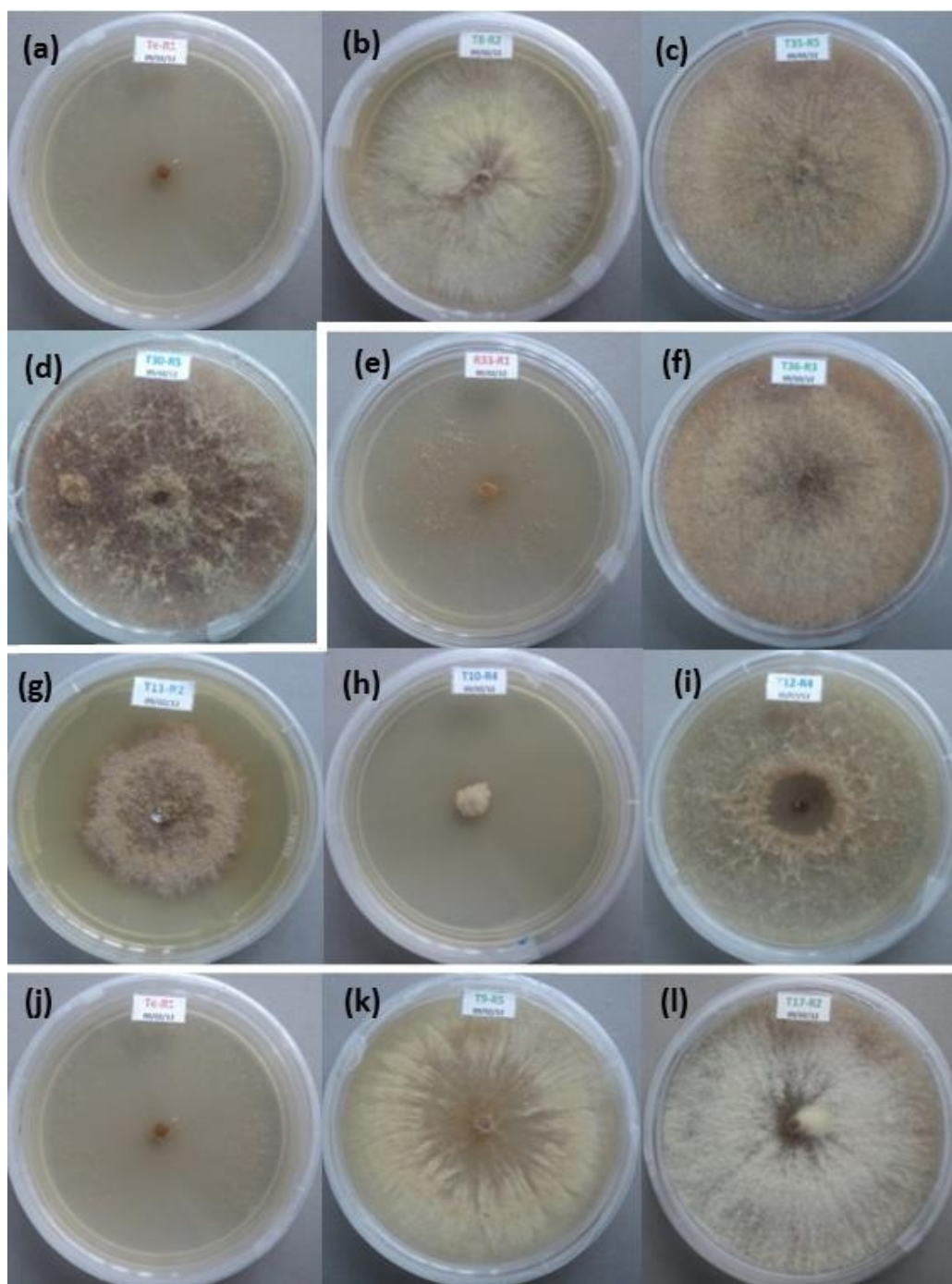
Curled



Lobate

(Tomado de: Society of General Microbiology: <http://www.microbiologyonline.org.uk/teachers/observing-microbes/observing-fungi-in-a-petri-dish>)

(Continuación Anexo II: Hifas aéreas, textura y densidad)



Hifas aéreas (a-d): (a) Ausente [-], (b) Poco [+], (c) regular [++], (d) abundante [+++]. Texturas (e-i): (e) acanalada [Ac], (f) Lanosa [L], (g) granulosa [G], (h) aterciopelada [A], (i) lisa, sólo el centro de la cepa [Li]. Densidad (j-l): (j) baja [+], (k) media [++], (l) alta [+++]. Elaborado a partir de las observaciones durante la presente investigación.

