



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES  
DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS DEL  
ESTADO DE HIDALGO MÁS COMPETENTES  
EN MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PRESENTA:  
ZURISADAI CARRANZA DÍAZ

DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. BLANCA ROSA RODRIGUEZ PASTRANA

Tulancingo de Bravo, Hgo., 2006.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero dar gracias a **Dios** por su eterno amor, misericordia y sobre todo por su fidelidad, por permitirme llegar hasta este lugar, por acompañarme en cada momento de mi vida y por permanecer a mi lado siempre. Mi Dios gracias también por la hermosa familia que me diste, por mis amigos, profesores y compañeros.

A el Sr. Salomón Carranza Q. y la Sra. Socorro Díaz M., hoy quiero darles las gracias por permitirme cumplir cada uno de mis sueños, por ayudarme a ver claramente la meta y luchar por alcanzarla, por creer en mi, por darme su apoyo incondicional, por todos y cada uno de los sacrificios que hicieron por que yo llegara hasta aquí y mas que nada gracias por ser mis padres.

Yeni Noemí Carranza Díaz gracias hermana por que siempre has estado cuando he necesitado tu ayuda, por acompañarme en los momentos difíciles y por sobre todo por tu amistad.

Gracias a toda la familia Carranza Quiroz por que siempre han estado aquí, y cuando algo ha faltado de cada uno de ustedes siempre recibí su apoyo, comprensión y amor.

Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana por su dirección, enseñanza, paciencia y sobre todo su apoyo le agradezco por que mucho de lo que aprendí en este tiempo lo llevo de usted.

A mis asesores: Dra. Adriana Inés Rodríguez, Dra. Carmen Sánchez Hernández, Dr. Norberto Chavarría Hernández, Dr. Rafael Germán Campos Montiel, M. en C. Sergio Soto Simental, M. en C. Alfonso Suárez Islas agradezco el apoyo, aporte e intervención en este trabajo.

A todos los profesores que durante la carrera compartieron conmigo sus conocimientos y experiencia profesional al igual que su tiempo y sabiduría.

A todos mis compañeros y amigos con los que conviví todo este tiempo quiero expresarles que para mi fue privilegio conocerlos y compartir todas y cada una de las experiencias vividas.

Gracias a Raúl, Rocío, Rosario, Enrique por su amistad y por todos los momentos que compartimos, Cande por trabajar juntas en este proyecto, a Isabel por tu ayuda en todo tiempo y especialmente a Omar por todo este tiempo, por ser parte de esto, por tus palabras de aliento, por tus exhortos, por tu compañía y por que siempre estuviste presente cuando necesité tu ayuda.

*A todos y a cada uno de ustedes gracias por acompañarme a lograr esta meta y por ser parte de mi vida.*

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección de la Profa. Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana. El cual forma parte del Proyecto de Investigación “DESARROLLO DE UN BANCO DE CEPAS NATIVAS DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS DEL ESTADO DE HIDALGO” financiado por el Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) UAEHGO-PTC-166.

# CONTENIDO

	Página
<b>1 RESUMEN</b> .....	1
<b>2 INTRODUCCIÓN</b> .....	3
2.1 Hongos.....	4
2.2 Clasificación de Hongos.....	6
2.2.1 Chytridiomycota.....	6
2.2.2 Zygomycota.....	7
2.2.3 Ascomycota.....	7
2.2.4 Basidimycota.....	8
2.3 Micorrizas.....	18
2.3.1 Clasificación y Estructura de la Asociación Micorrízica.....	19
2.3.2 Tipos de Micorrizas.....	21
2.3.2.1 Micorriza Vesículo-Arbuscular (Endomicorrizas).....	23
2.3.2.2 Ectomicorrizas.....	24
2.3.3 Importancia de las Micorrizas.....	27
2.4 Caracterización e Identificación de Hongos.....	28
2.5 Métodos de Conservación de Hongos.....	29
2.5.1 Transferencia Periódica.....	29
2.5.2 Liofilización.....	29
2.5.3 Aceite Mineral.....	30
2.6 Pruebas Fisiológicas y Bioquímicas .....	30
2.6.1 Crecimiento a Temperaturas Extremas.....	30
2.6.2 Degradación de Compuestos.....	31
2.7 Estudios Moleculares.....	32
2.7.1 Extracción de ADN Total.....	33
2.7.1.1 Determinación de Pureza y Cuantificación de ADN.....	33
2.7.1.2 Espectrofotometría.....	33
2.7.1.3 Electroforesis en Gel.....	34
2.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	36

2.7.2.1 Aplicaciones de la PCR.....	38
<b>3. HIPOTESIS.....</b>	<b>46</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
4.1 Objetivo General.....	46
4.2 Objetivos Particulares.....	46
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
5.1 Lugar de Trabajo.....	47
5.2 Recolecta de Material Biológico.....	47
5.3 Crecimiento Micelial de las Especies Fúngicas.....	50
5.4 Aislamiento Vegetativo.....	51
5.4.1 Aislamiento a partir de la Raíz Micorrizada.....	52
5.4.2 Aislamiento a partir de Esporas.....	53
5.5 Observaciones Anatómicas y Morfológicas del Micelio.....	53
5.6 Métodos de Conservación de Hongos.....	53
5.6.1 Transferencia Periódica.....	54
5.6.2 Liofilización.....	54
5.6.3 Aceite Mineral.....	54
5.7 Pruebas Fisiológicas y Bioquímicas.....	54
5.7.1 Crecimiento en Temperaturas Extremas.....	54
5.7.2 Degradación de Compuestos.....	55
5.7.2.1 Degradación de Grenetina.....	55
5.7.2.2 Degradación del Almidón.....	55
5.8 Estudios Moleculares.....	56
5.8.1 Extracción de ADN Total.....	56
5.8.1.1 Determinación de Pureza y Cuantificación de ADN.....	56
5.8.1.1.1 Espectrofotometría.....	56
5.8.1.1.2 Electroforesis en Gel.....	57
5.8.1.1.2 .1 Preparación de las Muestras.....	58

5.8.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	59
5.8.2.1 Preparación de Muestras.....	59
5.8.2.2 Condiciones de Amplificación.....	59
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>61</b>
6.1 Recolecta de Material Biológico.....	61
6.2 Aislamiento Vegetativo .....	64
6.3 Observaciones Anatómicas y Morfológicas del Micelio.....	66
6.4 Métodos de Conservación de Hongos.....	68
6.5 Pruebas Fisiológicas y Bioquímicas.....	69
6.5.1 Crecimiento a Temperaturas Extremas.....	69
6.5.2 Degradación de Compuestos .....	75
6.6 Estudios Moleculares.....	77
6.6.1 Extracción de ADN Total.....	77
6.6.1.1 Determinación de Pureza de ADN y Cuantificación.....	77
6.6.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	79
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>83</b>
<b>8. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>84</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>85</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura del hongo, mostrando las partes principales del mismo.....	5
2. Ciclo vital de los ascomicetos.....	8
3. Ciclo de vida de un hongo Basidiomicete .....	9
4. Protuberancia hifal denominada Fibula o clamp.....	10
5. Tipos de anastomosis o conexiones entre hifas. ....	10
6. Diferentes formas de Esporas.....	11
7.1. Diferentes formas de Estipites o gorros.....	11
7.2. Diferentes formas de Pileo o sombrero.....	12
8. Diferentes formas de Cutícula.....	13
9. Diferentes formas de Himenio.....	14
10. Diferentes formas de Estipites o pies.....	15
11. Velo universal y volva.....	16
12. Presencia de anillo en dos cuerpos fructíferos diferentes.....	16
13. Presencia de cortina.....	17
14. Observación de retículo.....	17
15. Principales formas de micorrizas.....	20
16. Estructuras de una endomicorriza.....	23
17. Detalle de un típico sistema de asociación de hongo ectomicorrizógeno con raíz de agiosperma y pino, mostrando las partes principales.....	24
18. Raíces Modificadas en la Ectomicorriza formada por un hongo sobre <i>Fagus sylvatica</i> .....	25
19. SEM de raíz de pino colonizada por <i>Pisolithus tinctorius</i> . Manto de Hifas..	26
20. ECM en corte transversal de raíz de <i>Populus tremuloides</i> Mostrando hifas en laberinto de la red de Hartig .....	26
21. Esquema de las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.....	37
22. Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTA).....	47
23. Área de recolecta Municipio de Singuilucan, Hgo. Ex. Hacienda de Cuyamaloya, Bosque de Encino-pino.....	48

24. Área de recolecta Municipio de Acatlan, Hgo. "Cerro Prieto", Bosque de Encino-pino.....	49
25. Área de recolecta municipio de Huasca, Hgo., Bosque de Pino.....	49
26. Raíz micorrizada que corresponde al morfotipo micorrízico no ramificado.....	52
27. Espectrofotómetro Cary 100 VARIAN® (Varian Analytical Instruments)....	57
28. Cámara de Electroforesis ® (electroforesis system Cole parmer instruments).....	58
29. Termociclador Techne® incorporated, Princeton.....	60
30. Sistema de Documentación de geles ®BioDoc-It Electrophoresis Image Aquistion System.....	60
31. Micelio de <i>Russulla</i> .....	66
32. Micelio de <i>Lactarius</i> .....	66
33. Micelio de <i>Tricholoma</i> .....	67
34. Micelio de la cepa parecida a <i>Cantharellus</i> .....	67
35. Micelio de la Raíz Micorrizada.....	68
36. Muestra de hongos liofilizados.....	69
37. Cepas en Diferentes medios nutritivos y temperaturas.....	74
38. Pruebas fisiológicas.....	76
39. Separación electroforética de los extractos de ADN.....	79
40. Separación electroforetica de PCR utilizando primers ITS1 y ITS4.....	80
41. Separación electroforética de PCR utilizando primers ITS1 y ITS4.....	82

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Estrategias para el estudio de la caracterización e identificación de hongos ectomicorrizógenos.....	39
2 Composición de los Medios Nutritivos.....	50
3 Componentes de la reacción para PCR.....	59
4 Características de colección del material recolectado.....	61
5 Características culturales de los cultivos puros.....	64
6 Crecimiento a diferentes temperaturas.....	71
7 Biomasa a diferentes temperaturas y medios.....	72
8 Degradación de compuestos.....	75
9 Concentración de ADN por medio de espectrofotometría.....	78

## TERMINOLOGÍA EMPLEADA

1. Abs	Absorbancia
2. ADN	Ácido desoxirribonucleico
3. ADNr	ADN ribosomal
4. BAF	Biotina Anuerina Ácido Fólico
5. BET	Bromuro de etidio
6. EDTA	Ácido Etilendiaminoteracético
7. dNTPs	Desoxinucleotido trifosfatos
8. INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias
9. ITS	Espacio interno transcrito
10. ITS1	Iniciador upstreaml
11. ITS4	Iniciador downstream'
12. kb	Kilo base
13. loading dye	Bromofenol azul y glicicerol
14. MMN	Medio Melin Norkrans modificado (Molina y Palmer, 1982)
15. m.s.n.m.	metros sobre el nivel del mar
16. ng	Nanogramos
17. nm	Nanometros
18. OD	Densidad Óptica
19. pb	Pares de bases
20. PDA	Papa-dextrosa-agar (PDA, Difco, Detroit, Mich.)
21. PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
22. Primers	Cebador o iniciador
23. RAPD's	Amplificación polimorfita al azar
24. RFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
25. RNA <sub>SA</sub>	Enzima que corta el ARN
26. TBE	Tris, Acido Bórico y EDTA
27. Taq enzima	Enzima de restricción <i>Termophilus aquaticus</i>
28. UV	Ultravioleta
29. µL	Microlitros

**SELECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES  
DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS DEL  
ESTADO DE HIDALGO MÁS COMPETENTES EN  
MEDIO DE CULTIVO SÓLIDO**

## 1. RESUMEN

Esta tesis contribuye al estudio inicial sobre hongos ectomicorrizógenos nativos del Estado de Hidalgo que se empieza en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTA).

Con base a un proceso biotecnológico para la producción de inoculantes a base de hongos ectomicorrizógenos para uso en viveros principalmente forestales, la primera etapa de selección e identificación fisiológica, bioquímica y molecular de hongos ectomicorrizógenos ha sido satisfactoria.

Se logró obtener una muestra representativa de la biodiversidad existente en 3 diferentes regiones, recolectándose 10 clases de hongos en sus diferentes etapas de desarrollo, pertenecientes a siete familias: *Russulaceae*, *Ramariaceae*, *Agaricaceae*, *Tricholomataceae*, *Boletaceae*, *Cantharellaceae*, *Amanitaceae*. Estos simbiontes formarán parte del cepario fúngico del laboratorio de Biotecnología del CICyTA.

Las cepas seleccionadas fueron sometidas a diferentes estudios para lograr su identificación y selección realizando observaciones anatómicas y morfológicas del micelio, algunas pruebas fisiológicas y bioquímicas como crecimiento en diferentes medios nutritivos, crecimiento a temperaturas extremas, degradación de algunos compuestos y estudios moleculares básicos como la extracción y amplificación de ADN con el propósito de su identificación a nivel molecular a través del análisis de Polimorfismo en la longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP).

De acuerdo a los resultados, la cepa que obtuvo mejores resultados de adaptación y crecimiento fue la cepa de *Russula* ya que presentó un mejor crecimiento a 24°C, con una velocidad media de 1.504 mmd<sup>-1</sup> en medio papa-dextrosa-agar (PDA) y 1.155 mmd<sup>-1</sup> en Biotina Aneurina Ácido Fólico (BAF), superior a los demás resultados obtenidos con las demás cepas.

Con el propósito de tener otro parámetro de selección de inoculante, se puede tomar en cuenta la producción de enzimas hidrolíticas, en este trabajo de investigación se realizaron las pruebas preliminares de la presencia de amilasas y proteasas. Obteniéndose con estos primeros ensayos, que la actividad proteolítica fue presente en todas las cepas investigadas, mientras que la actividad amilolítica solamente estuvo presente en la cepa relacionada a *Cantharellus* (Santiago-Martínez, 1992).

Para tener una caracterización e identificación completa de las cepas puras aisladas, es necesario realizarlo a nivel molecular, por lo cual, se iniciaron con éxito las técnicas moleculares básicas. La extracción de ADN con una pureza adecuada y con cantidad fue suficiente (31 ng/μL) para las amplificaciones del espacio interno transcrito (ITS) del ADNr. Los parámetros de la amplificación fueron satisfactorios, la temperatura de alineamiento de la pareja de primers o iniciadores universales para hongos (ITS1 e ITS4) en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue de 52 °C, siendo óptima para la amplificación de un segmento nucleotídico con una talla que varía de 550 a 700 pb, correspondiente al ITS.

Con los amplificadores obtenidos en la PCR fué posible distinguir al menos 4 polimorfismos entre las cepas de *Tricholoma*, *Russula*, la relacionada a *Cantharellus* y el hongo micorrízico no identificado.

Finalmente la cepa *Russula*, hongo ectomicorrizógeno comestible se seleccionó en forma preliminar con fines de inoculación posterior, ya que presentó la mayor velocidad de crecimiento, mayor biomasa además de ser la más tolerante a temperaturas extremas.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos muy comunes en la naturaleza, puesto que viven prácticamente en todos los medios (Guzmán *et. al.*, 1993). Tienen gran importancia en el mantenimiento de los bosques, por que además de ser degradadores de materia orgánica, son capaces de formar asociaciones con numerosos árboles (Santiago, 1992).

Se ha reportado que aproximadamente el 90% de las plantas terrestres forma algún tipo de asociación con la raíz. En esta asociación, llamada micorriza, los hongos ayudan al crecimiento de las diferentes especies vegetales como los pinos, que bajo condiciones naturales son indispensables para su sobrevivencia (Molina *et. al.*, 1992).

Actualmente están en progreso considerables investigaciones sobre las aplicaciones de las micorrizas y una micorrización controlada. Las primeras fases en un proceso de micorrización controlada son: aislamiento, identificación, caracterización y la multiplicación del micelio utilizado en programa de producción de planta y hongos comestibles, como es el caso del hongo micorrizógeno *Tricholoma magnivelare* (hongo de ocote), el cual se recolecta en algunas comunidades del Estado de Hidalgo. Por lo que México necesita incorporar en sus viveros nuevas y mejores técnicas para producir plantas de calidad, capaces de sobrevivir y desarrollarse en el campo; con beneficios ecológicos específicos, por ejemplo, tolerancia a la sequía, mejor absorción de nutrientes, producción de hongos comestibles (Santiago *et. al.*, 1999).

Los hongos comestibles han sido apreciados por su sabor y aroma además de su valor económico y ecológico. Ellos tienen una composición química que los hace atractivos desde el punto de vista nutricional. En general los hongos contienen 90%

de agua y 10% de materia seca, conteniendo entre 27% y 48% de proteína, aproximadamente un 60% de carbohidratos y 2-8% de lípidos (Sánchez, 2004).

Una forma de conocer la biología de los hongos es por medio de los cultivos puros de cepas *in vitro*, con éstos se pueden conocer su capacidad fisiológica o bioquímica de cada cepa en la forma de degradar los compuestos carbonatados y nitrogenados o su resistencia a crecer en condiciones extremas que aseguren el éxito en el establecimiento de las plantaciones forestales y en la recolecta de hongos comestibles.

## 2.1 Hongos

Los hongos son organismos eucariotes cuyas células contienen mitocondrias, un núcleo bien definido y otros organelos rodeados de membrana, carecen de clorofila y cloroplastos, por lo que no fotosintetizan. Las células de los hongos están rodeadas de paredes celulares constituidas por quitina, un polímero que consiste en subunidades de un azúcar nitrogenado y es el componente más resistente que la celulosa a la degradación por microorganismos (Alexopoulos, 1995). Dado que son heterótrofos, son incapaces de sintetizar su propia materia orgánica, pero no ingieren alimento. Los hongos secretan enzimas digestivas y después absorben al alimento predigerido a través de su pared celular y membrana plasmática. Obtienen nutrimentos de otros organismos vivos a los que parasitan o de materia orgánica muerta a la que descomponen (Solomon *et. al.*, 2000).

La mayoría de los hongos están constituidos por finas fibras que contienen protoplasma, llamadas hifas. Éstas a menudo están divididas por tabiques llamados septos. En cada hifa hay uno o dos núcleos y el protoplasma se mueve a través de un diminuto poro que ostenta el centro de cada septo (Fig. 1). También existen hifas llamadas cenocíticas porque no se dividen en células individuales, sino que tienen el aspecto de una célula gigante multinucleada alargada. (Guzman *et. al.*, 1993). Las hifas crecen por alargamiento de las puntas y también por

ramificación. La proliferación de hifas, resultante de este crecimiento, se llama micelio. (Courtecuisse y Duhem, 2000).

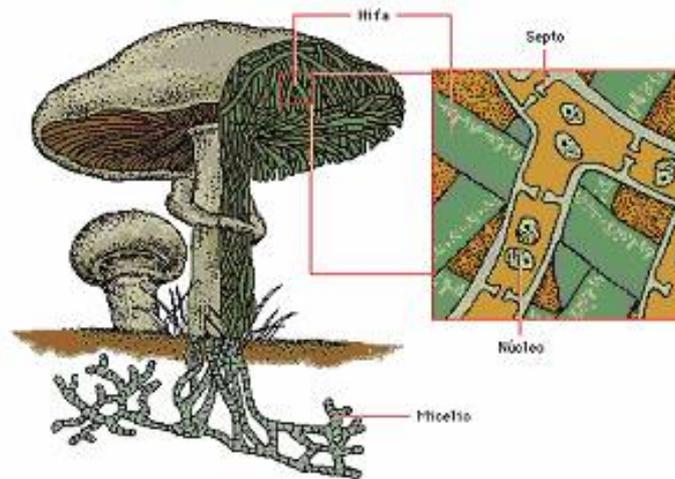


Fig. 1 Estructura de un hongo, mostrando hifas, micelio y cuerpo fructífero (Saenz, 2004).

Los hongos se desarrollan mejor en hábitats oscuros y húmedos, requieren humedad y pueden obtener agua de una atmósfera húmeda así como del medio en que viven. Cuando el ambiente se torna demasiado seco, los hongos sobreviven entrando en una fase latente o produciendo esporas resistentes a la desecación. El pH óptimo para ellos es de 5.6, sin embargo algunos hongos toleran ambientes con pH de 2 a 9 y pueden desarrollarse en soluciones salinas concentradas, o en soluciones azucaradas como jalea, que dificultan o impiden la proliferación de bacterias. Los hongos también prosperan en un amplio intervalo de temperatura (Guzman *et. al.*, 1993).

Los hongos se reproducen por medio de esporas microscópicas, que carecen de flagelos y son estructuras reproductivas inmóviles, dispersadas por el viento o por animales. Suelen tener hifas aéreas en contacto con la atmósfera, lo que permite que las esporas sean llevadas por el viento a nuevas zonas. En algunos hongos las hifas aéreas forman estructuras reproductivas grandes y complejas en las cuales se producen esporas. Estas estructuras se denominan cuerpos fructíferos o esporocarpos (Fig. 1) (Solomon *et. al.*, 2000).

Los hongos pueden producir esporas de manera sexual o asexual. Las células fungales por lo general poseen núcleo haploide. En la reproducción sexual, las hifas de dos tipos de apareamiento genéticamente distinto se reúnen y sus núcleos se fusionan, formando un cigoto diploide. En dos grupos de hongos (ascomicetos y basidiomicetos), las hifas se fusionan pero los dos núcleos distintos no se fusionan de inmediato, sino que permanecen separados dentro del citoplasma fungal. Cuando la espora fungal entra en contacto con una fuente de alimento adecuada, germina y comienza a desarrollarse. Una hifa filiforme emerge de la diminuta espora y crece, ramificándose con frecuencia (Guzman *et. al.*, 1993 y Solomon *et. al.*, 2000).

## 2.2 Clasificación de los Hongos

La clasificación de los hongos se basa sobre todo en las características de su heterotrofismo, formación de esporas, presencia de quitina en sus paredes y cuerpos fructíferos. Después de las últimas modificaciones hechas en el Congreso Internacional de Micología de 1994, donde se han introducido muchos cambios, el reino queda dividido en 4 filos: Chytridiomycota (quitrídios), Zygomycota (zigomicetos), Ascomycota (ascomicetos) y Basidimycota (basidiomicetos) (Alexopoulos, 1995).

### 2.2.1 Chytridiomycota

Dentro de los que ahora consideramos reino Hongos, los Chytridiomycetes son los únicos que producen células móviles en su ciclo de vida, aunque con un solo flagelo posterior en forma de látigo, es el único grupo de hongos verdaderos que presentan esporas flageladas (Alexopoulos, 1995).

### 2.2.2 Zygomycota

Están caracterizados por un micelio aseptado, cenocítico, con septos en la base de las estructuras reproductoras o septos secundarios. El nombre del grupo proviene de la presencia en parte de su ciclo de una zigospora característica. Producen esporas sexuales llamadas cigosporas. Casi todos son descomponedores que viven en el suelo sobre la materia animal o vegetal en descomposición (Alexopoulos, 1995).

### 2.2.3 Ascomycota

Los Ascomycetes están caracterizados por la presencia en su ciclo de vida (Fig. 2), de una célula fértil, llamada célula ascógena, denominada asco, que producirá endógenamente 8 ascosporas.

