

1 9 9 0 - A

CODIGO: 82492054

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



AISLAMIENTO DE LOS HONGOS ECTOMICORRIZICOS DEL
BOSQUE-ESCUELA DEL IMC Y P Y SINTESIS *in vitro*
DE LA MICORRIZA

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARIA DEL REFUGIO SANCHEZ JACOME

GUADALAJARA, JALISCO. 1993



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sección

Expediente

Número

C. MA. DEL REFUGIO SANCHEZ JACOME
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis " AISLAMIENTO DE LOS HONGOS ECTOMICORRIZICOS DEL BOSQUE-ESCUELA DEL IMCyP Y SINTESIS in vitro DE LA MICORRIZA ". para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis la M. en C. Laura Guzmán Dávalos.

A T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "
"AÑO DEL BICENTENARIO"
Guadalajara, Jal., 20 de Octubre de 1992.
EL DIRECTOR

M. EN C. JUAN LUIS CIFUENTES LEMUS



EL SECRETARIO

BIOL. JESÚS ANTONIO SAPINOSA ARIAS

c.c.p.- M. en C. Laura Guzmán Dávalos, Directora de tesis pte.-
c.c.p.- El expediente del alumno.

JLCL>JAEA>Cgir.

Al contestar este ofido citese fecha y número

C. Dr. Eulogio Pimienta Barrios

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad de Guadalajara

P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) Pasante en Biol. María del Refugio Sánchez Jácome código número 82492054 con el título "Aislamiento de los hongos ectomicorrízicos del Bosque - Escuela del IMCYP y síntesis 'in vitro' de la micorriza.

consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

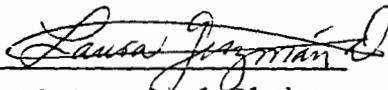
Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 2 de noviembre

1993

EL DIRECTOR DE TESIS



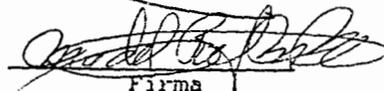
M.C. Laura Guzmán Dávalos

SINODALES

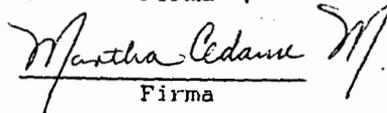
1. M.C. Martín Pedro Tena Meza
Nombre completo
2. M.C. Ma. del Refugio Mora Navarro
Nombre completo
3. Biol. Martha Cedano Maldonado
Nombre completo



Firma



Firma



Firma

El presente estudio se realizó en coordinación con el *Departamento Forestal del Instituto de Madera Celulosa y Papel "Karl Augustin Grellmann", Universidad de Guadalajara y el **Laboratorio de Micología del Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara.

Bajo el patrocinio de los proyectos de investigación:

*** Manejos alternativos de la corteza de pino.**

**** Estudio de los hongos de interés ecológico y económico del Estado de Jalisco.**

Ambos proyectos apoyados por el Departamento de Investigación Científica y Superación Académica (DICSA), Universidad de Guadalajara.

**Esta tesis fue dirigida por
la M. en C. Laura Guzmán Dávalos
y asesorada por
el Ing. Pablo Orozco García y
la Biol. María Olivia Rodríguez Alcántar
todos investigadores de la
Universidad de Guadalajara**

A Claudia y Victor

El autor expresa su agradecimiento a la Universidad de Guadalajara, al Instituto de Madera Celulosa y Papel (IMCyP) y al Instituto de Botánica (IBUG) de la Universidad de Guadalajara por las facilidades otorgadas durante el desarrollo del presente trabajo.

Al personal del departamento forestal del IMCyP, en particular al Ing. Pablo Orozco por su asesoría, así como al personal de servicio social por su colaboración en el trabajo de campo y laboratorio.

Al M. C. Virgilio Zúñiga por las facilidades brindadas en el uso de instalaciones y equipo de laboratorio del departamento de Bióingeniería y Ing. Q. Arturo Camacho por sus valiosas sugerencias.

A la Química Hilda Palacios por la toma de parte del material fotográfico.

Agradezco en especial a la M. en C. Laura Guzmán Dávalos por su apoyo incondicional, así como su paciente revisión de manuscritos.

A la Biol. Olivia Rodríguez por su asesoría y colaboración en la identificación de ejemplares.

Al Biol. L.S. Vázquez por su colaboración en el estudio taxonómico de los ejemplares y sus valiosos e inolvidables consejos.

A Tino Granata Leone por su ayuda en la elaboración de mapas en computadora y sus múltiples asesorías.

Al personal del IBUG por su apoyo y amistad.

Al departamento de Investigación Científica y Superación Académica de la U de G, que bajo el Programa de Motivación a la Investigación para Estudiantes Sobresalientes 1992, apoyaron la realización de este trabajo.

También agradezco al Dr. Gaston Guzmán y a sus colaboradores la ayuda en la identificación de especímenes.

A mis padres por esta pequeña gran herencia.

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	iii
RESUMEN	iv
1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	4
3. OBJETIVOS	7
3.1. HIPOTESIS	7
4. MATERIALES Y METODOS	8
4.1 TRABAJO DE CAMPO	8
4.1.1 Descripción del sitio de colecta	8
4.1.2 Colecta de hongos	10
4.1.3 Colecta de semillas	13
4.2. TRABAJO DE LABORATORIO	13
4.2.1 Aislamiento de los hongos	13
4.2.2 Resiembra de los hongos	14

4.2.3 Germinación de las semillas	14
4.2.4 Síntesis <i>in vitro</i> de la micorriza	15
4.2.5 Identificación de los hongos	16
5. RESULTADOS	18
5.1 AISLAMIENTOS	18
5.2 SINTESIS <i>in vitro</i>	29
6. DISCUSION DE RESULTADOS	34
6.1 AISLAMIENTO	34
6.2 SINTESIS <i>in vitro</i>	37
7. CONCLUSIONES	39
8. RECOMENDACIONES	41
9. LITERATURA CITADA	43

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Mapa No. 1 Localización del área Bosque - Escuela	9
Mapa No. 2 Tipos de vegetación	11
Mapa No. 3 Area de colecta	12
Tabla No. 1. Géneros de hongos ectomicorrízicos colectados en el área del Bosque - Escuela, Tala, Jal	19
Tabla No. 2. Relación de aislamientos obtenidos en comparación con el número de aislamientos efectuados	20
Tabla No. 3. Tiempo que tardó en presentarse micelio después del aislamiento	21
Tabla No. 4. Aislamientos contaminados	22
Tabla No. 5. Síntesis <i>in vitro</i> de la micorriza de algunas especies de hongos con <i>Pinus</i> <i>devoniana</i> y <i>P. oocarpa</i>	30

RESUMEN

Como se ha demostrado en numerosas investigaciones, la introducción de los hongos micorrízicos en los viveros forestales es de gran importancia para el establecimiento de plantaciones. Por esta razón, en el presente trabajo se llevó a cabo la obtención de cepas puras de hongos ectomicorrízicos, así como la síntesis *in vitro* de la micorriza, con la finalidad de iniciar la formación de un cepario y observar la especificidad de los hongos con dos especies de pino.

El trabajo de campo se efectuó en el área Bosque - Escuela del Instituto de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, ubicado en el Bosque La Primavera, Tala, Jalisco, en donde se colectaron 136 ejemplares de hongos ectomicorrízicos, que corresponden a 23 géneros de Basidiomycotina. A partir de los hongos colectados se realizaron 120 aislamientos vegetativos, obteniéndose las cepas de los hongos *Amanita flavoconia*, *A. verna*, *Boletus flammans*, *Boletus* sp. 1, *Boletus* sp. 2, *Boletus* sp. 3, *Clitocybe* sp. aff. *catervata*, *Geastrum* sp., *Phylloporus phaeoxanthus*, *Pisolithus tinctorius*, *Russula subfoetens* var. *grata* y *Tylopilus* aff. *gomezii*.

La síntesis *in vitro* de la micorriza se realizó con las cepas obtenidas, excepto con las cepas de *Tylopilus* aff. *gomezii* y *Geastrum* sp., y las especies nativas *Pinus devoniana* y *P. oocarpa*, para lo cual se utilizó la técnica de bolsas de crecimiento. Se observó la asociación de *Pisolithus tinctorius* con ambas especies de pino, *Amanita verna* y *Boletus* sp. 2 sólo formaron micorriza con *Pinus devoniana*, *Amanita flavoconia* y *Boletus flammans* únicamente se asociaron con *P. oocarpa*. Bajo las condiciones del experimento no se obtuvo la asociación micorrízica de las especies *Boletus* sp. 1, *Boletus* sp. 3, *Clitocybe* sp. aff. *catervata* y *Russula subfoetens* var. *grata* con ninguna de las 2 especies de pino estudiadas.

1. INTRODUCCION:

El hombre siempre ha ejercido gran influencia sobre los recursos naturales y esto es evidente en el recurso forestal, en donde debido al incremento de la población se ha generado una mayor demanda de materias primas, entre las que se encuentra la madera, otros productos forestales y sus derivados. El territorio nacional comprende 196.7 millones de ha, de las cuales el 70%, por las características ecológicas que presenta, se considera como superficie forestal, es decir que debe estar cubierta por algún tipo de vegetación forestal. En México la superficie arbolada con vocación forestal esta disminuyendo paulatinamente, tanto en área, como en contenido de especies útiles, a causa de incendios y enfermedades forestales, pero principalmente por desmontes con fines agrícolas o ganaderos, así como la tala desmedida y la explotación selectiva de algunas especies. Se estima que en los últimos 40 años los bosques han disminuido 200,000 ha por año (Patiño y Vela, 1980).

Garantizar el abasto de productos forestales, ha originado el establecimiento de plantaciones forestales y con este fin la silvicultura se ha inclinado por la utilización de mejores técnicas. Se han desarrollado investigaciones para entender los factores de operación en estos ecosistemas, las cuales proveen nuevas estrategias de manejo y técnicas adecuadas de reforestación.