Anexo III. Secuencias de 16 cepas de *Morchella* spp. obtenidas con ITS4 e ITS5, localizadas en bosques de *Abies religiosa* en el Monte Tláloc, Estado de México y área de influencia del Parque Nacional Izta-Popo, Puebla.

IP=Izta-popo; T=Tláloc; E=Aislado de esporas; C=Aislado de contexto.

>IP-2E *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 577 pb

AGGTGGACAGTCCTCCCCAGAGTTCCGCCCTTCGGCGTCTGCGAGCCATCGGGGCATGGAACC
TTGGGGGCTGTCCGGTTTCCCGCTGGGCATACGTCCGATGCCGCTCGGGGAGCGAAACGT
GGCTCGCGCAGCGTCGCAGCGTTGGTCCCCACTCACTACCAAACCCTCTGCGTACCTTG
CCCACTTGCTTCCCCCGGCCCTCCCGGCCGGGGGGCGACACCAAAAACCAAACCTTTGCGA
TGAACCGACGTCTGAATGCCAAAAGCAAAAACAAAACAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCT
TGGCTCCACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCG
AGCGTCATAAAACCCCCTCCCCCTCGGATTAATGTTCTTGGGGGGTATTGGCCAATGGGAT
TGCGAGATAGCAATTGTTACCCAGGCGCCCAAATGCATCAGTACCCCGCCATTTACAGATTTA
CCAGCACCGAGGCC

>IP-3E *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 626 pb

CCACACAGAAAAGGGAGGCCAAAGGGGGCCGACAGGATTAGTAGCTTATACGTTGTTGAACGTC
CTGGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTAAACCCTCTGCGTACCTGTCCCTTCTTGCTTCCCC
CGACATCTCGTCGGGGGGAGGGGAACAACCAAACCTCTTTGTGAATCAAACAGCCGTCAGAATT
ATAAAACAACAAAAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCACATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATAAAAACCTCCTCCCC
CTTCGGGTTTTGTTACTATCGTTGGGGGGTTTTGGCCTAATGGGATAGCGATTGGCAATTCGTT
TCCCAATGTCCTAAATACACGTAGACCCGCTCCAGATGCGACAGCACCGAGGCCATCAACCG
TGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGACAGTAAATGCTCACCTCTCTTACACGCCGATGGCAC
GACAGTTGAGTTGCGGGCGTAAATTGGAGCCCTTTTCAGGACCCTCGTGGCCTAGC

>IP-4E *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 577 pb

AGGGCTAGTAGCTTATACGTTGTTGAACGTCCTGTCTGGACCCGGAGCGTCCCCCATCTAAC
CCTCTGCGTACCTGTCCCTTCTTGCTTCCCCGGCATCCCGTCGGGGGGAGGTAACAACCAA
AACTCTCTGTGAATCAAACAGCCGTCAGAATTATAAAACAAACAAAAAGTTAAAACCTTTCAACAA
CGGATCTCTTGGTTCCACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCAT
GCCTGTTGAGCGTCATAAAAACCTCCTCCCCCTTCGGGTTTTGTTACTATCGTTGGGGGGTTT
TGGCCTAATGGGATAGCGATTGGCAATTCGTTTCCCAATGTCCTAATAGACGTAGACCCGCC
TCCAGATGCGACAGCACCGAGGCCATCAACCGTGGAGTTATGGGATATAATAGGCTTGCAGTA
AAATGCTCACCTCTCTCCACACGCCGATGGCACGACAGTTGAGTTGCGGGCGTAAATTGGAG
CCCTTTTC

>T1E *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 675 pb

GAAGGATCATTACCAAGAACCACACAGAAAAGGGAGGCCAAAGGGGGCCGACAGGATTAGTAGC
TTATACGTTGTTGAACGTCCTGGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTAAACCCTCTGCGTACC
TGTCCTTCTTGCTTCCCCGACATCTCGTCGGGGGGAGGGGAACAACCAAACCTTTTGTGAA

TCAAACAGCCGTCAGAATTATAAAACAAACAAAAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT
TCCCACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT
CATAAAAACCTCCTCCCCCTTCGGGTTTTGTTACTATCGTTGGGGGGTTTTGGCCTAATGGGAT
AGCGATTGGCAATTCGTTTCCAATGTCCTAAATAGACGTAGACCCGCCTCCAGATGCGACAG
CACCGAGGCCATCAACCGTGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGCAGTAAAATGCTCACCTCTC
TTCACATGCCGATGGCAGCAGATTGCAGTTGCGGGCGTAAATTGGAGCCCTTTTCAGGACCC
TCGTGGCCTAGCATCCACAATACATAATTTGACCTCGGATCA

>T4E *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 679 pb

TGCGGAAGGATCATTACCAAGAACCACACAGAAAAGGGAGGCAAAGGGGGCCGACAGGATTAG
TAGCTTATACGTTGTTGAACGTCCTGGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTAAACCCTCTGCG
TACCTGTCCCTTCTTGCTTCCCCGACATCTCGTCGGGGGGAGGGAACAACCAAACTCTTTG
TGAATCAAACAGCCGTCAGAATTATAAAACAAACAAAAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCT
TGGTTCACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTCCG
AGCGTCATAAAAACCTCCTCCCCCTTCGGGTTTTGTTACTATCGTTGGGGGGTTTTGGCCTAAT
GGGATAGCGATTGGCAATTCGTTTCCAATGTCCTAAATAGACGTAGACCCGCCTCCAGATGC
GACAGCACCGAGGCCATCAACCGTGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGCAGTAAAATGCTCAC
CTCTCTTACACGCCGATGGCAGGCCAGTTGCAGTTGCGGGCGTAAATTGGAGCCCTTTTCAG
GACCCTCGTGGCCTAGCATCCACAATACATAATTTGACCTCGGATCA

>T5E *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 628 pb

GACAGGATTAGTAGCTTATACGTTGTTGAACGTCCTGGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTA
AACCTCTGCGTACCTGTCCCTTCTTGCTTCCCCGACATCTCGTCGGGGGGAGGGAACAAC
CAAACTCTTTGTGAATCAAACAGCCGTCAGAATTATAAAACAAACAAAAAGTTAAACTTTCAA
CAACGGATCTCTTGGTTCACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGG
CATGCCTGTTTCGAGCGTCATAAAAACCTCCTCCCCCTTCGGGTTTTGTTACTATCGTTGGGGG
GTTTTGGCCTAATGGGATAGCGATTGGCAATTCGTTTCCAATGTCCTAAATACACGTAGACCC
GCCTCCAGATGCGACAGCACCGAGGCCATCAACCGTGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGC
GTAAAATGCTCACCTCTTTCACACGCCGATGGCAGCAGATTGCAGTTGCGGGCGTAAATTG
GAGCCCTTTTCAGGACCCTCGTGGCCTAGCATCCACAATACATAATTTGACCTCGGATCA

>T6E *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 558 pb

GGATTAGTAGCTTATACGTTGTTGAACGTCCTGGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTAAACC
CTCTGCGTACCTGTCCCTTCTTGCTTCCCCGACATCTCGTCGGGGGGAGGGAACAACCAAAA
CTCTTTGTGAATCAAACAGCCGTCAGAATTATAAAACAAACAAAAAGTTAAACTTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGC
CTGTTTCGAGCGTCATAAAAACCTCCTCCCCCTTCGGGTTTTGTTACTATCGTTGGGGGGTTTTG
GCCTAATGGGATAGCGATTGGCAATTCGTTTCCAATGTCCTAAATAGACGTAGACCCGCCTC
CAGATGCGACAGCACCGAGGCCATCAACCGTGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGCAGTAAAA
TGCTCACCTCTCTTTCACACGCCGATGGCAGGCCAGTTGCAGTTGCGGGCGT

>T7E *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 602 pb

CACACAGAAAAGGGAGGCAAAGGGGGCCGACAGGATTAGTAGCTTATACGTTGTTGAACGTCCT
GGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTAAACCCTCTGCGTACCTGTCCCTTCTTGCTTCCCC
GACATCTCGTCGGGGGGAGGGAACAACCAAACTCTTTGTGAATCAAACAGCCGTCAGAATTA
TAAACAAACAAAAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCACATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA
CATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATAAAAACCTCCTCCC
CTTCGGGTTTTGTTACTATCGTTGGGGGGTTTTGGCCTAATGGGATAGCGATTGGCAATTCGTT

TCCAATGTCCTAAATACACGTAGACCCGCTCCAGATGCGACAGCACCGAGGCCATCAACCG
TGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGCAGTAAATGCTCACCTCTCTTCACACGCCGATGGCAC
GACAGTTGCAGTTGCGGGCGTAAATTGGAGCCCT

>T8E *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 690 pb

TAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCAAGAACCACACAGAAAAGGGAGGCCAAAGGGGCCG
ACAGGATTAGTAGCTTATACGTTGTTGAACGTCCTGGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTAA
ACCCTCTGCGTACCTGTCCCTTCTTGCTTCCCCGACATCTCGTCGGGGGGAGGGAACAACC
AAAACCTTTTGTGAATCAAACAGCCGTCAGAATTATAAAACAAACAAAAAGTTAAAACCTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCCACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGC
ATGCCTGTTGAGCGTCATAAAAACCTCCTCCCCCTTCCGGTTTTTGTACTATCGTTGGGGGG
TTTTGGCCTAATGGGATAGCGATTGGCAATTCGTTTCCAATGTCCTAAATACACGTAGACCCG
CCTCCAGATGCGACAGCACCGAGGCCATCAACCGTGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGCAGT
AAAATGCTCACCTCTCTTCACACGCCGATGGCACGACAGTTGCAGTTGCGGGCGTAAATTGGA
GCCCTTTTCAGGACCCTCGTGGCCTAGCATCCACAATACATAATTTGACCTCGGATCAG

>T9E *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 581 pb

ACAGGATTAGTAGCTTATACGTTGTTGAACGTCCTGGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTAA
ACCCTCTGCGTACCTGTCCCTTCTTGCTTCCCCGACATCTCGTCGGGGGGAGGGAACAACC
AAAACCTTTTGTGAATCAAACAGCCGTCAGAATTATAAAACAAACAAAAAGTTAAAACCTTCAAC
AACGGATCTCTTGGTTCCACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGC
ATGCCTGTTGAGCGTCATAAAAACCTCCTCCCCCTTCCGGTTTTTGTACTATCGTTGGGGGG
TTTTGGCCTAATGGGATAGCGATTGGCAATTCGTTTCCAATGTCCTAAATAGACGTAGACCCG
CCTCCAGATGCGACAGCACCGAGGCCATCAACCGTGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGCAGT
AAAATGCTCACCTCTCTTCACACGCCGATGGCACGCCAGTTGCAGTTGCGGGCGTAAATTGGA
GCCCTTTTCAGG

>IP-3C *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 663 pb

CAAGAACCACACAGAAAAGGGAGGCCAAAGGGGGCCGACAGGATTAGTAGCTTATACGTTGTTGA
ACGTCCTGGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTAAACCTCTGCGTACCTGTCCCTTCTTGCT
TCCCCGACATCTCGTCGGGGGGAGGGAACAACCAAACCTTTTGTGAATCAAACAGCCGTC
GAATTATAAAACAAACAAAAAGTTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCACATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA
ACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATAAAAACCTCCT
CCCCCTTCCGGTTTTTGTACTATCGTTGGGGGGTTTTGGCCTAATGGGATAGCGATTGGCAAT
TCGTTTCCAATGTCCTAAATACACGTAGACCCGCCTCCAGATGCGACAGCACCGAGGCCATC
AACCGTGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGCAGTAAATGCTCACCTCTCTTCACACGCCGAT
GGCACGACAGTTGCAGTTGCGGGCGTAAATTGGAGCCCTTTTCAGGACCCTCGTGGCCTAGC
ATCCACAATACATAATTTGACCTCGGATCAG

>T1C *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 587 pb

GGATTAGTAGCTTATACGTTGTTGAACGTCCTGGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTAAACC
CTCTGCGTACCTGTCCCTTCTTGCTTCCCCGACATCTCGTCGGGGGGAGGGAACAACCAAAC
CTCTTTGTGAATCAAACAGCCGTCAGAATTATAAAACAAACAAAAAGTTAAAACCTTCAACAACG
GATCTCTTGGTTCCACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAG
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGC
CTGTTGAGCGTCATAAAAACCTCCTCCCCCTTCCGGTTTTTGTACTATCGTTGGGGGGTTTTG
GCCTAATGGGATAGCGATTGGCAATTCGTTTCCAATGTCCTAAATACACGTAGACCCGCCTC
CAGATGCGACAGCACCGAGGCCATCAACCGTGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGCAGTAAAC
TGCTCACCTCTCTTCACACGCCGATGGCACGACAGTTGCAGTTGCGGGCGTAAATTGGAGCC
CTTTTCAGGACCCTCGT

>T2C *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 540 pb

TAGCTTATACGTTGTTGAACGTCCTGGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTAAACCCTCTGCG
TACCTGTCCCTTCTTGCTTCCCCGACATCTCGTCGGGGGAGGGAACAACCAAACTCTTTG
TGAATCAAACAGCCGTCAGAATTATAAAACAAACAAAAAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCT
TGGTCCACATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTCCG
AGCGTCATAAAAACCTCCTCCCCCTTCGGGTTTTGTTACTATCGTTGGGGGGTTTTGGCCTAAT
GGGATAGCGATTGGCAATTCGTTTTCCAATGTCCTAAATACACGTAGACCCGCCTCCAGATGC
GACAGCACCGAGGCCATCAACCGTGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGCAGTAAAATGCTCAC
CTCTCTTACACGCCGATGGCAGACAGTTGCA

>T3C *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 511 pb

GAACGTCCTGGCTGGACCCGGAGCCGCCCCCATCTAAACCCTCTGCGTACCTGTCCCTTCTT
GCTTCCCCCGACATCTCGTCGGGGGGAGGGAACAACCAAACTCTTTGTGAATCAAACAGCC
GTCAGAATTATAAAACAAACAAAAAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCACATCG
ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT
TTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATAAAAAC
TCCTCCCCCTTCGGGTTTTGTTACTATCGTTGGGGGGTTTTGGCCTAATGGGATAGCGATTGG
CAATTCGTTTTCCAATGTCCTAAATACACGTAGACCCGCCTCCAGATGCGACAGCACCGAGGC
CATCAACCGTGGAGTTATGGGATATATAGGCTTGCAGTAAAATGCTCACCTCTCTTACACGCC
GATGG

>T6C *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 648 pb

AAAGGGAGGCCAAAGGGGGCCGACAGGATTAGTAGCTTATACGTTGTTGAACGTCCTGGCTGGA
CCCGGAGCCGCCCCCATCTAAACCCTCTGCGTACCTGTCCCTTCTTGCTTCCCCCGACATCTC
GTCCGGGGGGAGGGAACAACCAAACTCTTTGTGAATCAAACAGCCGTCAGAATTATAAAACAA
ACAAAAAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCACATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC
CCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATAAAAACCTCCTCCCCCTTCGGGTT
TTGTTACTATCGTTGGGGGGTTTTGGCCTAATGGGATAGCGATTGGCAATTCGTTTTCCAATGT
CCTAAATAGACGTAGACCCGCCTCCAGATGCGACAGCACCGAGGCCATCAACCGTGGAGTTA
TGGGATATATAGGCTTGCAGTAAAATGCTCACCTCTCTTACACGCCGATGGCAGCCAGTTG
CAGTTGCGGGCGTAAATTGGAGCCCTTTTCAGGACCCTCGTGGCCTAGCATCCACAATACATA
ATTTGACCTCGGATCAG

>T9C *Morchella* sp., en bosque de *Abies religiosa*. ITS4/ITS5, 737 pb

ATTGATATGCTTAAGTTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAATTATGTATTGTGGAT
GCTAGGCCACGAGGGTCTGAAAAGGGCTCCAATTTACGCCCGCAACTGCAACTGTCGTGCC
ATCGGCGTGTGAAGAGAGGTTGAGCATTACTGCAAGCCTATATATCCCATAACTCCACGTT
GATGGCCTCGGTGCTGTCGCATCTGGAGGCGGGTCTACGTGTATTTAGGACATTGGGAAACG
AATTGCCAATCGCTATCCCATTAGGCCAAAACCCCCAACGATAGTAACAAAACCCGAAGGGG
GAGGAGTTTTTATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGC
GTTCAAAGATTGATGATTCACTGAATTCTGCAATTACACTTATCGCATTTCGCTGCGTTC
TTCATCGATGTGGGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTTTTTGTTTATAATT
CTGACGGCTGTTTGATTCAAAAGAGTTTTGTTGTTCCCTCCCCCGACGAGATGTCGGGGG
AAGCAAGAAGGGACAGGTACGCAGAGGGTTAGATGGGGGCGGCTCCGGGTCCAGCCAGGA
CGTTCAAACGATAAGCTACTAATCCTGTCGGCCCCCTTTCCTCCCTTTTCTGTGTGGTTCT
TGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTA