



Agrociencia

ISSN: 1405-3195

agrocien@colpos.mx

Colegio de Postgraduados

México

García Rodríguez, José L.; Pérez Moreno, Jesús; Aldrete, Arnulfo; Cetina Alcalá, Víctor M.; Vaquera Huerta, Humberto

Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino

Agrociencia, vol. 40, núm. 5, septiembre-octubre, 2006, pp. 665-676

Colegio de Postgraduados

Texcoco, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30240511>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

CARACTERIZACIÓN DEL HONGO SILVESTRE ECTOMICORRÍZICO *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker *et* Couch EN CULTIVO Y EN SIMBIOSIS CON EUCALIPTO Y PINO

CHARACTERIZATION OF THE WILD ECTOMYCORRHIZAL FUNGUS *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker *et* Couch IN CULTURE AND IN SYMBIOSIS WITH EUCALYPT AND PINE

José L. García-Rodríguez¹, Jesús Pérez-Moreno², Arnulfo Aldrete¹, Víctor M. Cetina-Alcalá¹ y Humberto Vaquera-Huerta³

¹Forestal, ²Edafología y ³Estadística. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Km 36.5, Carretera México-Texcoco. Montecillo, Texcoco, Estado de México. (jperez@colpos.mx)

RESUMEN

Pisolithus tinctorius es un hongo ectomicorrízico, comestible en estadios juveniles, de enorme importancia en la inoculación de plantas de interés forestal. Se aislaron tres cepas del hongo, a partir de esporocarpos recolectados en plantaciones forestales tropicales de eucaliptos y pinos. Dichas cepas se caracterizaron *in vitro* en tres medios de cultivo sólido a 28 °C y se evaluó el crecimiento micelial en medio Melin-Norkrans modificado (MNM) líquido y en una mezcla de vermiculita y turba; todas las evaluaciones se hicieron a pH 4.7 y 5.7. En el medio sólido, los mayores crecimientos en diámetro e incremento en biomasa se observaron en los medios papa dextrosa agar y MNM, en comparación con extracto de malta. Los mayores incrementos en biomasa, en el cultivo en medio líquido, se registraron en la cepa procedente de Oaxaca a pH 5.7. En el medio líquido se observó un oscurecimiento del color original del medio, como lo reveló un análisis de absorbancia en espectrómetro de masa. Además, se caracterizaron morfológicamente ectomicorrizas sintetizadas en brinzales de *Eucalyptus urophylla* y *Pinus greggii*. Debido a variaciones en el crecimiento de los hongos ECM en diferentes condiciones de cultivo es indispensable la caracterización de cepas ECM, previa al escalonamiento comercial de la producción de inóculo ECM a utilizar en viveros forestales.

Palabras clave: *Eucalyptus*, *Pinus*, cultivo *in vitro*, inoculación, plantaciones forestales tropicales, simbiosis ectomicorrízica.

ABSTRACT

Pisolithus tinctorius is an ectomycorrhizal fungus, edible in early stages, of great relevance in the inoculation of plants with forestal importance. Three strains of fungus were isolated from fruit bodies collected in tropical eucalyptus and pine forest plantations. An *in vitro* characterization of these strains was carried out on three solid media at 28 °C. Mycelial growth in modified Melin Norkrans (MNM) liquid medium and on a vermiculite-peat mixture was assessed for all strains. In all cases, assessments were conducted at pH 4.7 and 5.7. In solid medium, greater growth in diameter and increase in biomass were observed on potato-dextrose-agar and MNM than on malt extract. The greatest increases in biomass in liquid culture medium were recorded for the strain from Oaxaca at pH 5.7. In the liquid culture, darkening of the original color of the medium was observed, as revealed by an analysis of absorbance in a mass spectrometer. Also, a morphological characterization of ectomycorrhiza synthesized with *Eucalyptus urophylla* and *Pinus greggii* was made. Because of variations in growth of the ECM fungi under different culture conditions, the characterization of ECM strains is compulsory before commercial scale production of ECM inoculum to be used in forest nurseries.

Key words: *Eucalyptus*, *Pinus*, *in vitro* culture, inoculation, tropical forest plantations, ectomycorrhizal symbiosis.

INTRODUCCIÓN

La simbiosis ectomicorrízica (ECM) se establece en unas 3000 especies de plantas y alrededor de 5000 especies de hongos, principalmente basidiomicetos y ascomicetos (Smith y Read, 1997; Estrada-Torres y Santiago-Martínez, 2003). Las especies forestales dependen de la simbiosis ECM y diversas especies de árboles, incluyendo pinos, no se desarrollarían sin esa simbiosis. Es importante la inoculación

INTRODUCTION

Ectomycorrhizic (ECM) symbiosis occurs in about 3000 plant species and around 5000 species of fungi, mainly Basidiomycetes and Ascomycetes (Smith and Read, 1997; Estrada-Torres and Santiago-Martínez, 2003). Forest species depend on ECM symbiosis, and diverse species of trees, including pines, would not grow without it. Inoculation in nurseries with selected ectomycorrhizic fungi is important in improving the establishment of plantations in the field (Marx *et al.*, 1994). Information has been generated in temperate northern regions but

en vivero con hongos ectomicorrízicos seleccionados para mejorar el establecimiento de plantas en campo, en sitios rutinarios o adversos (Marx *et al.*, 1994). Se ha generado información en regiones templadas y boreales, pero existe menor conocimiento de hongos ectomicorrízicos procedentes de regiones tropicales.

Pisolithus tinctorius (Pers.) Coker *et* Couch (syn. = *P. arhizus* (Scop.: Pers.) Rauschert) es un hongo del grupo de los basidiomicetos, comestible en estadios juveniles, y además se utiliza en la elaboración de tintes de colores café brillante y negro (Lincoff, 1984). El mayor interés en esta especie se deriva de su éxito en la inoculación de plantas forestales en países de los cinco continentes. Las plantas con las que *P. tinctorius* establece simbiosis ECM incluyen más de 20 géneros de gimnospermas y angiospermas con distribución mundial (Cairney y Chambers, 1997); incluyendo especies forestales de las familias Casuarinaceae, Dipterocarpaceae, Pinaceae y Myrtaceae (Pérez-Moreno y Read, 2004). Las fuentes de inóculo ectomicorrízico usadas en vivero han sido tradicionalmente esporas y cultivos miceliales. En la propagación micelial, el crecimiento de las cepas de hongos ectomicorrízicos es afectado por la condiciones de cultivo, principalmente pH, temperatura y composición de los medios. Dentro de una misma especie, aislamientos de diferentes procedencias presentan variaciones morfológicas y originan efectos diferenciales en el crecimiento vegetal al usarse como inoculantes (Castellano y Molina, 1989). Por tanto, es importante aumentar el conocimiento, especialmente en áreas tropicales, relacionado con dichas variaciones de crecimiento micelial en cultivo, previo al escalonamiento masivo de la producción de inóculo. Para seleccionar la especie de hongo a estudiar se hicieron recolecciones preliminares en plantaciones forestales de eucaliptos y pinos tropicales en los Estados de Nayarit, Oaxaca y Tabasco. La especie de hongo ectomicorrízico recolectada con mayor frecuencia y abundancia en dichas áreas fue *P. tinctorius*. Por tanto, los objetivos del presente trabajo fueron aislar cepas de *P. tinctorius* procedentes de plantaciones forestales tropicales de eucaliptos y pinos, caracterizar *in vitro* tres cepas en tres medios de cultivo sólidos a dos pH, y evaluar el crecimiento de las cepas en medio líquido en agitación constante y en mezcla de vermiculita y turba; además, caracterizar macro y micromorfológicamente las ectomicorrizas establecidas entre *P. tinctorius* y eucaliptos y pinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se recolectaron treinta cuerpos fructíferos de *Pisolithus tinctorius* en tres plantaciones tropicales de Tabasco, Oaxaca y Nayarit, y a partir de ellos se hicieron aislamientos en condiciones

there is less knowledge of ectomycorrhizic fungi of tropical regions.

Pisolithus tinctorius (Pers.) Coker and Couch (syn. = *P. arhizus* (Scop.: Pers.) Rauschert) is a fungus of the Basidiomycetes group edible in juvenile stages and also used to produce bright brown and black dyes (Lincoff, 1984). Major interest in this species has been due to its success in inoculating forest plants in countries of five continents. The plants with which *P. tinctorius* establishes ECM symbiosis include more than 20 genera of gymnosperms and angiosperms distributed worldwide (Cairney and Chambers, 1997); including forest species of the Casuarinaceae, Dipterocarpaceae, Pinaceae and Myrtaceae families (Pérez-Moreno and Read, 2004). Traditional sources of ectomycorrhizic inoculum used in nurseries have been spores and mycelial cultures. In mycelial propagation, growth of the ectomycorrhizic fungus strains is affected by culture conditions, principally pH, temperature and composition of the media. Within a single species, isolates from different origins exhibit morphological variations and cause differential effects in plant growth when used as inoculants (Castellano and Molina, 1989). Therefore, it is important to increase knowledge, especially in tropical regions, related to these variations in mycelial growth before mass production of inoculum. To select the fungus species to be studied, preliminary collections were conducted in forest plantations of tropical eucalyptus and pine in the states of Nayarit, Oaxaca and Tabasco. The ectomycorrhizic fungus species collected most frequently and abundantly was *P. tinctorius*. Thus, the objectives of this study were to isolate strains of *P. tinctorius* from tropical forest plantations of eucalyptus and pine; to characterize, *in vitro*, three strains on three solid culture media at two pH values, and to evaluate growth of the strains in liquid medium under constant agitation and on a mixture of vermiculite and peat, as well as to characterize, macro and micro morphologically, the ectomycorrhiza established between *P. tinctorius* and eucalyptus and pine.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Thirty fruit-bodies of *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker were collected in three tropical plantations of Tabasco, Oaxaca and Nayarit. These were used to obtain isolates under axenic conditions with the methods of Kumar and Satyanarayana (2002). Three strains were obtained whose codes were 1) PTTAB03, isolated from a *Eucalyptus urophylla* Blake plantation in Huimanguillo, Tabasco; 2) PTOAX03, isolated from a plantation of *Pinus caribaea* Morlet var *Hondurensis* (Sen.) Barret & Golfari in La Sabana, Oaxaca; and 3) PTNAY03, isolated from a plantation of *E. urophylla* in Acaponeta, Nayarit. The spores used for inoculation in seed

axénicas con los métodos de Kumar y Satyanarayana (2002). Se obtuvieron tres cepas cuyas claves fueron: 1) PTTAB03: aislada de una plantación de *Eucalyptus urophylla* Blake en Huimanguillo, Tabasco; 2) PTOAX03: aislada en una plantación de *Pinus caribaea* Morlet var *hondurensis* (Sén.) Barret & Golfari en La Sabana, Oaxaca; 3) PTNAY03: aislada de una plantación de *E. urophylla* en Acaponeta, Nayarit. Las esporas usadas para la inoculación en vivero de brinzales de *Eucalyptus urophylla* y *Pinus greggii* provenían de 20 cuerpos fructíferos recolectados en una plantación de *E. urophylla* en Huimanguillo, Tabasco y de *P. caribaea* en La Sabana, Oaxaca.

Cultivo en diferentes condiciones

Medio sólido

Las tres cepas aisladas se evaluaron en tres medios de cultivo: papa dextrosa agar (PDA) Merck (Darmstadt, Alemania), Melin Norkrans modificado (MNM) según Marx y Kenney (1984) y extracto de malta (EM) Difco (Sparks, MD, USA), a pH 4.7 y 5.7. Las variables evaluadas fueron crecimiento en diámetro (CD) e incremento en biomasa (IB), después de 30 d de crecimiento fúngico a 28 °C. Se consideró como CD al promedio (mm) de cuatro mediciones que pasaron por el centro del fragmento inoculado, restando el diámetro inicial de dicho fragmento. Para calcular el IB se restó de la biomasa final, la biomasa inicial (Sánchez *et al.*, 2001). Para la eliminación del agar se colocaron las colonias en agua hirviendo y se enjuagaron con agua caliente (Vázquez-García *et al.*, 2002). El secado se hizo a 60 °C hasta obtener el peso seco constante (biomasa, mg). Se utilizó un diseño completamente al azar y un arreglo factorial (3×2×3) de tratamientos, con tres repeticiones. Se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) (SAS Institute, 1999).

Medio líquido

Para el experimento de cultivo líquido en agitación constante se utilizó únicamente el medio MNM a pH 4.7 y 5.7 en las tres cepas. En frascos de vidrio de 400 mL se añadieron 250 mL de solución MNM estéril con 15 fragmentos de inóculo (5 mm diámetro cada uno). Los frascos se colocaron en una incubadora y se agitaron a 120 rpm, a 28 °C durante 30 d. El IB se evaluó de manera similar que para el cultivo en medios sólidos. El micelio se removió del medio líquido y se lavó con agua destilada para eliminar residuos, previo a su secado a 60 °C hasta peso constante.

Se determinó el pH del medio después de los 30 d de crecimiento micelial en cada frasco. Debido a que hubo variaciones en la coloración del medio, dependiendo de las cepas estudiadas, al final del experimento se efectuaron lecturas en un espectrómetro de masas (Hewlett Packard Mod. 8453, EE. UU.), para medir la absorbancia óptica de los medios en los cuales habían crecido las cepas de hongos durante 30 d. Para dichas lecturas se hicieron mezclas compuestas de 8 mL cada una, a partir de las repeticiones de cada tratamiento; las lecturas se hicieron en el intervalo de 200 a 300 nm. El diseño experimental fue completamente al azar y con

nurseries of *Eucalyptus urophylla* and *Pinus greggii* were mixed with spores from 20 fruit-bodies collected in a plantation of *E. urophylla* in Huimanguillo, Tabasco, and one of *P. caribaea* in La Sabana, Oaxaca.

Culture under different conditions

Solid medium

The three isolated strains were evaluated in three culture media at pH 4.7 and 5.7: potato-dextrose-agar (PDA) Merck (Darmstadt, Germany); Melin Norkrans, modified following Marx and Kenney (1984), (MNM); and malt extract (EM) Difco (Sparks, MD, USA). The evaluated variables were growth in diameter (DG) and increase in biomass (BI) after 30 d of fungal growth at 28 °C. DG was calculated as the average (mm) of four measurements through the center of the inoculated fragment, subtracting the initial diameter of the fragment. To calculate BI, initial biomass was subtracted from final biomass (Sánchez *et al.*, 2001). For elimination of agar, the colonies were placed in boiling water and rinsed with hot water (Vázquez-García *et al.*, 2002). Drying was accomplished at 60 °C until a constant dry weight was obtained (biomass, mg). A completely randomized design was used with a (3×2×3) factorial arrangement with three replications. An analysis of variance and the Tukey test of comparison of means ($p \leq 0.05$) were performed (SAS Institute, 1999).

Liquid medium

For the experiment in liquid medium under constant agitation, only the MNM medium at pH 4.7 and 5.7 was used for the three strains. In 400 mL glass jars, 15 fragments of inoculum (each 5 mm diameter) were placed in 250 mL of sterile MNM solution. These jars were placed in an incubator at 28 °C and agitated at 120 rpm for 30 d. BI evaluation was similar to that for culture on solid media. The mycelia removed from the liquid medium and washed with distilled water to eliminate residues before drying, which was accomplished at 60 °C until constant weight.

Medium pH was determined after 30 d of mycelial growth in each jar. Because color of the medium varied depending on the strain studied, at the end of the experiment readings were taken in a mass spectrometer (Hewlett Packard Mod. 8453, USA) to measure optical absorbance of the media in which the fungus strains had grown for 30 d. For these readings, 8 mL mixtures were made with each of the replications of each treatment. Readings were taken in the interval of 200 to 300 nm. The experimental design was completely randomized with a (3×2) factorial arrangement of treatments with four replications. An analysis of variance and a Tukey test of comparison of means ($p \leq 0.05$) were performed (SAS Institute, 1999).

Mixture of vermiculite, peat and nutrient solution

For the experiment of culture in substrates, 400 mL glass jars were used with 250 mL of the mixture of vermiculite:peat (7:1 v/v),

un arreglo factorial (3×2) de tratamientos con cuatro repeticiones. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) (SAS Institute, 1999).

Mezcla de vermiculita, turba y solución nutritiva

Para el experimento de cultivo en sustratos se utilizaron frascos de vidrio de 400 mL con 250 mL de la mezcla de vermiculita:turba en una proporción 7:1 v/v, humedecida con solución del medio MNM estéril, a pH 4.7 y 5.7. Cada frasco contenía siete fragmentos de inóculo (5 mm diámetro) de cada una de las tres cepas. Los frascos se colocaron en una incubadora a 28 °C durante 30 d. Para evaluar el porcentaje de llenado de envases por *P. tinctorius* se comparó el crecimiento micelial observado en cada frasco, con frascos graduados con porcentajes desde 5 a 100%, con intervalos de 2.5%. El diseño experimental fue completamente al azar y con un arreglo factorial (3×2) de tratamientos (tres cepas; pH 4.7 y 5.7), cada uno con cinco repeticiones. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) (SAS Institute, 1999).

Caracterización macro y micromorfológica de raíces ECM de eucaliptos y pinos

Se realizó en vivero un ensayo de inoculación de brinzales de *Eucalyptus urophylla* y *Pinus greggii* con basidiosporas de los cuerpos fructíferos recolectados. Se aplicaron 700 mg de basidiosporas (7×10^6 esporas) en solución por brinjal. La observación de raíces ECM se realizó después de dos meses en eucalipto y seis meses en pino. Las descripciones macro y micromorfológicas se realizaron con las técnicas propuestas por Natarajan y Mohan (2002). Para el análisis micromorfológico se tomaron muestras de raíces cortas con crecimiento micelial evidente de color café a amarillo brillante y se realizaron cortes con un microtomo de congelación (Mod. 880 American Optical) a 45 μm con la técnica de hielo seco. Para cada especie se tomaron fotografías en un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío con EDX acoplado (JOEL JSM-5600 LV Scanning Microscope) del Laboratorio de Microscopía, Instituto de Física, UNAM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de los basidiocarpos

Los cuerpos fructíferos presentaron la morfología típica de *Pisolithus tinctorius* en los tres sitios de procedencia. La forma varió de globosa, obpiriforme a clavada, 4 a 11 cm de diámetro y 3.0 a 8.5 cm de altura (sin considerar la longitud del estípite); el estípite amarillento fibroso, profundamente arraigado, alcanzó en algunos casos hasta 5 cm de diámetro $\times$ 9 cm de longitud. Con peridio liso delgado, amarillo brillante a café amarillento con tonos oliváceo-negruzcos (Figura 1a), su textura varió de carnosa, ligeramente viscosa en estados juveniles a pulvinosa frágil en etapas maduras.

moistened with sterile MNM medium solution with pH 4.7 and 5.7. Each jar contained seven fragments of inoculum (5 mm diameter) of each of the three strains. The jars were placed in an incubator at 28 °C for 30 d. To assess the percentage to which the containers were filled by *P. tinctorius*, mycelial growth observed in each jar was compared with jars graduated with percentages from 5 to 100% with intervals of 2.5%. The experimental design was completely randomized with a 3×2 factorial arrangement of treatments (three strains; pH 4.7 and 5.7), each with five replications. An analysis of variance and the Tukey test of comparison of means ($p \leq 0.05$) were performed (SAS Institute, 1999).

Macro and micromorphological characterization of ECM root of eucalyptus and pine

In the nursery *Eucalyptus urophylla* and *Pinus greggii* seedlings were inoculated with basidiospores of the collected fruit-bodies; 700 mg of basidiospores (7×10^6 spores) were applied in solution per seedling. ECM roots were observed two months later in eucalyptus and six in pine. The macro and micromorphological descriptions were performed with the techniques proposed by Natarajan and Mohan (2002). For the micromorphological analysis, samples were taken from short roots with evident mycelial growth, brown to bright yellow, and cuttings were performed with a freezing microtome (Mod. 880 American Optical) at 45 μm with the dry ice technique. For each species, photographs were taken in a low-vacuum electronic scanning microscope with a coupled EDX (JOEL JSM-5600LV Scanning Microscope) at the Microscopy Laboratory, Physics Institute, UNAM.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of basidiocarps

Fruit-bodies from the three sites of origin had morphology typical of *Pisolithus tinctorius*. Shape varied from globose, obpyriform to clavate, 4 to 11 cm diameter and 3.0 to 8.5 cm tall (without considering the length of the stipe), the deeply rooted yellowish fibrous stipe reached, in some cases, up to 5 cm diameter $\times$ 9 cm long. With a smooth, thin peridium, bright yellow to yellowish brown with blackish olive tones (Figure 1a), its texture varied from fleshy, slightly viscid in juvenile stages, to fragile pulvinate in mature stages.

The gleba and peridioles (Figure 1b) had white, yellowish brown, reddish and olive tones. Spores were spherical, 7 to 8 μm diameter, with ornamentations of up to 0.5 μm . The specimens from Nayarit had bright yellow tones, unlike the yellowish brown and blackish olive tones observed in those from Tabasco and Oaxaca. Likewise, differences in the shape of the fruit-bodies were observed. The specimens from Nayarit were clavate to pyriform and had conspicuous stipes, while those from Tabasco and Oaxaca were

La gleba y los peridiolos (Figura 1b) presentaron tonos blancos, café amarillentos, rojizos y oliváceos. Las esporas fueron esféricas, 7 a 8 μm de diámetro, con ornamentaciones de hasta 0.5 μm . Los especímenes procedentes de Nayarit registraron tonos amarillentos brillantes, a diferencia de los tonos café amarillentos y oliváceo-negruzcos observados en los de Tabasco y Oaxaca. Asimismo, se observaron diferencias en la forma de los cuerpos fructíferos. Los especímenes de Nayarit fueron clavados a piriformes y presentaron estípites conspicuos, mientras que los de Tabasco y Oaxaca fueron globosos a subglobosos con estípites cortos o inexistentes. Diferencias macro y micromorfológicas, en términos de carpóforos y de los cultivos aislados, se han observado en los cuerpos fructíferos de *P. tinctorius* en varios países. Por ejemplo, diferencias macromorfológicas similares a las encontradas en el presente trabajo se han detectado en colecciones australianas de *P. tinctorius* (Anderson *et al.*, 1998; Cairney *et al.*, 1999), e incluso, con técnicas moleculares utilizando extracción de ADN de los cuerpos fructíferos o del micelio cultivado y amplificación de la región ITS (internal transcribed spacer) del grupo de genes del ARN ribosomal mediante la metodología de la reacción de la cadena polimerasa (PCR), lo que actualmente se conoce como *P. tinctorius*, será segregado en distintas especies (Cairney, 2002).

Cultivo en medios sólidos

Las cepas aisladas de las tres localidades mostraron la morfología micelial típica *P. tinctorius* en los tres medios de cultivo. Se observó micelio color café oscuro a café amarillento, aterciopelado con zonas concéntricas (Figura 1c), presencia de gúttulas de color café oscuro observables macroscópicamente y abundantes hifas aéreas y sumergidas en el medio. En los tres medios de cultivo (PDA, MNM y EM) las cepas produjeron un pigmento color café amarillento, el cual se difundió en los medios originando un cambio de su color original. La liberación de estos pigmentos fue mayor en la cepa procedente de Oaxaca (Figura 1c).

El mejor crecimiento promedio, en diámetro, de las tres cepas (Cuadro 1) se observó en los medios PDA y MNM comparado con el del medio EM (Cuadro 1) (PDA=50.97 $\pm$ 3.11 mm y MNM=51.00 $\pm$ 4.12 mm *versus* EM=21.90 $\pm$ 2.96 mm). La velocidad promedio de crecimiento fue 1.7 mm d⁻¹ en PDA y MNM, y 0.7 mm d⁻¹ en EM. Velocidades menores se han reportado para otros hongos ectomicorrízicos: para *Laccaria bicolor* 0.22 mm d⁻¹ en el medio de cultivo Hagem (Santiago-Martínez *et al.*, 2003);

globoso to subgloboso with short or nonexistent stipes. Macro and micromorphological differences, in terms of carpophores and of isolated cultures, have been observed in the fruit-bodies of *P. tinctorius* in several countries. For example, macro morphological differences similar to those found in our study, have been detected in Australian collections of *P. tinctorius* (Anderson *et al.*, 1998; Cairney *et al.*, 1999). With molecular techniques using DNA extraction from the fruit-bodies or from cultured mycelium and amplification of the ITS (internal transcribed spacer) region of the group of genes from ribosomal RNA with the polymerase chain reaction methodology, what is currently known as *P. tinctorius* will be segregated into different species (Cairney, 2002).

Culture in solid media

The isolated strains from the three sites showed mycelial morphology typical of *P. tinctorius* in the three culture media. Dark brown to yellowish brown velvety mycelia with concentric zones were observed (Figure 1c), presence of dark brown guttae observable macroscopically and abundant hyphae, aerial and submerged in the medium. In the three culture media (PDA, MNM and EM), the strains produced a yellowish brown pigment, which diffused through the media causing a change from their original color. The release of these pigments was greater in the strain from Oaxaca (Figure 1c).

The higher average growth, in diameter, of the three strains (Table 1) was observed in the PDA and MNM media than in the EM medium (Table 1) (PDA=50.97 $\pm$ 3.11 mm and MNM=51.00 $\pm$ 4.12 mm *vs* EM=21.90 $\pm$ 2.96 mm). Average growth rate was 1.7 mm d⁻¹ in PDA and MNM and 0.7 d⁻¹ in EM. Lower rates have been reported for other ectomycorrhizic fungi: for *Laccaria bicolor* 0.22 mm d⁻¹ in Hagem culture medium (Santiago-Martínez *et al.*, 2003); for *Cantharellus cibarius* 0.5 mm d⁻¹ at a temperature of 20 °C in a modified Fries medium (Pilz *et al.*, 2003). Like growth in diameter, there were significant differences ($p\leq 0.05$) for increase in biomass in the three culture media, and the lowest growth was in EM (Figure 1c) (PDA=77.77 $\pm$ 12.81 mg and MNM=50.13 $\pm$ 6.42 mg *vs* EM=12.08 $\pm$ 4.28 mg). Besides, the strain from Tabasco had a lower growth rate ($p\leq 0.05$) in diameter (pH 4.7=49.99 $\pm$ 16.66 mm *vs* pH 5.7=41.01 $\pm$ 13.67 mm), and in biomass (pH 4.7=63.95 $\pm$ 21.32 mg *vs* pH 5.7=38.62 $\pm$ 12.87 mg) when pH increased from 4.7 to 5.7. Conversely, in the Oaxaca strain growth in diameter increased ($p\leq 0.05$) when pH was increased from 4.7 to 5.7



Figura 1. Aspectos generales de *Pisolithus tinctorius*: a) cuerpos fructíferos amarillentos con tonos oliváceos en una plantación de *Eucalyptus urophylla* en Huimanguillo, Tabasco; b) corte transversal de un cuerpo fructífero mostrando la coloración olivácea de la gleba y peridioles; c) crecimiento micelial de tres cepas en los medios de cultivo sólido EM: extracto de malta; MNM: Melin Norkrans modificado y PDA: papa dextrosa agar; d) crecimiento micelial en medio líquido MNM; e) crecimiento micelial en turba y vermiculita; f) ápice ectomicorrízico con *E. urophylla*; g) red de Hartig en corte transversal de raíz de *E. urophylla* con microscopía electrónica de barrido; h) detalle de rizomorfos en ápice ectomicorrízico con *Pinus patula*; i) manto (M) y fibulas (F) en corte de raíz de *Pinus greggii*.

Figure 1. General aspects of *Pisolithus tinctorius*: a) yellowish fruit bodies with olive tones in a plantation of *Eucalyptus urophylla* in Huimanguillo, Tabasco; b) cross-section of a fruit body showing the olive coloring of the gleba and peridioles; c) mycelial growth of three strains in the solid EM culture media: malt extract; MNM (modified Melin Norkrans), and PDA (potato-dextrose-agar); d) mycelial growth in MNM liquid medium; e) mycelial growth in peat and vermiculite; f) ectomycorrhizic apex with *E. urophylla*; g) Hartig net in *E. urophylla* root cross-section with electronic scanning microscopy; h) detail of rhizomorphs in ectomycorrhizic apex with *Pinus patula*; i) mantle (M) and fibules (F) on section of *Pinus greggii* root.

Cuadro 1. Crecimiento en diámetro e incremento en biomasa de tres cepas de *Pisolithus tinctorius* procedentes de plantaciones forestales, en tres medios de cultivo sólido a 28 °C, después de 30 días.**Table 1. Growth in diameter and increase in biomass in three solid culture media at 28 °C after 30 days of three strains of *Pisolithus tinctorius* collected from forest plantations.**

†Cepas / Variables	Medios de cultivo					
	‡PDA		MNM		EM	
	pH 4.7	pH 5.7	pH 4.7	pH 5.7	pH 4.7	pH 5.7
Cepa PTTAB03						
Crecimiento en diámetro (mm)	61.60 ± 0.23 a	59.33 ± 0.41 a	72.67 ± 7.38 a	53.13 ± 6.91 a	15.70 ± 1.33b	10.56 ± 0.66 b
Incremento en biomasa (mg)	132.12 ± 21.4 a	53.42 ± 6.70 b	59.69 ± 5.53 b	61.52 ± 6.95 b	0.05 ± 0.03 c	0.92 ± 0.29 c
Cepa PTOAX03						
Crecimiento en diámetro (mm)	44.87 ± 5.00 ab	62.27 ± 4.57 a	50.20 ± 3.00 ab	63.40 ± 4.24 a	29.55 ± 7.29 b	35.93 ± 9.69 ab
Incremento en biomasa (mg)	61.50 ± 20.84 ab	138.33 ± 41.8 a	58.33 ± 19.15 ab	73.63 ± 20.69 ab	37.17 ± 18.48 ab	20.97 ± 6.79 b
Cepa PTNAY03						
Crecimiento en diámetro (mm)	42.47 ± 3.84 a	35.30 ± 9.99 ab	28.77 ± 3.47 ab	37.88 ± 8.89 ab	28.77 ± 1.64 ab	10.87 ± 0.59 b
Incremento en biomasa (mg)	57.77 ± 16.42 a	23.47 ± 2.23 ab	21.48 ± 9.88 ab	26.15 ± 4.08 ab	4.29 ± 1.28b	9.09 ± 4.78 ab

† La cepa PTTAB03 se aisló de una plantación de *Eucalyptus urophylla* en Huimanguillo, Tabasco, la cepa PTOAX03 de una plantación de *Pinus caribaea* en La Sabana, Oaxaca, y la cepa PTNAY03 de una plantación de *E. urophylla* en Acaponeta, Nayarit.

‡ PDA: papa dextrosa agar; MNM: Melín Norkrans modificado; EM: extracto de malta. Medias con diferente letra en una hilera, son diferentes ($p \leq 0.05$).

para *Cantharellus cibarius* 0.5 mm d⁻¹ a 20 °C de temperatura en el medio Fries modificado (Pilz *et al.*, 2003). De manera similar que para el crecimiento en diámetro, hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para el incremento en biomasa en los tres medios de cultivo, y el menor incremento fue en EM (Figura 1c) (PDA=77.77±12.81 mg y MNM=50.13±6.42 mg *versus* EM=12.08±4.28 mg). Además, la cepa de Tabasco tuvo un menor crecimiento ($p \leq 0.05$) en diámetro (pH 4.7=49.99±16.66 mm *versus* pH 5.7=41.01±13.67 mm) y en biomasa (pH 4.7=63.95±21.32 mg *versus* pH 5.7=38.62±12.87 mg) al incrementar el pH de 4.7 a 5.7. Contrariamente, en la cepa de Oaxaca aumentó ($p \leq 0.05$) el crecimiento en diámetro al incrementar el pH de 4.7 a 5.7 (pH 4.7=41.54±13.85 mm *versus* pH 5.7=53.87±17.96 mm). Sánchez *et al.* (2001) observaron que las cepas de algunos hongos ectomicorrízicos comestibles, procedentes de regiones mediterráneas, como *Lactarius deliciosus*, *Suillus granulatus* y *S. luteus*, incrementan su biomasa al aumentar el pH en medios sólidos de 4.5 a 5.5; además, otros hongos ectomicorrízicos como *Tricholoma focale*, disminuyeron su biomasa con incrementos similares de pH. En el presente estudio, dichas tendencias se observaron no en distintas especies, sino en cepas de *P. tinctorius* de diferentes procedencias.

(pH 4.7=41.54±13.85 mm *vs* pH 5.7=53.87±17.96 mm). Sánchez *et al.* (2001) observed that the strains of some edible ectomycorrhizic fungi from regions of the Mediterranean, such as *Lactarius deliciosus*, *Suillus granulatus* and *S. luteus*, increased their biomass when pH of solid media increased from 4.5 to 5.5. Moreover, other ectomycorrhizic fungi, such as *Tricholoma focale*, diminished their in biomass with similar increments in pH. In our study, these trends were observed not in distinct species, but rather in *P. tinctorius* strains from different sites of origin.

Greater growth in diameters ($p \leq 0.05$) were observed in the strains from Oaxaca and Tabasco than in those from Nayarit (PTOAX03=47.70±3.68 mm and PTTAB03=45.50±5.91 mm *vs* PTNAY03=30.68±3.18 mm). The strains from Oaxaca and Tabasco produced greater increases ($p \leq 0.05$) in biomass compared with the strain from Nayarit (PTTAB03=51.29±11.31 mg and PTOAX03=64.99±12.11 mg *vs* PTNAY03=23.71±5.04 mg).

Culture in liquid medium

In liquid MNM medium under constant agitation and at pH 4.7 and 5.7 at 28 °C, the strains from the

Los mayores crecimientos en diámetro ($p \leq 0.05$) se observaron en las cepas de Oaxaca y Tabasco en comparación con la de Nayarit (PTOAX03=47.70±3.68 mm y PTTAB03=45.50±5.91 mm *versus* PTNAY03=30.68±3.18 mm). Las cepas de Oaxaca y Tabasco produjeron mayores incrementos ($p \leq 0.05$) en biomasa en comparación con la cepa de Nayarit (PTTAB03=51.29±11.31 mg y PTOAX03=64.99±12.11 mg *versus* PTNAY03=23.71±5.04 mg).

Cultivo en medio líquido

En el medio MNM líquido en agitación constante, a pH 4.7 y 5.7 a 28 °C, las cepas de las tres localidades mostraron la morfología micelial típica *P. tinctorius*. Se observó abundante micelio café oscuro (principalmente en la cepa de Oaxaca), a café amarillo dorado (principalmente en las cepas de Tabasco y Nayarit), con apariencia aterciopelada, abundantes hifas enmarañadas en forma de pelotones o esférulas concéntricas creciendo en todas direcciones (Figura 1d). Una morfología similar fue descrita por Marx *et al.* (1984). Al igual que en los medios sólidos, en el medio líquido las cepas produjeron siempre un pigmento café amarillento, el cual se difundió en el medio originando un cambio de su color original; este cambio de coloración fue más evidente en la cepa de Oaxaca (Figura 1d).

La cepa de Tabasco produjo mayor crecimiento en biomasa a pH 4.7 que a 5.7. Una tendencia contraria se observó en la cepa de Oaxaca, y el mayor incremento en biomasa se registró en la cepa PTOAX03 a pH 5.7 (Cuadro 2). En cultivos en medio líquido, algunas cepas de *P. tinctorius* tienen crecimiento óptimo a pH 5 (Hung y Trappe, 1983), mientras que otras cepas de los géneros ectomicorrízicos *Laccaria* y *Hebeloma* tienen mayores crecimientos a pH 6 (Yamanaka, 2003). El método de cultivo en líquido, en agitación constante, se utiliza frecuentemente en la propagación micelial de hongos ectomicorrízicos. Por ejemplo, *Laccaria laccata* puede producir hasta 1.7 g biomasa d⁻¹ cuando se adiciona 20 g L⁻¹ de glucosa al medio MNM (Kuek, 1996). Las tasas de crecimiento en el presente trabajo son relativamente modestas comparadas con las producidas en bioreactores con inyección artificial de aire, las cuales pueden alcanzar hasta 454 mg d⁻¹ en algunas cepas de *Pisolithus microcarpus* (Rossi *et al.*, 2002).

Después de 30 d de crecimiento micelial a pH 5.7, disminuyó el pH original del medio en 2.5 unidades en la cepa de Nayarit, y hasta 3.0 unidades en la de Oaxaca. Esta acidificación estuvo relacionada con un cambio paulatino de coloración del medio de cultivo,

three sites exhibited mycelial morphology typical of *P. tinctorius*. Abundant dark brown mycelium (principally in the strain from Oaxaca) to golden yellowish brown (principally in the strains from Tabasco and Nayarit) with velvety appearance, abundant hyphae tangled into balls or concentric spherules growing in all directions (Figure 1d). A similar morphology was described by Marx *et al.* (1984). Like in the solid media, in liquid medium the strains consistently produced a yellowish brown pigment, which diffused in the medium causing a change from its original color. This change in coloring was more evident in the strain from Oaxaca (Figure 1d).

The strain from Tabasco had greater growth in biomass at pH 4.7 than at 5.7. A contrasting trend was observed in the strain from Oaxaca, and the greatest increase in biomass was recorded for the strain PTOAX03 at pH 5.7 (Table 2). In liquid medium cultures, some strains of *P. tinctorius* grow optimally at pH 5 (Hung and Hrappe, 1983), while other strains of the ectomycorrhizic genera *Laccaria* and *Hebeloma* grow more at pH 6 (Yamanaka, 2003). The method of culture in liquid medium under constant agitation is often used in the mycelial propagation of ectomycorrhizic fungi. For example, *Laccaria laccata* can produce up to 1.7 g biomass d⁻¹ when 20 g L⁻¹ glucose is added to MNM medium (Kuek, 1996). The growth rates in our study are relatively modest compared with those produced in bioreactors with artificial injection of air, which can reach up to 454 mg d⁻¹ in some strains of *Pisolithus microcarpus* (Rossi *et al.*, 2002).

After 30 d of mycelial growth at pH 5.7, original pH of the medium of the Nayarit strain decreased by 2.5 units, and in that of Oaxaca it decreased up to 3.0. This acidification was related to the gradual change in color of the culture medium, from crystalline to dark yellowish brown; this was more evident in the strain from Oaxaca, as was confirmed by an analysis of absorbance. For the three strains, pH 5.7 caused darker coloring than pH 4.7. For example, the readings at a 240 nm wavelength were 26.5 and 15.2, 19.9 and 9.3, 11.0 and 6.1 units of optical absorbance for the pH 4.7 and pH 5.7 solutions, respectively, where the strains PTOAX03, PTTAB03 and PTNAY03 grew. Decreases in pH of solid and liquid media have been reported in association with *P. tinctorius* culture (Hung and Trappe, 1983; Vázquez-García *et al.*, 2002). This decrease has been recorded in the culture of *Laccaria laccata* (Kuek, 1996), *Cenococcum geophilum*, *Suillus bovinus*, *Rhizopogon roseolus* (Giltrap and Lewis, 1981), *Lactarius deliciosus* and *Tricholoma striatum* (Sánchez *et al.*, 2001). In the culture of the last four species mentioned, drastic decreases in the original

Cuadro 2. Incremento en biomasa (mg) de tres cepas de *Pisolithus tinctorius* procedentes de plantaciones forestales, en medio de cultivo Melin Norkrans modificado líquido en agitación constante a 28 °C, después de 30 días.**Table 2. Increase in biomass (mg) of three strains of *Pisolithus tinctorius* collected from forest plantations, in modified Melin Norkrans liquid culture medium under constant agitation at 28 °C after 30 days.**

Tratamientos	Cepas		
	[†] PTTAB03	PTOAX03	PTNAY03
pH 4.7	382.10 ± 78.299 a	279.250 ± 59.443 b	364.675 ± 146.547 a
pH 5.7	165.375 ± 3.711 b	503.400 ± 63.998 a	191.200 ± 67.535 a

[†] La procedencia de las cepas es la misma del Cuadro 1. Medias con diferente letra en una columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05).

de cristalino a café oscuro amarillento, el cual fue más evidente en la cepa de Oaxaca, como se constató al realizar un análisis de absorbancia. Para las tres cepas el pH 5.7 originó coloraciones más oscuras que el pH 4.7. Por ejemplo, las lecturas a una longitud de onda de 240 nm fueron 26.5 y 15.2, 19.9 y 9.3, 11.0 y 6.1 unidades de absorbancia óptica para las soluciones donde crecieron las cepas PTOAX03, PTTAB03 y PTNAY03 a pH 5.7 y 4.7, respectivamente. La disminución del pH se ha reportado en medios sólidos o líquidos, asociada con el cultivo de *P. tinctorius* (Hung y Trappe, 1983; Vázquez-García *et al.*, 2002). Dicha disminución se ha registrado en el cultivo de *Laccaria laccata* (Kuek, 1996), *Cenococcum geophilum*, *Suillus bovinus*, *Rhizopogon roseolus* (Giltrap y Lewis, 1981), *Lactarius deliciosus* y *Tricholoma striatum* (Sánchez *et al.*, 2001). En las últimas cuatro especies mencionadas, se han observado drásticas disminuciones en el pH original del medio, de 5.5 a 2.5. Esta reducción en el pH se ha atribuido a la toma excesiva de cationes, como amonio (Giltrap y Lewis, 1981), o a la liberación de ácidos orgánicos por el micelio ectomicorrízico (Tsantrizos *et al.*, 1991). En *P. tinctorius* se han identificado al menos dos compuestos: el ácido *p*-hidroxibenzoilfórmico y el ácido (*R*)-(-)-*p*-hidroxymandélico denominados pisolitina A y pisolitina B. Se ha hipotetizado que las propiedades antibióticas de dichos compuestos pueden estar vinculadas con el control de patógenos que *P. tinctorius* podría tener en condiciones naturales (Tsantrizos *et al.*, 1991; Kope *et al.*, 1991).

Cultivo en vermiculita, turba y solución nutritiva

Después de 30 d de crecimiento, las tres cepas mostraron la morfología micelial típica *P. tinctorius* con micelio aterciopelado café oscuro a café amarillento dorado ó mostaza, abundantes hifas enmarañadas creciendo en todas direcciones a través de las partículas del sustrato y también adheridas a las paredes de los frascos (Figura 1e). Estas características de crecimiento son similares a las reportadas por Marx *et al.* (1984).

pH of the media have been observed, from 5.5 to 2.5. This reduction in pH has been attributed to the excessive uptake of cations such as ammonium (Giltrap and Lewis, 1981) or to the release of organic acids by the ectomycorrhizic mycelia (Tsantrizos *et al.*, 1991). In *P. tinctorius* at least two compounds have been identified: *p*-hydroxybenzoilformic acid and (*R*)-(-)-*p*-hydroxymandelic acid, denominated pisolitin A and pisolitin B. It has been hypothesized that the antibiotic properties of these compounds may be linked to the control of pathogens that *P. tinctorius* may have under natural conditions (Tzantrizos *et al.*, 1991; Kope *et al.*, 1991).

Culture in vermiculite, peat and nutrient solution

After 30 d of growth, the three strains exhibited the mycelial morphology typical of *P. tinctorius*, with velvety, dark brown to golden yellowish brown or mustard mycelia, abundant tangled hyphae growing in all directions through the particles of the substrate and also adhered to the walls of the jars (Figure 1e). These characteristics of growth are similar to those reported by Marx *et al.* (1984). Also, hyphae were observed growing around the particles of peat and between the particle lamina of the vermiculite. This suggests an advantage for ECM inoculation in the nursery because the mycelia growing in the laminar structures of the vermiculite particles maintain their structure intact and are protected from environmental stress and from microbial saprophytic competition, unlike mycelia cultivated in other substrates such as sand, perlite and cereal grains, which offer little or no protection against these factors at inoculation (Smith and Read, 1997). The mixture of peat and vermiculite with ectomycorrhizic fungi mycelia has been used to inoculate plants in nursery for commercial purposes (Marx *et al.*, 1984; Le Tacon *et al.*, 1985; Smith and Read, 1997).

At pH 4.7, the best mycelial growth occurred in the strain from Nayarit, compared with those strains from Tabasco and Oaxaca (Table 3). At pH 5.7

Asimismo, se observaron hifas creciendo alrededor de las partículas de turba y entre las láminas de las partículas de vermiculita, lo cual puede ser una ventaja para la inoculación ECM en vivero debido a que el micelio desarrollado en las estructuras laminares de las partículas de vermiculita mantiene su estructura íntegra y es protegido del estrés ambiental y de la competencia microbiana saprofítica, a diferencia del micelio cultivado en otros sustratos como arena, perlita y granos de cereales, el cual tiene poca o nula protección contra estos factores al momento de la inoculación (Smith y Read, 1997). La mezcla de turba y vermiculita con micelio de hongos ectomicorrízicos se ha utilizado para inocular plantas en vivero con fines comerciales en varios países (Marx *et al.*, 1984; Le Tacon *et al.*, 1985; Smith y Read, 1997).

A pH 4.7, los mejores crecimientos miceliales ocurrieron en la cepa de Nayarit, comparados con los de las cepas de Tabasco y Oaxaca (Cuadro 3). A pH 5.7 no hubo diferencias entre las tres cepas. El mejor crecimiento se observó en la cepa de Nayarit a pH 4.7.

Caracterización morfológica de las ectomicorizas

Las ectomicorizas producidas por *P. tinctorius* en raíces de *E. urophylla* fueron simples, de color café amarillento a amarillo brillante, de 1.0 a 2.6 mm de longitud y alrededor de 0.2 mm de diámetro, con terminaciones mayormente rectas a ligeramente torcidas. El manto fue fibroso, con abundantes hifas emergentes de color café amarillento a amarillo brillante y presencia de rizomorfos bien diferenciados del mismo color y hasta 0.02 mm de diámetro (Figura 1f). Las ectomicorizas presentaron desarrollo de una red de Hartig la cual penetró una a dos capas de células corticales, las cuales fueron globosas de 13.9-16.6×11.9-13.3 μm (Figura 1g). La profundidad del manto fue alrededor de 15.0 μm .

Las ectomicorizas producidas por *P. tinctorius* en las raíces *Pinus greggii* fueron dicotómicamente

there were no differences among the three strains. The best growth was observed in the strain from Nayarit at pH 4.7.

Morphological characterization of the ectomycorrhizae

The ectomycorrhizae produced by *P. tinctorius* in roots of *E. urophylla* were simple, yellowish brown to bright yellow, 1.0 to 2.6 mm long and around 0.2 mm in diameter, with mostly straight to slightly twisted ends. The mantle was fibrous with abundant emerging yellowish brown to bright yellow hyphae and well-differentiated rhizomorphs of the same color and up to 0.02 mm in diameter (Figure 1f). The ectomycorrhizae developed into a Hartig net which penetrated one to two layers of cortical cells, which were globose, 13.9-16.6×11.9-13.3 μm (Figure 1g). Depth of the mantle was around 15.0 μm .

The ectomycorrhizae produced by *P. tinctorius* on *Pinus greggii* roots were dicotomically ramified, rarely monopodial, with a fibrillose-rugose surface and a main axis 2.0 to 3.8 mm long and 0.4 to 0.8 mm diameter. The ectomycorrhizae were yellowish brown, bright yellow to opaque brown with age, with a surface with silvery tones in initial stages. The rhizomorphs were abundant, yellowish brown to dark brown (Figure 1h) and up to 0.5 mm in diameter, generally growing from the base of the ectomycorrhizae and infrequently connected directly to the mantle. The cells of the rhizomorphs were parallel, thin-walled, septate, fibulate, with frequent anastomoses. The mantle consisted of prosenchymatose tissue, with a depth of 20 to 30 μm (Figure 1i), constituted on its surface by individual hyphae, laxly intertwined, septate, 2 to 5 μm in diameter, non-fibulate. In the part next to the cortical cells, the mantle had densely agglutinated hyphae, septate, 2 to 8 μm in diameter, with thin walls. The cortical cells were subglobose 30 to 50×20 to 30 μm . The Hartig net was composed of

Cuadro 3. Porcentaje de llenado de envase, en relación al volumen total de mezcla, de tres cepas de *Pisolithus tinctorius* procedentes de plantaciones forestales, en vermiculita y turba adicionados con solución del medio de cultivo Melin Norkrans modificado líquido a 28 °C, después de 30 d.

Table 3. Percentage of container filled, relative to the total volume of mixture, in vermiculite and peat supplemented with modified Melin Norkrans liquid culture medium at 28 °C after 30 d of three strains of *Pisolithus tinctorius* collected from forest plantations.

Tratamientos	Cepas		
	[†] PTTAB03	PTOAX03	PTNAY03
pH 4.7	5.00 ± 5.00 b	42.50 ± 7.50 b	80.00 ± 9.35 a
pH 5.7	75.00 ± 13.69 a	65.00 ± 15.00 a	55.00 ± 12.25 a

[†] La procedencia de las cepas es la misma que la del Cuadro 1. Medias con diferente letra en una hilera son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$).

ramificadas, raramente monopodiales, con una superficie fibrilosa-rugosa y con un eje principal de 2.0 a 3.8 mm de longitud y de 0.4 a 0.8 mm de diámetro. Las ectomicorrizas fueron de color café amarillento, amarillento brillante a café opaco con la edad, con una superficie con tonos plateados en los estadios iniciales. Los rizomorfos fueron abundantes, de color café amarillento a café oscuro (Figura 1h) y hasta 0.5 mm de diámetro, generalmente crecieron de la base de las ectomicorrizas y en pocas ocasiones estuvieron conectados directamente al manto. Las células de los rizomorfos fueron paralelas, de pared delgada, septadas, fibuladas, con frecuentes anastomosis. El manto estuvo constituido por tejido prosenquimatoso, con una profundidad de 20 a 30 μm (Figura 1i), constituido en su superficie por hifas individuales laxamente entretejidas, septadas, de 2 a 5 μm de diámetro, no fibuladas. En la parte cercana a las células corticales, el manto tenía hifas densamente aglutinadas, septadas de 2 a 8 μm de diámetro, con paredes delgadas. Las células corticales fueron subglobosas de 30 a 50 $\times$ 20 a 30 μm . La red de Hartig estuvo compuesta por células globosas a ovales, de 3 a 5 μm de diámetro, las cuales penetraron de dos a tres capas de células corticales.

El color de las ectomicorrizas de *P. tinctorius* es considerado un carácter distintivo, así como su abundancia de rizomorfos, los cuales se han descrito en algunas especies de pino como *Pinus montezumae* (Santiago-Martínez *et al.*, 1993); sin embargo, en la literatura revisada no se encontró una caracterización en *P. greggii*.

CONCLUSIONES

El crecimiento óptimo de las cepas varió en función de los medios de cultivo, los sustratos y el pH. De acuerdo con el desarrollo micelial observado, se podrían emplear los medios PDA o MNM para el cultivo en medios sólidos de las tres cepas estudiadas. Si se efectuara una propagación masiva en cultivo líquido, se recomendaría la utilización de la cepa PTOAX03 a pH 5.7. En el caso de utilizar turba y vermiculita con solución MNM, en producción de inoculante micelial se recomendaría la cepa PTNAY03 a pH 4.7. En plantaciones forestales en México, existen cepas de *P. tinctorius* que se pueden utilizar en programas de inoculación ECM en vivero en la producción de brinzales de *Eucalyptus urophylla* y *Pinus* spp. Sin embargo, debido a que actualmente se considera más apropiada la inoculación de plantas con mezclas de especies de hongos ectomicorrízicos que la inoculación simple, se debe estudiar el cultivo de otras especies de hongos ectomicorrízicos que prosperan en áreas tropicales.

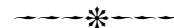
globose to oval cells, 3 to 5 μm in diameter, which penetrated two to three layers of cortical cells.

The color of the *P. tinctorius* ectomycorrhizae is considered a distinctive trait, as well as the abundance of rhizomorphs, which have been described in species of pine such as *Pinus montezumae* (Santiago-Martínez *et al.*, 1993); however, in the literature reviewed a characterization of *P. greggii* was not found.

CONCLUSIONS

Optimal growth of the strains varied in function of culture media, substrates and pH. According to the mycelial growth observed in this study, the media PDA or MNM can be used for culture of the three strains in solid media. If mass propagation is carried out in liquid medium, the use of the PTOAX03 at pH 5.6 is recommended. In the case that peat and vermiculite are used with MNM solution in the production of mycelial inoculant, the PTNAY03 strain is recommended at pH 4.7. In forest plantations in México, *P. tinctorius* strains exist that can be used in ECM inoculation programs in nursery production of *Eucalyptus urophylla* and *Pinus* spp. seedlings. However, because inoculation of plants with mixtures of ectomycorrhizic fungi is currently considered more appropriate than inoculation of a single species, it is necessary to study the culture of other ectomycorrhizic fungus species that prosper in tropical regions.

—End of the English version—



AGRADECIMIENTOS

A los M. C. Jorge Valdés-Carrasco, Gabriela Sánchez-Viveros y Alicia Carrera-Nieva, del Colegio de Postgraduados por su apoyo en la toma de microfotografías. También se agradece el apoyo financiero al proyecto FOSEMARNAT-CONACYT-2004-01-45 “Los hongos comestibles silvestres del Parque Nacional Iztá-Popo-Zoquiapan y Anexos”.

LITERATURA CITADA

- Anderson, I. C., S. M. Chambers, and J. W. G. Cairney. 1998. Molecular determination of genetic variation in *Pisolithus* isolates from a defined region in New South Wales, Australia. *New Phytologist* 138: 151-162.
- Cairney, J. W. G. 2002. *Pisolithus* – death of the pan- global super fungus. *New Phytologist* 153: 199-211.
- Cairney, J. W. G., and S. M. Chambers. 1997. Interactions between *Pisolithus tinctorius* and its hosts: a review of current knowledge. *Mycorrhiza* 7: 117-131.

- Cairney, J. W. G., S. M. Chambers, and I. C. Anderson. 1999. *Pisolithus* systematics –molecular methods provide fresh insights. *Mycologist* 13: 31-35.
- Castellano, M. A., and R. Molina. 1989. Mycorrhizae. In: The Container Tree Nursery Manual. Volume Five. Landis, T. D., R. W. Tinus, S. E. McDonald, and B. P. Barnett (eds). United States Department of Agriculture, Washington. pp: 101-167.
- Estrada-Torres, A., y G. Santiago-Martínez (eds). 2003. Avances en el Estudio de la Ectomicorriza en el Estado de Tlaxcala, México. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Ixtacuixtla, Tlaxcala, México. 76 p.
- Giltrap, N. J., and D. H. Lewis. 1981. Inhibition of growth of ectomycorrhizal fungi in culture by phosphate. *New Phytologist* 87: 669-675.
- Hung, L., and J. M. Trappe. 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. *Mycologia* 75: 234-241.
- Kuek, C. 1996. Shake-flask culture of *Laccaria laccata*, an ectomycorrhizal basidiomycete. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 45: 319-326.
- Kope, H. H., Y. S. Tsantrizos, J. A. Fortín, and K. K. Ogilvie. 1991. Para-hydroxybenzoylformic acid and (R)-(-)-Para-hydroxymandelic acid, 2 antifungal compounds isolated from the liquid culture of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus arhizus*. *Can. J. Microbiol.* 37: 258-264.
- Kumar, S., and T. Satyanarayana. 2002. Isolation of ectomycorrhizal fungi: Methods and techniques. In: Techniques in Mycorrhizal Studies. Mukerji, K. G., C. Manoharachary, and B. P. Chamola (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp: 133-142.
- Le Tacon, F., G. Joung, J. Mugnier, P. Michelot, and C. Mauperin. 1985. Efficiency in a forest nursery of an ectomycorrhizal fungus inoculum produced in a fermentor and entrapped in polymeric gels. *Can. J. Bot.* 63: 1664-1668.
- Lincoff, G. H. 1984. The Audubon Society Field Guide to North American Mushrooms. Visual key by Caron Nehring. Alfred A. Knopf, New York. 926 p.
- Marx, D. H., and D. S. Kenney. 1984. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. In: Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Schenck, N. C. (ed). 2nd. ed. The American Phytopathological Society. Minnesota, USA. pp: 131-146.
- Marx, D. H., C. E. Cordell, D. S. Kenney, J. G. Mexal, J. D. Artman, J. W. Riffle, and R. J. Molina. 1984. Commercial vegetative inoculum of *Pisolithus tinctorius* and inoculation techniques for development of ectomycorrhizae on bare-root tree seedlings. *Forest Sci.* 30 (Monograph 25): 1-101.
- Marx, D. H., J. L. Ruehle, and C. E. Cordell. 1994. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. In: Techniques for Mycorrhizal Research: Methods in Microbiology. Norris, J. R., D. Read, and A. K. Varma (eds). Academic Press, London. pp: 383-411.
- Natarajan, K., and V. Mohan. 2002. Identification of ectomycorrhizas. In: Techniques in Mycorrhizal Studies. Mukerji, K. G., C. Manoharachary, and B. P. Chamola (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. pp: 167-200.
- Pérez-Moreno, J., and D. J. Read. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia* 29: 239-247.
- Pilz, D., L. Norvell, E. Danell, and R. Molina. 2003. Ecology and management of commercially harvested Chanterelle mushrooms. Forest Service, Pacific Northwest Research Station. Portland, OR, USA. 83 p.
- Rossi, M. J., J. A. R. Souza, and V. L. Oliveira. 2002. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus macrocarpus* in airlift bioreactor. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 59: 175-181.
- Sánchez, F., M. Honrubia, and P. Torres. 2001. Effect of pH, water stress and temperature on *in vitro* cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. *Cryptogamie Mycologie* 22: 243-258.
- Santiago-Martínez, G., L. Varela, y A. Estrada-Torres. 1993. Síntesis *in vitro* de la micorriza de *Pisolithus tinctorius* y *Pinus montezumae*. *Rev. Mex. Micología* 9: 77-83.
- Santiago-Martínez, G., A. Estrada-Torres, L. Varela, y T. Herrera. 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de un cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia* 37: 575-584.
- SAS Institute. 1999. SAS User's Guide, ver. 8.0. SAS Institute Inc., Cary, NC. 595 p.
- Smith, S. E., and D. J. Read. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd. ed. Academic Press. London, England. 605 p.
- Tsantrizos, Y., H. H. Kope, J. A. Fortín, and K. K. Ogilvie. 1991. Antifungal antibiotics from *Pisolithus tinctorius*. *Phytochemistry* 30: 1113-1118.
- Vázquez-García, A., G. Santiago-Martínez, and A. Estrada-Torres. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizogénos. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 73: 1-15.
- Yamanaka, T. 2003. The effect of pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi *in vitro*. *Mycologia* 95: 589-589.