Para ello se ha tomado en cuenta la importancia de microorganismos benéficos del suelo, particularmente de los hongos micorrízicos, con el fin de favorecer el establecimiento y crecimiento de plántulas en aquellos sitios que por los factores del medio ambiente se dificulta la reforestación (Molina, 1981).

La micorriza es la asociación simbiótica entre las hifas de ciertos hongos (micobionte) y las raíces de las plantas superiores (hospedero) (Alexopoulos y Mims, 1979). La mayoría de las plantas dependen de la estructura micorrízica para sobrevivir en los ecosistemas naturales (Trappe, 1969; Molina y Trappe, 1984).

Los beneficios que esta asociación aporta al hospedero son el incremento de agua y nutrimentos, particularmente de iones poco móviles como el fósforo y el zinc (Molina, 1981); incremento en la tolerancia a sequías, toxinas del suelo, pH extremo, baja y alta temperaturas (Molina y Trappe, 1982); protección contra agentes patógenos (Peña y Valdés, 1973; Trappe y Fogel, 1977; Molina y Trappe, *op. cit.*; Marx, 1991); además de producir enzimas, auxinas, vitaminas, citoquininas y otros componentes que incrementan el tamaño y longevidad de la raíz (Trappe y Fogel, *op. cit.*). El micobionte recibe del hospedero los carbohidratos en forma de azúcares simples y otros compuestos derivados de la fotosíntesis (Molina y Trappe, 1984).

Por la anatomía de la infección se conocen dos tipos principales de micorrizas: la endomicorriza y la ectomicorriza. La endomicorriza se caracteriza porque las hifas crecen de manera intracelular, penetrando en pelos radiculares, células epidérmicas y en células corticales. Las hifas además forman hinchamientos llamados vesículas y ramificaciones diminutas llamadas arbuscúlos dentro de las células del hospedero (Alexopoulos y Mims, 1979). Los hongos que forman endomicorriza son Zygomycetes del orden Endogonales y algunos Basidiomycetes, y se sabe que se encuentran en más del 90% de las plantas vasculares (Powell, 1982).

La ectomicorriza se caracteriza por presentar un manto fúngico cubriendo la raíz y por que las hifas se desarrollan intercelularmente en la región cortical sin penetrar a la endodermis, formando la red de Hartig; además hay modificación de la raíz a nivel de raíces secundarias. El manto fúngico, conectado a hifas o agregaciones hifales coloniza el suelo circundante, logrando una efectiva absorción de nutrimentos. Este tipo de micorriza se encuentra sólo en el 5% de las plantas superiores, predominando en familias de importancia económica, como Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Tiliaceae y Salicaceae; se puede presentar esporádicamente en familias tropicales como Caesalpiniaceae y Dipterocarpaceae. Los hongos ectomicorrízicos son usualmente Basidiomycetes y Ascomycetes, ocasionalmente Zygomycetes (Trappe y Fogel, 1977; Trappe, 1981; Molina y Trappe, 1982; Powell, 1982; Söderström, 1991).

Por la importancia que tiene la ectomicorriza en el establecimiento de plantaciones forestales se han realizado diferentes métodos para su introducción en vivero, ya sea de manera natural o

artificial. El método natural más utilizado para introducir a la ectomicorriza es mediante el uso de suelo forestal. Este sistema tiene grandes inconvenientes, como son el acarreo de enormes volúmenes de suelo, que contiene agentes benéficos pero también patógenos, además de que se desconoce el tipo de micorriza que se introduce y que en ocasiones puede no resultar la apropiada para la especie a inocular. Otra forma natural de introducción es por esporas, especialmente de hongos que contienen gran cantidad como los Gasteromycetes, con varias formas de aplicación, ya sea por aspersión, mezclas con el sustrato, revistiendo semillas, suspendidas en agua de riego o incorporadas en coloides (Molina, 1981; Marx y Kenney, 1982; Powell, 1982; Molina y Trappe, 1982 y 1984; Marx, 1991).

Artificialmente la ectomicorriza se introduce utilizando cultivos puros, que se obtienen a partir de cuerpos fructíferos, raíces micorrizadas, rizomorfos, esclerocios y esporas. Este método es la base para la realización de investigaciones sobre la síntesis micorrízica *in vitro*, que proporcionan la información necesaria para determinar la habilidad de los hongos para formar micorriza y sobre la especificidad hongo - hospedero, así como para realizar la selección adecuada de cepas con el fin de introducir las en vivero (Marx y Kenney, 1982; Molina y Palmer, 1982; Riffle y Maronek, 1982).

2. ANTECEDENTES:

La introducción de especies exóticas o realizar plantaciones forestales en sitios improductivos, ha demostrado la importancia que tiene la micorriza en el desarrollo y establecimiento de las plantas. Kessell en 1927 es el primero en establecer *Pinus radiata* Don. y *P. pinaster* Ait. inoculados con suelo, obteniendo un crecimiento normal de las plántulas. El artículo de Kessell generó otros trabajos con resultados similares. Hatch en 1936 mezcló por primera vez suelo con micelio desarrollado en cultivo puro; inoculó plántulas de *P. strobus* L. con algunas especies de *Boletus*, *Boletinus*, *Lactarius*, etc., seis meses más tarde observó que las plantas eran dos veces mayores en comparación con las no inoculadas. A partir de esta investigación se desarrollaron innumerables plantaciones empleando diferentes especies de hongos y plantas en varias partes del mundo. Moser en 1958 es el primero en producir seriamente inóculo vegetativo de hongos ectomicorrízicos y proporcionó la información básica necesaria para su preparación, que después fue modificada por otros investigadores (Vozzo, 1971; Marx y Kenney, 1982).

Previamente a los trabajos mencionados, ya en 1921 Melin realizaba investigaciones para obtener la síntesis micorrízica *in vitro*, empleando arena como substrato y así definir la naturaleza de los organismos causantes. Esta técnica ha sufrido modificaciones, por ejemplo Hacskaylo en 1953 introdujo el uso de vermiculita y Marx y Zak en 1965 adicionaron turba a la vermiculita. En todos los casos se realizaban empleando matraces con tapón, que tienen el inconveniente del aumento de temperatura y del crecimiento limitado de la plántula, por el alto contenido de bióxido de carbono en el medio. Trappe en 1968 utilizó jarras alimentadoras, permitiendo que la parte aérea de la planta esté fuera del medio. En los métodos mencionados no se puede observar la formación de la síntesis micorrízica, es difícil mantener las condiciones asépticas y se requiere de gran espacio. Más adelante Pachlewska en 1968 empleó agar agua y tiamina en tubos de ensayo; Mason en 1975 modificó esta técnica, adicionándole minerales y glucosa, dando origen a varios trabajos de fisiología y de nutrición, como el realizado por Biggs

y Alexander en 1981. Skinner y Bowen en 1974 y Nyuland en 1981, observaron las modificaciones estructurales de la raíz durante la formación ectomicorrízica, utilizando diversos contenedores de vidrio y suelo estéril. Las condiciones asépticas son usualmente consideradas, pero Mullette en 1976, utilizando jarras Leonard, demostró que no hay diferencia en la formación ectomicorrízica bajo condiciones asépticas y no asépticas (HacsKaylo, 1953; Molina y Palmer, 1982; Fortin et al., 1983; Kähr y Arveby, 1986).

Fue Lalonde en 1979 quién adaptó la técnica de bolsas de crecimiento, antes utilizada en el estudio de la nodulación de legumbres, para la síntesis *in vitro* de micorrizas, según Fortin et al. (1980). Este método facilita la selección de las raíces a inocular y permite la observación directa o bajo microscopio estereoscópico de las etapas del desarrollo de la ectomicorriza y de la fase extramatricial, así como su forma, color y textura. Otras ventajas son que requiere un mínimo de tiempo y espacio para la formación ectomicorrízica y no es necesario la adición de glucosa y vitaminas (Fortin et al., 1983).

En México la manera de introducir la ectomicorriza es por medio de suelo forestal, a pesar de que se han realizado trabajos de investigación sobre la aplicación de otros métodos, éstos no se llevan a cabo en el país por varias razones, principalmente por que el empleo de suelo forestal es un método tradicional, sencillo y barato, en cambio los otros métodos aunque son eficientes son poco conocidos, elevan los costos de la propagación de las plántulas y el proceso es más elaborado. Algunas investigaciones mexicanas sobre la inoculación de plantas de pino con esporas o por medio de cepas puras de diversas especies de hongos son las de Macdonal (1963), Peña y Valdés (1973), Valdés et al. (1983), Estrada y Valdés (1986), entre otros. Estos trabajos se iniciaron utilizando cepas extranjeras, pero en la actualidad ya se emplean cepas nativas, que se encuentran depositadas en algunos ceparios de México.

En el Estado de Jalisco no se cuenta con ninguna colección de cepas de hongos ectomicorrízicos y como en todo el país su introducción en vivero se sigue haciendo por métodos naturales, es por esta razón que la finalidad del presente estudio es obtener el aislamiento de diversas especies de hongos e inducir la síntesis *in vitro*, ya que el aislamiento y estudio

comparativo de diversas especies de hongos, son la base para seleccionar el inoculante específico para cada hospedero y su introducción en vivero. Asimismo la síntesis *in vitro* de la ectomicorriza a partir de cultivos puros de hongos, nos da la información necesaria para comprender la fisiología de la simbiosis, por ejemplo el intercambio mineral y de carbohidratos, la producción de enzimas y hormonas, la interacción celular entre el hongo y el hospedero, la interacción con otros organismos, la respuesta a variaciones de pH, temperatura y humedad, así como la especificidad y compatibilidad entre el micobionte y el hospedero.

3. OBJETIVOS:

1) Iniciar un cepario de hongos ectomicorrízicos con fines de investigación, se obtendrán cepas puras a partir del aislamiento vegetativo de hongos ectomicorrízicos colectados en el Bosque - Escuela del Instituto de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, ubicado en el Bosque La Primavera, Jalisco.

2) Realizar mediante la técnica de bolsas de crecimiento la inducción *in vitro* de la síntesis micorrízica de dos especies de pino nativas y las cepas obtenidas y observar su respuesta.

3.1. HIPOTESIS:

1) Es posible obtener cuando menos el 50 % de los aislamientos de hongos ectomicorrízicos realizados y mantenerlos en condiciones de cultivo.

2) Los hongos aislados se asociarán por lo menos con una de las dos especies de pino inoculadas.

4. MATERIALES Y METODOS:

4.1 TRABAJO DE CAMPO:

4.1.1 Descripción del sitio de colecta:

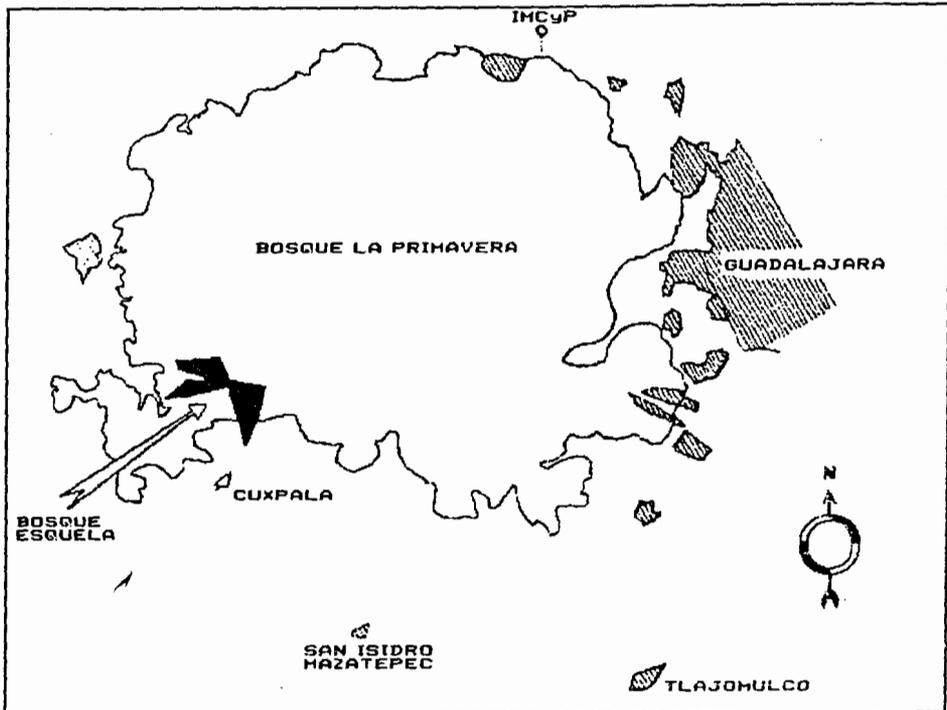
El Bosque - Escuela del Instituto de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, es un predio de 672 ha, en el que se llevan a cabo actividades de investigación. Forma parte de la Sierra La Primavera, en el Municipio de Tala, Jalisco y se encuentra entre los $103^{\circ}37'15''$ y los $103^{\circ}40'08''$ longitud oeste y $20^{\circ}36'26''$ y $20^{\circ}34'34''$ latitud norte (Abud, 1988). La zona se localiza a 3 km al noreste de Cuxpala, 1 km al norte de Laterillas, 4.5 km al noroeste de La Villita y al suroeste del Cerro de San Miguel (mapa no. 1) (Anónimo, 1990; Villavicencio, 1992).

Presenta altitudes que oscilan entre los 1390 y 1700 m.s.n.m., con un clima templado semicálido subhúmedo, con temperatura media anual de 20°C , mínima de 0.5°C y máxima de 37.5°C , con lluvias en verano y una precipitación pluvial anual de 900 mm (Abud, *op. cit.*).

Es parte de un macizo montañoso de origen volcánico y tectónico. Su formación se inició a finales del Mioceno, hace unos 30 millones de años y siguió en el período Cenozoico Superior, en el que continuaron las emisiones volcánicas acumulando material piroclástico, constituido principalmente por rocas ígneas extrusivas de composición ácida, como pómez, riolita, tobas volcánicas y obsidiana (Estrada Faudón, 1974).

La topografía de la zona es muy accidentada, constituida por lomerío, con pendientes de 0 a 25 %, con suelos muy delgados, en donde el proceso erosivo es severo y se presenta en forma de cárcavas, con erosión laminar, encontrándose una pérdida promedio de 229.31 ton/ha/año. El suelo que se localiza en esta área pertenece en su mayoría al regosol dístico (Estrada, 1986). Se encuentran en el área arroyos perennes como Los Letreros, El Taray, Las Presitas y Agua

Mapa No. 1 Localización del área Bosque - Escuela.



Caliente, además de presentar diversos arroyos de temporal (Abud, 1988).

En esta región se presentan 4 tipos de vegetación natural: bosque de pino encino, matorral subtropical, pastizal y vegetación acuática y semiacuática, además de contar con una superficie de uso agrícola, un huerto y vegetación secundaria (mapa no. 2) (Anónimo, 1990). La vegetación dominante es el bosque de pino - encino, en donde el género *Quercus* es el más frecuente y en segundo orden aparece el género *Pinus* (Villavicencio, 1992).

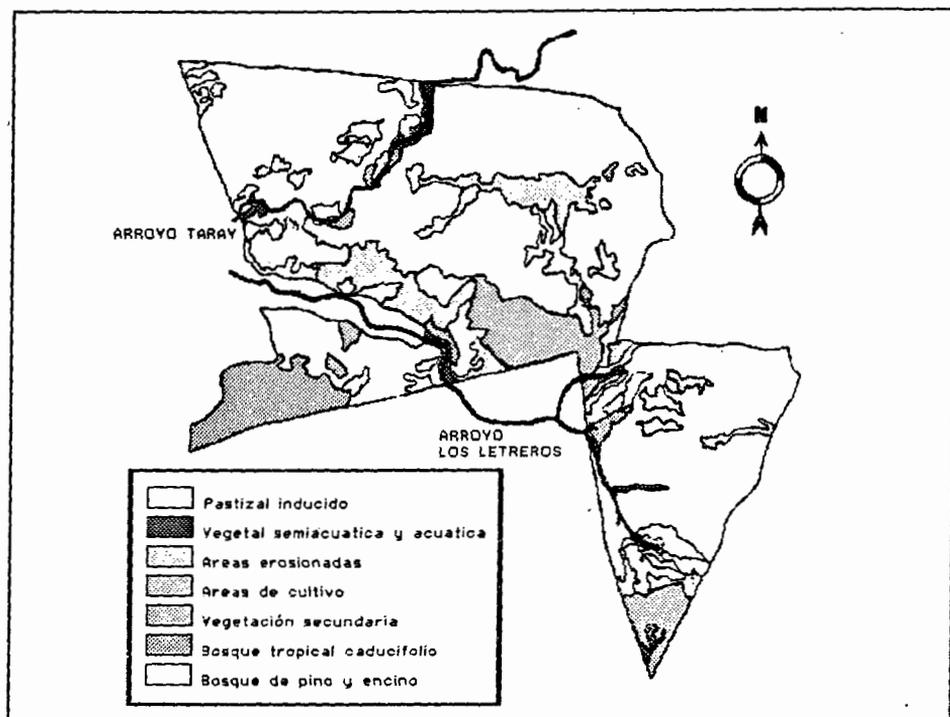
El estudio se realizó en la superficie que comprende el distrito Rancho Nuevo, que se divide en 6 subdistritos y en parte del subdistrito número 1 del distrito El Tepame (Crespo, 1991)(ver mapa no. 3). En esta área se llevan a cabo la mayor parte de las actividades de investigación del Departamento Forestal del Instituto de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara. Se han realizado plantaciones experimentales de las siguientes especies: *Pinus michoacana* Martínez, *P. douglasiana* Martínez, *P. pseudostrobus* Lindl., *P. oocarpa* Schiede, *P. halepensis* Miller, *P. cembroides* Zucc. y *Quercus resinosa* Liemb.

4.1.2 Colecta de hongos:

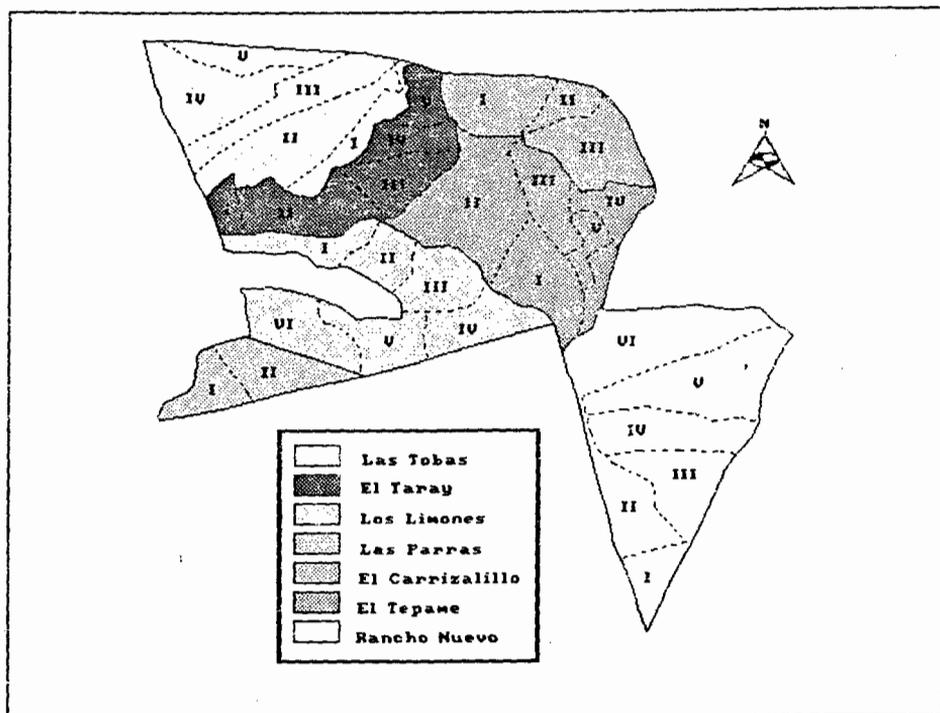
Se realizaron 14 salidas al campo para la colecta de hongos ectomicorrízicos durante la época de lluvia comprendida entre los meses de junio a octubre. Las colectas se realizaron al azar en los sitios donde se presenta bosque de pino encino, tomándose en cuenta la cercanía de los hongos a los árboles y la presencia de raíces típicas micorrizadas. Además se tomaron como base los trabajos de Trappe (1962) y Miller (1982), en donde presentan listados de géneros de hongos micorrízicos.

Los hongos se colectaron con la ayuda de una navaja, tanto carpóforos jóvenes como maduros en buen estado, que se colocaron en bolsas de papel encerado y se transportaron en una canasta al laboratorio. Se registraron en una libreta y se tomaron las características en fresco de valor taxónomico, como color, olor, tamaño, forma de cada una de sus partes, etc., para su

Mapa No. 2 Tipos de vegetación



Mapa No. 3 Area de colecta.



posterior determinación.

4.1.3 Colecta de semillas:

Para la síntesis *in vitro* se utilizaron semillas de las dos especies de pino presentes en el área, *Pinus devoniana* Lindl. y *P. oocarpa* Schiede. Las semillas fueron colectadas durante los meses de diciembre a febrero. Se buscó que para cada una de las especies empleadas las semillas se obtuvieran de un mismo árbol, con el fin de que las características de crecimiento fueran homogéneas. Se extrajeron las semillas de los conos y se almacenaron en frascos de vidrio hasta su uso.

4.2. TRABAJO DE LABORATORIO

Se realizó en el área de Genética Forestal y Viveros del Departamento Forestal del Instituto de Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, excepto el punto de identificación de los hongos (ver punto 4.2.5).

4.2.1 Aislamiento de los hongos:

Se utilizaron los carpóforos jóvenes libres de daños por insectos y el aislamiento se efectuó lo más rápido posible; cuando se hizo más de dos días después de la colecta, los carpóforos se guardaron en refrigeración. Estos se limpiaron de los restos de materia orgánica adherida, se lavaron con una solución de cloruro de mercurio al 1 % y se secaron con una torunda de algodón. Los aislamientos se realizaron bajo condiciones asépticas, 5 por cada especie. Con un bisturí flameado se practicaron cortes del carpóforo, para obtener pequeños cubos de 2 a 5 mm³ de tejido del contexto. Con la ayuda de una aguja de disección los fragmentos se colocaron en tubos de ensayo que contenían medio mineral nutritivo Melin Norkrans modificado (MNM), con pH de 5.5 a 5.7 y 500 ppm de estreptomycin. Finalmente los tubos se incubaron a una temperatura de 24°C (Molina y Palmer, 1982).

Para la descripción de las cepas se tomaron en cuenta las siguientes características: color, textura, densidad, presencia y cantidad de micelio aéreo, forma de crecimiento de la colonia, así como algunas estructuras microscópicas de importancia. En el caso del color se describió de acuerdo a la guía de Kornerup y Wanscher (1989).

4.2.2 Resiembra de los hongos:

Los aislamientos se revisaron tres veces por semana para eliminar tubos contaminados y observar el crecimiento micelial. Los cultivos que presentaron micelio se resembraron dos veces más con el fin de eliminar contaminantes y obtener cepas puras.

Las cepas obtenidas se encuentran depositadas en el área de Genética Forestal y Vivero, del Departamento Forestal, Instituto de Madera, Celulosa y Papel. Las cepas debidamente etiquetadas se conservan en el medio MNM en refrigeración a 5 °C.

4.2.3 Germinación de las semillas:

a) Tratamiento de las semillas.

De acuerdo a lo propuesto por Molina y Palmer (1982) y modificado para este trabajo, las semillas se lavaron con agua corriente durante 90 min., se remojaron en peróxido de hidrógeno al 30 % por 12 hrs., se enjuagaron con abundante agua destilada estéril y se escurrieron para eliminar el exceso de agua.

b) Almácigos.

Los almácigos se prepararon con vermiculita como sustrato. Esta se depositó en bolsas de papel estraza y se esterilizó en autoclave a 18 lbs/pulg² durante 90 min. El sustrato se colocó en charolas de plástico desinfectadas con alcohol al 73 % y se humedeció con agua destilada estéril. Las semillas se sembraron al voleo y encima se colocó una capa fina de sustrato. Las

charolas se cubrieron con papel estroza desinfectado y se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz, temperatura y humedad hasta su germinación. Para evitar agentes contaminantes se realizaron riegos con Captán al 0.5 % (Iglesias, 1986).

4.2.4 Síntesis *in vitro* de la micorriza:

La síntesis *in vitro* se realizó utilizando la técnica de bolsas de crecimiento, descrita por Fortin et al. (1980). La bolsa de crecimiento es de papel poliéster transparente y contiene una pared de papel absorbente. Cada bolsa cuenta con una marca indicando los niveles de la solución nutritiva que se le adiciona. Las bolsas fueron elaboradas especialmente para el trabajo, ya que las bolsas originales, aparte de tener un costo elevado se encuentran descontinuadas en el mercado.

a) Transplante.

Las plántulas se transfirieron a las bolsas de crecimiento cuando presentaron una longitud aproximada de 10 cm. Auxiliados de una espátula acanalada y una asa bacteriológica se colocó su sistema radical en la pared de papel contenida en la bolsa. Se transfirieron 40 plantas de cada especie de pino, para realizar 3 repeticiones por cada hongo seleccionado. Para evitar evaporación y la entrada de contaminantes las bolsas fueron selladas con cinta indicadora de esterilidad.

A cada bolsa se le adicionaron 20 ml de la solución nutritiva Melin Norkrans. Los niveles de la solución nutritiva se ajustaron cada dos días a la marca indicada en la bolsa con agua destilada estéril y se agregaron 5 ml de la solución nutritiva cada dos semanas por medio de una jeringa.

b) Inoculación.

Después de observar la presencia de raíces cortas, las plántulas fueron inoculadas con fragmentos de agar que contenían crecimiento micelial activo de los hongos en estudio. Los fragmentos de agar se cortaron de la colonia dos o tres semanas antes y se encubaron en el medio MNM recién preparado, para la generación de hifas en la periferia. Posteriormente se transfirieron a las bolsas, colocándolos de 3 a 5 mm de distancia de un primordio de raíz corta, según lo recomienda Fortin en 1967, citado por Fortin *et al.* (1980).

c) Incubación.

Las plántulas se mantuvieron bajo condiciones controladas en una cámara de crecimiento, que consta de una caja de paredes de melamina. En su interior presenta 4 focos de luz incandescente, 8 lámparas de luz fluorescente, 2 ventiladores con pared húmeda de celulosa para entrada de aire, 1 extractor de aire, 3 equipos de venoclisis para la conducción del agua a los ventiladores, 1 humidificador, 1 controlador de humedad, 1 higrómetro, 1 termómetro. Todos los sistemas se encuentran conectados a un cronómetro que mantenía las siguientes condiciones: fotoperíodo 14 horas, temperatura de 22 a 24 °C y humedad de 60 %.

d) Comprobación de resultados:

Se realizaron observaciones por medio de una lupa o a través de el microscopio estereoscópico cada tercer día, hasta la formación de la síntesis micorrízica. Para comprobar los resultados se llevaron a cabo cortes de raíz, para observar la presencia de la red de Hartig y el manto fúngico.

4.2.5 Identificación de los hongos:

El material colectado se encuentra depositado debidamente herborizado, fumigado y

etiquetado en el Herbario Micológico del Instituto de Botánica, de la Universidad de Guadalajara. En este Instituto se realizó la determinación del material aislado, contando con la colaboración del personal del Laboratorio de Micología.

Para la identificación macroscópica se tomaron en cuenta las características descritas en fresco y se consultó la obra de Guzmán (1977). El estudio microscópico se basó en las técnicas micológicas usuales para la observación de estructuras de importancia taxonómica, como esporas, basidios, cistidios, etc.; con este fin se utilizaron los reactivos hidróxido de potasio al 3 %, solución de Melzer y rojo congo (Largent *et al.*, 1977). Además para la determinación se empleó material bibliográfico especializado, como el de Romagnesi (1967), Smith y Thiers (1971), Bigelow (1982), Montiel *et al.* (1984), Chinchilla y Pérez Silva (1987), Abraham y Kachroo (1989), Pérez Silva y Herrera (1991) y Singer *et al.* (1991).

5. RESULTADOS

5.1 AISLAMIENTOS

Se colectaron 136 ejemplares, de los cuáles 83 fueron colectados por el autor, 51 por P. Orozco García y 2 por L. Guzmán - Dávalos, que corresponden a 23 géneros de Basidiomycotina (ver tabla no. 1).

Con los hongos colectados se llevaron a cabo 120 aislamientos.

En la mayoría de los casos los aislamientos se realizaron un día posterior a la colecta, a excepción de 3 aislamientos que se efectuaron 4 días después, en donde los hongos permanecieron en refrigeración hasta su aislamiento. Los resultados obtenidos de los aislamientos se describen a continuación. Las tablas 2, 3, 4 y 5 se presentan siguiendo el orden taxonómico indicado en la tabla número 1.

En el 57.5 % de los casos (69 aislamientos) no se observó desarrollo de micelio, como se muestra en la tabla no. 2; específicamente en los géneros *Collybia*, *Cortinarius*, *Craterellus*, *Hydnum*, *Inocybe*, *Strobilomyces* y *Suillus*, en aproximadamente la mitad o más de la mitad de los aislamientos de *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Geastrum*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Russula* y *Tylopilus*.

En el 42.5 % restante (51 aislamientos) se observó desarrollo miceliar de 3 a 24 días después del aislamiento, no importando que los hongos se aislaran 1 o 4 días después de su colecta (tabla no. 3). De los hongos que se obtuvo micelio fueron *Astraeus*, *Boletellus*, *Clitocybe*, *Lepiota*, *Phylloporus*, *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Suillus* y *Tricholoma*, en algunos aislamientos de *Amanita*, *Boletus*, *Cantharellus*, *Geastrum*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Russula* y *Tylopilus* (ver tabla no. 2).

Tabla No. 1. Géneros de hongos ectomicorrízicos colectados en el área del Bosque - Escuela, Tala, Jal.

REINO FUNGI

Eumycota

Basidiomycotina

Holobasidiomycetidae

Aphylliphorales

Cantharellaceae

Cantharellus

Craterellus

Hydnaceae

Hydnum

Agaricales

Tricholomataceae

Clitocybe

Collybia

Laccaria

Tricholoma

Amanitaceae

Amanita

Agaricaceae

Lepiota

Cortinariaceae

Cortinarius

Inocybe

Boletaceae

Boletellus

Boletus

Phylloporus

Strobilomyces

Suillus

Tylopilus

Russulaceae

Lactarius

Russula

Gasteromycetes

Lycoperdales

Geastrum

Sclerodermatales

Astraeus

Pisolithus

Scleroderma

Tabla No. 2. Relación de aislamientos obtenidos en comparación con el número de aislamientos efectuados.

GENEROS	NUMERO DE AISLAMIENTOS	DESARROLLO DE MICELIO	MICELIO AUSENTE
<i>Cantharellus</i>	2	1	1
<i>Craterellus</i>	1	-	1
<i>Hydnum</i>	1	-	1
<i>Clitocybe</i>	1	1	-
<i>Collybia</i>	4	-	4
<i>Laccaria</i>	21	3	18
<i>Tricholoma</i>	1	1	-
<i>Amanita</i>	32	13	19
<i>Lepiota</i>	1	1	-
<i>Cortinarius</i>	3	-	3
<i>Inocybe</i>	1	-	1
<i>Boletellus</i>	2	2	-
<i>Boletus</i>	26	15	11
<i>Phylloporus</i>	1	1	-
<i>Strobilomyces</i>	1	-	1
<i>Suillus</i>	1	-	1
<i>Tylopilus</i>	5	2	3
<i>Lactarius</i>	3	2	1
<i>Russula</i>	9	5	4
<i>Geastrum</i>	2	1	1
<i>Astraeus</i>	1	1	-
<i>Pisolithus</i>	1	1	-
<i>Scleroderma</i>	1	1	-

Tabla No. 3. Tiempo que tardó en presentarse micelio después del aislamiento.

GENEROS	APARICION DE MICELIO/DIAS
<i>Cantharellus</i>	5
<i>Clitocybe</i>	3
<i>Laccaria</i>	3 - 5
<i>Tricholoma</i>	3
<i>Amanita</i>	3 - 12
<i>Lepiota</i>	4
<i>Boletellus</i>	5 - 12
<i>Boletus</i>	3 - 24
<i>Phylloporus</i>	12
<i>Suillus</i>	3
<i>Tylopilus</i>	6 - 12
<i>Lactarius</i>	3
<i>Russula</i>	5 - 17
<i>Geastrum</i>	3
<i>Astraeus</i>	4
<i>Pisolithus</i>	4
<i>Scleroderma</i>	4

El principal problema que se presentó en los aislamientos fue la presencia de agentes contaminantes, como hongos y/o bacterias, que por tener un desarrollo más rápido invadieron el medio de cultivo y provocaron el difícil o nulo aislamiento de las cepas, específicamente de ejemplares de los géneros siguientes: *Astraeus*, *Cantharellus*, *Cortinarius*, *Geastrum*, *Hydnum*, *Laccaria* y *Suillus*, en algunos ejemplares de *Amanita*, *Boletellus*, *Boletus*, *Collybia*, *Lactarius*, *Russula*, *Scleroderma* y *Tylopilus* (ver tabla no. 4).

Tabla No. 4. Aislamientos contaminados.

GENEROS	NO. DE AISLAMIENTOS	AISLAMIENTOS CONTAMINADOS
<i>Cantharellus</i>	2	2
<i>Hydnum</i>	1	1
<i>Collybia</i>	4	1
<i>Laccaria</i>	21	13
<i>Amanita</i>	32	5
<i>Cortinarius</i>	3	2
<i>Boletellus</i>	2	1
<i>Boletus</i>	26	4
<i>Suillus</i>	1	1
<i>Tylopilus</i>	5	2
<i>Lactarius</i>	3	2
<i>Russula</i>	9	1
<i>Astraeus</i>	1	1
<i>Gastrum</i>	2	2
<i>Scleroderma</i>	1	1

En algunos cultivos se observó desarrollo solamente sobre el tejido, nunca sobre el agar, como fue el caso de algunos especímenes de *Boletus*. En ocasiones al realizar la segunda o tercer resiembra el crecimiento miceliar se detuvo, como sucedió con ejemplares de *Amanita*, *Lactarius*, *Lepiota*, *Russula*, *Scleroderma*, *Suillus* y *Tricholoma*.

Finalmente se obtuvieron 14 cepas, que fueron las que crecieron bajo las condiciones de cultivo dadas y presentaron mayor vigor en su desarrollo, las que se desarrollaron después de resembrarlas por varias ocasiones y las que se aislaron sin problemas de contaminantes. Las especies de las que se logró obtener cepa (s) se indican a continuación; entre paréntesis se señala el número de cepas para cada especie.

Amanita flavoconia Atk. (2)

A. verna (Bull. : Fr.) Roques (1)

Boletus flammans Dick & Snell (1)

Boletus sp. 1 (1)

Boletus sp. 2 (1)

Boletus sp. 3 (1)

Clitocybe sp. aff. *catervata* Bigelow (1)

Geastrum sp. (1)

Phylloporus phaeoxanthus Sing. & Gómez (1)

Pisolithus tinctorius (Mich. : Pers.)Coker & Couch. (1)

Russula subfoetens var. *grata* (Britz.)Romagn. (1)

Tylopilus aff. *gomezii* Sing. (2)

Los ejemplares de *Boletus* sp. 1 y *Geastrum* sp. no se logró su plena identificación por tratarse de material inmaduro; en el caso de los ejemplares de *Boletus* sp. 2 y 3 su identificación se encuentra en proceso.

Enseguida se hace una descripción de las cepas de hongos ectomicorrízicos aislados siguiendo el orden taxonómico.

AGARICALES

Amanita flavoconia

Presencia de micelio a los 5 días de su aislamiento. Colonia blanquecino amarillenta (4A2), bordes blanquecino naranja (5A2), naranja grisáceo claro (5A3) o gris naranja claro (5B3), parte inferior blanquecino amarillento (4A3) a naranja pálido (5A4), densidad abundante, micelio aéreo ausente, adherido al agar y entre el agar, textura lanosa, plumosa, margen ceroso, crecimiento radiado. Hifas de 1.6 - 3.2 μm de diámetro, con pared delgada, lisas, ramificadas, septadas, con falsas fibulas, hialinas, con contenido refringente.

A. verna

Presencia de micelio a los 10 días de su aislamiento. Colonia blanquecino amarillenta (3A2), densidad regular, micelio aéreo escaso, íntimamente adherido al agar, textura condensado en el centro, plumoso hacia el borde, formando agregaciones hifales, crecimiento esparcido. Hifas de 3.2 - 8.0 μm de diámetro, con pared delgada, lisas, infladas, septadas, hialinas, con contenido refringente.

Boletus flammans

Presencia de micelio a los 5 días de su aislamiento. Colonia castaño oscuro (6F5), densidad abundante, micelio aéreo regular, además se observa crecimiento entre el agar, textura algodonosa en el centro, plumoso en el borde, crecimiento radiado. Hifas de 1.6 - 2.8 μm de diámetro, septadas, hialinas, con gránulos refringentes, en algunos casos formando cordones miceliarios con las hifas acomodadas en espiral. Mancha el agar de color café grisáceo rojizo (6F8) a café rosado (6E8) finalmente café mostaza (5E6), que se pierde con las resiembras.

Boletus sp. 1

Presencia de micelio a los 3 días del aislamiento. Colonia de color carne (6B3), blanquecino anaranjado (5A2), gris con leves tonos naranjas (5B2), parte inferior de color café caramelo (6C6), densidad abundante, micelio aéreo regular, textura algodonosa, crecimiento radiado. Hifas de 2.4 - 5.6 μm de diámetro, con pared subgruesa, lisas, ramificadas, septadas, algunas hifas infladas, hialinas.

Boletus sp. 2

Presencia de micelio a los 10 días del aislamiento. Colonia blanquecina hacia el centro (3A2), gris naranja claro (5B2,5B3) hacia la periferia, densidad regular, micelio aéreo regular, crece la mayor parte sobre el agar, textura algodonosa, crecimiento anillado. Hifas de 1.6 - 5.2

μm de diámetro, con pared lisa, septadas, con partes infladas intercaladas. Mancha el agar de amarillo ocre (5C6).

Boletus sp. 3

Presencia de micelio a los 4 días de su aislamiento. Colonia blanquecina (4A2) a gris naranja (6B2), parte inferior de color café bronceado (6E6) a café oscuro (5F6), densidad abundante, micelio aéreo regular, crece sobre el agar, textura algodonosa, crecimiento radiado. Hifas de 1.6 - 4.8 μm de diámetro, con pared lisa, ramificadas, septadas, no presenta fibulas, en cepas jóvenes se presentan gotas de exudado de color amarillento.

Clitocybe sp. aff. catervata

Presencia del micelio a los 3 días del aislamiento. Colonia en el centro naranja grisáceo (5B5), margen más claro (5B4), densidad regular, micelio aéreo escaso, poco micelio dentro del medio de cultivo, textura cerosa plumosa, crecimiento radiado. Hifas de 1.6- 2.8 μm de diámetro, con pared delgada, ramificadas, septadas, con fibulas, hialinas, con incrustaciones refringentes.

Phylloporus phaeoxanthus

Presencia de micelio a los 12 días del aislamiento. Colonia blanquecina (2A2) en cepas jóvenes, en cepas viejas en el centro de color café oscuro (7F6) y margen café oro claro (5D6), densidad regular, micelio aéreo escaso, adherido al agar y entre el medio, textura aterciopelada, crecimiento anillado. Hifas de 1.6 - 2.8 μm de diámetro, con pared lisa, septadas, con contenido refringente. Las cepas viejas manchan el agar de amarillo naranja claro (4B7).

Russula subfoetens var. *grata*

Presencia de micelio a los 17 días del aislamiento. Colonia blanquecina cuando joven, en cepas viejas naranja pálido (5A4), naranja grisáceo claro (5B4), naranja café grisáceo pálido (5C4), densidad escasa en cepas jóvenes, regular en cepas viejas, micelio aéreo escaso, muy unido al agar, además crece bajo el medio de cultivo, crecimiento irregular, escaso, y muy lento. Hifas de 2.4 - 4.8 μm de diámetro, con pared lisa, ramificadas, septadas, hialinas, con contenido refringente a manera de bandas.

Tylopilus aff. *gomezii*

Presencia de micelio de 5 a 12 días de su aislamiento. Colonia naranja café con tono rosado (5C4), bordes de color café mostaza (5D8), parte inferior de color café oscuro con tonos rojizos (7F8), densidad abundante, micelio aéreo regular, crece sobre y entre el agar, textura

lanosa, al centro micelio muy compacto, más esparcido y poco denso hacia el margen, crecimiento irregular. Hifas de 1.6 - 4.0 μm , con pared subgruesa, hifas delgadas, con contenido verde oliváceo, con incrustaciones refringentes, en ocasiones formando cordones miceliares.

GASTEROMYCETES

Geastrum sp.

Presencia de micelio a los 4 días del aislamiento. Colonia de color café oscuro con tonos oliváceos (5F8), parte inferior de color café naranja oscuro (6F8) a café oscuro con tonos rojizos (7F8), densidad abundante, micelio aéreo abundante, textura lanosa en el centro, con numerosas agregaciones hifales en el margen, crecimiento esparcido. Hifas de 1.6 - 5.6 μm de diámetro, con pared lisa, ramificadas, septadas, con fibulas, en su mayoría hialinas, algunas hifas con contenido homogéneo de color café amarillento claro, con escasas granulaciones refringentes.

Pisolithus tinctorius

Presencia del micelio a los 4 días del aislamiento. Colonia de color café amarillento (5E8) o café óxido (6E8), parte inferior café oscuro con tonos rojizos (7F8), densidad abundante, micelio aéreo abundante, textura lanosa en el centro, aborlada en el margen,

crecimiento esparcido. Hifas de 3.2 - 6.4 μm de diámetro, con pared subgruesa, ramificadas, septadas, con fíbulas, hialinas o de color café amarillento muy claro, algunas hifas con incrustaciones irregulares de pigmento. Mancha el agar de color café amarillento claro (5E8) a café naranja rosado (6E7).

5.2 SINTESIS *in vitro*

Para realizar la síntesis *in vitro* se emplearon únicamente las cepas de *Amanita flavoconia*, *A. verna*, *Boletus flammans*, *Boletus* sp. 1, *Boletus* sp. 2, *Boletus* sp. 3, *Clitocybe* sp. aff. *catervata*, *Phylloporus phaeoxanthus*, *Pisolithus tinctorius* y *Russula subfoetens* var. *grata*.

La inoculación de ambas especies de *Pinus* se hizo conforme a la velocidad de desarrollo de las colonias, ya que se observó que a medida que las cepas se sembraban perdían vigor en su crecimiento. Las cepas con mayor vigor y crecimiento rápido fueron *Amanita flavoconia*, *Phylloporus phaeoxanthus* y *Pisolithus tinctorius*, que presentaron micelio activo a los 16 días de su resiembra y *Boletus* sp. 1 que se inoculó 20 días después. Por otro lado, *Boletus flammans*, *Boletus* sp. 3, *Clitocybe* sp. aff. *catervata* y *Russula subfoetens* var. *grata* se inocularon después de un mes o más, *Amanita verna* y *Boletus* sp. 2 más de dos meses después.

La observación directa de los resultados se realizó durante 3 a 5 meses aproximadamente y no en todos los tratamientos debido a la presencia de contaminantes como bacterias, hongos

y ácaros que dificultaron el proceso de observación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla no. 5.

Tabla No. 5. Síntesis *in vitro* de la micorriza de algunas especies de hongos con *Pinus devoniana* y *P. oocarpa*.

	<i>Pinus devoniana</i>	<i>Pinus oocarpa</i>
<i>Clitocybe</i> sp. aff. <i>catervata</i>	-	-
<i>Amanita flavoconia</i>	-	+
<i>Amanita verna</i>	+	-
<i>Boletus flammans</i>	-	+
<i>Boletus</i> sp. 1	-	-
<i>Boletus</i> sp. 2	+	-
<i>Boletus</i> sp. 3	-	-
<i>Phylloporus phaeoxanthus</i>	-	-
<i>Russula subfoetens</i> var. <i>grata</i>	-	-
<i>Pisolithus tinctorius</i>	+	+

Bajo las condiciones del experimento, no se obtuvo la síntesis micorrízica en ninguno de las dos especies de *Pinus* con las cepas de *Boletus* sp. 1, *Boletus* sp. 3, *Clitocybe* sp. aff. *catervata*, *Phylloporus phaeoxanthus* y *Russula subfoetens* var. *grata*. Solamente el hongo *Pisolithus tinctorius* se asoció con ambas especies de *Pinus*. Se observó que los hongos *Amanita verna* y *Boletus* sp. 2 formaron la micorriza con *Pinus devoniana*. Los hongos que se asociaron con *Pinus oocarpa* únicamente fueron *Amanita flavoconia* y *Boletus flammans*. El desarrollo de estas simbiosis se describen a continuación:

Clitocybe sp. aff. *catervata* con ambas especies de *Pinus* no se observó asociación; se presentó poco desarrollo de micelio en las bolsas de crecimiento y aunque se observaron hifas rodeando la raíz, a través del microscopio estereoscópico se apreciaron pelos absorbentes y en corte se comprobó la ausencia de la red de Hartig y del manto fúngico.

En la asociación de *Amanita flavoconia* con *Pinus devoniana* no se observó el desarrollo de micelio, en cambio con *P. oocarpa* la simbiosis fue clara después de 20 días de la inoculación. Inició con el desarrollo de hifas a partir de los discos de agar, después el micelio se extendió hacia las raíces, se observó un cambio de color en ellas, a más blanquecinas y se desarrollaron abundantes raíces típicas micorrizadas. En corte se pudo apreciar una capa densa de micelio formando el manto fúngico y la red de Hartig. En esta asociación fue en donde se presentó mayor desarrollo del micelio en la bolsa, así como también mayor número de raíces micorrizadas.

La asociación de *Amanita verna* con *P. devoniana* se observó a los 72 días de la inoculación, la simbiosis no fue tan evidente como con *A. flavoconia*; se presentó manto fúngico blanquecino, laxo y delgado cubriendo la raíz y algunas raíces bifurcadas, no se observaron pelos radicales. En el corte se apreció el manto fúngico y la red de Hartig poco desarrollados. En la asociación con *P. oocarpa* no se observó presencia de micelio.

Boletus flammans no se desarrolló con *P. devoniana*, en cambio con *P. oocarpa* la asociación se observó a los 15 días de la inoculación. Se inició con la liberación de pigmento

color café grisáceo rojizo a café mostaza, las raíces próximas a los discos de agar presentaron bifurcaciones, pero el micelio no tuvo mayor desarrollo, sólo se asoció a las raíces cercanas. En el corte se pudo apreciar el manto fúngico y la red de Hartig.

En el caso de *Boletus* sp. 1 en ambas especies de pino se observó desarrollo de micelio a partir de los trozos de agar, pero al realizar observaciones con el microscopio se comprobó que las raíces presentaron pelos absorbentes y no formaron manto fúngico, además fue evidente la formación de esclerocios adheridos a diversas partes de la raíz y la pared de papel de la bolsa de crecimiento.

Boletus sp. 2 con *P. devoniana* formó abundante micelio blanquecino que cubrió la raíz y se presentaron bifurcaciones en las raíces secundarias; en el corte se observó el manto fúngico no muy denso y la red de Hartig. A pesar de que esta asociación no fue tan evidente como la de *A. flavoconia* y *P. oocarpa*, fue el hongo que mejor se asoció con *P. devoniana*. En cambio con *P. oocarpa* el micelio no se desarrolló.

Boletus sp. 3 con *P. devoniana* no presentó desarrollo de micelio en las bolsas de crecimiento; con *P. oocarpa* se observó desarrollo de micelio y algunas bifurcaciones, pero no se formó la simbiosis, ya que las raíces presentaban pelos absorbentes y no hubo formación del manto fúngico, ni de la red de Hartig.

Con *Phylloporus phaeoxanthus* aunque se presentó desarrollo de micelio en las bolsas de ambas especies de pinos, en los cortes se observó la presencia de pelos absorbentes y la ausencia de la red de Hartig y del manto fúngico.

En relación con *Russula subfoetens* var. *grata* en ninguno de los pinos se observó el desarrollo de micelio en las bolsas de crecimiento.

En *Pisolithus tinctorius* se observó la simbiosis a partir de los 10 días de la inoculación, inició en *Pinus devoniana* con la liberación de abundante pigmento color café amarillento, aunque el micelio fue escaso y sólo se asoció a las raíces próximas a los discos de agar; en cambio con *P. oocarpa* se observó menor liberación de pigmento y el crecimiento del micelio fue más extenso. Al corte se observó el manto fúngico laxo, las hifas con fíbulas y la red de Hartig en ambas especies de pino.

6. DISCUSION DE RESULTADOS

6.1 AISLAMIENTO

El cultivo de los hongos ectomicorrízicos es comúnmente realizado a partir de aislamientos vegetativos, debido a que de esta forma se facilita la identificación del hongo en cuestión, además el proceso es relativamente sencillo. De los hongos colectados la mayoría pertenecían a los géneros citados como micorrízicos, aunque también se encontraron algunos ejemplares de otros hongos como *Galerina*, *Mycena* y *Omphalina*, que al revisar los trabajos de Trappe (1962) y Miller (1982) fueron descartados al comprobar que no los consideran como micorrízicos.

Los aislamientos se realizaron en su mayoría un día después de la colecta, ya que se observó que en algunas géneros con especies pequeñas como *Cantharellus* y *Laccaria*, se deshidratan rápidamente, por lo que es conveniente aislarlos lo más pronto posible. Se intentó realizar el aislamiento en campo, pero éstos no prosperaron a causa del ataque de agentes contaminantes. También se observó que los hongos carnosos son atacados por insectos y se descomponen fácilmente, por ello se recomienda su aislamiento inmediato, aunque se comprobó que los hongos aislados después de 4 días de la colecta y que permanecieron en refrigeración respondieron favorablemente. Por ejemplo, se obtuvo micelio de 2 de los 3 aislamientos en el caso de *Amanita alexandrii* Guzmán y *Scleroderma texense* Berk. en un período de tiempo

corto, 2 y 3 días respectivamente, después de que los cuerpos fructíferos permanecieron en refrigeración por 4 días. Molina y Palmer (1982) recomiendan evitar refrigerar los especímenes y si no se puede evitar hacerlo por poco tiempo y mantenerlos a una temperatura de 3 a 5 °C.

De los aislamientos realizados sólo se obtuvo respuesta o desarrollo en el 42.5 %, debido probablemente a la falta o presencia en baja cantidad de algunos nutrimentos en el medio de cultivo que se empleó, ya que los requerimientos nutricionales para cada micobionte son diferentes y en muchos de ellos son desconocidos, así como las sustancias aportadas por el hospedero. Algunos géneros como *Amanita*, *Astraeus*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Scleroderma*, *Suillus* y *Tricholoma*, entre otros se menciona que son fácilmente aislados, en cambio hay taxa como *Russula*, en que sólo se pueden cultivar algunas especies; también hay géneros que no crecen en cultivos puros y sólo se establece la relación del micobionte con el hospedero, hecho que únicamente se ha detectado a través de la observación en campo (Miller, 1982; Molina y Palmer, 1982).

Como se comprobó en este trabajo la obtención y mantenimiento de los cultivos no es fácil, ya que para ello se requiere trabajar bajo condiciones estrictas de asepsia al realizar los aislamientos y resiembras. En muchas ocasiones los agentes contaminantes intervienen como factor decisivo en el fracaso del establecimiento de un cepario, por ejemplo los géneros *Cantharellus* y *Laccaria* son difíciles de obtener, como lo señalan Daniell y Fries (1990) y Palmer (1971), ya que se han encontrado bacterias creciendo en el tejido de los hongos. Por otro lado, hongos de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium*, entre otros son comúnmente

encontrados como contaminantes en cultivos. Para ello Palmer (1971) recomendó el empleo algunos antibióticos en bajas concentraciones en el medio de cultivo, para reducir el ataque de contaminantes.

Al realizar resiembras es frecuente observar que algunos cultivos que crecen prósperamente se pierden o su vigor de crecimiento disminuye. Marx y Daniel en 1976 citado por Molina y Palmer (1982) establecen que algunos hongos ectomicorrízicos cambian sus hábitos de crecimiento y pueden perder su habilidad para formar micorrizas después de algún tiempo de estar almacenados.

Por otro lado, se observó que de los aislamientos de carpóforos jóvenes se obtiene mejor respuesta, pero éstos sólo se deben utilizar cuando se tengan ejemplares maduros, ya que es muy importante lograr su identificación para futuros trabajos de investigación, como en el caso de *Boletus* sp. 1 y *Geastrum* sp., en donde por ser carpóforos inmaduros no se logró su determinación.

Aunque los hongos estudiados se desarrollaron en medio Melin Norkrans Modificado, es conveniente realizar resiembras en otros medios de cultivo y bajo otras condiciones de pH y temperatura, para observar su comportamiento. En este medio la cepa de *Russula subfoetens* var. *grata* crece exageradamente lento, por lo que sería recomendable probar su crecimiento en otros medios de cultivo.

Como se observó en la tabla no. 3 los hongos aislados presentaron desarrollo del micelio a partir del día 3 hasta el 24, no interesando el género. En la literatura se registra desarrollo después de 4 a 7 días, aunque hay informes que puede llevarse de 2 a 6 semanas para mostrar algún tipo de crecimiento (Molina y Palmer, 1982).

6.2 SINTESIS *in vitro*

Cada año el listado de las asociaciones micorrízicas planta - hongo se hace más numeroso, en donde se incluyen nuevas especies, géneros, familias y órdenes (Zak, 1971). Desafortunadamente la mayoría de estos informes se basan en observaciones preliminares de los hongos y de las plantas, que consisten básicamente en detectar el grado de incidencia de los carpóforos con una especie determinada de árbol y usarlos como indicio de una relación micorrízica (Palm y Stewart, 1984). Pocos de estos listados se basan en métodos experimentales mediante la síntesis *in vitro*, que nos ofrece ventajas como el conocer la habilidad de los hongos para formar ectomicorrizas bajo ciertas condiciones y así poder inferir cual es la relación más apta para introducirla en determinado sitio de plantación.

En el presente estudio, bajo las condiciones dadas, se obtuvo un sólo caso en donde un hongo se asoció con las 2 especies de pino y este hongo fue *Pisolithus tinctorius*. Los hongos *Amanita flavoconia* y *Boletus flammans* se asociaron a *Pinus oocarpa* y los hongos *A. verna* y *Boletus* sp. 2 con *P. devoniana*. De estas asociaciones la de *A. flavoconia* con *P. oocarpa* y *Boletus* sp. 2 con *P. devoniana* fueron las de mayor éxito, ya que presentaron un desarrollo

importante de micelio, así como gran cantidad de raíces micorrizadas; en cambio con *A. verna*, *B. flammans* y *P. tinctorius* se obtuvo una débil respuesta a la asociación. De los hongos *Boletus* sp. 1, *Boletus* sp 3, *Clitocybe* sp. aff. *catervata* y *Phylloporus phaeoxanthus* se presentó algún grado de desarrollo de micelio en la bolsa, pero no hubo asociación con ninguna de las dos especies de pino. La única especie que no presentó desarrollo de micelio en ninguno de los pinos estudiados fue *Russula subfoetens* var. *grata*.

Los resultados negativos obtenidos no indican que los hongos que se inocularon no sean hongos micorrízicos o que no se puedan asociar con alguna de las dos especies de pino probadas, ya que según Godbout y Fortin (1984) se ha demostrado que algunos hongos ectomicorrízicos no se desarrollan en las bolsas de crecimiento, además Dennis (1985) mencionó que factores como pH, temperatura y humedad son importantes para el desarrollo y establecimiento de la simbiosis.

7. CONCLUSIONES

1. No todos los hongos se desarrollan en un medio de cultivo determinado; la composición del medio, así como las condiciones de pH y temperatura son fundamentales para el desarrollo de las colonias.

2. Cada especie presentó una respuesta diferente en su desarrollo en el medio de cultivo, así como en la resiembra, almacén y pruebas de síntesis micorrízica, pero en general todas las cepas son delicadas y deben de tratarse con sumo cuidado.

3. Algunos de los factores fundamentales que limitan el establecimiento de un cepario son el ataque por agentes contaminantes, así como también el desconocimiento de los requerimientos nutricionales de cada hongo.

4. Aunque todas las especies empleadas en la síntesis *in vitro* se desarrollan en bosque de pino encino y muchas de ellas son registradas en la literatura de bosque de pino, no todas se asociaron a las especies de pino inoculadas, a pesar de que estas especies están presentes en la zona de la que fueron colectados los hongos.

5. La cepa del hongo *Amanita flavoconia* fue la que mejor se desarrolló con *Pinus oocarpa* y la de *Boletus* sp. 2 con *P. devoniana*.

6. La respuesta obtenida por las cepas empleadas en la síntesis *in vitro* puede ser diferente si las condiciones de pH, temperatura y humedad, así como el contenido y calidad de los nutrimentos en el medio de cultivo se modifican.

8. RECOMENDACIONES

1. Efectuar consultas previas en el herbario micológico respectivo, para familiarizarse con las especies existentes en la zona de estudio y trabajar con las más conocidas.

2. Realizar más de 10 aislamientos por cada hongo, además de preferencia de unas cuantas especies en varias ocasiones, ya que esto permitirá hacer comparaciones con cepas de una sola especie y con varias especies entre sí.

3. Aislar los hongos en viales, ya que dan un mayor control de los contaminantes y reducen el gasto de medio de cultivo y espacio.

4. Realizar aislamientos de carpóforos inmaduros únicamente cuando se cuente con ejemplares adultos.

5. Hacer aislamientos en diversos medios de cultivo, variando pH y temperatura o establecer mediciones de pH y temperatura en los sitios de colecta y con estos datos establecer intervalos de crecimiento de los hongos y los medios de cultivos.

6. Trabajar en el lugar apropiado con las condiciones de asepsia requeridas, ya que de esto depende el éxito o fracaso de este tipo de estudios.

7. La técnica bolsas de crecimiento empleada en la síntesis *in vitro* es muy útil para este tipo de estudios, aunque es necesario buscar otros materiales, ya que el papel poliéster con que se elaboraron es escaso en el mercado y la elaboración de las bolsas, especialmente el sellado, resulta complicado.

8. Debido a la complejidad de las condiciones de los sitios de plantación se sugiere realizar estudios *in vitro* bajo condiciones similares, así como estudios experimentales en condiciones de vivero, invernadero y campo.

9. LITERATURA CITADA:

- ✓ Abraham, S.P. y J.L. Kachroo, 1989. Larger fungi from Kashmir, India, VI. The genus Amanita. Micol. Neotrop. Apl. 2: 41 - 45.
- ✓ Abud, G.A., 1988. Aspectos ecológicos y taxonómicos de insectos (Orden Lepidóptera e Himenóptera) en el Bosque - Escuela de la Sierra de La Primavera. 'Amatl, Bol. dif. Inst. Madera, Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, México 2 (4): 12 - 21.
- Alexopoulos, C.J. y C.W. Mims, 1979. Introductory Mycology. Wiley, Nueva York.
- ✓ Anónimo, 1990. Bosque Escuela. Instituto de Madera Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara. Folleto, Guadalajara.
- Bigelow, H.E., 1982. North American species of Clitocybe. Part I. Nova Hedwigia 72. Cramer, Vaduz.
- Chinchilla, E.F. y E. Pérez - Silva, 1987. Consideración taxonómica sobre Amanita verna (Agaricales) de México. Serie Botánica, No. Unico, Instituto de Biología, UNAM, México.

- ✓ Crespo, G.M., 1991. Mapa de distritos y subdistritos del Bosque Escuela. Instituto de Madera Celulosa y Papel, Universidad de Guadalajara, (inédito).
- Daniell, E. y N. Fries, 1990. Methods for isolation of *Cantharellus* species, and the synthesis of ectomycorrhizae whit *Picea Abies*. Mycotaxon 38: 141 - 148.
- Dennis, J.J., 1985. Effect of pH and temperature on *in vitro* growth of ectomicorrhizal fungi. Can. Fores. Serv., Canada.
- Estrada, G., 1986. Investigaciones de suelo para evaluación de sitios mediante factores abióticos en el Bosque - Escuela. Tesis Profesional. Facultad de Agricultura, Universidad de Guadalajara.
- Estrada Faudón, E., 1974. Características de la región denominada "La Primavera" del Estado de Jalisco. Bol. Inst. Bot., Epoca 1 (3): 8 - 24.
- ✓ Estrada, A. y M. Valdés, 1986. El crecimiento y la micorrización de plántulas de pino inoculadas con *Pisolithus tinctorius* en semillero o envase de transplante. Biótica 11: 137 - 142.
- Fortin, J.A., Y. Piché y M. Lalonde, 1980. Technique for the observation of early morphological changes during ectomycorrhiza formation. Can. J. Bot. 58: 361 - 365.

✓ Fortin, J.A., Y. Piché y C. Godbout, 1983. Methods of synthesizing ectomycorrhizas and their effect on mycorrhizal development. *Plant. & Soil* 71: 275 - 284.

Godbout, C. y J.A. Fortin, 1984. Synthesized ectomycorrhizal of aspen: fungal genus level of structural characterization. *Can. J. Bot.* 63: 252 - 262.

✓ Guzmán, G., 1977. Identificación de los hongos. Limusa, México.

✓ Hacskeylo, E., 1953. Pure culture syntheses of pine mycorrhizae in terra - lite. *Mycologia* 45 (6): 971 - 975.

✓ Iglesias, G.L., 1986. Efecto de los fungicidas en la micorrización de pinos con Pisolithus tinctorius (Pers.) Coker & Couch. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua.

✓ Kähr, M. y A.S. Arveby, 1986. A method for establishing ectomycorrhiza on conifer seedlings in steady - state conditions of nutrition. *Physiol. Plant.* 67: 333 - 339.

✓ Kornerup, A. y J.H. Wanscher, 1989. Methuen handbook of colour. Methuen, Londres.

✓ Largent, D., D. Johnson y R. Watling, 1977. How to identify mushrooms to genus III: Microscopic Features. Mad River Press, Eureka.

- ✓ Macdonal, M., 1963. Formaciones micorrícicas en pinos de semillero (Pinus montezumae Lamb. y P. patula Schl. et Cham). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales S.A.G. Bol. Tec. 9: 1 - 44.
- Marx, D.H., 1991. The practical significance of ectomycorrhizae in forest establishment, in: Ecophysiology of ectomycorrhizae of forest trees. Marcus Wallenberg Foundation Simposia Proceedings 7: 54 - 90.
- ✓ Marx, D.H. y D.S. Kenney, 1982. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum, in: Schenck, N.C. (ed.). Methods and principles of mycorrhizal research. Amer. Phyt. Soc., St. Paul.
- Miller Jr., O.K., 1982. Taxonomy of ecto - and ectendomycorrhizal fungi, in: Schenck, N.C. (ed.) Methods and principles of mycorrhizal research. Amer. Phyt. Soc., St. Paul.
- Molina, R., 1981. Mycorrhizal inoculation and its potential impact on seedlings survival and growth in southwest Oregon, in: Hobbs, S.D. y O.T. Helgerson (eds.). Reforestation of skeletal soil: Proceedings of Workshop, Medford, Oregon State University, Corvallis.
- ✓ Molina, R. y J.G. Palmer 1982. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi, in: Schenck, N.C. (ed.). Methods and principles of mycorrhizal research. Amer. Phyt. Soc., St. Paul.

- Molina, R. y J.M. Trappe, 1982. Applied aspects of ectomycorrhizae, in: Subba Rao, N.S. (ed.). Advances in agricultural microbiology. Oxford & Ibh, Nueva Delhi.
- Molina, R. y J.M. Trappe, 1984. Micorrhizal management in bare roots nurseries, in: Duryea, M.L. y T.D. Landls (eds.). Forest nursery manual: Production of bare root seedlings. Nijhoff & Junk, Boston.
- Montiel, E., L. López y G. Guzmán, 1984. El género Amanita en el estado de Morelos. *Biótica* 9(3): 223 - 242.
- Palm, M.E. y E.L. Stewart, 1984. *In vitro* synthesis of mycorrhizae bet ween presumed especific and nonspecific *Pinus* + *Suillus* combinationes. *Mycologia* 76(6) 579 - 600.
- Palmer, J.G., 1971. Techniques and procedures for culturing ectomycorrhizal fungi, in: Hacskaylo, E. (ed.). Mycorrhizae. Proc. Fir. Nort. Amer. Conf. Mycorr., 1969, Misc. Publ. 1189. U.S. Dep. Agr., Washington.
- Patiño, V.F. y L. Vela, 1980. Criterios para el establecimiento de plantaciones forestales por área ecológica. Memoria Segunda Reunión Nacional Plantaciones Forestales. Pub. Esp. 33 INIF, Tuxtla Gutiérrez.

- ✓ Peña, J.J. y M. Valdéz, 1973. Antagonismo de la micorriza del oyamel (Abies religiosa) hacia algunos patógenos de especies forestales. Rev. Lat - Amer. Microbiol. 15: 107 - 111.
- ✓ Pérez - Silva, E. y T. Herrera, 1991. Iconografía de macromicetos de México. I Amanita. Publ. espec. 6, Instituto de Biología, UNAM, México.
- Powell, C.L.I., 1982. Micorrhizae, in: Burns, R.C. y J.M. Slater (eds.). Experimental Microbial Ecology. Blackwell Scientific, Londres.
- Riffle, J.W. y D.M. Maronek, 1982. Ectomycorrhizal inoculation procedures for greenhouse and nursery studies, in: Schenck, N.C. (ed.). Methods and principles of mycorrhizal research. Amer. Phyt. Soc., St. Paul.
- ✓ Romagnesi, H., 1967. Les Russules d' Europe et d' Afrique du Nord. Bordas, Paris.
- ✓ Singer, R., J. García y L.D Gómez, 1991. The Boletineae of México and Central America III. Beih. Nova Hedwigia 102, Cramer, Stuttgart.
- ✓ Smith, A.H., y H.D. Thiers, 1971. The Boletes of Michigan. Univ. Mich. Press, Ann Arbor.
- Söderström, B., 1991. The fungal partner in the mycorrhizal symbiosis, in: Ecophysiology of ectomycorrhizae of forest trees. Mercus Wallenberg Foundation Simposia Proceedings,

✓ Trappe, J.M., 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. Bot. Rev. 28: 538 - 606.

Trappe, J.M., 1969. Mycorrhizae. McGraw - Hill, Yearbook Science and Technology, Nueva York.

Trappe, J.M., 1981. Mycorrhizae and productivity of arid and semiarid rangelands, in: Advances in food producing systems for arid and semi arid lands. Acad. Press. Inc, Nueva York.

Trappe, J.M. y R.D. Fogel, 1977. Ecosystematic functions of mycorrhizae, in: Marshall, J. (ed.). The Belowground Ecosystem: A synthesis of plant associated processes. Colorado State Univ., Range Sci. Dep. Sci. No. 26.

✓ Valdés, M., P. Piña y R. Grada, 1983. Inoculación micorrícica y crecimiento de plántulas de pino en suelo erosionado. Bol. Soc. Mex. Mic. 18: 65 70.

✓ Villavicencio, G.R.F., 1992. Implantación de sitios permanentes de investigación, medio indispensable para la ordenación ecológica forestal del Bosque - Escuela. Tesis Profesional. Facultad de Agricultura, Universidad de Guadalajara.

✓ Vozzo, J.A., 1971. Field inoculations with mycorrhizal fungi, in: HacsKaylo, E. (ed.).
Mycorrhizae. Proc. Fir. Nort. Amer. Conf. Micorr., 1969, Misc. Publ. 1189. U.S. Dep.
Agr., Washington.

Zak, B., 1971. Characterization and identification of Douglas - Fir micorrhizae, in: HacsKaylo,
E. (ed.). Mycorrhizae. Proc. Fir. Nort. Amer. Conf. Mycorr., 1969, Misc. Publ. 1189,
U.S. Dep. Agr., Washington.