Esta célula ascógena proviene de un ascogonio y en general está dispuesta en una capa de células similares y en estructuras características denominadas cleistotecio, peritecio o apotecio. Los representantes de este grupo prácticamente se encuentran poblando todo tipo de hábitat, y pueden presentar cualquier tipo de forma de nutrición, ya sea saprobios, parásitos o simbioses (Alexopoulos, 1995).



Los basidiomicetes se reproducen sexualmente formando basidiosporas, deben su nombre al hecho de que forman un basidio, estructura en forma de garrote, en cuya punta se desarrollan cuatro basidiosporas. Cada hongo individual produce millones de basidiosporas y cada basidiospora tiene el potencial de producir un nuevo micelio primario. Aquí encontramos organismos que pueden habitar los más variados ambientes y vivir como saprófitos, parásitos y simbioses (Alexopoulos, 1995).

Existen alrededor de 25 000 o más especies de basidiomicetos donde se incluyen los hongos más conocidos como champiñón, setas, etc. y la mayoría de las micorrizas (Solomon *et. al.*, 2000).

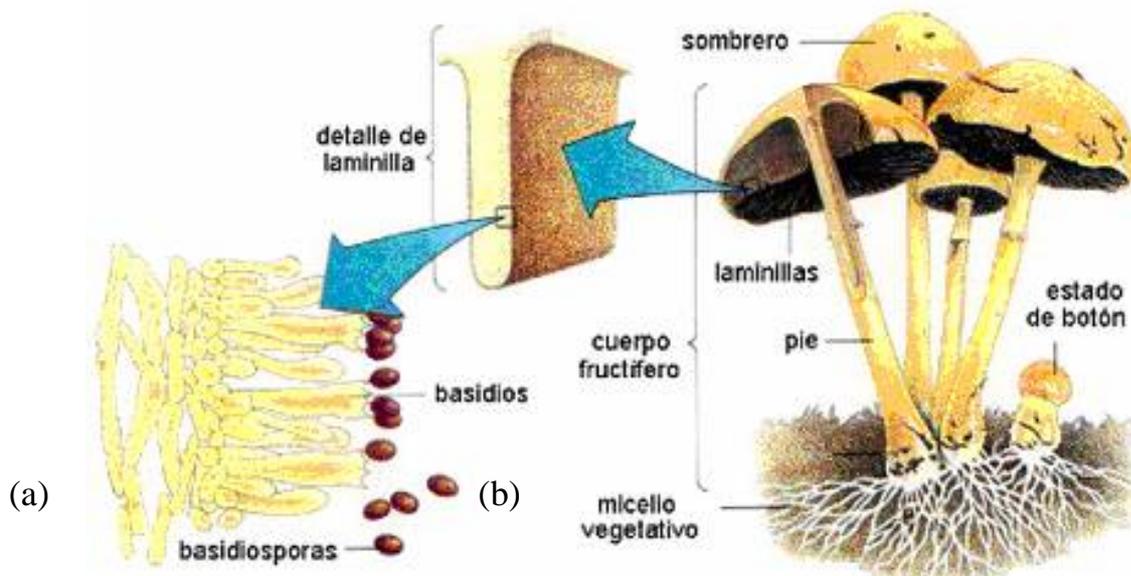


Fig. 3 Ciclo de vida de un hongo Basidiomicete (a) Micrografía electrónica de barrido de un basidio. Cada basidio produce cuatro basidiosporas. (b) hifas entrelazadas del micelio vegetativo forman el basidiocarpo que llamamos "Hongo". Las laminillas contienen numerosos basidios (Solomon *et. al.*, 2000).

Una forma de identificar a los hongos es de acuerdo a la observación de características que presentan ya sea en sus hifas, esporas y cuerpos fructíferos que finalmente permitan identificarlos y clasificarlos.

Dentro de las hifas encontramos la presencia de fibulas o clamps (protuberancia hifal, Fig. 4), estructura peculiar que permite la mantención del estado dicariótico heterocariótico del micelio secundario, la cual asegura que cada célula hija resultante, tenga la combinación original de núcleos distintos y compatibles. En muchos Basidiomycetes esta presente esta característica (Alexopoulos, 1995).



Fig. 4 Protuberancia hifal denominada Fibula o clamp.

Otra característica es el tipo de anastomosis, que es cuando dos hifas se fusionan produciendo una estructura característica, la figura 5 muestra algunos tipos de anastomosis.

	Abierto con un puente largo.		Cerrado con un septo simple y con un puente corto o casi nulo.
	Abierto con un puente corto o casi nulo.		Cerrado con un clamp y con un puente largo.
	Cerrado con un septo simple y con un puente largo.		Cerrado con un clamp y con un puente corto o casi nulo.

Fig. 5 Tipos de anastomosis o conexiones entre hifas (Imagen tomada de <http://www.deemy.de/>)

Las esporas hacen un papel similar en los hongos, que el de las semillas en las plantas. Pueden ser de todas las formas imaginables: lisas, con verrugas, redondas, cilíndricas, elipsoides, naviformes, etc. (Fig. 6). Además de las formas algunas cuentan con otras características muy peculiares, como por ejemplo poro germinativo, que puede ser central, ápical, o marginal, más grande o más pequeño. Por otra parte sus medidas son inalterables, por lo que al cotejarlas con las de la misma especie nos aporta datos muy fidedignos.

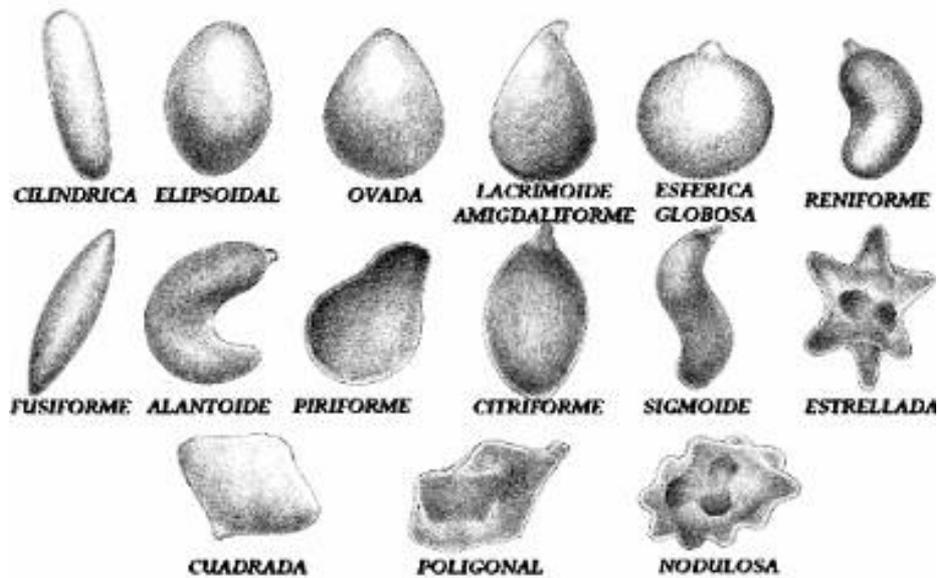


Fig. 6 Diferentes formas de Esporas (Bruns *et. al.*, 2002)

Las características de cuerpos fructíferos que podemos diferenciar son: pileo o sombrero, cutícula, himenio, pie o estipite, trama o carne que se describen a continuación.

Pileo o Sombrero: Es la parte ensanchada de la seta, en el extremo superior. Las [formas](#) del sombrero son muy variables sin olvidar que la forma del sombrero habitualmente cambia a medida que se desarrolla la seta. En la figura 7.1 y 7.2 se muestran algunas de las formas más comunes de los sombreros (Courtecuisse y Duhem 2000).



Fig. 7.1 Diferentes formas de Pileo o sombreros (Courtecuisse y Duhem 2000).



Figura 7.2 Diferentes formas de Pileo o sombrero (Courtecuisse y Duhem 2000).

**Cutícula:** La cutícula es la piel o membrana fina que recubre toda la porción superior del sombrero o pileo. (Fig. 8) Es, por tanto, la responsable del color que observamos en el sombrero, puede presentar estructuras sobre ella, como restos del velo (habitual en amanitas), fibrillas, pelillos o escamas. También puede ser lisa, aterciopelada o viscosa, o estar agrietada, cuarteada o zonada (Courtecuisse y Duhem 2000).



Fig. 8 Diferentes formas de Cutícula (Courtecuisse y Duhem 2000).

**Himenio:** Situado en la parte inferior del sombrero y la más importante del cuerpo fructífero, ya que en él se forman las esporas (se dice que es la parte fértil de la seta); así mismo también es una de las partes del hongo donde se encuentra la mayor parte de la información macro y microscópica. En la figura 9 se diferencian 5 tipos de himenios (Courtecuisse y Duhem 2000).

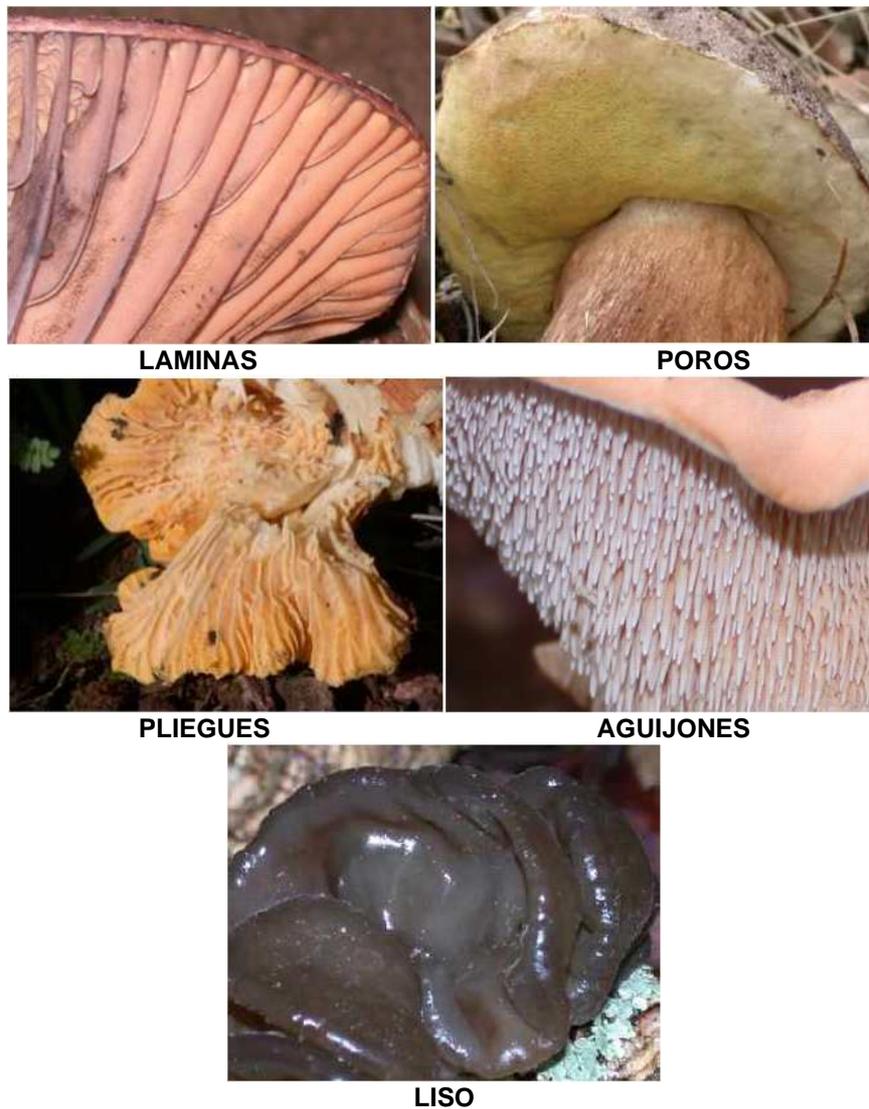


Fig. 9 Diferentes formas de Himenio (Courtecuisse y Duhem 2000).

Estipite o Pie: Equivalente al tronco de un árbol en su función, elevar, nutrir y sostener la ramificación reproductora, en este caso el sombrero con el himen (Fig. 10) (Courtecuisse y Duhem 2000).

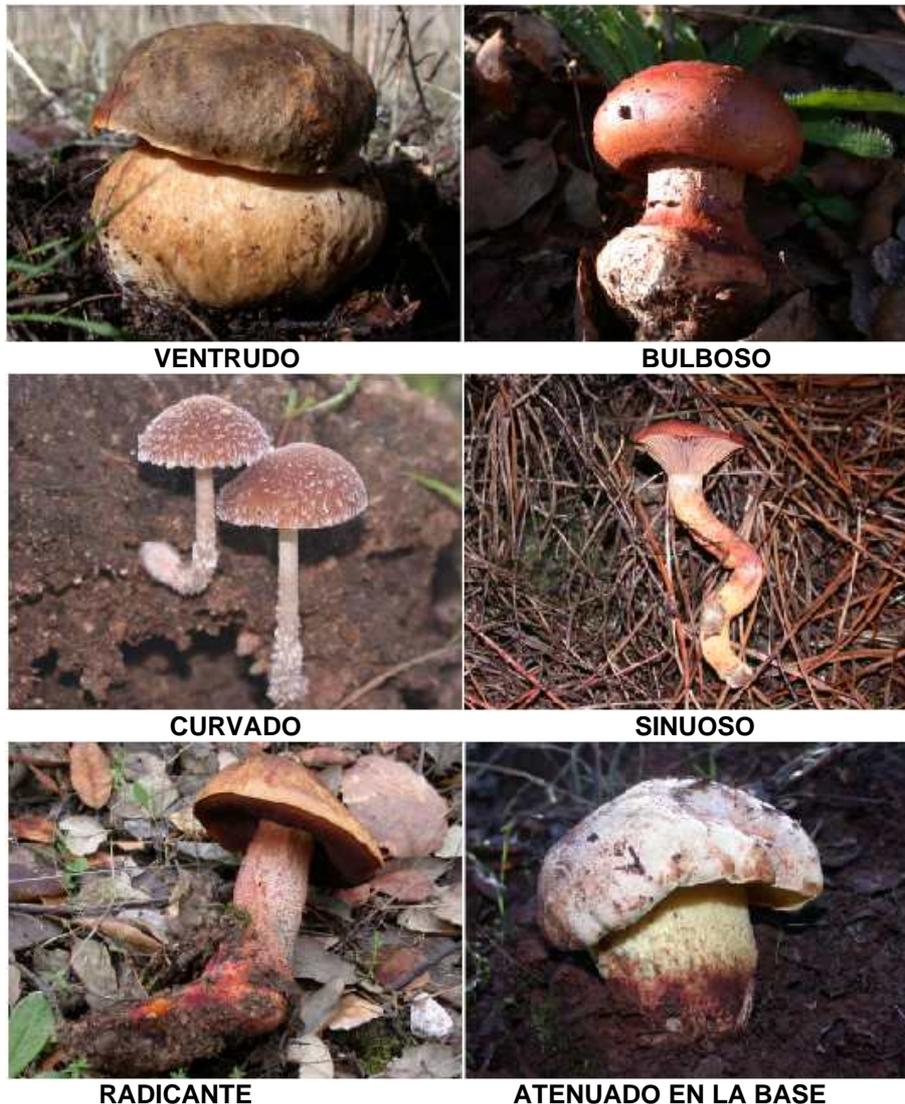


Fig. 10 Diferentes formas de Estipites o pies. (Courtecuisse y Duhem 2000).

Estructuras Especiales del Pie: En el pie pueden aparecer ciertas estructuras muy típicas y que son de gran ayuda para identificar y clasificar los cuerpos fructíferos. Las principales son las siguientes:

El **velo universal** es una membrana que envuelve toda la seta al inicio de su desarrollo y que se rompe al crecer ésta, quedando restos en el sombrero y pie. Los restos de velo que recubren la parte inferior del pie constituyen la **volva** (Fig. 11) (Courtecuisse y Duhem 2000).



Fig. 11 Velo universal y volva (Courtecuisse y Duhem 2000).

El **anillo** es una membrana que protege el himenio de algunas setas mientras se forman las esporas, para desprenderse y permanecer unida al pie cuando éstas han madurado (Fig 12).



Fig. 12 Presencia de anillo en dos cuerpos fructíferos diferentes (Courtecuisse y Duhem 2000).

La **cortina** es una cubierta protectora del himenio, mientras se forman y maduran las esporas, formada por multitud de fibrillas muy finas (Fig. 13) (Courtecuisse y Duhem 2000).



Fig. 13 Presencia de cortina (Courtecuisse y Duhem 2000).

El **retículo** es una especie de malla en relieve, más o menos visible, que recubre todo o parte del pie de algunas setas (Fig. 14) (Courtecuisse y Duhem 2000).



Fig. 14 Observación de retículo (Courtecuisse y Duhem 2000).

Los hongos contribuyen en grado importante al equilibrio ecológico del planeta. Estos organismos desprovistos de clorofila e incapaces de sintetizar los glúcidos que necesitan para vivir, han desarrollado tres sistemas de vida:

Hongos Saprófitos (o saprobios): Viven sobre materia orgánica en descomposición, es decir sobre materia muerta (restos orgánicos de la descomposición de plantas y animales que contiene el suelo, partes muertas de la madera de un árbol, excrementos de animales, etc.

Hongos Parásitos: Se alojan sobre algún ser vivo que los hospede, viviendo a expensas de éste sin ofrecerle ningún beneficio a cambio. Los hongos parásitos pueden producir daños de muy diversa consideración, desde pasar inadvertidos por completo para el huésped hasta causarle enfermedades graves o incluso la muerte. Pueden parasitar plantas, animales (incluido el hombre), o incluso a otros hongos.

Hongos Simbióticos o Micorrízicos: Viven en asociación con alguna especie vegetal (normalmente árboles), obteniendo ambos un beneficio mutuo. Estos hongos viven rodeando las partes más finas de las raíces de los árboles, envolviéndolas y alimentándose de exudados radiculares. Estos exudados radiculares aportan al hongo los glúcidos que necesita para vivir (Saenz, 2004).

## 2.3 Micorrizas

El termino micorriza deriva de los vocablos griegos **mykes** que significa “hongo” y **rhiza**, “raíz”; esto es asociación entre un hongo y raíces de plantas vasculares. El primero en descubrir la relación micorrízica fué el botánico alemán Frank en 1885. En 1900 se hizo manifiesta la importancia de la micorriza en las orquídeas por el francés Bernard. Pero fue en los últimos 20 años cuando los agricultores han dado la importancia a las micorrizas en el mejoramiento de sus cultivos. A mediados de este siglo, las micorrizas tomaron relevancia debido a los trabajos de Melin en estudios sobre árboles forestales (Cruz, 1992).

En la mayoría de las asociaciones micorrízicas, uno de los miembros, la planta autotrófica proporciona los compuestos carbonados, procedentes de la fotosíntesis al otro miembro, el hongo heterotrófico. Por otro lado los hongos derivan agua y minerales esenciales del suelo que, después de pasar por los tejidos fúngicos, son incorporados a los tejidos de la planta.

Existe por lo tanto un movimiento bidireccional, simultáneo, selectivo y polar, entre el hongo y la planta. Es polar por que el carbono pasa de la planta hacia el hongo, y los nutrimentos obtenidos del suelo se transportan en la dirección contraria (Herrera y Ulloa, 1990).

### 2.3.1 Clasificación y Estructura de la Asociación Micorrízica

Aproximadamente unas 5000 especies de hongos con carpóforos (principalmente Basidiomycetes) están asociadas a árboles forestales en regiones boreales y templadas, estableciendo un tipo de micorrizas. Cada tipo se distingue sobre la base de la relación de las hifas del hongo con las células radicales del hospedador (Cruz, 1992).

Al principio, las micorrizas se clasificaron en ectotróficas y endotróficas, basándose en el tipo de estructuras que formaban el hongo con la raíz. Posteriormente, basados en estudios de histología vegetal, se agruparon en endomicorrizas, ectomicorrizas y ectendomicorrizas, dependiendo de la penetración de las hifas en las células de la raíz.

Harley y Smith en 1983, descubrieron 7 tipos de micorrizas: ectomicorrizas, arbutoide, monotrofoide, vesículo-arbuscular, ericales, orquideoide y ectendomicorrizas (Fig. 15). Cada tipo de micorriza forma diferentes combinaciones de estructuras (Brundrett *et. al.*, 1996).

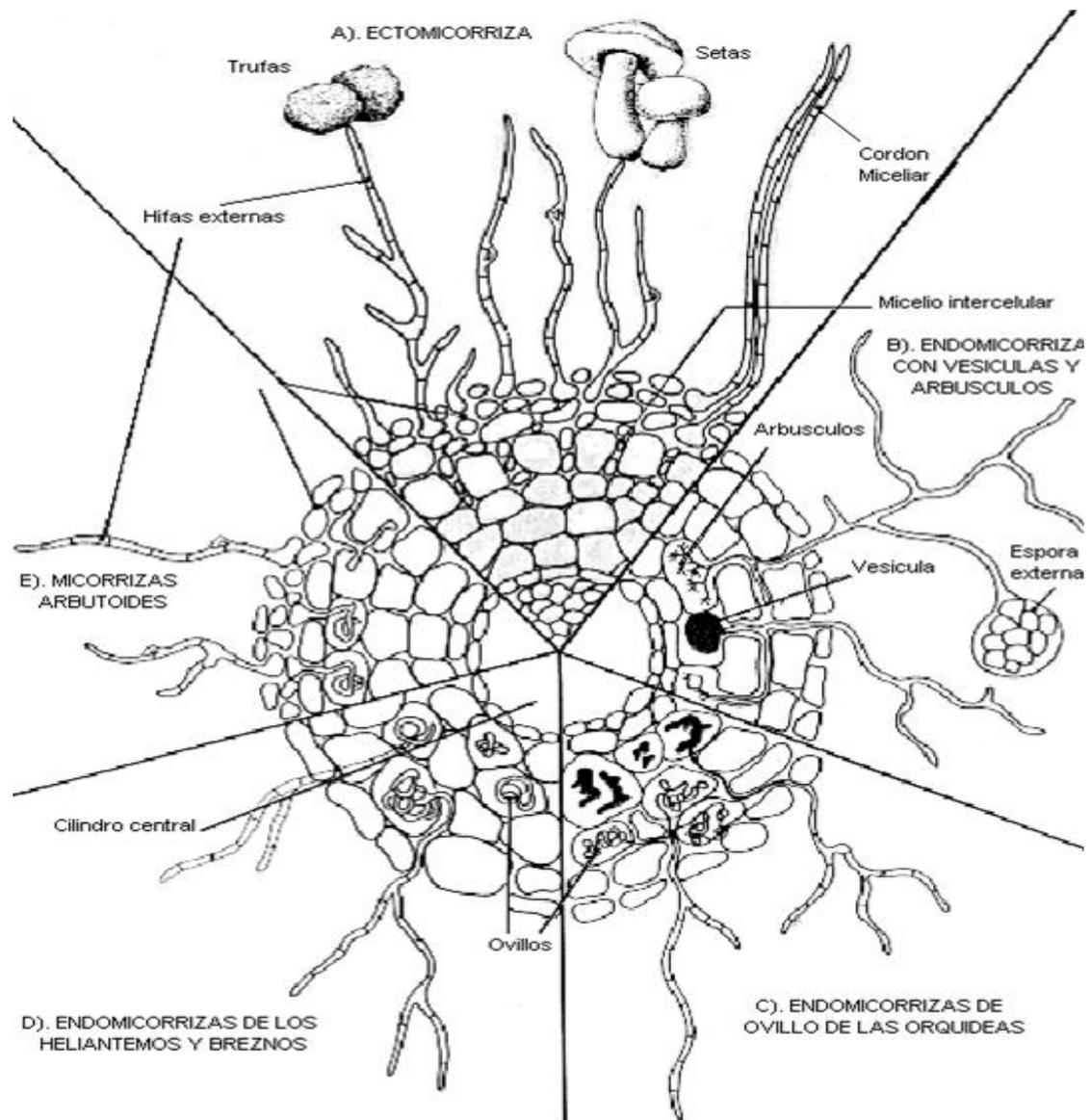


Fig. 15 Representación gráfica de cinco de las principales tipos de micorrizas: A). Ectomicorriza; las hifas no penetran en las células radicales, forman manto alrededor de la raíz. B). Micorrizas Vesículo-arbuscular (Endomicorriza) las hifas penetran en las células de la raíz, en su interior forman arbusculos y vesículas. C). Endomicorrizas de ovillo de las orquídeas (Orquideoide); forman ovillos en el interior de las células. D). Endomicorrizas de los heliantemos y breznos (Ericales). E). Ectendomicorrizas; forman un manto y las hifas penetran en las células en forma de ovillos (Brundrett *et. al.*, 1996).

### 2.3.2 Tipos de Micorrizas

Ectomicorriza se presenta en general en las plantas leñosas perennes, coníferas, donde la ramificación de la raíz corta y lignificada impide la captura óptima de nutrimentos. En este caso, el hongo, además de incrementar la absorción de sales minerales, tiene la capacidad de utilizar fuentes nitrogenadas no disponibles para las plantas y de producir antibióticos (Bruns *et. al.*, 2002).

Distribución: bosques boreales, bosques templados, bosques de dipterocarpaceas en Asia.

Plantas hospederas: gimnospermas y angiospermas.

Hongos endófilos: zigomicetos, ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos (Álvarez y Ramos 2004).

Arbutoide el nombre científico del madroño es *Arbutus*, las plantas que la presentan son de la familia arbutoideae, son leñosas y fotosintéticas. Los hongos en este caso son los órganos de absorción, por lo que se ha señalado que este tipo de micorriza es una ventaja selectiva para estas plantas.

Distribución: zonas templadas.

Plantas hospederas: ericales y briofitas.

Hongos endófilos: ascomicetos y basidiomicetos (Álvarez y Ramos 2004).

Monotropoide monotropa es un género de plantas epiparásitas no fotosintéticas que obtienen carbono de otras especies de plantas. Este tipo de micorriza la desarrollan plantas aclorófilas y hongos involucrados forman ectomicorrizas con plantas autotróficas cercanas, transfiriendo así carbono orgánico a la planta monotropide.

Distribución: zonas templadas.

Plantas hospederas: monotropas.

Hongos endófilos: ascomicetos y basidiomicetos (Álvarez y Ramos 2004).

Vesículo-Arbuscular el hongo no causa modificaciones a la raíz. Dentro de la célula de la corteza radical se observan hifas, arbusculos, esporas y vesículas (en algunos géneros), mientras que en la rizósfera se encuentran hifas, esporas y células auxiliares (en algunos géneros). Permite la entrada de iones poco móviles al aumentar la superficie de absorción de la raíz, mejora las relaciones hídricas y la protege de elementos tóxicos y patógenos. Sólo se conocen 147 especies de hongos que forman este tipo de micorriza. Poseen poca especificidad, sin embargo, su efectividad (aumento en biomasa y supervivencia) puede variar aún dentro de la misma especie vegetal.

Distribución: zonas tropicales y en cultivos.

Plantas hospederas: briofitas, pteridofitas, angiospermas, gimnospermas.

Hongos endófilos: cigomicetos (Álvarez y Ramos 2004).

Ericoide se establece principalmente en plantas de breznales, con altos niveles de carbono y nitrógeno y bajo pH. Los hongos tienen capacidades saprobias, por lo que son capaces de asimilar formas complejas de nitrógeno y fósforo, así como secuestrar iones metales tóxicos de los vástagos de las plantas que pueden interferir en la fotosíntesis.

Distribución: zonas polares y alpinas.

Plantas hospederas: ericales.

Hongos endófilos: ascomicetos y basidiomicetos (Álvarez y Ramos 2004).

Orquideoide las orquídeas en sus primeros estadios, no contienen clorofila. En estas etapas los hongos con los que se asocian, al ser saprobios o parásitos de otras plantas, son capaces de transferir a la orquídea compuestos orgánicos de carbono y otros nutrimentos. Generalmente al llegar a la edad adulta son fotosintéticas y ya no requieren el hongo.

Distribución: zonas templadas y tropicales.

Plantas hospederas: orquídeas.

Hongos endófilos: basidiomicetos (Álvarez y Ramos 2004).

Ectendomicorrizas los hongos que las producen colonizan de forma dual las raíces: externamente formando un manto cortical e internamente penetrando intracelularmente en el córtex, formando unas estructuras en forma de tirabuzón llamadas coil (Álvarez y Ramos 2004).

A continuación se describen de forma más extensa los dos tipos de micorrizas mas estudiadas, las endomicorrizas y las ectomicorrizas.

### 2.3.2.1 Micorriza Vesículo-arbuscular (Endomicorriza)

Las micorrizas vesículo-arbusculares (VA) no forman ni manto ni red de Harting, ni siquiera los ovillos. En su lugar encontramos en el interior de las células de la raíz unas estructuras muy ramificadas que recuerdan a unos diminutos árboles llamados arbusculos que absorben el almidón de la célula vegetal y es donde se produce el intercambio entre el hongo y la planta, también encontramos unas estructuras globosas con material lipídico que actúan tanto de reserva del hongo como órganos de reproducción asexual, llamadas vesículas (Fig. 16). Algunas hifas emergen de la raíz y se desarrollan formando el micelio externo, cuya función es absorber los nutrimentos (Cruz, 1992 y Brundrett, 2004).

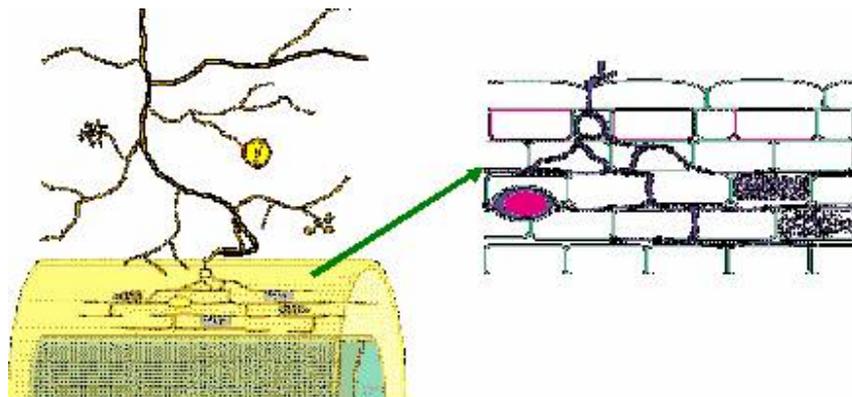


Fig. 16 Estructuras de una endomicorriza, mostrando hifas en el interior de la célula y vesículas y arbusculos (Brundrett *et. al.*, 1996).

La micorriza vesículo arbuscular cambia poco la morfología de la raíz. La infección se origina por la propagación del micelio en la raíz, o por la germinación de clamidosporas o esporas de resistencia que forman apresorios (hifa vegetativa que se adhiere en la superficie del hospedante) sobre la superficie de la raíz y posteriormente penetra en ella. Las hifas no invaden la endodermis, los tejidos vasculares, ni meristemas.

### 2.3.2.2 Ectomicorriza

Los hongos ectomicorrizógenos se forman por la asociación de las raíces de los árboles y las plantas leñosas, principalmente coníferas. El proceso de infección se inicia cuando el hongo coloniza la superficie de las raicillas secundarias de la raíz y con frecuencia forma un manto grueso a su alrededor. Las hifas penetran a la raíz entre las células corticales, formando una serie de hifas interconectadas denominadas red de Hartig (Fig. 17). En esta zona es donde existe contacto con la raíz para el intercambio de nutrientes. El hongo también produce hormonas que estimulan el crecimiento y ramificación de las raíces de la planta, incrementando de esta manera la superficie de absorción (Cruz, 1992 y Brundrett, 2004).

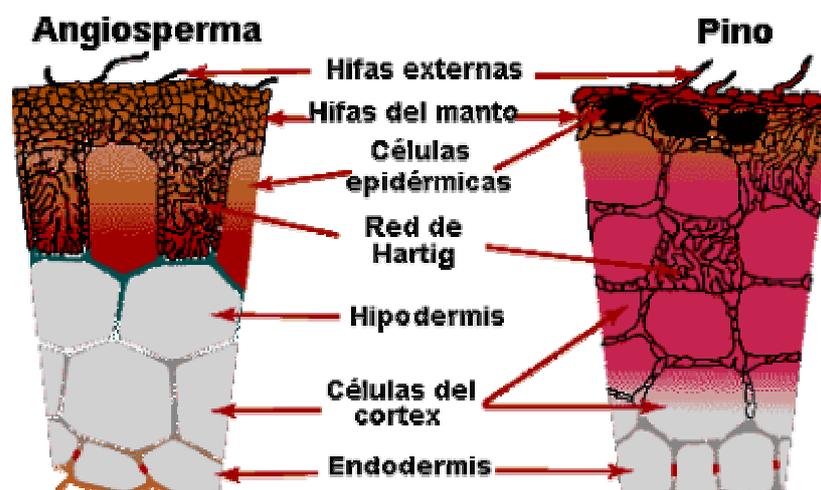


Fig. 17 Detalle de un típico sistema de asociación de hongo ectomicorrizógeno con raíz de agiosperma y pino, mostrando las partes principales (Brundrett *et. al.*, 1996).

Las raíces involucradas en la formación de ectomicorrizas son las más pequeñas del sistema radicular, las cuales se ramifican abundantemente para constituir un sistema que aumente la capacidad de absorber agua y minerales del humus y de la hojarasca del suelo. La forma de ramificación es característica de cada hospedero. En la modificación morfológica de la raíz se pierden sus pelos absorbentes y generalmente los extremos se ramifican profusamente y se acortan ensanchándose (Fig. 18). La existencia de fosfatasas en la superficie de las micorrizas les permite explorar fosfatos del suelo más eficientemente que las raíces no micorrizadas (Herrera y Ulloa, 1990 y Cruz, 1992).

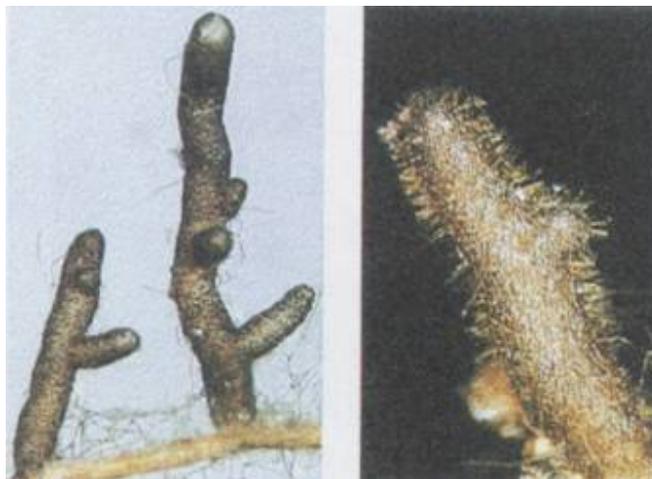


Fig. 18 Raíces Modificadas en la Ectomicorriza formada por un hongo sobre *Fagus sylvatica* (Brundrett *et. al.*, 1996).

Los hongos ectomicorrizógenos son importantes en el ciclo de los nutrientes, ya que los absorben, trasladan y almacenan, evitando que se pierdan por lixiviación del suelo. Además, pueden transformar las sustancias orgánicas complejas y minerales en nutrientes utilizables por las plantas. Cuando los hongos que establecen la simbiosis se reproducen, desarrollan cuerpos fructíferos que contienen grandes cantidades de estos compuestos químicos, que al descomponerse los integran nuevamente al suelo, también sirve de alimento para insectos y animales superiores (Bruns y Shefferson, 2004).

Los hongos ayudan a la nutrición de la planta por un lado y por otro sirve para proteger el tejido de la raíz contra el ataque de patógenos, debido a que el manto del hongo otorga una barrera mecánica, además de incrementar su resistencia a enfermedades ya que los hongos pueden secretar antibióticos o bien, simplemente se establecen como una población protectora contra la rizósfera.

El extremo de una raíz ectomicorrizada típicamente está cubierta por un manto de hifas, como una vaina, que puede ser desde una capa floja hasta pseudo-parenquimática (Fig 19). Desde este manto se extiende una red de hifas entre las primeras capas de células de la corteza radical y rara vez llegan hasta la endodermis, pero sin entrar en el interior de las células, de aquí el nombre de ectomicorrizas (Fig. 20) (Arias, *et. al.*, 1998).

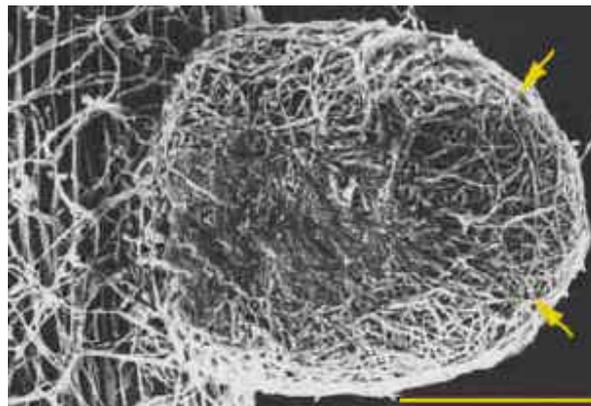


Fig. 19. SEM de raíz de pino colonizada por *Pisolithus tinctorius*. Manto de Hifas (flechas) (Brundrett *et. al.*, 1996).

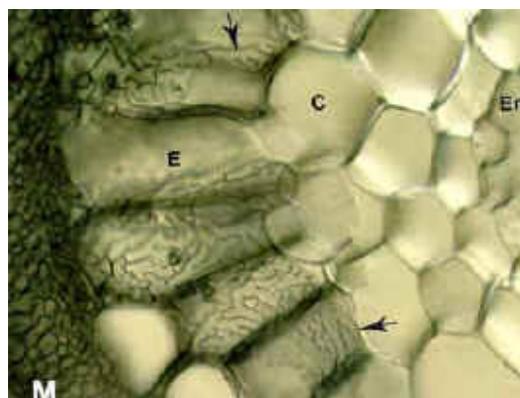


Fig. 20 ECM en corte transversal de raíz de *Populus tremuloides* Mostrando hifas en laberinto de la red de Hartig (flecha) (Brundrett *et. al.*, 1996).

Las ectomicorrizas están ampliamente dispersas en la naturaleza y se estima que el 10% de la flora mundial presenta este tipo de asociación. Principalmente las familias Pinaceas, Betulaceas, Fagaceas, y también Ericaceas y algunas Myrtaceas, Junglandaceas y Salicaceas (Arias *et.al.*, 1998).

Los hongos que forman estas micorrizas son en general los conocidos hongos de sombrero, como "amanitas" y "boletos". Sólo en Norte América son más de 2,000 especies, en su mayoría Basidiomycetes y algunos Ascomycetes ("trufas"). Muchos de estos hongos pueden ser cultivados en cultivo puro, aislados de su planta huésped, pero no pueden formar carpóforos en su ausencia (Arias *et.al.*, 1998).

### 2.3.3 Importancia de las Micorrizas

Los hongos son de gran importancia para el mantenimiento de los bosques, ya que la mayoría de las especies arbóreas no podrían sobrevivir por mucho tiempo sin la presencia de las micorrizas, sobre todo, en ambientes biológicos de gran competencia.

La presencia de hongos en las raíces de los pinos, es una condición indispensable para su establecimiento y posterior desarrollo, ya que juegan un papel fisiológico en el crecimiento de las plantas. Con la asociación hongo-raíz se obtienen varias ventajas entre ellas:

- a) Generan un mayor crecimiento de las plantas en los suelos de baja fertilidad, incrementando el área fisiológicamente activa en las raíces.
- b) Aumenta la absorción de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y micronutrientes de la planta.
- c) Incrementan la captación de agua en la planta.

- d) Se incrementa la tolerancia a la sequía, altas temperaturas del suelo, toxinas orgánicas e inorgánicas, bajos contenidos de materia orgánica y pH's extremos.
- e) Ayudan a reducir los efectos causados por la interacción de agentes patógenos como son otros hongos o nematodos.
- f) Reducen el estrés ocasionado por los cambios de humedad y temperatura.
- g) Inducen relaciones hormonales que producen que las raíces alimentadoras permanezcan fisiológicamente activas por periodos mayores que las raíces no micorrizadas.
- h) Para los viveristas que producen árboles, el hecho de trabajar con micorrizas les puede suponer conseguir árboles bien desarrollados en menos tiempo y con menos bajas potenciales.
- i) La mayor adaptabilidad y vigorosidad de los árboles les permite sobrevivir mejor y sufrir menos las consecuencias del paso de un ambiente extremadamente favorable a un medio hostil.
- j) Además las micorrizas quedan adheridas al árbol y por tanto continúan haciendo su efecto mientras el árbol se adapta a las condiciones de su hábitat definitivo (Santiago *et. al.*, 1999).

## 2.4 Caracterización e Identificación de Hongos

La identificación de hongos es posible a dos niveles dependiendo de la exactitud que se desea. Como primer nivel, los especímenes frescos pueden ser comparados con ilustraciones a color que están disponibles en guías específicas y con claves simples, reconociendo el género de los hongos. La identificación a nivel de género es usualmente suficiente para determinar si un espécimen es o no micorriza. La investigación a segundo nivel es examinándolos microscópicamente, la medición de esporas, tests químicos, otras características y consultando con especialistas y trabajos publicados.

La observación microscópica constituye la primera etapa del estudio del micelio, que permite conocer algunas características de los microorganismos, en los hongos se observan los tubos filamentosos del micelio llamados hifas, los tipos de anastomosis, las paredes perforadas, o septos que dividen las hifas en células que contienen uno o dos núcleos, las fíbulas o clamps.

## 2.5 Métodos de Conservación de Hongos

### 2.5.1 Transferencia Periódica

Este método consigue menor estabilidad genética, puesto que al estar las células creciendo hay una alternancia de generaciones, y al cabo de un tiempo mayor las células que se están guardando serán descendientes lejanas de las células iniciales y es posible que ya no conserven algunas de sus características. Para llevar acabo la transferencia periódica la cepa del hongo aislado se guarda en forma de cultivo activo en un tubo con el medio de cultivo en el que ha crecido. Sin embargo, estas células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celular, por lo que es necesario transferirlas a otro tubo con medio de cultivo fresco (García y Uruburu, 2004).

### 2.5.2 Liofilización

La liofilización conocida también como secado por congelación es un proceso de secado por sublimación, es decir el paso de una sustancia (agua) de su estado sólido al estado gaseoso sin pasar por el estado líquido. La sustancia es evaporada mediante la aplicación de temperatura y vacío cuando ha sido previamente congelada. Es un método de conservación a largo plazo que paraliza el crecimiento de las células, sin que estas mueran. Así se garantiza al máximo la estabilidad genética (García y Uruburu, 2004).

### 2.5.3 Aceite Mineral

Una manera relativamente simple y barata de almacenar cepas de hongos por largo tiempo, consiste en limitar el oxígeno disponible para el crecimiento de las mismas. Este método da altos porcentajes de viabilidad y la estabilidad para caracteres morfológicos y fisiológicos es buena. Consiste en adicionar aceite mineral de densidad 0.8 a los tubos de ensayo en donde está creciendo el micelio. Esto se hace cuando el micelio ha cubierto la superficie de agar en el tubo de ensayo. El material así procesado se puede guardar por espacio de 1-2 años, dependiendo de la especie (García y Uruburu, 2004).

## 2.6 Pruebas Fisiológicas y Bioquímicas

Las plantas ectomicorrízicas han tenido que colonizar diversos hábitats en una amplia gama geográfica. Sin embargo, para que un hongo pueda colonizar exitosamente las raíces de un árbol influyen factores edafológicos y ambientales, tales como temperaturas, pH, humedad, disponibilidad de nutrientes, etc. Por esta razón se planeó medir la influencia de la temperatura y degradación de compuestos de las cepas aisladas.

### 2.6.1 Crecimiento en Temperaturas Extremas

Hutchison (1990) mencionó que la sensibilidad y tolerancia de los hongos ectomicorrizógenos a las temperaturas extremas puede ser empleada como la herramienta taxonómica para marcar la diferencia de los aislamientos y que en comparación con las características fisiológicas y bioquímicas permite definir la identidad genérica o específica de las cepas de identidad desconocida.

## 2.6.2 Degradación de Compuestos

Los microorganismos tienen toda una gama de enzimas extracelulares que degradan polímeros que se encuentran alrededor que le permiten nutrirse y sobrevivir en ambientes específicos. Los hongos, como cualquier organismo viviente digiere algunas moléculas complejas con enzimas hidrolíticas que secretan a su alrededor, las cuales rompen los sustratos en sub-unidades más pequeñas. Algunas de estas moléculas complejas que son degradadas para obtener fuentes de carbono y nitrógeno se encuentran en el almidón, gelatina, lignina, celulosa, pectina, lípidos, urea y aminoácidos.

Los hongos tienen una forma de nutrición característica y altamente exitosa, requieren como fuentes de energía y de carbono de compuestos orgánicos preformados. Las moléculas más simples como monosacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos, los obtienen a través de la membrana celular y las moléculas más complejas que incluyen muchos disacáridos, deben degradarse en el exterior de la célula por medio de enzimas extracelulares. Los alimentos se digieren por enzimas hidrolíticas que los hongos secretan a su alrededor, las cuales rompen los sustratos en sub-unidades más pequeñas. Los hongos como todos los organismos vivientes toman el material que está alrededor de sus membranas, lo transportan por sitios metabólicos activos y lo transforman en energía para el mantenimiento y procesos biosintéticos (Garraway y Evans, 1991).

Entre las diferentes fuentes de carbono y nitrógeno que usan los hongos se encuentran la lignina, celulosa, pectina, almidón, lípidos, gelatina, urea y aminoácidos. Las investigaciones sobre la actividad enzimática de varios hongos han tenido interés para diferenciar los grupos ecológicos basados en su modo de nutrición. El medio basal utilizado para el seguimiento de las pruebas fisiológicas fue MMN descrita por Hutchison en 1990.

Se ha reportado que diferentes cepas de la misma especie de hongos pueden variar en su habilidad para utilizar ciertas clases de compuestos de carbono y nitrógeno para su transporte y asimilación en las diferentes vías metabólicas (Hutchison, 1990).

## 2.7 Estudios Moleculares

Taxonómicamente existen entre 5000 y 6000 especies de hongos ectomicorrízogenos principalmente basidiomicetos. Por tal motivo es necesaria su identificación no solo morfológica si no también molecular y una forma de identificar estas especies es por medio de la técnica de ADN recombinante como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). La técnica de PCR-RFLP se conoce como el procedimiento que detecta la región polimórfica del ADN, uno de los más utilizados es el ADN ribosomal amplificado por un cebador o primer específico de oligonucleotidos y digerido con diferentes enzimas de restricción. La variable a medir para los estudios moleculares es la secuencia génica del Espacio Interno Transcrito (ITS) completo, localizado entre el gen de la subunidad menor y la subunidad mayor del ADN ribosomal nuclear. La variación del ITS se analiza y se compara la similitud y disimilitud de los fragmentos digeridos (Gomez *et. al.*, 2002).

La identificación por PCR ha sido el método de selección más utilizado por su rapidez, reproducibilidad y potencial para la comparación entre micorrizas y esporocarpos recolectados en diferentes épocas y áreas. Los análisis por polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) acoplados a la PCR y la amplificación al azar del polimorfismo del ADN (RAPD) entre otros, varían el grado de resolución del polimorfismo, por lo cual se puede seleccionar cualquier tipo de marcador molecular, dependiendo del organismo a identificar (Bruns *et. al.*, 1991).

## 2.7.1 Extracción de ADN Total

La extracción y purificación del ADN son la base de cualquier protocolo en laboratorios de biología molecular y depende de la naturaleza del material inicial (micelio, esporocarpo, esporas). Este procedimiento primero consiste en romper las células fúngicas, la segunda etapa remueve las proteínas celulares por precipitación dejando el ADN en solución, finalmente, el ADN genómico es concentrado y desalado por precipitación con isopropanol.

### 2.7.1.1 Determinación de Pureza y Cuantificación de ADN

La pureza del ADN es un factor muy importante para los subsecuentes análisis moleculares. Existen en general métodos diferentes para medir la cantidad de ácidos nucleicos en solución entre los cuales podemos mencionar al método de absorbancia y el de fluorescencia, la elección de estos está en función del método de extracción del ácido nucleico.

#### 2.7.1.2.1 Espectrofotometría

La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda (260 nm) permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico en la muestra. Si la densidad óptica (OD) es 1, corresponde a aproximadamente 50  $\mu\text{g/mL}$  de cadena doble de ADN, entonces calculamos la concentración de ADN que tenemos en nuestras muestras, midiendo simplemente su absorbancia, sin necesidad de realizar una curva patrón.

Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 (principalmente por residuos de triptofano), así las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico.

El cálculo de una relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm es una manera común para hacer un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de una

preparación de ADN con proteínas del ácido nucleico, ésta relación debe estar entre los valores de 1.8 y 2.0. Si la muestra es pura, el primer método comúnmente usado para la cuantificación es el de espectrofotometría.

### 2.7.1.3 Electroforesis en Gel

La electroforesis en gel es un modo conveniente de cuantificar el ADN y analizar su estado físico al mismo tiempo, se puede visualizar si existen contaminantes que pueden estar presentes en la muestra de ADN o si está degradado.

La electroforesis es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial, se define como el método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, de modo que se diferencian en el comportamiento en un campo eléctrico. Aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migrarán hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo (Sambrook y Russell, 2001).

En biología, no se utiliza esta técnica con iones, sino con macromoléculas o incluso con células enteras. Entre las macromoléculas, las más utilizadas son las proteínas seguidas de los ácidos nucleicos, ya que ambos tipos presentan una carga importante, algo que no presentan los lípidos, sin contar con que son insolubles.

El método consiste en inmovilizar las muestras en estudio en un material gelatinoso (gel). El gel se somete a una corriente eléctrica durante un periodo de tiempo determinado. Cada muestra comenzará a migrar a través de los poros del gel con una velocidad diferencial, que dependerá de la carga eléctrica y del tamaño molecular. Cuando las separaciones se han completado se interrumpe el paso de corriente y las muestras separadas se tiñen para visualizarse. Cada muestra se encontrará a una distancia distinta respecto al origen (Sambrook y Russell, 2001).

Los ácidos nucleicos presentan carga y son solubles ya que tienen un grupo *fosfato*, parte que confiere la carga, y está presente de forma regular en la estructura. Los ácidos nucleicos tienen la capacidad de migrar en un campo eléctrico y por tanto, son susceptibles de ser separados por electroforesis.

El gel se encuentra sumergido en un electrolito tamponado con Tris-Borato (no glicina), para garantizar que los ácido nucleico estén cargados negativamente; por esto a la técnica se le denomina electroforesis de inmersión. Las moléculas migrarán hacia el polo positivo, de modo que viajarán en esa dirección por el gel, separándose por tamaño (nº de nucleótidos) (Sambrook y Russell, 2001), a la hora de cargar la muestra se colocan unos marcadores de frente (Loading dye) que nos permitan detener la electroforesis en el momento que lo creamos oportuno.

Para visualizar las bandas, hay que teñir el gel o marcar radiactivamente las moléculas. El método más utilizado en geles de agarosa es el del **BrEt** (bromuro de etidio), el cual se comporta como un agente intercalante, de modo que además de disminuir la densidad de la molécula, tiene la capacidad de emitir luz cuando se le excita con luz ultravioleta. Hay que tener cuidado con este compuesto ya que es altamente cancerígeno (Sambrook y Russell, 2001).

La electroforesis en gel es muy utilizada en la detección, control de pureza, caracterización, cuantificación (por comparación con controles) así como preparación y purificación (por extracción de bandas desde el gel) de moléculas y fragmentos de DNA y RNA (Sambrook y Russell, 2001).

Los geles que se emplean son geles tridimensionales de polímeros ramificados que tienen los espacios entre ramificación rellenos de líquido. Las redes de polímeros no sólo reprimen la convección sino que también actúan como cribas que pueden retardar y hasta bloquear la migración de los analitos poliméricos más grandes. En cambio los iones pequeños pueden moverse libremente a través de la estructura porosa del gel. De este modo la electroforesis en gel tiene dos mecanismos de

separación: la electroforesis, que separa por la relación carga/tamaño y el tamizado por el gel, que separa mayormente por tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.

La agarosa es un polímero derivado de un polisacárido neutro, que gracias a su poder de gelificación y propiedades físico-químicas, lo han convertido en el soporte más común para electroforesis en el área de Biología Molecular. La poliacrilamida es un polímero formado a partir de acrilamida y metilenbisacrilamida. La concentración de ambos reactivos define el grado de reticulación del gel. Ambos geles tienen en común que adquieren la misma forma y están prácticamente libres de cargas iónicas. Esto es importante para evitar que la disolución tampón se desplace por el gel cuando se active el campo eléctrico (Sambrook y Russell, 2001).

### 2.7.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El impacto de la PCR en la biología molecular ha sido muy grande. Este es un método para obtener múltiples copias de fragmentos de ADN, utiliza una enzima polimerasa estable al calor y ciclos de calentamiento y enfriamiento para seccionar y separar, sucesivamente las hebras de ADN y utilizar los fragmentos así obtenidos como plantillas para la formación de nuevo ADN completo. La figura 21 muestra un esquema general de la PCR.

Es una técnica que permite duplicar un número ilimitado de veces un fragmento de ADN en un tubo de ensayo. Mediante esta técnica pueden generarse millones de moléculas idénticas, a partir de una molécula de ADN. Esto se puede conseguir en unas horas. La reacción es muy sencilla, necesita cantidades de ADN muy pequeñas y sólo se precisa un tubo de ensayo, algunos reactivos, una fuente de calor y unas pequeñas cadenas de nucleótidos que actúan como cebadores o primers (Sambrook y Russell, 2001).

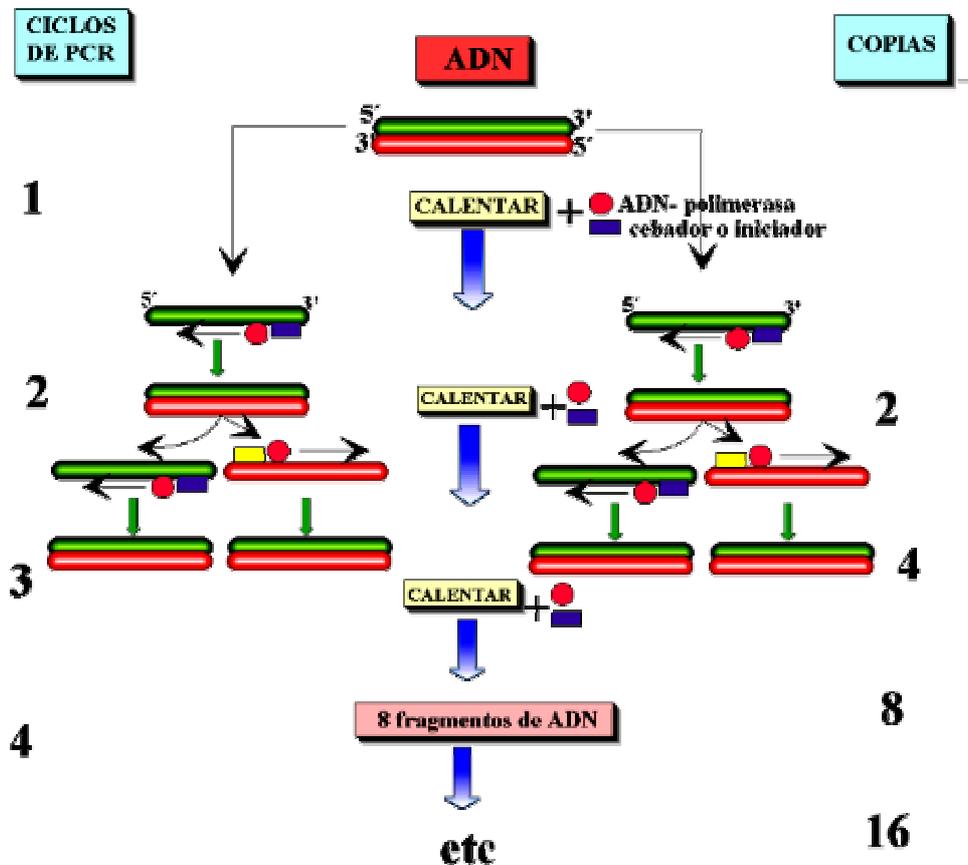


Fig. 21 Esquema de las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.

En la caracterización de hongos endo y/o ectomicorizógenos, las técnicas basadas en la PCR tienen una gran cantidad de protocolos, entre los cuales, los más comunes son: amplificación de una región variable de genes ribosomales (ITS o IGS), polimorfismos del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP del inglés "restriction fragment length polymorphism"), o la amplificación al azar del polimorfismo del ADN (RAPD's del inglés "random amplified Polymorphic DNA), entre otros.

Este estudio pretende realizar un análisis de una región del genoma como es el ITS (Internal Transcribed Spacer) que se encuentra repetidamente entre los genes del ARN ribosomal de la subunidad mayor y menor del ADN nuclear. El ITS contiene dos regiones espaciadoras separadas por el gen 5.8 S ARNr.

Estas regiones fueron amplificadas mediante el uso de pares de primers o iniciadores universales como son ITS 1 e ITS4 (White, *et. al.* 1990).

### 2.7.2.1 Aplicaciones de la PCR

1. Secuenciación: Una de las razones más comunes para el uso de la PCR es la formación de suficiente cantidad de ADN molde para su secuenciación. Es mucho más sencillo y rápido que la clonación en células.

2. Estudios evolutivos: Mediante la PCR se pueden amplificar genes de organismos ya extinguidos y comparar estos genes con los genes semejantes de organismos actuales y poder reconstruir árboles filogenéticos. El PCR también se ha utilizado para conseguir el mapa del genoma humano.

3. Huellas dactilares del ADN: La determinación de las huellas dactilares genéticas constituye una de las aplicaciones más interesantes de la PCR. Mediante esta técnica es posible comparar muestras diferentes de ADN para comprobar si pertenecen al mismo individuo o no, o si existe parentesco entre ellas (Sambrook y Russell, 2001).

Recientemente se han hecho esfuerzos para identificar y describir las ectomicorrizas. Tales estudios se han llevado a cabo usando una variedad de métodos: desde la comparación de micorrizas en campo y sintetizadas *in vitro*, pasando por descripción de la micorriza, refiriéndose a las descripciones anatómicas y más recientemente, comparando el perfil de amplificaciones de fragmentos de ADN.

A continuación se presenta un cuadro que recopila los trabajos relevantes sobre las estrategias utilizadas para la caracterización e identificación de hongos ectomicorrizógenos.

**Cuadro 1. Estrategias para el estudio de la caracterización e identificación de hongos ectomicorrizógenos.**

Hongo	Estudios morfológicos	Estudios moleculares (Primers y Enzimas)	Temperaturas de amplificación	Autor/año
<i>Botryosphaeria sp.</i>	No realizado	PCR-ITS: ITS1/NL4 RFLP: Alu I, Asu I, Hae II, Mbo I, Análisis asistidos por computadora, Secuenciación de ADN, Análisis del mapa de restricción.	95°C 5 min 94°C 30 s 30 ciclos 50°C 30 s 72°C 1 min 72°C 10 min	Alves <i>et.al.</i> , 2005.
<i>Ramaria acrisiccenscens</i> , <i>R. cyaneigranosa</i> , <i>R. sandaraccina</i> , <i>R. celerivirescens</i> , <i>R. flavobrunnescens</i> .	Observación morfológica	PCR-ITS: ITS1F-ITS4B RFLP: Alu I, Hinf I, Rsa I, Hae III, Taq I	95°C 3 min 95°C 30 s 30 ciclos 55°C 30 s 72°C 1.5 min	Nouhra <i>et.al.</i> , 2005.
<i>Cantharellus cibarius</i>	No realizado	PCR-ITS: ITS1F-ITS4 RFLP	94°C 2 min 94°C 2 min 50°C 25 s 72°C 2 min 72°C 10 min	Guevara <i>et.al.</i> , 2004.
<i>Lactarius mairei</i> , <i>L. tesquorum</i> , <i>L. pubescens</i> , <i>L. scoticus</i> , <i>L. spinosolus</i> , <i>L. tomentosus</i> .	Características anatómicas del manto.	PCR-ITS: ITS1F-ITS4B	95°C 2 min 95°C 15 s 10 ciclos 63°C 20 s 72°C 1 min 53°C 35 ciclos 72°C 10 min.	Nuytinck <i>et.al.</i> , 2004.
<i>Lactarius deliciosus</i>	Crecimiento de la planta	PCR-ITS: ITS1F-ITS4		Guerin-laguette <i>et. al.</i> 2003.

Hongo	Estudios morfológicos	Estudios moleculares (Primers y Enzimas)	Temperaturas de amplificación	Autor/año
<i>Tricholoma magnivelare</i>	Estudios taxonómicos Estudios geográficos Estudios ecológicos.	No realizado		Zamora y Nieto de Pascual 2003.
<i>Rhizopogon, Cortinarius, Lactarius</i>	No realizado	PCR-ITS: ITS1F,ITS4B-GL, Desnaturalización gradiente gel, Electroforesis, Secuenciación de DGGE bandas	94°C 3 min 94°C 1 min 50°C 1 min 72°C 3 min 30 ciclos 72°C 10 min	Landerweert <i>et. al.</i> , 2003
<i>Amanita muscaria, Cenococum geophilum, Chondrogaster angustisporus, Hyterangium garoneri, Paxillus involutus, Pisolitus sp., Scleroderma sp., S.Citrum</i>	No realizado	PCR-ITS: NSA3/NLC2 ITS1F/NLB3 RFLP: Hinf I y Taq I		Malvarez y Olveira 2003.
<i>Lactarius sanguifluus, Lactarius vinosus.</i>	Características macroscópicas del esporocarpo y de esporas	PCR-ITS: ITS1F-ITS4B Secuenciación ITS	95°C 2 min 95°C 15 s 10 ciclos 63°C 20 s 72°C 1 min 53°C 30 ciclos 72°C 2 min.	Nuytinck y Verbeken 2003.
Varias	No realizado	PCR-ITS:ITS1F-ITS4B Clonación, Identificación de fragmentos ITS	94°C 3 min 94°C 1 min 50°C 1 min 72°C 3 min 72°C 10 min	Landerweert <i>et. al.</i> , 2003.

Hongo	Estudios morfológicos	Estudios moleculares (Primers y Enzimas)	Temperaturas de amplificación	Autor/año
<i>Pleurotus pulmonaris</i>	Crecimientomicelial Producción biomasa Actividad enzimática Crecimiento a través de una membrana de celofán	No realizado		Téllez <i>et. al.</i> , 2003.
<i>Russulaceae</i>	Características macroscópicas del cuerpo fructífero fresco y de las esporas	PCR-ITS: ITS1F-ITS4B Secuenciación ITS	95°C 2 min 95°C 15 s 10 ciclos 63°C 20 s 72°C 1 min 53°C 35 ciclos 72°C 2 min.	Nuytinck <i>et. al.</i> , 2003.
<i>Tricholoma matsutake</i> , <i>T. bakamatsutake</i> , <i>T. fulvocastaneum</i> , <i>T. ponderosum(magnivelare)</i> , <i>T. robudtum</i> ,	No realizado	PCR-ITS SSR Caracterización	94°C 1 min 1 ciclo 94°C 30 s 29 ciclos 30 s para cada primer 72°C 30 s 94°C 30 s 1 ciclo 72°C 5 min	Lian <i>et. al.</i> , 2003
<i>Laccaria bicolor</i>	Pruebas de crecimiento y caracterización de colonias	No realizado		Santiago <i>et. al.</i> , 2002.
<i>Tricholoma matsutake</i>	No realizado	PCR-IGS1:SSA/CNL12 Secuencia nucleótidos RFLP: Msp I, Hae III y CfrB I, Alu I, Sau 3 AI, Scr FI y Hinf I Secuencia IGS1		Guerin-laguette <i>et. al.</i> , 2002.

Hongo	Estudios morfológicos	Estudios moleculares (Primers y Enzimas)	Temperaturas de amplificación	Autor/año
<i>Laccaria bicolor</i>	No realizado	PCR-ITS RAPD	94°C 3 min 30 ciclos 94°C 30 s 50°C 30 s 72°C 2 min 72°C 10 min	Weber <i>et. al.</i> , 2002.
<i>Russula nigricans</i> , <i>Lactarius sp.</i> , <i>Leccinum scabrum</i> , <i>Rhizopogon sect</i> , <i>Villosuli</i> , <i>Telephora terrestris</i> .	Características de Raíces, Manto e Hifas	PCR-ITS:ITS1F-NLGB mun, Secuenciación ADN	95°C 1 min 35 ciclos 94°C 45 s 48°C 45 s 72°C 55 s 72°C 2 min.	Sakakibara <i>et. al.</i> , 2002.
<i>Tricholoma terrum</i>	No realizado	RAPD		Huai <i>et. al.</i> , 2002
<i>Agaricaceae</i> , <i>Amanitaceae</i> , <i>Bankeraceae</i> , <i>bolbitaceae</i> , <i>Boletaceae</i> , <i>Ceratobasidiaceae</i> , <i>Clavulinaceae</i> , <i>Coniophoraceae</i> , <i>Curtinaceae</i> .	No realizado	PCR-ITS: MYK1/MYK 2 (Bowen1992) ML3/ML4, L5/ML6 (White 1990) ITSF/ITSR y CNL12/SSA Secuenciación ADN Restricción digestión y PAGE electroforesis		Glen <i>et. al.</i> , 2001.
<i>Tricholoma magnivelare</i> y <i>T. bakamatsutake</i>	No realizado	PCR-ITS:ITS1F/ITS4B RLFP: Alu I, Hinf I, Rsa I, Hae III y Taq I	95°C 3 min 95°C 3 seg 30 ciclos 55°C 30 seg 72°C 1.5 min 72°C 10 min	Yamada <i>et. al.</i> , 2001.

Hongo	Estudios morfológicos	Estudios moleculares (Primers y Enzimas)	Temperaturas de amplificación	Autor/año
<i>Lyphyllum semitale</i> , <i>Lyphyllum shimeil</i> , <i>Tricholoma flavovirens</i> , <i>T. portentosum</i> , <i>T. saponaceum</i> , <i>Suillus granulatus</i> , <i>S. loteus</i> , <i>S. bovinus</i> , <i>Lactarius hatsudake</i> , <i>L. akahatsa</i> .	Morfología y anatomía microscópica	PCR-ITS ITS1F-ITS4B basidiomicetes RFLP	95°C 3 min 95°C 30 s 30 ciclos 55°C 30 s 72°C 90 s 72°C 10 min	Yamada <i>et. al.</i> , 2001.
Amphinema byssoides, Catathelesma imperiale C. favrei, C.brunneus, C.calochrous, C. oraceus C. delibotus, C. evernius, C.glaucopus,C.hinnueleus, C.multiformis,C.trformis, C. percomis, C. muscigenus, Dermocybe crocea, Geopora arenosa, Hebeloma crustuliniforme, Hydnellum caeruleum, Hygrophorus chysodom,	Descripción morfológica y foto microscópica. Comparación de características anatómicas.	PCR-ITS: ITS 1F-ITS 4 RFLP: Alu I, Hha I, Hinf I, Rsa I		G. Kernaghan 2001
<i>Lyphyllum semital</i> , <i>L.shimeiji</i> , <i>L. decastes</i> , <i>L. fomusum</i> <i>Tricholoma Flavorvi-rens</i> , <i>T. portentosum</i> , <i>T. saponaceum</i> , <i>Leucopaxillus giganteus</i> , <i>Suillus granulatus</i> , <i>S.luteus</i> , <i>S. bovinus</i> , y otras.	Adaptación de micorrizas al suelo	No realizado		Yamada <i>et. al.</i> , 2000.

Hongo	Estudios morfológicos	Estudios moleculares (Primers y Enzimas)	Temperaturas de amplificación	Autor/año
<i>Boletus satanas</i> , <i>Chalciporus pierrhognesii</i> , <i>Hebeloma crustuliniforme</i> , <i>H. edurum</i> , <i>Suillus luteus</i> , <i>S. variegatus</i> , <i>Tricholoma caligatum</i> , <i>T. focale</i> , <i>T. striatum</i> , <i>Xerocomus subtomentosus</i> .	Descripción de la morfología del micelio, margen, presencia de exudados, etc. Microscópicamente tamaño de hifas, ramificaciones, presencia de fibulas y anastomosis			Sánchez <i>et. al.</i> , 2000.
<i>Boletus edulis</i> , <i>Lactarius deliciosus</i> y <i>Suillus luteus</i>	Características morfológicas de las colonias y crecimiento en medio de cultivo.			P. Royo, M. Fernández Torran y C. R. Fischer. 1998.
<i>Pisolithus tinctorius</i>	No realizado	PCR-ITS P-01/P-02 RAPD	94°C 1 min 60°C 2 min 72°C 3 min 30 ciclos 72°C 10 min	Anderson <i>et. al.</i> , 1998
<i>Lactarius alnicola</i> , <i>L. caespitosus</i> , <i>L. aff-indeliciosus</i> , <i>L. uvidus</i> , <i>L. pubescens</i> , <i>R. bre-vipes</i> , <i>R. fragilis</i> , <i>R. integra</i> , <i>R. torulosa</i> , <i>R. silvicola</i> , <i>R. nigricans</i> , <i>R. xerampelina</i>	Morfología del manto	PCR-ITS ITS1F-ITS4 RFLP	94°C 2 min 94°C 1 min 30 ciclos 55°C 1 min 72°C 2 min 72°C 10 min	Kernaghan <i>et. al.</i> , 1997.
<i>Pisolithus tinctorius</i>	No realizado	PCR-ITS: ITS 1F-ITS 4		Carnero <i>et. al.</i> , 1997

Hongo	Estudios morfológicos	Estudios moleculares (Primers y Enzimas)	Temperaturas de amplificación	Autor/año
<i>Amanita muscaria</i> , <i>A. pruphyria</i> , <i>A. rube-</i> <i>scens</i> , <i>Boletus edulis</i> , <i>B.</i> <i>aereus</i> , <i>B. erythro-pusm</i> <i>B. calopus</i> , <i>Lactarius</i> <i>deterrimus</i> , <i>L. deli-</i> <i>ciosus</i> , <i>L. porni-nsis</i> , <i>L.</i> <i>scrobicalatus</i> .	No realizado	PCR-ITS CTK-052/CTK-031	95°C 35 s 35 ciclos 62°C 60 s 72°C 60 s 95°C 90 s 55°C 60 s 72°C 10 min	Kreuzinger <i>et. al.</i> , 1996.
<i>Suillus granulatus</i> .	Morfología del esporocarpio	RAPD		Jacobson <i>et. al</i> , 1993.

### 3. HIPÓTESIS

La caracterización fisiológica, bioquímica y molecular de un simbiote en la asociación micorrízica, permite seleccionar un hongo micorrízico de interés para la producción de hongos comestibles con valor agregado a programas de reforestación.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo General

- Seleccionar e identificar parcialmente especies o cepas de hongos ectomicorrizógenos específicos por medio de algunas pruebas fisiológicas, bioquímicas y moleculares.

#### 4.2 Objetivos Particulares

- Evaluar el crecimiento y adaptación del hongo ectomicorrizógeno en diferentes medios de cultivo.
- Estudiar la influencia de la temperatura en el crecimiento micelial.
- Realizar algunas pruebas enzimáticas con fines de caracterización.
- Seleccionar algun(os) hongo(s) ectomicorrizógeno(s) susceptible(s) a su posterior propagación en plántulas de interés.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Lugar de Trabajo

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTA) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo dentro Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria, como parte de las actividades del proyecto “Desarrollo de un banco de cepas nativas de hongos ectomicorrizógenos del Estado de Hidalgo” (PROMEP/103.5/03/1130).



Fig. 22 Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTA)

### 5.2 Recolecta de Material Biológico

Los hongos que se estudiaron fueron recolectados en temporada de lluvia, en la región conocida como “Sierra de Pachuca” que se localiza en la parte centro-meridional del estado de Hidalgo, a unos 100 km al NNE de la Ciudad de México. La porción sureste de esta sierra se localiza dentro de las coordenadas geográficas: 20° 03' a 20°06' de lat. N y los 98°30' a 98°33' Long. O del Meridiano de Greenwich (Suárez, 1997)

Una de las áreas de estudio está comprendida dentro del predio particular: Fracción II de la Ex. Hacienda de Cuyamaloya e Innominado, en el municipio de Singuilucan, Hidalgo. Los copropietarios de los predios están organizados en la Sociedad de Producción Rural de Responsabilidad Limitada “Rincón del Agua” (SPR y RL). La parcela se localiza en el paraje conocido como “La Mesita” situados sobre un cerro adyacente a la Cañada del Rincón del Agua. Esta zona es una ladera con vegetación de Encino-Pino (*Quercus crassifolia* y *Pinus teocote*), en el sotobosque se presentan especies como *Arbutus glandulosa*, *A. xalapensis*, *Eupatorium glabratum*, *Calibanus sp*, *Baccharis conferta*, *Arctostaphylos pungens* y *Verbesina virgata*, la altitud es de 2660 m.s.n.m. y pendiente de 36° de inclinación, cobertura arbórea de 88%, clima templado-subhúmedo, una precipitación pluvial de 900 mm y temperatura media anual 12.8°C (Suárez, 1997)



Fig. 23 Área de recolecta Municipio de Singuilucan, Hgo.  
ExHacienda de Cuyamaloya, Bosque de Encino-pino.

La siguiente recolecta se realizó en Mixquiapan que corresponde al municipio de Acatlan, Hgo. En el cerro conocido como “Cerro Prieto”. Esta zona es una ladera con exposición Norte, altitud de 2600 m.s.n.m., pendiente de 20° de inclinación, vegetación de Encino-Pino (*Quercus crassifolia*, *Pinus teocote* y *Pinus leiophylla*), Con una altura promedio del dosel de 20 m, clima templado-subhúmedo, el sotobosque tiene como especies comunes a *Arbutus glandulosa*, *Baccharis conferta*, *Prunus capulli*, *Mulembergia sp.* y *Senecio sp.* (Suárez A. 2005. Comunicación personal).



Fig. 24 Área de recolecta Municipio de Acatlan, Hgo.  
"Cerro Prieto", Bosque de Encino-pino.

Finalmente la tercer recolecta se realizó en Huasca de Ocampo, Hgo. El sitio tiene una exposición zenital con una pendiente de 4°, altitud de 2320 m.s.n.m., bosque de Pino (*Pinus teocote* y *Pinus michoacana*) con una altura promedio del dosel de 20-25 m, clima templado-subhúmedo, el sotobosque tiene como especies comunes a *Arbutus glandulosa*, *Bacharis conferta*, *Juniperus deppeana* y *Senecio* sp. (Suárez, 2005).

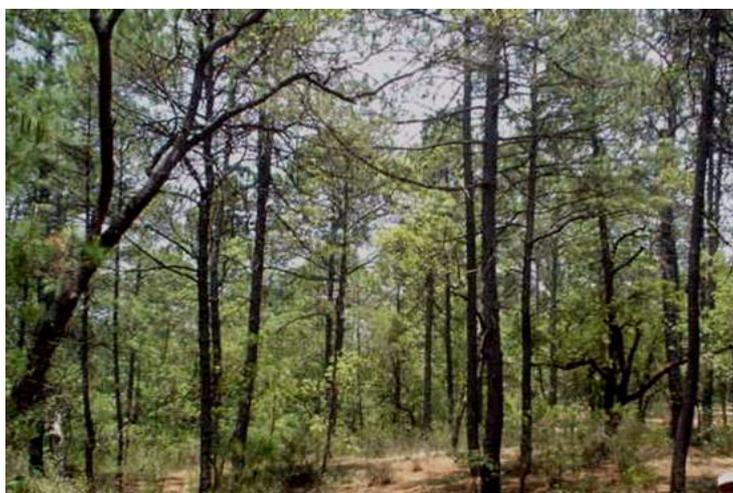


Fig. 25 Área de recolecta municipio de Huasca, Hgo., Bosque de Pino.

Además se estudiaron esporocarpos comerciales provenientes de Acaxochitlan, Hgo., apreciados por su sabor y aroma.

### 5.3 Crecimiento Micelial de las Especies Fúngicas

Con el objeto de seleccionar el medio nutritivo más adecuado para el cultivo de cada cepa se evaluaron los tres medios: el Medio Melin Norkrans modificado (MMN) (Molina y Palmer, 1982), Biotina Anuerina Ácido Fólico (BAF) (Moser, 1960) (Tabla 1) y papa-dextrosa-agar (PDA, Difco, Detroit, Mich.) a pH 5.5.

**Cuadro 2. Composición de los Medios Nutritivos**

Reactivo	Concentración g / L	
	BAF	MMN
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	50
CaCl <sub>2</sub>	0.1	---
MnSO <sub>4</sub>	0.005	---
Peptona	2.0	---
Extracto de levadura	0.2	---
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	---	25
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	---	5
NaCl	---	2.5
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.5	15
FeCl <sub>3</sub> * 6H <sub>2</sub> O	0.0094	16.66
Glucosa	30	10
Tiamina	0.0005	1
Biotina	0.00001	---
Mio-inositol	0.05	---
Ácido Fólico	0.0001	---
Agar	15	15
Agua destilada	1 L	1 L

El Medio de Papa Dextrosa se elaboró en base a las especificaciones del fabricante. Cuando fue oportuno, se cubrió el medio de cultivo con celofán, el cual se sumergió previamente por 15 min. en agua destilada hirviendo para posteriormente esterilizarlo. Este dispositivo permite separar del medio a las colonias fúngicas en fase de crecimiento rápido.

## 5.4 Aislamiento Vegetativo

El aislamiento vegetativo consistió en tomar un pequeño fragmento del contexto (carne) del cuerpo fructífero y se reprodujo en un medio de cultivo seleccionado. El espécimen del hongo seleccionado fue un ejemplar en buen estado, fresco, turgente, joven y limpio. Llevándose a cabo en un ambiente de absoluta asepsia en el laboratorio, el cuerpo fructífero se cortó longitudinalmente con una navaja estéril y con la ayuda de unas pinzas de disección con puntas delgadas y también estériles, se extrajo un fragmento de unos 2 mm de dicha carne de la zona central del cuerpo fructífero y se colocó inmediatamente en una caja de petri con el medio de cultivo seleccionado. Las cajas se sellaron con parafilm para evitar la contaminación y se incubaron. Los aislamientos que se realizaron correctamente mostraron en el segundo o tercer día un crecimiento micelial sobre la superficie del medio a partir del fragmento del cuerpo fructífero, lo que indicó un desarrollo normal del hongo que se había sembrado. Se consideraron aislamientos positivos, todos aquellos con crecimientos y características miceliales uniformes, sin presencia de estados conidiales.

El micelio crecido durante 3 semanas en cajas de petri con el medio de cultivo MMN, se cuadrículó con un bisturí estéril, cortando fragmentos de 5 mm por lado, posteriormente se transfirieron a cajas de petri de 90 mm de diámetro por 10 mm de alto que contenían los medios de cultivo que se utilizan cotidianamente en la manipulación de cepas de hongos ectomicorrizógenos. Se sembraron cinco repeticiones por cepa y medio de cultivo. Las placas se incubaron en la oscuridad a 25°C, durante 46 días.

El desarrollo de las cepas se evaluó midiendo el diámetro de las colonias cada tercer día, hasta que se estabilizó el crecimiento registrándose el diámetro final. Con los valores obtenidos cada tercer día, se obtuvo matemáticamente el valor de la pendiente de la curva para tener un indicador de la velocidad media de crecimiento (Tellez-Tellez *et. al.*, 2003).

Al final de estos periodos, se midió la biomasa por peso seco, modificando la técnica de Chapman *et. al.* (1990) en la cual el micelio se separó calentando la caja hasta el punto de fusión del agar. Posteriormente se enjuagó con agua caliente para eliminar el medio nutritivo y se secó a 60°C hasta obtener peso constante. A los resultados de diámetro final, velocidad de crecimiento y producción de biomasa se les aplicó el análisis de varianza simple, así como pruebas de intervalos múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

Las especies aisladas se encuentran depositadas en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTA) de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

#### 5.4.1 Aislamiento a partir de la Raíz Micorrizada

Se eliminó de la raíz micorrizada la hojarasca y tierra, (Fig. 26) se lavó enérgicamente con agua destilada y unas gotas de tween 80. Después se introdujo la ectomicorriza en una solución acuosa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durante 20 min. y transferida a 1 litro de agua destilada estéril durante 20 min. Se enjuagó la micorriza con agua destilada estéril varias veces y se depositó en cajas petri con diferentes medios nutritivos (Bruns *et. al.*, 2002).



Fig. 26 Raíz micorrizada que corresponde al morfotipo micorrízico no ramificado.

### 5.4.2 Aislamiento a partir de Esporas

Las esporas se obtuvieron a partir de un producto comercial que contiene una mezcla de esporas viables de *Pisolithus tinctorius* EctoRIZE DC ® proporcionada amablemente por el Dr. Joel Meza R. (UAEH). Posteriormente se realizó una suspensión de 2.1 g por litro de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Se realizaron diluciones 10X, 50X, de las cuales se tomaron 0.5 mL con una pipeta estéril de cada dilución colocándolas en las cajas petri con diferentes medios nutritivos. Se sembraron cinco repeticiones por medio de cultivo y se incubaron en la oscuridad a 25°C, durante 46 días.

### 5.5 Observaciones Anatómicas y Morfológicas del Micelio

Las estructuras microscópicas del micelio aislado se observaron al microscopio (Olympus CH20), las imágenes fueron tomadas con Moticam 480 con el software Motic Images 2000 1.3 (Motic Instruments Inc).

### 5.6 Métodos de Conservación de Hongos

Con el fin de conservar correctamente y evitar que se contaminaran los hongos que integraron el cepario del laboratorio de biotecnología (CICyTA-UAEH), (carpóforo recolectado y cultivo micelial), se llevaron a cabo las siguientes técnicas (García y Uruburu, 2004).

### 5.6.1 Transferencia Periódica

Se realizó la transferencia de un fragmento del micelio crecido en medios nutritivos a otra caja con medio fresco, de cada una de las cepas aisladas anteriormente las cepas, la transferencia se realizó cada dos o tres semanas dependiendo del crecimiento presentado por la cepa. (García y Uruburu, 2004).

### 5.6.2 Liofilización

La liofilización de los cuerpos fructíferos recolectados se llevó a cabo con la ayuda de un sistema de liofilización LABCONCO Freeze Dry System (Labconco Corporation, Kansas Mo.).

### 5.6.3 Aceite Mineral

Se sembró la cepa en los tubos de ensayo previamente llenos con el medio nutritivo, una vez crecido el micelio se llenaron los tubos completamente con el aceite mineral estéril. Luego se cerraron bien y se almacenaron en condiciones de refrigeración a 5°C.

## 5.7 Pruebas Fisiológicas y Bioquímicas

### 5.7.1 Crecimiento en Temperaturas Extremas

Para esta prueba se realizaron pruebas de crecimiento sometiendo a las cepas a diferentes temperaturas: 4°C, 24°C y 30°C. de crecimiento en diferentes temperaturas, se tomó un fragmento del micelio con un orador No. 2 y se transfirieron a las cajas petri que contenían los diferentes medios (MMN, PDA, BAF) (Marx, 1969). Se sembraron 10 cajas con cada una de las cepas por medio y se separaron dos grupos los cuales se sometieron a las temperaturas de 4°C, 24°

y 30°C. La velocidad de crecimiento radial fue calculada como la pendiente del radio versus tiempo, analizado por regresión lineal en la fase de crecimiento de todas las repeticiones. (Téllez-Téllez *et al.*, 2003). El desarrollo de las cepas se evaluó midiendo el diámetro de las colonias diariamente. Al final de este periodo se midió la producción de biomasa a través del peso seco de la colonia, calentando la caja hasta el punto de fusión del agar para separar el micelio, la colonia se enjuagó con agua destilada para eliminar el medio nutritivo restante, secándose posteriormente a 60°C hasta obtener peso constante. Todos los resultados obtenidos de velocidad de crecimiento y biomasa se les aplicó un análisis de varianza simple, así como pruebas de intervalos múltiples de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05.

## 5.7.2 Degradación de Compuestos

Para diferenciar algunos hongos basados en su modo de nutrición, y en su capacidad para utilizar ciertas clases de compuestos en diferentes rutas metabólicas, se seleccionaron como primera instancia las pruebas cualitativas de amilasas y proteasas.

### 5.7.2.1 Degradación de Grenetina

Para la elaboración de este medio se utilizó el medio basal de MMN conteniendo 120 g/L de gelatina en lugar del agar. Para esto la gelatina se disolvió en 900 mL de agua esterilizándose por separado de los demás ingredientes, después de esterilizar la mezcla de sales se adicionó a la gelatina tibia antes de vaciar a las cajas petri. En el caso de que el hongo haya producido proteasas se observó la licuefacción de la gelatina alrededor y debajo de la colonia.

### 5.7.2.2 Degradación del Almidón

Al medio basal de MMN se le agregaron 2.0g/L de Almidón soluble después de tres semanas de incubación, las cajas petri se inundaron con una solución de yodo

(5.0 g KI y 1.5 g de I en 100ml de agua). Después de varios minutos el líquido se eliminó. Si el hongo produjo amilasa se observaría una zona desteñida del color púrpura que tomó el medio al adicionar la solución de Yodo.

## 5.8 Estudios Moleculares

### 5.8.1 Extracción de ADN Total

Para la extracción de ADN total se utilizó el Kit de purificación WIZARD® (Promega, Madison, Wis.). El ADN fue extraído a partir de 150 µg de micelio fúngico crecido en los medios nutritivos, el cual previamente había sido congelado en nitrógeno líquido y triturado. Se agregaron 600 µL de solución de lisis, incubándose a 65°C por 15 min., posteriormente se agregaron 3 µL de  $R_{NASE}$  y se incubó a 37°C por 15 min., se agregaron 200 µL de solución para la precipitación de proteína, se agitó y centrifugó por 3 min. Se removió el sobrenadante dejando la proteína y se transfirió a otro tubo que contenía 600 µL de isopropanol y se mezcló hasta que se formaran filamentos de ADN, se centrifugó 1 min. y se removió el isopropanol. Posteriormente se agregaron 100 µL de solución para rehidratar el ADN y se incubó a 65°C por una hora.

#### 5.8.1.1 Determinación de Pureza y Cuantificación de ADN

##### 5.8.1.1.1 Espectrofotometría

La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda (260 nm), permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico en la muestra. Si la densidad óptica (OD) es 1, corresponde a aproximadamente 50 µg/mL de cadena doble de ADN, entonces calculamos la concentración de ADN que tenemos en nuestras muestras, midiendo simplemente su absorbancia, sin necesidad de realizar una curva patrón.

Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 (principalmente por residuos de triptofano), así las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. El cálculo de una relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm es una manera común para hacer un estimado de la pureza del ácido nucleico, ésta relación debe estar entre los valores de 1.8 y 2.0. La lectura del extracto de ADN se realizó por medio de un Espectrofotómetro Cary 100 VARIAN® (Varian Analytical Instruments) que se muestra en la figura.27, a una absorbancia de 260 nm para medir ADN y 280 nm para la proteína.

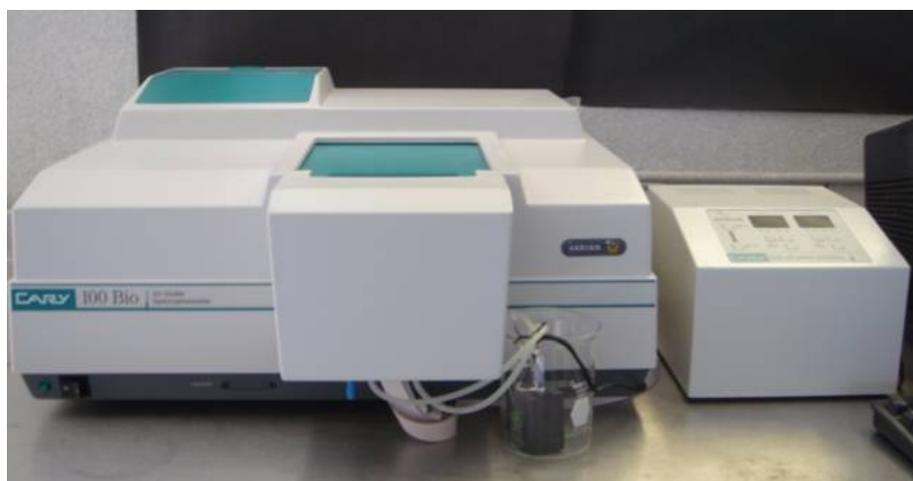


Fig. 27 Espectrofotómetro Cary 100 VARIAN® (Varian Analytical Instruments)

#### 5.8.1.1.2 Electroforesis en Gel

Se elaboró un gel con agarosa al 1% en buffer TBE, (Cuadro No. 3) en el que se colocó un peine de 1.5 mm de espesor, dejándose enfriar para que el gel solidifique. Posteriormente se introduce a la cámara de electroforesis (electroforesis system Cole parmer instruments) la cual contiene suficiente buffer TBE.

**Cuadro 3. Formulación del Buffer TBE**

<b>Componente</b>	<b>Concentración (g/L)</b>
TRIS	107
Ac. Bórico	55
EDTA	9.3

### 5.8.1.1.2 .1 Preparación de las Muestras

En el primer pozo del gel, se depositó un marcador o regla molecular (1 Kb ADN ladder o 100 pb según fue el caso). A 8  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras se le agregó 5  $\mu\text{L}$  de colorante azul de carga (loading dye) que contenía bromofenol azul y glicérol y se depositaron en el resto de los pozos. El bromofenol azul es un tinte que permite observar la migración del ADN y el glicérol es el que le confiere peso a la muestra evitando que esta salga del pozo.

Se conectó la cámara de electroforesis y se aplicó un voltaje constante de 5V por cm de gel durante cuatro horas aproximadamente (Fig. 28). Una vez terminada la migración, se retiró el gel y se llevó a una solución de BET durante 10-15 minutos, se enjuagó con agua destilada y se examinó con luz UV para ser fotografiado y así conocer la talla del ADN en base a la regla molecular.

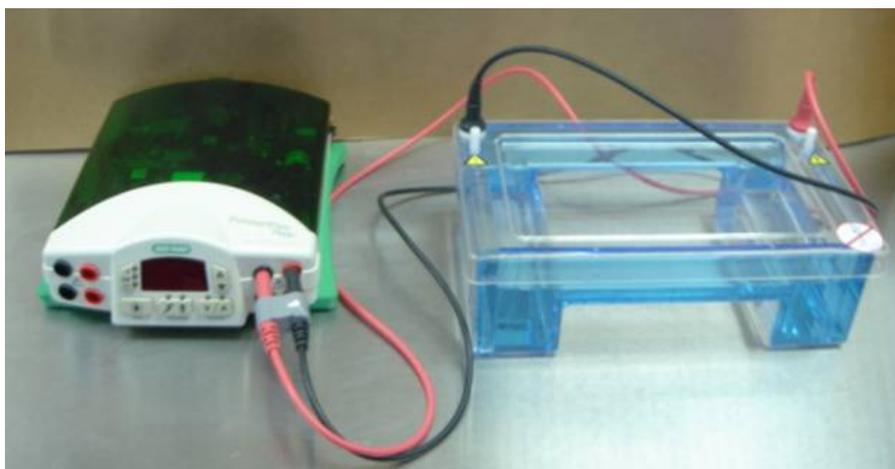


Fig. 28 Cámara de Electroforesis ® (electroforesis system Cole parmer instruments)

El movimiento de los fragmentos de ADN va a producir un patrón de bandas, donde cada banda corresponde a un fragmento de una talla particular. La visualización del gel se realizó por medio de un sistema de documentación de geles con luz UV, el cual nos permitió la obtención de la fotografía del gel, esto también se realizó con una cámara polaroid o con una cámara digital Sony Cyber Shot DSC F828.

## 5.8.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

### 5.8.2.1 Preparación de Muestras

Los extractos de ADN que se utilizaron como templates se diluyeron (1:250, 1:500, 1:1000) para determinar la mejor opción para su amplificación. Se agregaron los ingredientes del PCR Master mix ® (Promega Corporation, Madison, WI) que incluye la taq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y buffers a concentraciones óptimas para una amplificación eficiente del ADN por la PCR. Los iniciadores utilizados para amplificar la región ITS del ADNr fueron ITS1 con la secuencia 5'TCCGTAGGTGAACCTG-CGG3' (White et al. 1990) y el ITS4 cuya secuencia es 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' (White et al. 1990) sintetizados por Sigma-Aldrich Química S. A. de C. V. La reacción se preparó en tubo eppendorff, en un volumen de reacción de 25 µl como se menciona en el siguiente Cuadro.

**Cuadro 3. Componentes de la reacción PCR**

Componente	Volumen (µL)	Concentración final
PCR Master mix®, 2x	12.5	1x
Primer ITS1 10 µM	2.0	1.0 µL
Primer ITS4 10 µM	2.0	1.0 µL
Template de ADN	5-8,5	< 250 ng
Agua libre de nucleasas	25	---

### 5.8.2.2 Condiciones de Amplificación

La amplificación fue realizada en un termociclador TECHNE TC-412 (Techne corporation, Cambridge) (Fig.29) con los siguientes parámetros: una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento a 52°C y una extensión a 72°C durante 1.5 minutos, con una síntesis final de ADN a 72°C durante 10 minutos. En cada serie de amplificaciones se realizó un control negativo sin ADN que sirvió para detectar la presencia de contaminantes en los reactivos.

La detección del producto de PCR se realizó mediante un corrido electroforético en gel de agarosa al 1%, utilizando una regla molecular de 1kb (Promega Corporation, Madison, Wis.) (Fig.30). Para la visualización el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó con luz UV en un documentador de geles.



Fig. 29 Termociclador Techne® incorporated, Princeton



Fig. 30 Sistema de Documentación de geles ® BioDoc-It Electrophoresis Image Acquisition System

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1 Recolecta de Material Biológico

En el periodo de enero a agosto del 2004 se recolectaron hongos frescos en los diferentes bosques cercanos al municipio de Tulancingo, Hgo., se seleccionaron los que no presentaron daños físicos para realizar su aislamiento, se anotaron sus características anatómicas para su posterior herborización. La identificación fue a nivel familia, género o especie en base a las características anatómicas de acuerdo a descripciones reportadas en la literatura (Zamora, *et. al.* 2000 y Courtecuisse, *et. al.* 1995).

Los micobiontes fueron pertenecientes a la división amastigomycota, subdivisión basidiomycotina y clase homobasidiomycetes, encontrándose presentes a tres subclases Agaricomycetidae, Gasterimycetidae y Aphylophoromycetidae y siete familias *Russulaceae*, *Ramariaceae*, *Agaricaceae*, *Tricholomataceae*, *Boletaceae*, *Cantharellaceae*, *Amanitaceae* (Courtecuisse, *et. al.* 1995).

En el cuadro 4 se muestra una relación de los aislados, número de registro, localidades de procedencia, características morfológicas del cuerpo fructífero, indicando su hospedero.

**Cuadro 4. Características de colección del material recolectado**

Registro de colección del herbario	Taxa	Lugar de recolecta	Características morfológicas
CSZ01B1	<i>Russula</i> sp.	SINGUILUCAN	Pileo convexo rojizo, laminillas poco separadas, estípite 5 cm.
CCP02A	<i>Russula</i> sp.	CERRO PRIETO	Pileo rojizo, laminillas poco separadas y estípite Blanquecino.
ETZO1A1	Hongo no	SINGUILUCAN	La raíz presenta un manto

Registro de colección del herbario	identificado 1 <i>Taxa</i>	Lugar de recolecta	Algodonoso, color blanquecino Características morfológicas
ETZ02A1	Hongo no identificado 2	SINGUILUCAN	La raíz presenta un manto color Amarillo intenso
CSZ02A1	<i>Suillus</i> sp	SINGUILUCAN	Pileo rojizo de 5.5 cm., poroso de color amarillento, estípite leñoso de 6 cm. de altura 3 cm; de diámetro.
CSH03A	<i>Suillus granulatus</i>	HUASCA	Pileo liso, color café claro, poroso, color café, estípite leñoso 11cm.
CCP01A	<i>Suillus</i> sp	CERRO PRIETO	Pileo liso, color café claro, poroso, color amarillo, estípite leñoso.
CSZ03A1	<i>Ramaria</i> sp	SINGUILUCAN	Estructura ramificada, estas ramificaciones cortas erectas y cilíndricas con puntas divididas, cortas puntas manchadas irregularmente de color rojo-amarillo, de base gruesa y carnosa de color blanco; Hongo completo 11cm.
CAX04A	<i>Ramaria fennica</i>	ACAXOCHITLAN	Ramificaciones cortas erectas y cilíndricas, color café, base gruesa cilíndrica y carnosa; hongo completo 9 cm.
CAX05A	<i>Ramaria largentii</i>	ACAXOCHITLAN	Ramificaciones cortas erectas y cilíndricas, color amarillo, base gruesa cilíndrica y carnosa; hongo completo 6 cm.
CSZ04A1	<i>Macrolepiota procera</i>	SINGUILUCAN	Pileo convexo de 7-8 cm., estípite de 1.5 cm. de diámetro y de 8 cm. De altura
CSZ05A1	<i>Tricholoma magnivelare</i>	SINGUILUCAN	Pileo concavo blanquecino, estípite
CSH01A1	<i>Cantharellus</i> sp	HUASCA	Pileo convexo; 12cm de diámetro, laminillas del estípite blanquecinas, estípite corto y grueso.

Registro de colección del herbario	Taxa	Lugar de recolecta	Características morfológicas
CCP05A	<i>Cantharellus</i> sp	CERRO PRIETO	Pileo color amarillo-naranja; laminillas finas, estípite corto y grueso.
CCP04A	<i>Cantharellus</i> sp	CERRO PRIETO	Pileo convexo color blanco-amarillo de 8-10 cm. de diámetro, laminillas separadas decreciendo desde el estípite hasta la punta del gorro, estípite corto y grueso.
CSH02A	<i>Amanita</i> sp	HUASCA	Pileo color plateado, dorado y bronce; 9 cm del gorro, forma plana, laminillas distantes, estípite blanco con volva 14 cm.
CCP03A	<i>Amanita</i> sp	CERRO PRIETO	Pileo color grisáceo forma plana, laminillas distantes, estípite blanco con volva 14 cm. (se encontraron en las dif: etapas de crecimiento, presenta volva)
CAX01A	<i>Boletus</i> sp	ACAXOCHITLAN	Pileo café amarillento, convexo, poros blanquecinos, estípite 10 cm.
CSH05A	<i>Lactarius indigo</i>	HUASCA	Pileo color azul, convexo, laminillas poco recurrentes color azul, al final juntas, estípite corto azulado y grueso: 7cm, 5 cm de diámetro.
CAX03A	<i>Lactarius indigo</i>	ACAXOCHITLAN	Pileo color azul, convexo con aspecto de embudo con el centro deprimido, laminas adnatas o poco decurrentes, azules, carne azul índigo. Estípite corto y grueso de 3cm.

**NOTA; Fecha de Recolecta: Singuilucan, Hgo. (Enero-agosto 2004), Huasca, Hgo. (Julio 2004) y Acatlan, Hgo. (Julio 2004), Acaxochitlan, Hgo. (agosto 2004), todo el material recolectado es huésped de *Pinus sp.* y/o *Quercus sp.***

## 6.2 Aislamiento Vegetativo

En caso de los hongos ectomicorrizógenos, el aislamiento y cultivo axénico de las especies fúngicas con las que se desea trabajar es parte fundamental de cualquier trabajo de investigación encaminado a generar conocimiento sobre su biología y fisiología. En este estudio se lograron aislar 8 cepas a partir de los cuerpos fructíferos y dos a partir de la asociación micorrízica.

Se seleccionaron 4 cepas que tenían mejor crecimiento micelial para ser estudiadas en este trabajo, teniendo como testigos una cepa de *Lactarius deliciosus* donada amablemente por la M. en C. Zamora M. (INIFAP) y una cepa de un basidiomicete *Pleurotus* sp., el cual no es micorrizico.

La descripción y caracterización de las colonias fúngicas crecidas en PDA seleccionadas para este trabajo están integradas en el cuadro 5.

El aislamiento a partir de esporas comerciales de *Pisolithus tinctorius* se perdió por contaminación de las cajas petri en los diferentes medios nutritivos utilizados.

**Cuadro 5. Características culturales de los cultivos puros.**

Nombre de la cepa	Color de la colonia	Morfología y textura	Color del agar	
			Frente	Reverso
<i>Pleurotus</i>	Micelio inicial blanquecino y finalmente blanco.	Radial, uniforme, algodonoso y micelio abundante.	incoloro	blanco
<i>Russula</i>	Micelio inicial rosáceo y finalmente toma un color marrón-violeta.	Aterciopelada, en algunas partes planas y algunas veces eleva la colonia.	Rosa-café	Café-marrón
<i>Lactarius</i>	Micelio inicial	Micelio aéreo	amarillo	Crema-

Nombre de la cepa	Color de la colonia	Morfología y textura	Color del agar	
	amarillento y finalmente color mostaza	blanquecino, de aspecto fibroso, margen irregular	anaranjado	
Hongo no identificado	Micelio inicial blanquecino, posteriormente hay formación de un anillo amarillento, permaneciendo de color amarillo intenso y finalmente un anillo blanco rodea el micelio.	Textura plana y en algunas zonas algodonosa	Rojo-rosa	Naranja rojizo
<i>Tricholoma</i>	Micelio inicial blanco y finalmente blanquecino grisáceo	Algodonoso pardo	incoloro	pardo
Relacionado a <i>Cantharellus</i>	Micelio inicial blanco y finalmente amarillo con coloraciones rojas	Micelio de aspecto rugoso, abundante y algodonoso	Anaranjado	Anaranjado intenso

Estas cepas se encuentran en el banco de germoplasma fúngico (cepario) localizado en el laboratorio de Biotecnología del ICAP-UAEH, la gestión de este cepario implica una tarea de laboratorio permanente destinada a su acrecentamiento, mantenimiento y preservación. Esta colección de material genético nos proporcionara material para obtener principalmente:

- Cepas de hongos comestibles.
- Cepas con probada capacidad para formar simbiosis micorrízica.
- Cepas de interés biotecnológico para la producción de enzimas de potencial aplicación en industria en general.
- Cepas de interés para el control biológico de plagas de insectos y vectores de enfermedades.
- Producción de inóculo micelial en pequeña o gran escala.

### 6.3 Observaciones Anatómicas y Morfológicas del Micelio

Dentro de la observación morfológica al microscopio se distinguieron algunas características de las estructuras microscópicas del micelio aislado, como las dimensiones de hifas, grosor y forma de la pared de las hifas, estructuras características como frecuencia de septos, clamps y anastomosis principalmente.

Las hifas de *Russula* presentaron clamps y septos, de pared delgada y lisa, con algunas terminales dicotomizadas, y una talla de 19.4 $\mu$ m de diámetro y 87.7  $\mu$ m de largo entre septos (Figura 31).



Fig. 31 Micelio de *Russula* (1) La flecha indica el clamp y tamaño de la hifa, (2) Septos definidos, (3) hifa dicotómica.

En la cepa de *Lactarius* se observa la presencia de clamps, pared bien definida, delgada y lisa como se observa en la figura 32.

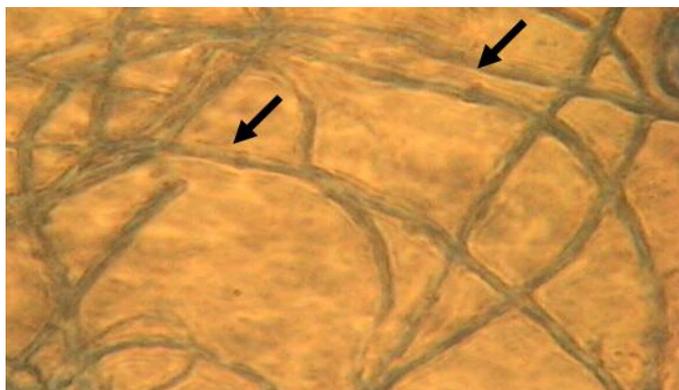


Fig. 32 Micelio de *Lactarius* donde las flechas muestran la presencia de clamps.

En el caso de las hifas de *Tricholoma*, presentaron una pared delgada y bien definida, con un diámetro de 32 a 46  $\mu\text{m}$  además de una pared lisa con pocas o ninguna célula emergente, con septos no bien definidos pero visibles y ramificaciones laterales largas. Además de la presencia de esporas de un diámetro aproximado de 18  $\mu\text{m}$  (Figura 33).

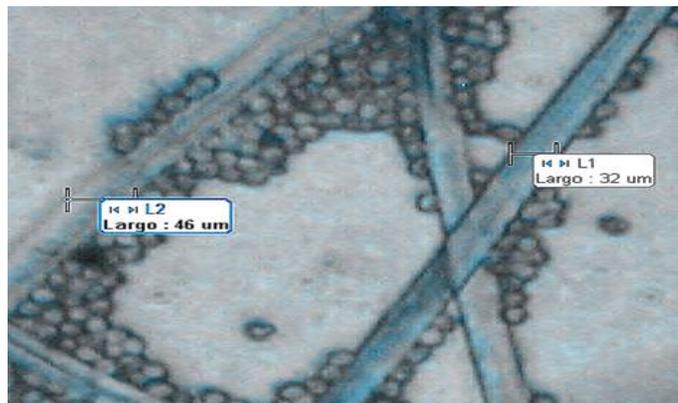


Fig. 33 Micelio de *Tricholoma* sin clamp, manto liso, micelio septado, esporas redondas

El hongo relacionado a *Cantharellus* presenta una pared delgada, de un diámetro de 22 a 25  $\mu\text{m}$ , manto fibroso, micelio septado y dicotómico (Figura 34).



Fig. 34 Micelio de la cepa parecida a *Cantharellus* mostrando septos.

El micelio del hongo no identificado no fue septado y tiene una superficie bien definida y fibrosa, también presenta clamp y una terminación coraloide con ejes densamente ramificados y cortos, como se observa en la Figura 35.

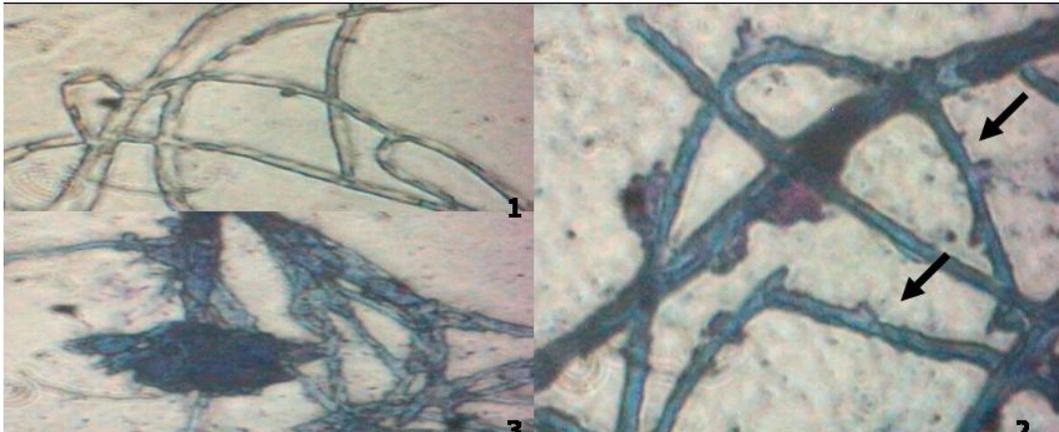


Fig. 35 Micelio del Hongo no identificado. (1) micelio no septado, superficie fibrosa (2) las flechas indican los clamps, (3) terminación coraloide.

#### 6.4 Métodos de Conservación de Hongos

Con el fin de conservar los hongos que integran el cepario del laboratorio de biotecnología (CICyTA-UAEH), se realizaron algunos métodos de conservación. Para nuestro propósito de estudio, los cultivos puros se transfirieron periódicamente en diferentes medios nutritivos, durante las transferencias en este estudio no se presentaron variaciones importantes en el crecimiento micelial considerando entonces que se conservo una estabilidad genética.

Se puede observar en la figura 36 los hongos liofilizados, los cuales presentan una buena estructura y coloración después del secado.



Fig. 36 Fotografía de hongos liofilizados

## 6.5 Pruebas Fisiológicas y Bioquímicas

### 6.5.1 Crecimiento a Temperaturas Extremas

Para que un hongo ectomicorrizógeno pueda colonizar exitosamente las raíces de un árbol influyen factores edafológicos y ambientales; tales como la temperatura, tipo de suelo, pH, humedad etc. (Hutchison, 1990).

En ocasiones se correlaciona la asociación específica de los hongos con la tolerancia a las temperaturas de 30°C con la incidencia de los hongos en pinos y encinos que poseen características de un sistema profundo.

El carácter taxonómico como la temperatura ha sido bien establecida en la identificación de levaduras y ciertos grupos de hongos donde se definen los valores máximos, mínimo y óptimo de crecimiento para cada especie, pero ha sido poco estudiada en hongos ectomicorrizógenos (Hutchison, 1990).

Así, la sensibilidad o tolerancia de estos hongos a las temperaturas extremas puede ser utilizada como herramienta taxonómica para marcar las diferencias de los aislamientos y que en combinación con las características fisiológicas, bioquímicas y moleculares nos permita definir la identidad de un simbionte desconocido. Hutchison (1990) utilizó temperaturas extremas de 7°C y 30°C considerando la temperatura de 18°C como ideal, sin embargo, en los trabajos de Santiago-Martinez (1992) se reporta que las cepas estudiadas presentan un buen crecimiento a 25°C, concluyendo que las condiciones tanto de latitud como en altitud en el extranjero son diferentes a las que presenta el centro de nuestro país. Para determinar como influye la temperatura en el crecimiento fúngico, se utilizaron las temperaturas de 4°C, 24°C y 30°C.

Siguiendo el criterio de Hutchison (1990) mencionamos las siguientes categorías de tolerancia a la temperatura:

- Tolerante, cuando el crecimiento es mayor del 50 % con respecto al testigo.
- Semitolerante, cuando el crecimiento es del 20 al 50 % con respecto al testigo.
- Sensible, cuando el crecimiento es menor del 20 % con respecto al testigo.

Las cepas incubadas a 30°C no mostraron crecimiento alguno, por lo que se puede mencionar que todas ellas son sensibles a altas temperaturas. El cuadro 6 se muestra la respuesta de 5 de los aislados en diferentes medios nutritivos utilizados (MMN, PDA y BAF) incubadas a 4°C, 24°C y 30°C.

La velocidad media de crecimiento en los medios nutritivos de PDA y BAF utilizado a 24°C fué el doble en *Russula* comparado con las otras cepas (cuadro 6), mientras que en MMN no hay diferencia significativa entre las cepas estudiadas.

Las cepas incubadas a 4°C no mostraron diferencia significativa en la velocidad de crecimiento en el medio MMN, excepto el hongo no identificado, el cual no creció a esta baja temperatura en ningún medio nutritivo. En el análisis de varianza se observó que las cepas de *Russula*, *Lactarius*, *Tricholoma* y el relacionado a *Cantharellus* en los medios PDA y BAF no mostraron diferencias significativas en su crecimiento a 4°C.

**Cuadro 6. Crecimiento a diferentes temperaturas.**

Nombre de la cepa	Velocidad media (mm d <sup>-1</sup> )								
	30°C			24°C			4°C		
	MMN	PDA	BAF	MMN	PDA	BAF	MMN	PDA	BAF
<i>Russula</i>	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.40 <sup>a</sup> ± 0.02	1.15 <sup>b</sup> ± 0.08	1.15 <sup>b</sup> ± 0.07	0.26 <sup>a</sup> ± 0.03	0.27 <sup>a</sup> ± 0.02	0.31 <sup>a</sup> ± 0.02
Hongo no identificado	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.51 <sup>a</sup> ± 0.01	0.44 <sup>b</sup> ± 0.01	0.55 <sup>c</sup> ± 0.02	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
<i>Lactarius</i>	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.34 <sup>a</sup> ± 0.01	0.66 <sup>b</sup> ± 0.01	0.66 <sup>b</sup> ± 0.03	0.25 <sup>a</sup> ± 0.006	0.35 <sup>b</sup> ± 0.0003	0.33 <sup>b</sup> ± 0.02
<i>Tricholoma</i>	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.46 <sup>a</sup> ± 0.01	0.53 <sup>b</sup> ± 0.02	0.43 <sup>c</sup> ± 0.02	0.15 <sup>a</sup> ± 0.04	0.25 <sup>b</sup> ± 0.01	0.28 <sup>b</sup> ± 0.004
Relacionado a <i>Cantharellus</i>	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.32 <sup>a</sup> ± 0.03	0.62 <sup>b</sup> ± 0.02	0.64 <sup>b</sup> ± 0.009	0.14 <sup>a</sup> ± 0.01	0.34 <sup>b</sup> ± 0.02	0.24 <sup>c</sup> ± 0.03

Nota: Entre letras iguales no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey. ( $p \leq 0.05$ )

*Russula* cultivada a 24°C mostró mayor biomasa en el medio BAF seguido por PDA y MMN, sin embargo, mostró un aumento de biomasa micelial a 4°C en el medio BAF seguido por PDA (Cuadro 7), sugiriendo que el crecimiento es lento en condiciones extremas para reactivar su metabolismo con lo que recompensa con biomasa. Las temperaturas bajas afectaron parcialmente el crecimiento de las cepas estudiadas en los medios BAF y PDA, con lo que puede considerarse a

*Russula*, *Lactarius*, *Tricholoma* y el relacionado a *Cantharellus* como cepas semitolerantes.

**Cuadro 7. Biomasa a diferentes temperaturas y medios**

Nombre de la cepa	Biomasa (mg)								
	30°C			24°C			4°C		
	MMN	PDA	BAF	MMN	PDA	BAF	MMN	PDA	BAF
<i>Russula</i>	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.19 <sup>a</sup> ± 0.02	0.23 <sup>b</sup> ± 0.02	0.37 <sup>c</sup> ± 0.04	0.20 <sup>a</sup> ± 0.03	0.31 <sup>b</sup> ± 0.02	0.52 <sup>c</sup> ± 0.02
Hongo no identificado	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.25 <sup>a</sup> ± 0.01	0.30 <sup>b</sup> ± 0.04	0.35 <sup>b</sup> ± 0.02	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
<i>Lactarius</i>	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.18 <sup>a</sup> ± 0.01	0.48 <sup>b</sup> ± 0.01	0.43 <sup>b</sup> ± 0.05	0.18 <sup>a</sup> ± 0.006	0.60 <sup>b</sup> ± 0.07	0.34 <sup>c</sup> ± 0.01
<i>Tricholoma</i>	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.12 <sup>a</sup> ± 0.02	0.23 <sup>b</sup> ± 0.04	0.34 <sup>b</sup> ± 0.06	0.08 <sup>a</sup> ± 0.07	0.20 <sup>b</sup> ± 0.001	0.33 <sup>c</sup> ± 0.003
Relacionado a <i>Cantharellus</i>	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.13 <sup>a</sup> ± 0.02	0.27 <sup>b</sup> ± 0.01	0.42 <sup>c</sup> ± 0.06	0.10 <sup>a</sup> ± 0.02	0.29 <sup>b</sup> ± 0.0006	0.36 <sup>c</sup> ± 0.002

Nota: Entre letras iguales no hay diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey. ( $p \leq 0.05$ ).

La biomasa de *Lactarius* y *Tricholoma* no tuvieron diferencias significativas cuando se incubaron en los medios PDA y BAF a 24°C, pero en el medio MMN la biomasa se ve afectada hasta casi un 50% (Cuadro 7). Mientras que si hubo diferencia significativa en el valor de biomasa de *Cantharellus* cuando fue crecido en los tres medios nutritivos, por lo cual podemos seleccionar el medio BAF como productor de micelio de esta cepa.

A la temperatura de 4°C, la cepa fúngica aislada a partir de la simbiosis raíz-hongo fue sensible ya que su crecimiento fue menor del 20 %. Cabe señalar que a pesar de que no hubo crecimiento en el tiempo de este ensayo, el medio se tiñó con un tono rojizo-anaranjado que puede suponer que el hongo excreta algún metabolito para iniciar con su crecimiento en un tiempo más prolongado (entre 10-15 días) comparado con las otras cepas seguramente podrá reactivar su metabolismo sin que exista una evidencia bibliográfica al respecto.

Finalmente, las cinco cepas evaluadas en general lograron adaptarse mejor en los medios BAF y PDA a 24°C sin diferencias significativas entre ambos que en el medio MMN como se puede observar en la fig. 37, donde se puede apreciar el crecimiento radial de *Russula* en los 3 medios nutritivos utilizados a las dos temperaturas (4°C y 24°C) estudiadas, considerando entonces que la cepa aislada *Russula* es tolerante a bajas temperaturas.

Las temperaturas bajas afectaron completamente el crecimiento de la cepa aislada a partir de la planta huésped pues no hubo crecimiento, sin embargo se pudo observar (Fig. 37.2, 37.4 y 37.6) una coloración naranja-rojiza probablemente porque excreta algunos metabolitos para tratar de sobrevivir a dicha temperatura extrema.

Se han encontrado en la literatura una variedad de respuestas al incubar diferentes cepas de una misma especie, que fueron aisladas de lugares geográficos próximos. Denis (1985) menciona que *Amanita rubescens* presenta crecimiento a los 35°C, en tanto Yang *et al* (1999) reportaron que esta especie no sobrevive a -10°C y es sensible a 7 y 30°C.

Las cepas de *Suillus glandulosipes* fueron sensibles a temperatura de 7°C, pero la *Suillus* sp creció más que a 24°C, considerándose entonces como tolerante (Santiago 2002).

Samson y Fortín (1986) encontraron que *S. Grevillei* es una especie de amplia distribución pero su origen geográfico no se correlaciona con el crecimiento en las temperaturas probadas, argumentando que la altitud es un factor más importante que la latitud o el intervalo de latitudes muestreadas y sugiriendo que esto se debe a una gran variedad genética.

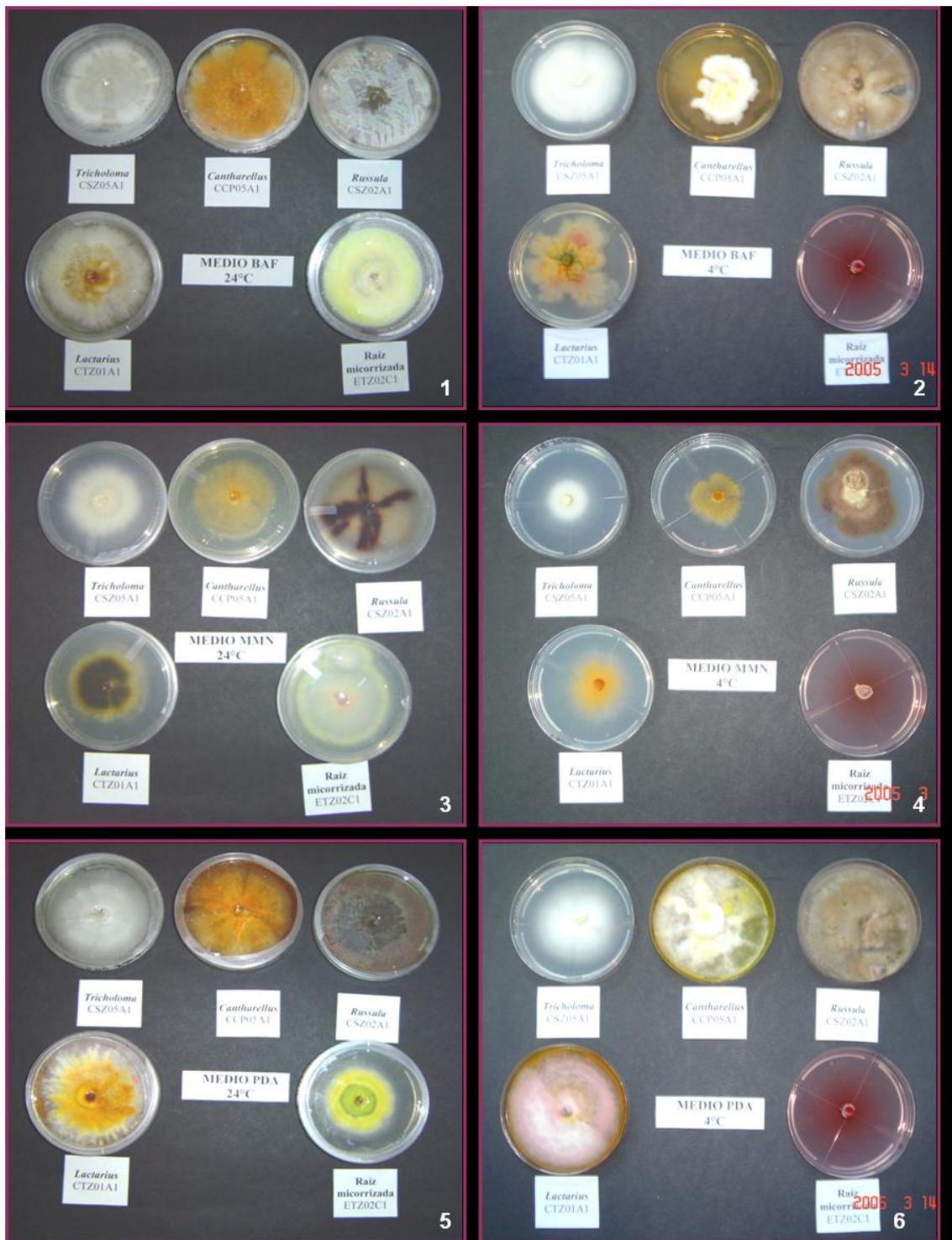


Fig. 37 Cepas en Diferentes medios nutritivos y temperaturas (1) BAF a 24°C. (2) BAF a 4°C. (3) MMN a 24°C. (4) MMN a 4°C (5) PDA a 24°C (6) PDA a 4°C

La determinación de la temperatura óptima de cada una de las cepas es muy importante para la reproducción masiva de las cepas para posteriormente realizar inoculaciones en vivero, debido a que en algunos estudios indican que las respuestas a la temperatura pueden limitar su distribución actividad y persistencia en la formación de micorrizas ectotróficas con especies de árboles particulares (HacsKaylo *et. al.*, 1965).

Cline *et. al.*, (1987) citaron que es importante determinar los requerimientos de temperatura, porque esto permite que el crecimiento del inóculo sea efectivo, que la micorriza alcance un buen desarrollo después de la inoculación en el vivero, y que tenga buena sobrevivencia y crecimiento en el trasplante.

### 6.5.2 Degradación de Compuestos

Como una forma de diferenciar ciertos hongos, se ha tenido interés en saber algunos caracteres bioquímicos tales como actividades enzimáticas, que aunados con las características morfológicas y moleculares podran ser útiles en el estudio taxonómico entre ellos. Por tal motivo se inicio con algunas pruebas enzimáticas presentes en las cepas estudiadas. En el cuadro 8 se muestra que la única cepa pura relacionada a *Cantharellus* degrada el almidón, como se puede observar en la Fig. 38 con un halo desteñido del color púrpura que toma el medio al adicionar la solución de yodo. Mientras que las cepas aisladas, *Russula*, *Lactarius* y *Tricholoma* no presentan actividad amilolítica, ya que no hay un halo de actividad cuando es agregada la solución de yodo.

**Cuadro 8. Degradación de compuestos**

Nombre de la cepa	Almidón	Grenetina
Russula	-	+
Hongo no identificado	-	+
<i>Lactarius</i>	-	+
<i>Tricholoma</i>	-	+
Relacionado a <i>Cantharellus</i>	+	+

NOTA: (-) no presenta actividad enzimática (+) actividad presente

Santiago-Martinez (2002) reporta que varias cepas de *Suillus* son incapaces de producir amilasas, resultados que coinciden con los de Hutchison (1990) que menciona que algunas cepas de *Amanita muscaria* presentan respuesta negativa, mientras que *Amanita rubescens* tienen respuestas fuertemente positivas.

En la figura 38 se muestra la licuefacción de la gelatina alrededor de la colonia de *Russula* y el probable hongo simbionte, mostrando que existe una secreción de enzimas proteolíticas, esta actividad positiva fue observada también en todas las cepas.

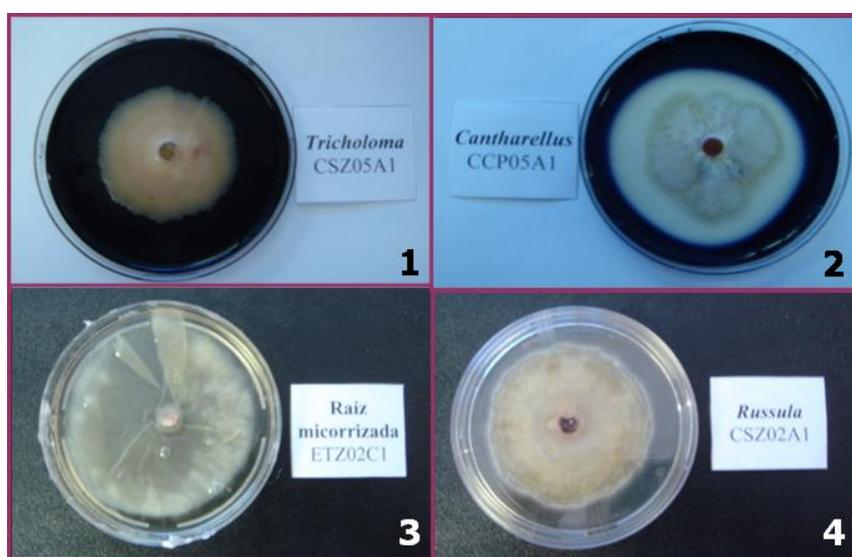


Fig. 38 Pruebas fisiológicas (1) Prueba de almidón negativa. (2) Prueba de almidón positiva. (3) y (4) Prueba de Gelatina positiva.

Hutchison (1990) reportó que *Amanita* presenta respuestas variadas, desde negativas hasta ligeramente positivas, mientras que Santiago-Martinez (2002) menciona que las cepas de *Amanita* fueron de moderada a fuertemente positivas en lo que concierne a proteasas. Estas diferencias en la capacidad proteolítica podrían resultar de los diferentes estados sucesionales del bosque así como en la capacidad proteolítica que sería prerequisite para la explotación selectiva de fuentes de carbono o nitrógeno orgánico de acuerdo a la especie dada (Hutchison, 1990).

Los resultados de actividades enzimáticas de las cepas estudiadas en esta tesis nos proporcionan solamente una aproximación de la capacidad de degradación de cada uno de los hongos, puesto que fueron solamente cualitativos por lo que es necesario medir otras pruebas enzimáticas para indicar el potencial real de cada uno de los hongos in vivo.

## 6.6 Estudios Moleculares

### 6.6.1 Extracción de ADN Total

El desarrollo de técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual permite la caracterización del ácido nucleico amplificado a partir de pequeñas cantidades de muestra, ha sido aplicada en hongos endo y ectomicorrizógenos donde los caracteres morfológicos han sido un conflicto o simplemente ambiguos para su identificación.

Como primer paso para realizar estos estudios es la extracción de ADN con buena calidad y concentración. Nuestros resultados mostraron que la técnica para la extracción del ADN total fue adecuada a partir de muestras de los micelios aislados de *Tricholoma*, *Russula*, hongo no identificado y *Lactarius deliciosus* en diferentes medios nutritivos, utilizando el protocolo de Wizard (Promega, Madison, Wis.1996), realizando por duplicado las extracciones.

#### 6.6.1.1 Determinación de Pureza de ADN y Cuantificación

Se cuantificó el ADN extraído por absorbancia a 260 nm y se determinó la pureza con la relación de 260/280 nm. Como se puede observar en el cuadro 10, la cepa de *Tricholoma* crecida en el medio BAF, tiene una concentración aproximadamente de 5 veces más que cuando es incubado en el medio de PDA, lo cual concuerda con nuestros datos de biomasa. La menor concentración fue la

obtenida con *Russula*, con una concentración de 31 ng/ $\mu$ L mientras que la mayor concentración (1602 ng/ $\mu$ L) se obtuvo con el hongo no identificado.

La relación de la medición a 260 y 280 nm fue menor o igual que 1, lo que podría indicarnos que el ADN no es completamente adecuado en relación a su pureza para los análisis posteriores, por lo cual se confirmó con el siguiente método de determinación de pureza que es de fluorescencia.

**Cuadro 9. Concentración de ADN en agua por medio de espectrofotometría**

Nombre de la cepa	Medio	Absorbancia (nm)		Relación de 260/280	Concentración ng/ $\mu$ l
		260	280		
<i>Russula</i>	MMN	0.0125	0.0046	2.7173	31.25
Hongo no identificado	MMN	0.6410	0.6334	1.0119	1602.5
<i>Lactarius</i>	PDA	0.0489	0.0472	1.0360	122.25
<i>Lactarius</i>	PDA	0.1809	0.1635	1.1064	452.25
<i>Tricholoma</i>	PDA	0.0461	1.4761	0.03123	115.25
<i>Tricholoma</i>	BAF	0.2464	0.2348	1.0494	616
Relacionado a <i>Cantharellus</i>	PDA	0.0480	0.0238	2.0168	120

Según los patrones electroforéticos de cada uno de los extractos de ADN analizados por fluorescencia, observamos en los carriles 1-5 y el 7 que se presenta una sola banda bien definida cercana al extremo superior, la talla del fragmento mayor en la regla molecular, es de 10,000 pb, (Fig. 39), que nos indica que el ADN está intacto y en concentración suficiente para los demás análisis. En el carril 6 donde se depositó la muestra del extracto de ADN de *Lactarius*, no se alcanza a distinguir la banda en la foto tomada (Fig. 39) porque en el volumen máximo de depósito en el pocillo (15  $\mu$ L) contiene muy poca concentración de ADN.

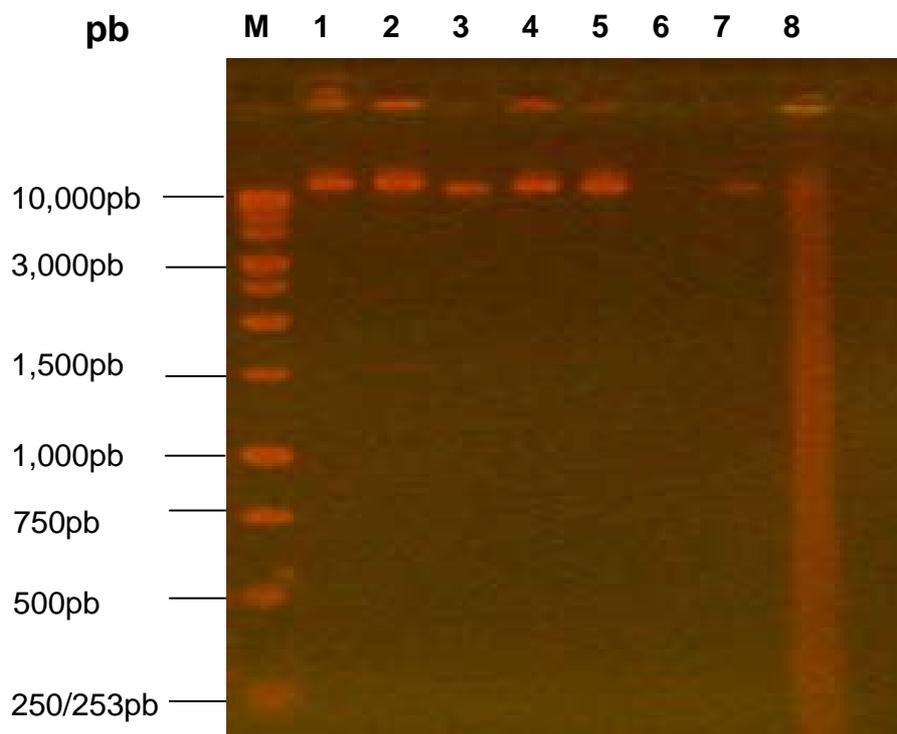


Fig. 39 Separación electroforética de los extractos de ADN, (1) *Tricholoma*, (2) *Tricholoma*, (3) *Russula*, (4) Relacionado a *Cantharellus*, (5) Hongo no identificado, (6) *Lactarius*, (7) *Pleurotus*, (8) *Tricholoma* liofilizado, (M) Regla molecular. (1 kb ladder promega®)

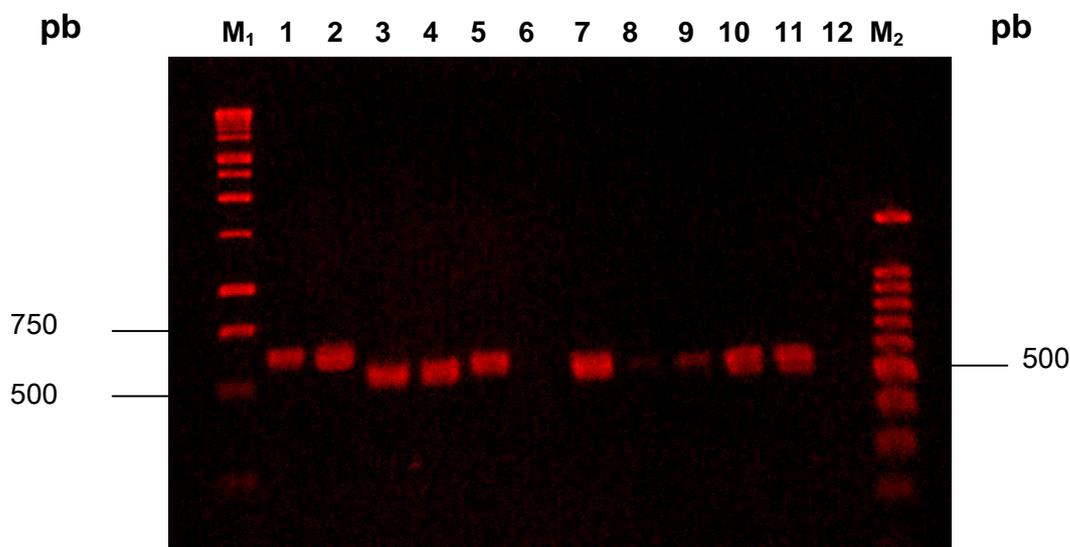
En el carril 8 se depositó el ADN total de *Tricholoma*, el cual fue extraído a partir del cuerpo fructífero herborizado y no con micelio como las muestras anteriores. Se puede observar en la Fig. 39 que existe un barrido, significando que el ADN es degradado, probablemente por ADNasas, por tal motivo, ésta muestra no fue seleccionada para ser amplificada.

### 6.6.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

El template de ADN que mostró una buena amplificación fue con una dilución de 1:500, el cual se utilizó en las subsecuentes amplificaciones. El ADN template de un hongo conocido, no micorrízico (*Pleurotus sp.*) fue usado como control positivo.

La Fig. 40 muestra en cada uno de los carriles un sola banda bien definida que representa el amplificado de la región ITS con talla que varía de 550 a 700 pb

aproximadamente de acuerdo a la regla molecular que se encuentra en el primer y último carril.



**Fig. 40** Separación electroforetica de PCR utilizando primers ITS1 y ITS4 (1)*Tricholoma*, (2)*Tricholoma*, (3)*Russula*, (4) Relacionado a *Cantharellus*, (5)Hongo no identificado, (6)*Lactarius*, (7)*Lactarius*, (8)*Pleurotus*, (9)*Russula*, (10)*Lactarius*, (11) *Lactarius*, (12) Control negativo (sin template), (M1 y 2) Reglas moleculares (1 kb y 100pb promega)

Existe una marcada diferencia de talla de *Tricholoma* con respecto a los demás amplificados con lo que podemos mencionar que desde la amplificación del ITS existe un leve polimorfismo entre las especies analizadas en este trabajo.

El amplificado de *Russula* (carril 3), Relacionado a *Cantharellus* (carril 4) y el probable hongo micorrizico (carril 5) muestran un pequeña variación polimórfica que es necesario confirmar con la resolución de otro gel.

El carril 6 no presenta ninguna banda, probablemente la cantidad de ADN utilizada como template no fue suficiente. Mientras que el producto de la amplificación del ITS correspondiente a *Lactarius* (carril 7,10 y 11) coinciden entre si en la misma talla.

El control positivo utilizado fue la amplificación del segmento ITS de *Pleurotus* (carril 8), en el cual se puede observar una banda muy ligera alrededor de 500 pb,

y un control negativo (sin templete de ADN) en el carril 12 donde no existe templete de ADN para probar si existe presencia de contaminantes en la mezcla de reacción.

White, *et. al.* 1990 ha reportado una talla del ITS que varía de 560 a 850 dependiendo de la especie fúngica. Guevara *et al.*, 2004 reporta para el género de *Canharellus* un valor de 720 hasta más de 1600 pb, mencionando que esta variación ocurre Inter e intra específicamente, mientras que para las especies de *Rhizopogon* se encuentra entre 740 y 850 pb y para las especies de *Suillus* es de 710 pb

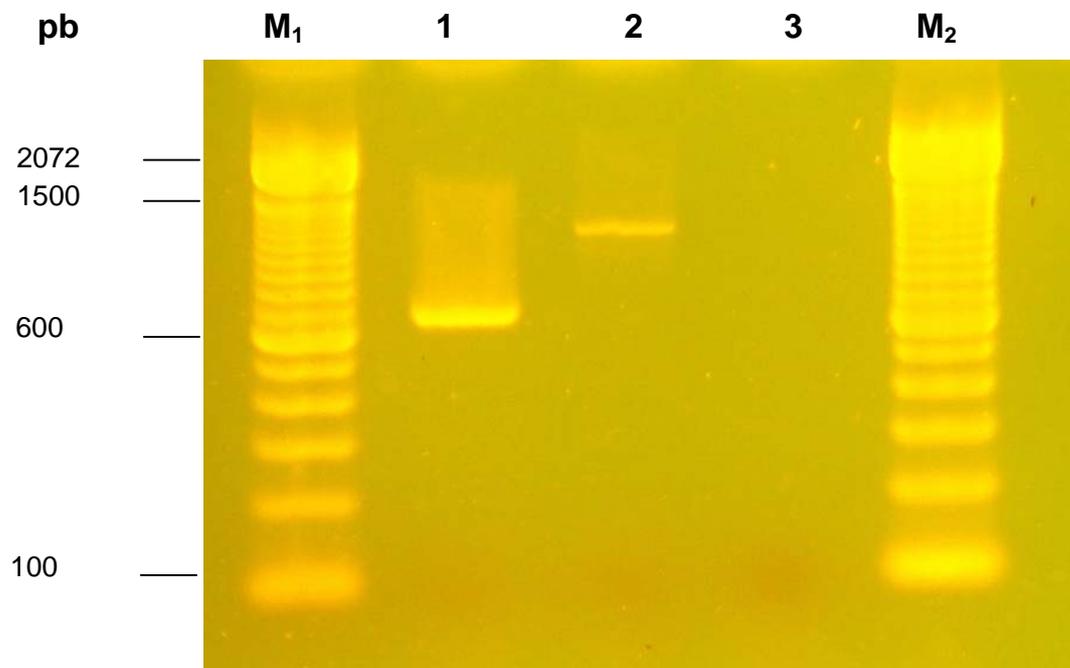
De acuerdo a la longitud del fragmento amplificado, pudimos distinguir 4 polimorfismos, pero sin ninguna otra distinción intra o inter específica suplementaria basándose solo en el polimorfismo de la región ITS realizado en este trabajo.

La temperatura de alineamiento es crítica para la buena amplificación de un templete de ADN. Si es muy alta esta temperatura, el alineamiento de los cebadores o primers es pobre y por lo tanto el rendimiento de la amplificación de ADN es muy bajo; y si la temperatura es muy baja, el alineamiento puede ser no específico, resultando de segmentos de ADN no deseados.

La optimización de los parámetros para la PCR fueron satisfactorios, incluyendo la temperatura de alineamiento (52 °C), así, encontramos una sola banda bien definida de la talla esperada confirmando la amplificación correcta del fragmento ITS.

En la Fig. 41 se observa una de las réplicas de la amplificación del fragmento ITS del ADNr con los primers ITS1-ITS4 en el termociclador TOUCH GENE (Techne corporation, Cambridge), donde la talla del ITS de *Tricholoma* comparado con la

regla molecular (100pb INVITROGEN life technologies) está entre 600 y 700 pb, como han encontrado otras especies fúngicas (White, *et. al.* 1990).



**Fig. 41 Separación electroforética de PCR utilizando primers ITS1 y ITS4 (1) *Tricholoma*, (2) hongo muestra, (3) Control negativo (sin templete), (M1 y 2) Reglas moleculares (100pb INVITROGEN life technologies)**

## 7. CONCLUSIONES

Se logró la recolección de 10 clases de hongos nativos del estado de Hidalgo, pertenecientes a siete familias: *Russulaceae*, *Ramariaceae*, *Agaricaceae*, *Tricholomataceae*, *Boletaceae*, *Cantharellaceae*, *Amanitaceae* de las cuales se aislaron 8 cepas puras. Se seleccionaron las taxas de *Russula*, *Tricholoma*, Relacionado a *Cantharellus* y el hongo no identificado para su caracterización parcial como primera fase para la micorrización controlada de las cepas. Estos simbiontes forman parte del cepario fúngico del laboratorio de Biotecnología del CICyTA.

Comparando la adaptación de las cepas en los 3 diferentes medios nutritivos, se encontró que los medios BAF y PDA son mejores que el medio nutritivo MMN para el crecimiento y producción de biomasa.

*Tricholoma*, *Russula*, el hongo relacionado a *Cantharellus* y *Lactarius deliciosus* son capaces de degradar la gredina lo que indica la presencia de enzimas proteolíticas y por otro lado solo el hongo relacionado *Cantharellus* tiene actividad amilolítica.

Los protocolos utilizados para la extracción de ADN del micelio crecido en un medio nutritivo resultaron ser satisfactorios, logrando obtener una concentración de 1602 ng/ $\mu$ L, sin embargo es necesario realizar modificaciones al protocolo de extracción de ADN si se quiere utilizar un cuerpo fructífero herborizado.

La amplificación de los fragmentos ITS del ADNr, de talla entre 550 a 700 pb fue satisfactoria utilizando los primers ITS1/ITS4 con una temperatura de alineamiento de 52 °C. La detección de un leve polimorfismo fue evidente con la cepa de *Tricholoma* con respecto a las otras cepas aisladas.

## 8. RECOMENDACIONES

Siguiendo el proceso biotecnológico de la producción de inoculantes a base de hongos ectomicorrizógenos para uso hortícola frutícola y forestal, se deberá continuar con la identificación taxonómica a nivel molecular, utilizando algún marcador como el RFLP-PCR. Para detectar un amplio rango de polimorfismo es necesario la digestión de los productos de PCR con diferentes enzimas de restricción.

Igualmente se deberán realizar ensayos de selección basándose en su capacidad de colonización y promoción del crecimiento en los hospedantes para realizar una propagación inicial *in vitro*.

Analizar otras actividades enzimáticas que aunados a otros parámetros fisiológicos, morfológicos y moleculares nos sirva para la selección de un micobionte para la producción de inóculo en programas de forestación.

Utilizando éstos inoculantes en diferentes sistemas de producción se podrá realizar un control de calidad para finalmente realizar una reforestación en suelos marginales con diferentes grados de perturbación y/o contaminación, así como tener una alternativa rentable a cultivos agrícolas y valor añadido a explotaciones forestales.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez Sánchez J. y Ramos Zapata J. 2004. "Hongos y Plantas". Beneficios a diferentes escalas en micorrizas arbusculares. 39-45.

Alexopoulos. 1995. "Introduction to Micology". Redactado por el Dr. Orlando Popoff, Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.<<http://fai.unne.edu.ar/biologia/fungi/fungi.htm>> (fecha de acceso el 20 Julio 2005).

Alves A., Phillips A. J. L., HERRIQUES I. y Correia A. 2005. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. FEMS microbiology Letters(245): 221-229.

Anderson I. C., Chambers S. M. y Cairney J. W. G. 1998. Use of molecular methods to estimate the size and distribution of mycelial individuals of the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius*. Mycol. Res. 102 (3) 295-300.

Arias García A., Rodríguez Alcanzar O. y Villaseñor Ibarra L. 1998. "Las micorrizas: hongos amigos de los bosques". Centro Universitario de Ciencias Biológicas y de U. G.500pp.

Brundrett M. 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. Biol. Rev. (79):473-495.

Brundrett M. C., Bougher N, Dell B, Grove T. y Malajczuk N. 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research Monograph 32, Canberra. 374 pp. ISBN 1 86320 181 5.

Bruns T. D., Bidartondo M. I. y Taylor D. L. 2002. Host Specificity in Ectomycorrhizal communities: what do the exceptions tell us. *Integ and Comp. Biol.*, 42:352-359.

Bruns T. D., White T. J. y Taylor J. W. 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22:525-564.

Bruns T. D. y Shefferson R. P. 2004. Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Can. J. Bot.*, p.p.1122-1132.

Carnero Díaz E., Tagu D. y Martin F. 1997. Ribosomal DNA internal transcribed spacers to estimate the proportion of *Pisolithus tinctorius* and *Eucalyptus globules* RNAs in ectomycorrhiza. *Applied and Environmental Microbiology*.840-843.

Chapman W. K., Berch R. M., Ballard T. M. 1990. *In vitro* growth ectomycorrhizal fungi on dilute agar. *Mycologia* 82:526-527

Cline M. L., France R. y Reid C. P. P. 1987. Intraspecific grown variation of ectomycorrhizal fungi at different temperatures. *Can. J. Bot.* 65:869-875.

Courtecuisse R. y Duhem B. 1995. *Mushrooms & Toadstools of Brittain and Europe*. Ed. Harper Collins Publishers.

Courtecuisse, R. y Duhem. B. 2000. "Guide des champignons de France et d'Europe" Ed. Delachaux et Niestlé, Lausanne-Paris. LOS HONGOS. El reino Fungi: caracteres generales. <http://ecologia.unex.es/siamex/temasbio/vegetacion/setasex/Loshongos/reinofungi.html> (fecha de acceso el 18 Abril 2005).

Cruz Ulloa B. 1992. Micorrizas un caso de simbiosis entre plantas y hongos. Tesis. Colegio de ciencias y Humanidades. UNAM. México.

Denis J. J. 1985. Effect of pH and temperature on in vitro growth of ectomycorrhizal fungi. Information Report. Pacific Forestry Centre. BC-X-273.

García López M. D. y Uruburu Fernández F. 2004. "Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)". Universitat de València. 46100 Burjassot (Valencia). <<http://www.cect.org/docs/cons.doc>> (fecha de acceso el 18 Abril 2005).

Garraway M. O. y Evans R. C. 1991. Fungal nutrition and physiology. Krieger Publishing Company Malabon, Florida.

Glen M., Tommeruop I. C., Bougher N. L. y O'brien P. A. 2001. Specificity, sensitivity and discrimination of primers for PCR-RFLP of larger basidiomycetes and their applicability to identification of ectomycorrhizal fungi in Eucalyptus forest and plantations. Mycol. Res. 105(2):138-149.

Gomez E. A., Kasuya M. C. M., De Barros E. G., Borges A. G. y Acajú E. F. (2002). Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. Copyright by the Brazilian Society of Genetics. 25.4.477-483.

Guerin-laguette A., Matsushita N., Kikuchi K., Iwase K., Lapeyrie F. y Suzuki K. 2002. Identification of prevalent *Tricholoma Matsutake* ribotype in Japan by rDNA IGS1 spacer characterization. The British Mycological Society 106(4): 435-443.

Guerin-Laguette A., Convent S., Ruiz G., Plassard C. y Mousain D. 2003. The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples; symbiote efficiency and development on roots of a rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. Mycorrhiza 13:17-25.

Guevara Guerrero G., Garza Ocañas F. y Cazares González E. 2004. Estudio del ITS nuclear en algunas especies del género *Cantharellus* de México. Ciencia UANL. 7(3):371-378.

Guzmán G., Mata G., Salmones D., Soto Velazco C. y Guzmán Dávalos L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. 100pp.

Hacskeylo E., Palmer J. G. y Vozzo J. A. 1965. Efect to temperature on growth and respiration of ectotrophic mycorrhizal fungi. Mycologia 57:748-756.

Herrera T. y Ulloa M. 1990. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. UNAM. México 500pp.

Huai W., Guo L. y He W. 2002. Genetic diversity of an ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terrum* in *Larix principis-ruppreschtii* stand assessed using random amplified polymorphic DNA. Mycorrhiza 13:265-270.

Hutchinson, L. J. 1990. Studies on the Systematics of Ectomycorrhizal Fungi in Axenic Culture. III. Pattersn of Pollifenol Oxidase Activity. Mycologia 82:424-435.

Jacobson K. M., Miller O. K. Jr. y Turner B. J. 1993. Randomly amplified polymorphis DNA markers are superior to somatic incompatibility test for discriminating genotypes in natural populations of the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. Proc. Natl. acad. Sci. USA.

Kernaghan G. 2001. Ectomycorrhizal fungi at tree line in the Canadian Rockies. II. Identification of ectomycorrhizae by anatomy and PCR. Mycorrhiza 10: 217-229.

Kernaghan G., Currah R.S. y Bayer R.J. 1997. *Russulaceous* ectomycorrhizae of *Abies lasiocarpa* and *Picea engelmannii*. Can. J. Bot. 75:1843-1850.

Kreuzinger N., Podeu R., Gruber F., Golb F. y Kubicek C. P. 1996. Identification of some ectomycorrhizal basidiomycetes by PCR amplification of their gpd (Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase) genes. Applied and environmental microbiology 3432-3438.

Landerweert R., Leeflang P., Smith E. y Kuyper T. 2003. Diversity of an ectomycorrhizal fungal community studied by a root tip and total soil DNA approach. Mycorrhiza 15:1-6.

Landerweert R., Leeflang P., Kuyper T. W., Hoffend E., Rosling A., Werners K. y Smit E. 2003. Molecular Identification of Ectomycorrhizal Mycelium in Soil Horizons. Applied and Environmental Microbiology 327-333.

Lian C., Hogetsu T., Matsushita N., Guerin-laguette A., Suzuki K. y Yamada A. 2003. Development of microsatellite markers from an ectomycorrhizal fungus, *Tricholoma matsutake* by an ISSR-suppression-PCR-method. Mycorrhiza 13:27-31.

Malvarez G. y Oliveira V. L. 2003. A PCR/RFLP technique to characterize fungal species in *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden ectomycorrhizas. Mycorrhiza 13:101-105.

Manian S., Sreenivasaprasad S. y Mills P. R. 2001. DNA extraction method for PCR in mycorrhizal fungi. Letters in applied microbiology. 33: 307-310.

Marx D. J. 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology 59:153-163.

Molina R., Massicotte H. y Trappe J. M. 1992. Specificity Phenomena in Mycorrhizal Symbiosis. Community-Ecological consequences and practical implications. 357-423.

Molina R. y Palmer J. M. 1982. Isolation. Maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Schenk N. C. (Ed.). Methods and principles of mycorrhizal research. American Phytopathological Society. St. Paul, 115-129.

Moser M. 1960. Die gattung phlegmacium (Schleimköpfe) in ie pilze mitteleuopas. Julius Klinkhardt, Bad Heilbrunn. 4:1-440.

Münzenberg B., Wöllecke J., Gollack J. y Hüttl R. 2004. Mycorrhization of scots pine on forest sites with disturbed and undisturbed soils. Editores Agerer R, Piepenbring M., Blanz P. IHW-Verlag. 377-386.

Nouhra E. R., Horton T. R., Cazares E. y Castellano M. 2005. Morphological and molecular characterization of selected *Ramaria* mycorrhizae. *Mycorrhiza* 15:55-59.

Nuytinck J., Verceken A., Rinaldi A. C., Leonardi M., Pacioni G., Comandini O. 2004. Characterization of *Lactarius tesquorum* ectomycorrhizae on *Cistus* sp. and molecular phylogeny of related European *Lactarius* Taxa. *Mycologia* 272-282.

Nuytinck J. y Verbeken A. 2003. *Lactarius sanguifluus* versus *Lactarius vinosus* molecular and morphological analyses. *Micological Progress* 2(3):227-234.

Nuytinck J., Verbeken A., Delarue S. y Walley R. 2003. Systematics of European sequestrate Lactarioid *Russulaceae* with spiny spore ornamentation. *Journ. Bot.* 136(2):145-153.

Promega Madison®. 1996. Protocols and Applications Guide. Third Edition.

Regés R. Director de C.D.E.E.A. 1999. Derechos Reservados. Copyright © <<http://www.gratisweb.com/cdeea/identificacion.htm>> (fecha de acceso el 20 Octubre 2005).

Royo P., Fernández Torran M. y Fischer C. R. 1998. Síntesis micorrícica de *Lactarius deliciosus* Fr. y *Pinus sylvestris* L.

Saenz Peña C. 2004 Reino fungi: Micorrizas. Hipertextos del Área de Biología. <<http://www.biologia.edu.ar/fungi/micorrizas.htm>> (fecha de acceso el 18 Abril 2005).

Sakakibara S. M., Jones M. D., Gillespie M., Hagerman S. M., Forrest M. E., Simmard S. W. y Durall D. M. 2002. A comparison of ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis. Mycol. Res. 106(8):868-878.

Sambrook K. J. y Russell D. W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Volumen I, II y III. 3ed. Ed. Cold spring harbor laboratory press, New york. 2400pp

Samson J. y Fortín J. A. 1986. Ectomycorrhizal fungi of *Larix laricina* and the interespecific and interespecific variation in response to temperature. Can. J. Bot. 64:3020-3028.

Sánchez C. 2004. Modern aspects of mushroom culture technology. Applied Microbiology and Biotechnology. 10.1007/s 00233-004-1569-7 1:15

Sánchez F., Honrubia M. y Torres P. 2000. Características culturales de algunos hongos ectomicorrízicos en cultivo puro. Rev Iberpam Micol 17: 127-134.

Santiago M. G, Estrada T. A., Valera L. y Herrera T. 2002. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa *Laccaria bicolor*. Agrociencia 37:575-584.

Santiago Martinez M. G. y Estrada Torres A. 1999. Hongos ectomicorrizogenos y producción de inoculantes para plantas de interés forestal. Folleto técnico. Fundación Produce Tlaxcala/ Universidad Autonoma de Tlaxcala No. 19 20pp.

---

Santiago M. G, Estrada T. A. y Valera L. 1999. Pruebas de Crecimiento de Cultivos Puros de Hongos Ectomicorrizógenos en Diferentes Medio Nutritivos. Memorias IV Congreso Nacional de Micología. Tlaxcala, Tlax. 136

Santiago-Martínez M. G.1992. Pruebas de crecimiento, síntesis in vitro y caracterización de 10 cepas de hongos ectomicorrizógenos. Tesis de Maestría. Fac.de Cienc. UNAM. México 127pp.

1. Santiago-Martínez M. G.1992. Pruebas de crecimiento, descripción e identificación de cultivos de hongos ectomicorrizógenos e inoculación control plántulas, con esporas. Tesis de doctorado. Facultad de ciencias división posgrado. UNAM. México 182pp.

Solomon Pearl E., Berg L. R., Martin D. W. y Villee C. 2000. Biología de Ville. 4<sup>a</sup> Edición. Mc. Graw Hill. 1305pp.

Suárez I. A. 1997. Autoecología del hongo de pino (*Tricholoma magnivelare* (peck) Redhead) Tesis Ingeniería Forestal. Universidad Autónoma de Chapingo, México.

Tellez-Tellez M., Díaz -Godinez G. y Sanchez C. 2003. Physiology of a colony *Pleurotus pulmonaris* grown on medium overlaid with a cellophane membrane. Appl. Microbiol. Biothechnol 63:212-216.

Weber J., Díez J., Selosse M., Tagu D. y Le Tacon F. 2002. SCAR markers to detect mycorrhizas of American *Laccaria bicolor* strain inoculated in European Douglas-fir plantations. Mycorrhiza 12:19-27.

White T.J., Bruns T., Lee S. y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics. In: PCR-Protocols and Applications-A Laboratory Manual Eds, N. Innis D. Gelfand J. Sninsky and T. White. Academic Press New York 315-322.

Yamada A., Ogura T. y Ohmasa M. 2001. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro micorrhizal síntesis. II. Morphology of mycorrhizas in open-pot soil. *Mycorrhiza* 11:67-81.

Yamada A., Ogura T. y Ohmasa M. 2000. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro micorrhizal síntesis. I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza* 11:59-66.

Yamada A., Ogura T. y Ohmasa M. 2001. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal symthesis. II. Morphology oh mycorrhizas in open-pot soil. *Mycorrhiza* 11:67-81

Yamada A., Ogura T., Degawa Y. and Ohmasa M.. 2001. Isolation of *Tricholoma matsuke* and *T. bakamatsutake* cultures from fiels-collected ectomycorrhizas. *Mycoscience* 42:43-50.

Zamora-Martínez M. C., Alvarado-Lopez G., Domínguez-Gomez J. M. 2000. Hongos Silvestres Comestibles Región Zacualtipan, Hidalgo. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigaciones de la Region Centro. Campo Experimental Pachuca. (Folleto técnico).

Zamora-Martínez and Nieto de Pascual Pola C.2004. Studies of *Tricholoma magnivelare* in México. *Micología Aplicada Internacional* 16(1) 13-23.

Zamora-Martínez M. C. y Nieto de Pascual-Pola C. 2003. Studies of *Tricholoma magnivelare* in México. *Micología Aplicada Internacional* 16(1):13-23.

# ANEXOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CENTRO DE INVESTIGACION EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

OTORGA LA PRESENTE

## CONSTANCIA

**A:** CARRANZA DÍAZ ZURISADAI Y LÓPEZ LÓPEZ Ma. CANDELARIA

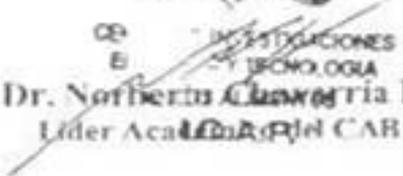
POR LA PRESENTACIÓN ORAL DEL TRABAJO : "AISLAMIENTO DE ALGUNOS HONGOS  
ECTOMICORRIZÓGENOS NATIVOS DEL ESTADO DE HIDALGO"

DURANTE EL PRIMER ENCUENTRO UNIVERSITARIO DE BIOTECNOLOGÍA  
UAM-XOCHIMILCO/ UAEH-ICAp.  
CELEBRADO EL 30 Y 31 DE JULIO

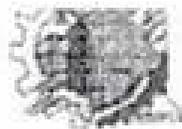
Amor, Orden y Progreso  
Tulancingo de Bravo, Hgo. a mediados de Julio del 2004



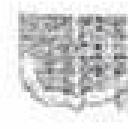
  
Dra. Alma Delia Hernández Fuentes  
Directora del CICyTA

  
Dr. Norberto Chavarría Hdez.  
Líder Académico del CAB

  
Dra. Blanca Rosa Rodríguez P.  
Coordinadora del Encuentro



CICYTA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

CARRANZA-DÍAZ Z., LÓPEZ-LÓPEZ M. C., Y RODRÍGUEZ-PASTRANA B.R

COMO PONENTE CON EL TEMA

AISLAMIENTO DE ALGUNOS HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS  
 NATIVOS DEL ESTADO DE HIDALGO

Tulancingo Hidalgo, del 4 al 5 de Noviembre del 2011

Dr. C. Cesar Maycotte Morales  
Director de ICAE



Dra. Alma Delfa Hernández Fuentes  
Directora de CICYTA

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO

Y

SOCIEDAD MEXICANA DE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA



Otorgan la presente

CONSTANCIA A:

Carranza-Díaz Z., López-López M. C., y Rodríguez-Pastrana B. R.

por su valiosa participación con el cartel:

*AISLAMIENTO DE ALGUNOS HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS  
NATIVOS DEL ESTADO DE HIDALGO*

Morelia, Michoacán, Noviembre 12 de 2004.

Dra. Dora Trejo Agullar

Una firma manuscrita en tinta que parece decir 'Dora Trejo'.

Presidenta de la Sociedad Mexicana de la  
Simbiosis Micorrizica

Dra. Yazmín Carreón Abud

Una firma manuscrita en tinta que parece decir 'Yazmín Carreón Abud'.

Presidenta del Comité Organizador Local



SOCIEDAD MEXICANA DE  
BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

# Reconocimiento

M. C. López-López, Z. Carranza-Díaz, R. G. Campos-Montiel y B. R.  
Rodríguez-Pastrana

Con la presentación del Trabajo libre: Estudio del ITS nuclear en algunos hongos  
ectomicorizógenos nativos del Estado de Hidalgo

Trabajo libre presentado en el Congreso de Biotecnología 2019



Publicado en el Boletín de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería