

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



**ESTUDIO DE ALGUNOS HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS
COMESTIBLES**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**PARA OBTENER EL TÍTULO
DE INGENIERO EN ALIMENTOS**

PRESENTA:

ANGELICA REMEDIOS OLIVARES REYES

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. BLANCA ROSA RODRÍGUEZ PASTRANA

Tulancingo de Bravo, Hidalgo, enero de 2008



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Tulancingo de Bravo, Hgo., 29 de noviembre de 2007

QUIM. ISAÍAS LOPEZ REYES,
SECRETARIO,
ICAp-UAEH,
P R E S E N T E.

Nos permitimos informar que después de haber revisado la versión final del trabajo de investigación titulado **“Estudio de algunos hongos ectomicorrizógenos comestibles”** presentada por la pasante de Ingeniería en Alimentos **Angelica Remedios Olivares Reyes**, consideramos que cumple con los elementos suficientes de contenido y forma para un trabajo de investigación de licenciatura, por lo que otorgamos nuestra aprobación para que ésta sea impresa y sea defendida en examen correspondiente.

ATENTAMENTE

Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana

Dr. Norberto Chavarria Hernández

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

M. en C. Sergio Soto Simental

Dr. Juan Francisco Hernández Chávez

AGRADECIMIENTOS

Le doy Gracias a Dios por estar conmigo en todo momento, por darme el entendimiento y la paciencia para concluir satisfactoriamente este trabajo.

A mis padres:

A ti mamá te doy las gracias por todo tu esfuerzo, esmero y dedicación, que siempre has tenido, con el único afán de que cada día sea una mejor persona y logre cada uno de mis sueños.

A ti papá:

Por ser un ejemplo de lucha, humildad y entrega, por ser mi mejor amigo y cómplice en cada uno de mis sueños. Gracias papi por todo tu apoyo y consejos.

A mis hermanos:

Jesús y Enrique por darle alegría y sentido a mi vida, por todo el cariño que siempre me han dado y los momentos que hemos compartido. Los quiero mucho.

A Sixto, por todo el apoyo, cariño y confianza que siempre me has dado, gracias amor

A mis amigas y hermanas: Iraís Adalís, Erika Guadalupe, Ana María y Nancy, por todos los momentos agradables que hemos pasado juntas, así como a Julián por su amistad y apoyo.

A la Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana, por su amistad y confianza, así como por todo el apoyo que me brinda en la elaboración de este trabajo de investigación, proporcionarme valiosos conocimientos, que se, me serán útiles en mi vida profesional.

A el Dr. Norberto Chavarria Hernández, la Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, el M. en C. Sergio Soto Simental, al Dr. Juan Francisco Hernández Chávez y a la Bióloga Marisela Cristina Zamora Martínez, por su apoyo en la revisión de este trabajo de investigación.

A la Dra. Pilar de la Garza López de Lara del INIFAP, por el apoyo técnico que aportó a esta investigación.

DEDICATORIA

A las dos personas que más quiero en la vida, mis padres quienes me dieron la oportunidad de venir al mundo y desde ese momento se han dedicado en cuerpo y alma a mí. Este trabajo es de ustedes en el se refleja mi esfuerzo y dedicación, que talvez sea poco en comparación de todo lo que ustedes me han dado. Los quiero mucho.

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección de la Dra. Blanca Rosa Rodríguez Pastrana. El trabajo forma parte de las actividades de los siguientes proyectos: “HACIA UNA INOCULACIÓN CONTROLADA DE HONGOS ECTOMICORRIZÓGENOS COMESTIBLES DE HIDALGO Y SU APLICACIÓN EN VIVEROS FORESTALES” Fundación Hidalgo Produce, proyecto 13-2005-1778, “DETECCIÓN MOLECULAR DE ALGUNOS HONGOS COMESTIBLES POR MEDIO DE LA SECUENCIA DEL ESPACIO INTERNO TRANSCRITO” Programa Anual de Investigación (PAI 2006) y “CONSOLIDACIÓN DEL CUERPO ACADÉMICO DE BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA” PIFI 3.3 2007.

ÍNDICE GENERAL

Página

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
TERMINOLOGÍA EMPLEADA.....	v
RESUMEN.....	vii

CAPÍTULO 1 REVISIÓN DE LITERATURA

1.0 REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Producción y comercialización de hongos comestibles	1
1.2 Cocina gourmet y valor nutritivo	4
1.3 ¿Qué son las micorrizas?.....	5
1.4 Hospederos de las asociaciones micorrízicas.....	6
1.5 Tipos de asociaciones micorrízicas.....	8
1.5.1 Ectomicorrizas.....	9
1.5.2 Micorrizas Vesículo-Arbusculares (VAM)	10
1.6 Lugar de crecimiento y periodo de fructificación	12
1.7 Principales beneficios de las micorrizas.....	12
1.8 Síntesis <i>in vitro</i> de micorrizas.....	14
19 Caracterización de la asociación micorrízica y el micobionte involucrado	18
1.9.1 Estudio macro-morfológico de la asociación hongo-planta	18
1.9.2 Análisis moleculares	21

CAPÍTULO 2 HIPÓTESIS

2.0 HIPÓTESIS	24
---------------------	----

CAPÍTULO 3 OBJETIVOS

3.0 OBJETIVOS	25
3.1 objetivo general.....	25
3.2 objetivos específicos	25

CAPÍTULO 4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1 Material biológico	26
4.1.1 Material fúngico	26
4.1.2 Material Vegetal	26
4.2 Síntesis <i>in vitro</i> de la micorriza.....	27
4.3 Extracción de ADN de hongos	28
4.4 Determinación de la concentración y grado de pureza del ADN	29
4.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	29
4.6 Amplificación del fragmento ITS.....	31
4.7 Parámetros de la PCR	32
4.8 Purificación del fragmento ITS amplificado.	33

CAPÍTULO 5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
5.1 Material biológico	35
5.2 Síntesis <i>in vitro</i>	36
5.3 Extracción de ADN: pureza y concentración	40
5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	41
5.5 Secuenciación nucleotídica del fragmento ITS	42

CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES	45
----------------------	----

CAPÍTULO 7 PERSPECTIVAS

7.0 PERSPECTIVAS.....	46
-----------------------	----

CAPÍTULO 8 BIBLIOGRAFÍA

8.0 BIBLIOGRAFÍA	47
------------------------	----

CAPÍTULO 9 ANEXOS

9.0 ANEXOS	54
------------------	----

ÍNDICE DE CUADROS

Página

Cuadro 1. Distribución de especies fúngicas en la República Mexicana.....	2
Cuadro 2. Precio de algunas especies de hongos comestibles.....	3
Cuadro 3. Composición química de algunos hongos comestibles.....	5
Cuadro 4. Géneros típicos de los hongos y su planta huésped.....	8
Cuadro 5. Clasificación de los diferentes tipos de asociaciones micorrízicas	11
Cuadro 6. Factores importantes en la síntesis <i>in vitro</i>	17
Cuadro 7. Ramificaciones que se presentan en sistemas radicales de árboles.	18
Cuadro 8. Terminaciones no ramificadas de raíces en especies arbóreas.	20
Cuadro 9. Distintas tallas de la región ITS en algunos hongos ectomicorrízicos.....	22
Cuadro 10. Componentes de la PCR.	32
Cuadro 11. Parámetros de amplificación en termociclador.	33
Cuadro 12. Concentraciones y grado de pureza del ADN	41
Cuadro 13. Concentraciones de los fragmentos ITS purificados.....	42
Cuadro 14. Resultado del BLAST del ITS con mayor correspondencia.	43
Cuadro 15. Ubicación y talla de las regiones ITS	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Presentación de una rueda alrededor de un hongo en Mesoamérica.	1
Figura 2. Muestra de un platillo preparado con diversos hongos.	4
Figura 3. Asociación hongo-planta	6
Figura 4. Bosque de encino-pino en el municipio de El Chico, Hgo.	7
Figura 5. Representación de las principales estructuras de una ectomicorriza.	9
Figura 6. Representación de una micorriza vesículo-arbuscular (VAM).	10
Figura 7. Representación de <i>Boletus granulatus</i> en su hábitat natural.	12
Figura 8. Beneficios de un pino no micorrizado frente a un pino micorrizado	13
Figura 9. Síntesis <i>in vitro</i> de raíces micorrizadas.	16
Figura 10. Diferentes mantos en terminaciones no ramificadas	20
Figura 11. Desinfección de semillas de <i>P. greggi</i> y <i>P. pseudostrobus</i>	27
Figura 12. Mezcla de turba-vermiculita.....	27
Figura 13. Inoculación de plántulas de <i>P. pseudostrobus</i> con <i>L. laccata</i>	28
Figura 14. Determinación de la concentración y pureza del ADN	29
Figura 15. Cámara de electrofóresis y fuente de poder.....	30
Figura 16. Sistema de documentación de geles.....	31
Figura 17. Termociclador de gradiente	32
Figura 18. Germinación de semillas de <i>Pinus greggii</i> y <i>P. pseudostrobus</i>	35
Figura 19. Crecimiento micelial de <i>L. laccata</i> en medio sólido y líquido.....	36
Figura 20. Desarrollo de una raíz de <i>Pinus pseudostrobus</i>	37
Figura 21. Sistema Radical de <i>Pinus pseudostrobus</i> con <i>L. laccata</i>	39
Figura 22. Perfil electroforético del fragmento ITS de varios aislados fúngicos.....	42

TERMINOLOGÍA EMPLEADA

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARNr	Acido Ribonucleico ribosomal
BAF	Biotina Aneurina y ácido fólico
Cc	Células corticales
Cv	Cilindro vascular
dNTPs	Deoxinucleótidos Trifosfato
dsDNA	ADN doble cadena
ECM	Ectomicorrizas
Ep	Epidermis
ETBr	Bromuro de etidio
Fig	Figura
INIFAP	Instituto Nacional de Investigación Forestal Agrícolas y Pecuarias
ITS	Espacio Interno Transcrito
kb	Kilo base
mg	Miligramos
min	Minutos
µL	Microlitros
mL	Mililitros
NA	No Aplica
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
nm	Nanómetros
nt	Nucleótido
Pa	Pascales
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa

Rep	Repetición
Rh	Red de hartig.
rpm	Revoluciones por minuto
TBE	Tris Ácido Bórico-EDTA
UV	Ultravioleta
VAM	Micorrizas Vesículo Arbusculares
Vis	Visible

RESUMEN

México es un país que cuenta con una biodiversidad fúngica de más de 100,000 especies de las cuales el 46% presentan una asociación a las raíces de las plantas. Actualmente en México se conocen 205 especies de hongos comestibles, siendo sólo 112, objeto de venta en los mercados populares de la región central del país.

Algunos hongos silvestres comestibles han registrado actualmente altos valores en el mercado, siendo los más cotizados *Amanita caesaria*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Tricholoma magnivelare*, *Lactarius deliciosus* y *Tuber melanosporum*, éstos son productos de temporal por lo que el precio es variable y han despertado el interés de algunas compañías comercializadoras quienes desean lograr el aprovechamiento intensivo de hongos comestibles para fines de exportación, sin embargo algunos de ellos están asociados a las raíces de las plantas, por lo que no han podido ser cultivados comercialmente por separado.

El descubrir por qué es tan difícil establecer una asociación hongo-raíz (micorrízica), para su cultivo comercial. se ha vuelto un tema de interés para varios científicos, quienes en su intento de aclarar este misterio han realizado ensayos de confrontación hongo-planta en condiciones controladas para la obtención *in vitro* de raíces micorrizadas, este sistema es el que más se ha estudiado y por tanto lo hemos adoptado para llevar a cabo el desarrollo de este trabajo de investigación, en el cual se estudiaron las siguientes especies de hongos micorrizógenos: *Lactarius deliciosus*, *Russula* sp., *Tricholoma magnivelare* y *Laccaria laccata*.

Tomando en cuenta que las asociaciones micorrízicas, donde el hongo que forma un manto de varias capas alrededor de la raíz sin penetrar las células (ectomicorriza), se establecen principalmente entre angiospermas y gimnospermas incluyendo notablemente grupos importantes de árboles como Pinaceae, Cupressaceae, Fagaceae, Betulaceae y Salicaceae, mientras que los hongos principalmente son Basidiomycetes y Ascomycetes, se ha realizado en este estudio, la confrontación de *Pinus* con *Laccaria laccata*, nativa del Estado de Hidalgo en un sistema de turba-vermiculita.

Después del primer mes de confrontación de *Laccaria laccata* y *Pinus*, fué posible observar pelos absorbentes en la raíz principal y raíces secundarias que desaparecieron en los 2 meses posteriores, con un aspecto hinchado, lo cual es típico en la formación de micorrizas, presentando un morfotipo clasificado como no ramificada con terminación recta, sin embargo, es necesario dar seguimiento a esta asociación ectomicorrizógena en un periodo mayor como lo indica la bibliografía consultada.

Al mismo tiempo, en esta investigación se realizó la identificación molecular del hongo silvestre comestible, *Tricholoma* sp., mediante la amplificación del fragmento interno transcrito (ITS) mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para lo cual se obtuvo suficiente concentración de ADN para la amplificación del fragmento, resultando una talla aproximadamente de 750 pb, el cual se purificó y secuenció. La secuencia completa del ITS 1 fue de 242 pb y el gen 5.8S de 152 pb, así como la secuencia parcial del fragmento del ITS 2 del ADN ribosomal fue de 98 pb, con un 98% de identidad con *Tricholoma matsutake*.

Estos resultados señalan que es posible identificar satisfactoriamente hongos ectomicorrizógenos nativos comestibles tales como *Tricholoma* sp, con la secuenciación del fragmento ITS a partir de carpóforos herborizados o en fresco, validando los protocolos de extracción de ADN y amplificación del ITS utilizadas en este trabajo.

CAPÍTULO 1

REVISIÓN DE LITERATURA

1.0 Revisión de literatura

1.1 Producción y comercialización de hongos comestibles

México es un país que cuenta con una gran diversidad alimentaria, en la cual destaca la diversidad de hongos silvestres comestibles. Éstos han sido recolectados desde tiempos prehispánicos, prueba de ello es la existencia de piezas arqueológicas encontradas en diversas regiones del territorio nacional las cuales han sido interpretadas como representaciones de hongos comestibles, por lo tanto su comercialización también es una práctica ancestral (Figura 1), (Zamora, 2001).



Figura 1. Presentación de una rueda alrededor de un hongo en Mesoamérica.

Actualmente se conocen 6,000 especies de hongos, de los cuales 2,000 son micromicetos y 4,000 macromicetos (Martin, 2007). Se estima que la biodiversidad fúngica mexicana es de más de 100,000 especies, y tan sólo se han estudiado alrededor del 6%. A la fecha se conocen 205 especies de hongos comestibles de las cuales 112 son objeto de venta en los mercados populares de México, particularmente en la región central del país. El total de especies comestibles presentes en México representa poco más del 10% de las 2,000 estimadas a nivel mundial, alrededor del 46% presentan una asociación con las raíces de las plantas, llamadas micorrizas, dichas especies se distribuyen en México a lo largo de un gradiente altitudinal que incluye los bosques de coníferas con 153 especies, encino con 88, mesófilo de montaña

con 35, bosques tropicales con 23 y zonas agrícolas y urbanas con 18. Las especies conocidas se encuentran distribuidas en 28 de los 31 Estados de la República Mexicana. En el Cuadro 1 se muestran los más representativos

Cuadro 1. Distribución representativa de especies fúngicas en la República Mexicana

Estados de la República Mexicana	No. de taxas estudiados
Estados de México	155
Veracruz	132
Hidalgo	126
Michoacán	118
Morelos	97
Tabasco	3
Baja California Sur	2
Colima	2
Nayarit	2
Sinaloa	1
Tamaulipas	1

Fuente: Villarreal, 1996

Actualmente diversas compañías comercializadoras extranjeras y nacionales han promovido el aprovechamiento intensivo con fines de exportación de algunos hongos comestibles como el “tecomate” (*Amanita caesarea*), las “pancitas” (*Boletus edulis*), el “duraznillo” (*Cantharellus cibarius*), y el “hongo blanco de ocote” (*Tricholoma magnivelare*), los cuales forman micorrizas (Villarreal, 1996). Estos hongos formadores de micorrizas pueden alcanzar los precios más elevados del mercado. Por ejemplo la cosecha y la exportación del *matsutake* en Corea del sur y China genera entre US \$20 y 80 millones al año a las poblaciones rurales. China solamente ha exportado de 500 a 600 toneladas de *Tricholoma matsutake* por año a Japón desde los años 90's. La información aproximada del mercado mundial de los principales hongos comestibles micorrizicos se encuentran en el Cuadro 2 (Yun y Hall, 2004). En México, la producción varía considerablemente, 24 toneladas en 1998, 14 en 1999 y 4 en el 2000, de acuerdo a los datos recolectados de varios autores (Boa, 2004).

Cuadro 2. Precio de algunas especies de hongos comestibles silvestres que forman micorrizas.

Nombre botánico	Nombre común	Venta al menudeo (USD)	Producción mundial (T)	Precio al mayoreo USD/kg
<i>Boletus edulis</i>	Porcini/pancitas/cepa de bordeaux	>250 millones	20,000 100,000	13 – 198
<i>Cantharellus cibarius</i>	Chanterelle/duraznillo	1.62 billones	200,000	8 – 19
<i>Tricholoma matsutake</i>	Matsutake/Hongo blanco o de ocote	500 millones	2,000	40 – 500
<i>Tuber melanosporum</i>	Trufa perigord negra	>150 millones	150	250 – 1200
<i>Tuber magnatum</i>	Trufa blanca italiana	>150 millones	50 – 200	1,000 – 13,000

Fuente: Hall y Yun, 2003

El precio de los hongos silvestres comestibles se ha incrementado debido a que en los últimos 100 años la recolecta de estos hongos ha disminuido drásticamente, por lo que han llevado a investigar su posible cultivo comercial.

Un ejemplo de ello son las cosechas europeas de *Tuber melanosporum* las cuales a causa de cambios en su medio ambiente originados por factores naturales o sociales, han disminuido de 2,000 toneladas, a partir de 1990, a 100 anualmente. Lo mismo ocurre en Japón donde la producción de *Tricholoma matsutake* es cerca del 5% de lo que se cosechaba en el año 1940 (Yun y Hall, 2004).

Algunas causas de la disminución en la recolecta de hongos silvestres comestibles incluye la tala de árboles, el calentamiento global, compactación del suelo, sustitución de bosques naturales por especies de huéspedes pobres, lluvias ácidas (Hall y Yun, 2003), así como los controles nulos de calidad que se tienen durante la recolecta y transporte del producto, la falta de organización entre los productores, la recolecta de carpóforos azarosa, lo que representa factores restrictivos a la estructuración de esquemas de acopio y exportación rentables (Yun y Hall, 2004).

1.2 Cocina gourmet y valor nutritivo

Los cuerpos fructíferos, debido a sus dimensiones, formas, colores y olores; no sólo son atractivos para los botánicos sino también para el buscador de hongos, quien los valora por sus sabores y olores. Por lo que son de considerable interés para la cocina gourmet, siendo apreciados por los gastrónomos del mundo entero, ya que los platillos elaborados a base de este tipo de hongos silvestres micorrízicos pueden alcanzar precios elevados en el mercado (Hall y Yun, 2003) (Figura 2).



Figura 2. Muestra de un platillo preparado con diversos hongos.

La mayoría de los autores coinciden al afirmar que, si bien los hongos no son el alimento ideal, constituyen una fuente alternativa de proteína para el hombre, y uno de los más completos que nos ofrece la naturaleza, es verdad que constituye una fuente nutritiva no despreciable además de contribuir a la salud con algunas propiedades medicinales como son algunas especies de *Ganoderma* (reíshi), *Lentinula edodes* y *Volvariella volvacea* (Calonge, 1990). Su valor nutritivo es similar a algunas hortalizas y otros alimentos (Cuadro 3), (Vedder, 1996).

Cuadro 3. Composición química de algunos hongos comestibles frente a otros productos agrarios, en porcentaje sobre peso fresco.

Alimento	Agua	Proteínas	Carbohidratos	Materias Grasas	Minerales
Champiñón	90	3.5	4.0	0.3	3.5
Boletus	88	5.4	5.2	0.4	5.4
Cantharellus	91	2.6	3.5	0.8	2.6
Espinacas	93	2.2	1.0	0.3	2.2
Espárrago	95	1.8	2.7	0.1	1.8
Papas	75	2.0	21.0	0.1	2.0
Leche	87	3.5	4.8	3.7	3.5

Fuente: Calonge,1990.

No existe un criterio para establecer si el cuerpo fructífero de un hongo es comestible, por lo que no son útiles el diente de ajo, ni la cuchara de plata, ni las hojas de perejil (Calonge, 1990). Para identificar un hongo es necesario someterlo a exámenes morfoanatómicos, organolépticos, químicos y moleculares. Finalmente, se debe tener en cuenta el habitat y la época de crecimiento, una vez identificado el hongo podrá juzgarse si es o no comestible (Leoni y Ferreri, 1998; Martin y Rygiewicz, 2005).

1.3 ¿Qué son las micorrizas?

La palabra micorriza se refiere a la raíz de una planta o fitobionte más un hongo simbionte asociado que se le puede llamar micobionte, y se considera en conjunto como un órgano funcionalmente distinto cuya función es la absorción de nutrientes del suelo (Figura 3). Los miembros en esta asociación son del reino fungi (Basidiomicetes, Ascomicetes, Quitridiomicetes y Zygomycetes) y la mayoría de las plantas vasculares (Castellano y Molina, 1989; Bruns *et al.*, 1999; Horton y Bruns, 2001).

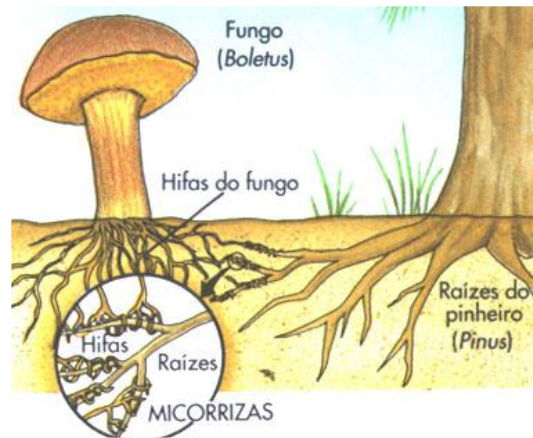


Figura 3. Asociación hongo-planta.

El término simbiosis y mutualismo ha sido usado indistintamente, pero de acuerdo a la perspectiva de los micólogos, las interacciones entre hongos y plantas tienen más categorías que el simple beneficio del hongo o planta. La simbiosis fúngica ha sido definida como “toda asociación donde el hongo está en contacto con el huésped vivo, del cual obtiene metabolitos o nutrientes” y el término mutualismo implica beneficios mutuos donde se involucran dos o más organismos diferentes vivos. El uso del término específico “asociación micorrízica” evita problemas de inconsistencia entre mutualismo y simbiosis (Brundrett, 2004).

1.4 Hospederos de las asociaciones micorrízicas

Por lo menos, el 90% de las plantas terrestres del planeta forman algún tipo de micorriza distinguiéndose en dos tipos básicos las ectomicorrizas y las endomicorrizas de acuerdo con la presencia del micelio del hongo afuera o adentro de las células corticales de la raíz (Santiago-Martínez y Estrada, 1999; Tedersoo *et al.*, 2006).

Las micorrizas se asocian a un importante grupo de especies forestales de la familia *Pinaceae* y otras plantas latifoliadas como las *Fagaceae* y *Betulaceae* (El Karkouri *et al.*, 2005a), así como todas las variedades de pinabetes, abetos verdaderos, y determinadas especies de nogal, encino, álamo y sauce. El Estado de Hidalgo tiene un 21.9% de terrenos forestales, como son los bosques templados con 67,330 Ha de coníferas, 72,599 Ha de coníferas y latifoliadas y 90,814 Ha de latifoliadas (SEMARNAT, 2007) siendo clara la vocación forestal del Estado (Figura 4).

Las micorrizas vesiculares-arbusculares (VAM) son comunes en latifoliadas particularmente en los géneros *Acer*, *Thuja*, *Liquidambar* y *Sequoia* (Castellano y Molina, 1989), son importantes para el olmo, el fresno y el nogal negro.



Figura 4. Bosque de encino-pino en el municipio de El Chico, Hgo.

Los principales géneros de hongos formadores de micorrizas y sus plantas huésped se mencionan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Géneros típicos del hongo formador de micorrizas y su planta huésped de zonas templadas y boreales involucradas en asociaciones ectomicorrízicas.

Hongos formadores de micorrizas	Planta huésped
Basidiomycetes	<i>Abies, Alnus, Betula, Corylus,</i>
<i>Alpova, Amanita, Astraeus, Boletus, Cantharellus,</i>	<i>Eucalyptus, Fagus, Larix, Picea, Pinus,</i>
<i>Cortinarius, Entoloma, Gastroboletus, Gamteria,</i>	<i>Populus, Pseudotsuga, Quercus, Salix, Tsuga.</i>
<i>Gomphidius, Hebeloma, Hygrophorus,</i>	
<i>Hymenogaster, Hysterangium, Hymenogaster,</i>	
<i>Hysterangium, Inocybe, Laccaria, Lactarius,</i>	
<i>Leccinum, Martellia, Paxillus, Pisolithus,</i>	
<i>Rhizopogon, Rozires, Russula, Tricholoma,</i>	
<i>Xerocomus.</i>	
Ascomycetes	
<i>Balsamia, Elaphomyces, Genea, Geopora, Helvella,</i>	<i>Abies, Betula, Corylus, Eucalyptus, Fagus,</i>
<i>Hydnortia, Sphaerosporella, Tuber.</i>	<i>Larix, Pinus, Populus, Pseudotsuga, Quercus,</i>
	<i>Salix, Tsuga.</i>
Zigomycetes	
<i>Endogone.</i>	<i>Eucalyptus, Pinus, Pseudotsuga.</i>
Deuteromicotina	
<i>Cenococcum.</i>	<i>Abies, Larix, Pinus, Polygonum, pseudotsuga.</i>

Fuente: Harley y Smith, 1983; Castellano y Molina, 1989

1.5 Tipos de asociaciones micorrízicas

A pesar de que las micorrizas se clasifican por sus características morfológicas usando criterios diseñados por los seres humanos, estas categorías pueden clasificarse en forma simple en ecto y endomicorrizas. Actualmente se reconocen 7 tipos de micorrizas dependiendo de la relación física del hongo con la raíz basándose en las estructuras típicas de la micorrización y en los organismos asociados que las forman: micorriza arbutoide, ericales, monotropoide, orquideoide, ectomicorriza (ECM), ectendomicorrizas y las vesículo-arbusculares (VAM) (Santiago-Martínez y Estrada, 1999; Brundrett, 2004).

1.5.1 Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas pueden ser fácilmente reconocidas por las característica cubierta fúngica o manto que envuelve a las raíces activas, a menudo el micelio fúngico en forma de fibra, puede ser visto emergido directamente del manto y colonizando el suelo o el sustrato de enraizamiento, la segunda característica principal de la ectomicorriza es la formación de la red de Hartig. En el interior de esta extensiva zona de contacto entre el hongo y el hospedante, el hongo trae y libera los nutrientes y el agua hacia su hospedante, recibiendo a cambio azúcares y otros productos de la fotosíntesis generados por la planta (Figura 5), (Castellano y Molina, 1989; Bruns *et al.*, 2002).

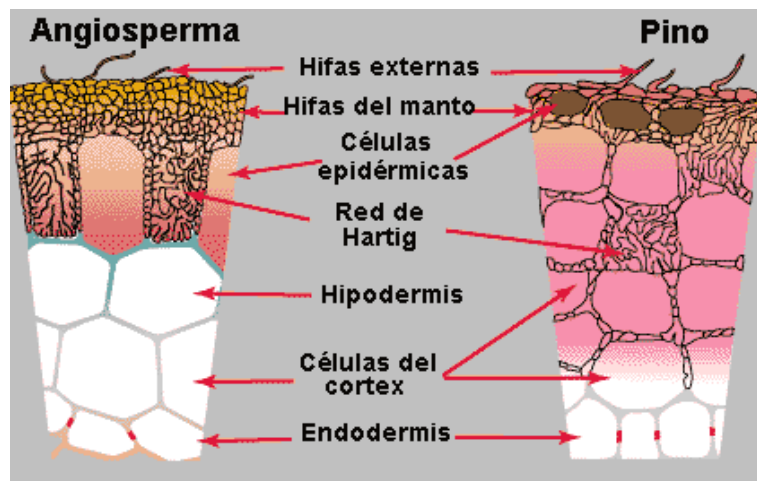


Figura 5. Representación de las principales estructuras de una ectomicorriza.

Los hongos que forman las ectomicorrizas son principalmente los Basidiomicetes incluyendo muchos de los hongos macromicetos forestales y los Sclerodermatales, así como el hongo hipogeo que fructifica bajo tierra, conocido como trufa. Géneros de hongos bien conocidos que forman ectomicorrizas son *Amanita*, *Boletus*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Scleroderma*, *Suillus*, *Tricholoma*, *Cenococcum* y *Tuber*, mientras que sus plantas huésped son todas las gimnospermas y angiospermas (Castellano y Molina, 1989; Selosse *et al.*, 2006).

1.5.2 Micorrizas Vesículo-Arbusculares (VAM)

Este tipo de asociaciones presenta vesículas, estructuras en forma de un balón, usualmente compuesto de lípidos que almacenan energía. Así mismo tiene otra estructura, los arbuscúlos, que se encuentran finamente ramificadas, son intracelulares de vida corta debido a que se desintegran en el suelo cuando muere la raíz, estos arbuscúlos sirven para el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta huésped (Figura 6), (Castellano y Molina, 1989; Selosse *et al.*, 2006).

La micorrizas VAM forman esporas relativamente grandes de 30 a 900 μm de diámetro, solitarias o en grupos sobre el suelo, debido a su tamaño y ubicación, estas esporas no pueden ser diseminadas por el viento como la mayoría de las pequeñas esporas de los hongos ectomicorrizógenos, por ello su desplazamiento es principalmente mediante procesos de movimiento del suelo; pequeños insectos y animales que también pueden comérselas y diseminar las esporas a través de sus heces (Castellano y Molina, 1989).

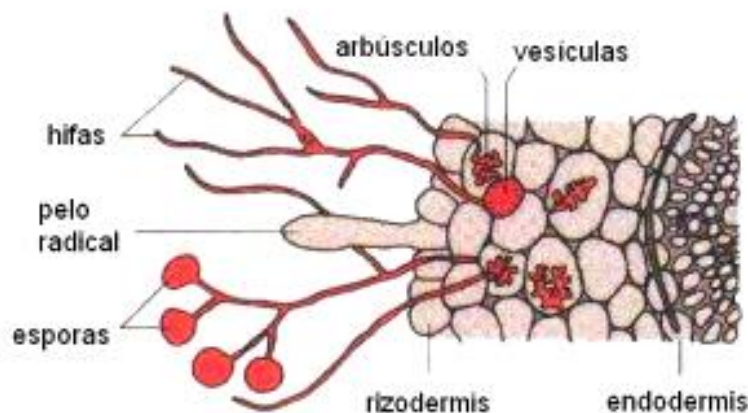


Figura 6. Representación de las estructuras de una micorriza vesículo-arbuscular (VAM).

En el siguiente cuadro se presenta un resumen de las diferencias entre las estructuras anatómicas de las siete asociaciones micorrízicas.

Cuadro 5. Clasificación de los diferentes tipos de asociaciones micorrízicas de acuerdo a sus estructuras.

Tipo Estructura	VAM	ECM	Ectendomicorizas	Arbutoide	Mono tropoide	Ericales	Orquideoide
Hifas Septadas	- (+)	+ -	+ -	+	+	+	+
Hifas en el interior de las Células radicales	+	-	+	+	+	+	+
Ovillos	+ -	-	-	-	-	+	+
Arbúsculos	+	-	-	-	-	-	-
Manto fúngico	-	+ (-)	+ (-)	+	+	-	-
Red Hartig	-	+	+	+	+	-	-
Vesículas	+ -	-	-	-	-	-	-
Hongos	Zygo-Glomales	La mayoría de basidiomycetes, algunos Ascomycetes y Zigomycetes				Ascomycetes	Basidiomycetes

Fuente: Harley y Smith, 1983

VAM: Micorizas Vesículo-Arbusculares

ECM: Ectomicorizas

1.6 Lugar de crecimiento y periodo de fructificación

El lugar de crecimiento influye en varios factores como: altitud, tipo de suelo, vegetación, planta huésped y/o planta simbiote. Todos estos factores contribuyen la determinación del carpóforo (Figura 7). Hay especies que crecen en todos los sitios (*Armillaria mellea*, *Lepista nuda*, *Russula cyanoxantha*), otras se encuentran en los bosques de planifolios (*Amanita caesarea*, *Russula aurea*, *Krombholziella*, *Boletus rufus*, *Boletus scaber*). Algunas especies se dan en los bosques de coníferas (*Russula mustelina*, *Gomphidius* y *Chroogomphus*), en cambio algunas se unen preferiblemente a un árbol (*Lactarius deliciosus*, *Suillus*, *Tricholoma magnivelare*, *Laccaria*), (Leoni y Ferreri, 1998).



Figura 7. Representación de *Boletus granulatus* en su hábitat natural.

Normalmente se considera el otoño como la estación más apropiada para la fructificación de los hongos, dando lugar a una explosión de carpóforos en los bosques y prados. Existen otras especies que lo hacen durante la primavera y otras en menor número, durante el verano e invierno. Esta norma no es constante, ya que puede fructificar cualquier especie en cualquier época del año. Además de esto, hay especies que fructifican todos los años mientras que otras lo hacen con cierta intermitencia, por lo que sólo pueden ser observados sus carpóforos cada dos o tres años, dependiendo de su ciclo biológico (Calonge, 1990).

1.7 Principales beneficios de las micorrizas

Las micorrizas benefician la nutrición, el crecimiento y la supervivencia de las plantas de muchas formas. El beneficio más conocido es el incremento en la absorción del agua y de los nutrientes minerales especialmente el fósforo y nitrógeno. Estos beneficios son

debidos en parte a la exportación de las hifas, que exploran grandes volúmenes de suelo con sus micelios externos, y en consecuencia proporcionan agua y nutrientes más allá de los límites de los pelos absorbentes de las raíces (Castellano y Molina, 1989; Buscot *et al*, 2000).

El manto que se forma alrededor de las raíces proporciona mayor superficie de absorción de los compuestos minerales que la de la raíz sola, lo que favorece el crecimiento de la planta en suelos de baja fertilidad y pueden resistir mejor las enfermedades. La producción de hormonas por los hongos es importante para la interacción simbiótica ya que las auxinas, citoquininas, giberelinas y etileno que producen, inhiben la formación de pelos radicales, estimulan la ramificación de la raíz y la reestructuración morfológica de las células exteriores del córtex de la raíz; también inducen a las raíces para tener una mayor actividad fisiológica que las raíces no micorrizadas (Figura 8), (Wild, 1990).

Los hongos micorrizógenos pueden proteger a las raíces contra patógenos de varias formas, el manto del hongo de las ectomicorrizas proporcionan una barrera directa contra la penetración de aquéllos, más aún, muchos hongos de este tipo producen antibióticos antagónicos a algunos patógenos de la raíz (Castellano y Molina, 1989). Los hongos pueden proteger a la planta contra patógenos mediante los siguientes mecanismos:

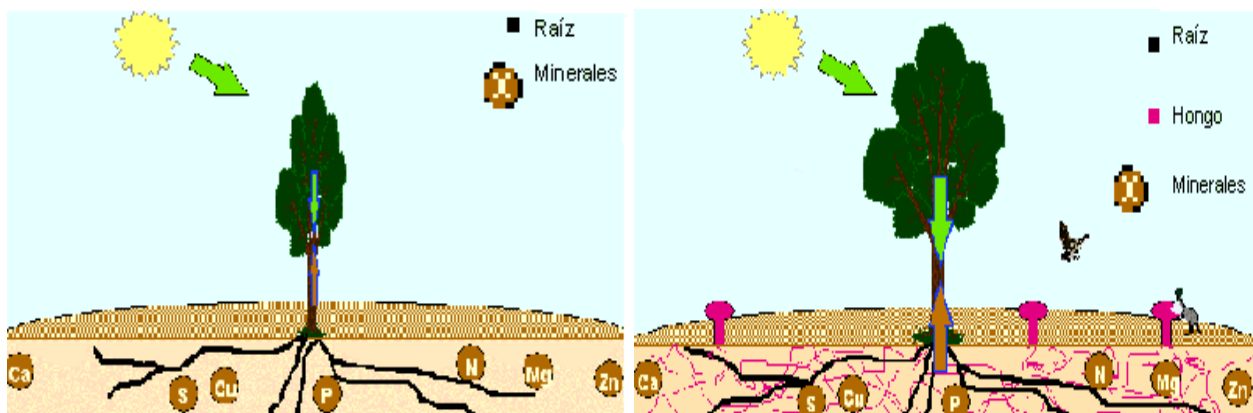


Figura 8. Beneficios de un pino no micorrizado frente a un pino micorrizado.

- La excreción de sustancias anti-fúngicas y antibióticas
- La estimulación de otros microorganismos que inhiben el crecimiento de los patógenos
- La producción de antibióticos por el hospedero, bajo el control de los simbioses
- La reducción de fuentes de carbono y fuentes de energía sobre la superficie de la raíz para que las esporas de los patógenos no puedan germinar
- La protección estructural de la raíz por el manto.

La posibilidad de producir especies micorrizógenas presenta un elevado interés ecológico, ya que todas las actividades derivadas de la gestión forestal producen alteraciones en el suelo y en la masa arbórea que pueden repercutir en su supervivencia y fructificación, igualmente tienen un interés económico en el momento en que la demanda de planta micorrizada con especies de interés comercial es alta, se hace imprescindible la caracterización de los principales tipos de micorrizas para un control de calidad de esta planta y revalorizar ciertas áreas marginales actualmente abandonadas (Royo *et al.*, 1998).

1.8 Síntesis *in vitro* de micorrizas

Las constantes disminuciones en la producción de hongos silvestres y su alto valor de mercado han llevado a realizar investigaciones recientes sobre su cultivo. Diferentes especies de trufas ya han sido obtenidas a través de distintos sistemas de cultivo, mediante plantación de planta micorrizada o inoculación directa en campo, de los que prácticamente se ha tenido poco o ningún éxito, algunas plantaciones artificiales han sido inoculadas esporalmente o miceliariamente, no obstante no todo está resuelto, la producción de algunas especies como *Pinus* son muy bajas o la fructificación puede ser azarosa y los conocimientos para el manejo de las plantaciones son ínfimos. A pesar de algunos éxitos, existen muchos otros hongos micorrízicos comestibles que no se han podido cultivar, incluyendo algunos hongos muy cotizados como la trufa blanca o *Tricholoma matsutake*, llevándonos a varias preguntas como ¿Por qué es tan complejo establecer la micorrización con especies vegetales adecuadas? ¿Por qué algunas

inoculaciones que parecen estables, fallan o son desplazadas por otros hongos en el campo sin llegar a fructificar? (Morcillo y Sánchez, 2007).

La síntesis *in vitro* es la confrontación de la planta con los micelios de hongos crecidos en el laboratorio. Con la posibilidad de producir especies micorrízicas de interés económico, ecológico y forestal, se hace imprescindible la caracterización de los principales tipos de micorrizas como base para un control de calidad de plantas, que permita realizar su descripción anatómica, morfológica y molecular. El cultivo *in vitro* permite el control riguroso de los factores que intervienen en el desarrollo y crecimiento de las plantas, sin embargo cada organismo es variable en diferentes medios de cultivo por lo que es importante estudiar su comportamiento en diferentes sistemas de síntesis de micorrizas en estado puro.

Melin en 1922 fue el primer investigador en diseñar dispositivos para la obtención *in vitro* de micorrizas, los cuales consistían de frascos que contenían arena como sustrato mantenidos bajo condiciones estériles, en los cuales se tenía que mantener la humedad del sistema. Posteriormente, se utilizó una mica expandida llamada vermiculita la cual tiene mayor capacidad de retención de agua y mejora la aeración de las raíces. A partir de esto, numerosas técnicas y variaciones de la síntesis *in vitro* se han probado; no obstante, algunas de ellas requieren de procesos de manipulación muy elaborados y tienen que llevarse a cabo bajo condiciones exigentes de cultivo, en la actualidad los métodos asépticos más convenientes incluyen el uso de tubos de ensaye grandes, matraces desde 500 hasta 2000 ml, cajas petri, frascos, etc (Figura 9) (Santiago-Martínez, 1992).



Figura 9. Diferentes sistemas empleados para la obtención *in vitro* de raíces micorrizadas.

Para lograr la síntesis es necesario tener en cuenta el periodo de independencia micorrízica en el cual la planta puede vivir y crecer sin necesidad de asociarse simbióticamente. Este intervalo de tiempo varía según la especie, pues existen especies como *Quercus coccoifera* que son capaces de seguir utilizando los nutrimentos de la semilla hasta finales del segundo año de vida. Este carácter es muy importante en las pruebas de síntesis *in vitro* de las micorrizas, ya que si este periodo es muy prolongado el hongo puede morir si es inoculado antes de que la planta sea receptiva a su colonización. En condiciones naturales, antes de que se establezca la asociación, el hongo tiene que sobrevivir a las características físicas y constitución química del suelo, donde influyen factores como el movimiento del agua, oxígeno, dióxido de carbono y varios productos metabólicos (Santiago-Martínez, 1992).

Mediante la micorrización artificial, varios autores señalan un tiempo variable de formación de micorriza, así como la utilización de diferentes sistemas para la obtención de una asociación entre hongo-planta exitosa, cabe mencionar que las plantas huésped y los hongos simbioses que se muestran en el siguiente cuadro la mayoría no son especies muy comunes en México.

Cuadro 6. Variaciones entre el tiempo, sistemas de síntesis *in vitro* de micorrízicas, y el tipo de inóculo.

Huésped	Hongo	Tiempo de formación de micorriza	Sistema de síntesis				Autor y año
			Cerrado	Abierto	Sustrato	Inóculo	
<i>C. argyrophylla</i>	<i>Cenococcum geophilum</i>	6-7 semanas	Cajas petri de 100 mL		Medio RM	Sólido	Vaario <i>et al.</i> , 2006
<i>Pinus densiflora</i>	<i>Tricholoma matsutake</i>	6 meses	Botellas de 1L		V-T (80:1) Medio MMN+G	Sólido	Yamada <i>et al.</i> , 2005
<i>P. densiflora</i> (maduro)	<i>T. matsutake</i>	5-10 semanas		In situ	V-C (55:1)	Sólido	Guerin-Laguette <i>et al.</i> , 2005
<i>P. densiflora</i>	<i>T. matsutake</i>	2.5 meses	Cajas de plástico de 920mL		V-C-S	Suspensión	Guerin-Laguette <i>et al.</i> , 2004
<i>P. pinaster</i> <i>P. sylvestris</i>	<i>Lactarius sp</i>	3 meses	Tubos de vidrio		V-T Medio BAF+G	Suspensión	Parladé <i>et al.</i> , 2004
<i>Pinus montesumae</i>	<i>Laccaria bicolor</i>	3-15 meses	Botella de vidrio 1L		V-T-S (10:1) BAF+G	Sólido	Santiago-Martínez <i>et al.</i> , 2003
<i>P. silvestris</i> L (embrión)	<i>Pisolithus tinctorius</i>	4-5 meses	Cajas petri		Medio DCR	Sólido	Niemi y Häggman, 2002
<i>P. densiflora</i>	Varios: <i>Tricholoma matsutake</i> , <i>Lyphillum</i> , <i>Suillus</i> , <i>Rhizopogon</i> y <i>Lactarius</i>	4-9 meses		Botellas de plástico 120mL	V-T Medio MNC-G		Yamada <i>et al.</i> , 2001
<i>P. silvestris</i>	Varios: <i>Lactarius deliciosus</i> (+) <i>Boletus edulis</i> <i>Suillus luteus</i>	6 meses	Tubos de vidrio		V-T Medio MMN-G		Royo <i>et al.</i> , 1998
Abreviaturas T= Turba		C= Corteza de árbol S= Suelo		V= Vermiculita			

1.9 Caracterización de la asociación micorrízica y el micobionte involucrado

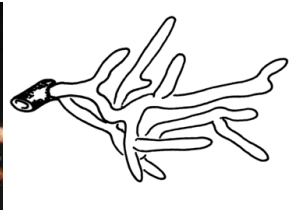
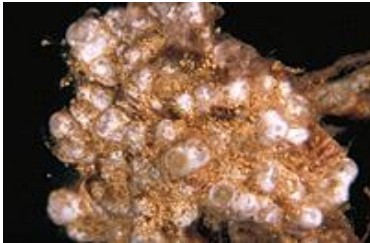
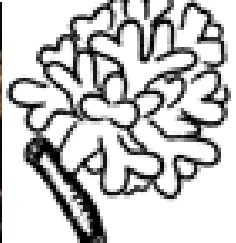
El estudio de las asociaciones micorrízicas contribuye a dilucidar las relaciones entre el hongo simbionte y la planta huésped, donde los estudios anatómicos-morfológicos y moleculares proveen información importante para su identificación.

1.9.1 Estudio macro-morfológico de la asociación hongo-planta

Las características estructurales externas definen tipos y categorías de micorrizas de acuerdo a las características del hongo y el género de la planta huésped que participan en la asociación. La descripción de su forma, junto con otras características pueden ayudar a la identificación de la especie fúngica, a continuación se muestran las características morfológicas anatómicas externas más comunes (Cuadro 7).

Cuadro 7. Formas mas conocidas de ramificación que se presentan en los sistemas radicales de las especies arbóreas.

		No ramificada: Consiste en micorrizas simples, no ramificadas; el manto solamente envuelve raíces simples.
		Monopodial-pinada: El sistema posee un eje desde el cual se originan ramas laterales mas cortas que el eje principal.
		Monopodial-piramidal: Similar a la anterior, pero las ramas laterales se originan desde el plano en varios ejes.

 	Dicotómicas: La raíz se divide en dos ramas laterales que crecen con la misma longitud.
 	Irregular-pinada: Unos ápices micorrízicos crecen más rápido que otros, parecido al dicotómico.
 	Tuberculadas: Las micorrizas están densamente ramificadas y unidas por una capa densa de hifas que le proporcionan la forma de tubérculo.
 	Trenzada: Las ramificaciones de un sistema monopoidal entrelazadas sobre el eje y en ocasiones con forma sinuosa o tortuosa.
 	Coraloides: Tienen ejes cortos que se encuentran densamente ramificados dando una apariencia de coral.

Fuente: Agerer y Rambold, 2007

Las células del manto en las terminaciones no ramificadas de los sistemas radicales pueden ser clasificadas como visibles (Figura 7A) o no visibles si son transparentes y delgadas (Figura 7B).

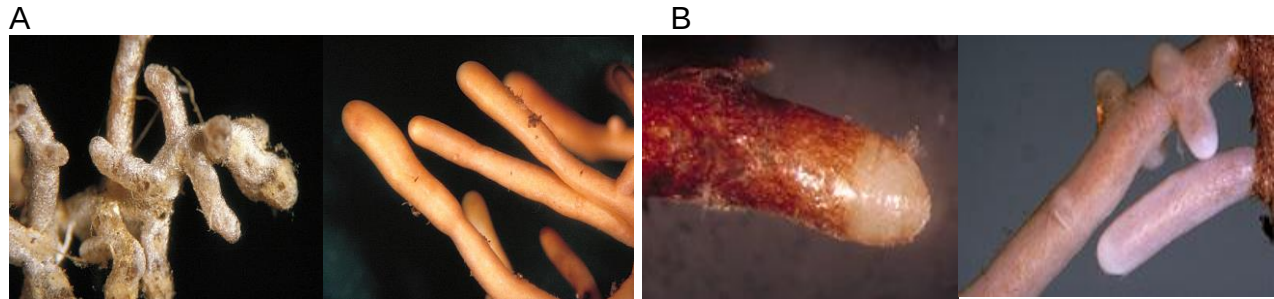


Figura 10. Manto en las terminaciones no ramificadas de los sistemas radicales pueden ser clasificadas como visibles (A) o no visibles (B)

Otra morfología para la identificación de sistemas micorrízicos no ramificados, son las formas de terminación de raíces como lo muestra el Cuadro 8.

Cuadro 8. Terminaciones no ramificadas de raíces en especies arbóreas.

	Tortuosas: Puntas retorcidas en 3 dimensiones.
	Torcidas: Puntas con flexiones en un plano.
	Rectas: Sin puntas modificadas.
	Comprimida: Puntas estrechas al final.

	Sinuosas: Punta ondulada en un plano.
	Collar: Varias constricciones en toda la punta.

Fuente: Agerer y Rambold, 2007

1.9.2 Análisis moleculares

Existen algunos hongos que producen alérgenos, moléculas que pueden desencadenar una reacción de hipersensibilidad en el huésped expuesto, generalmente son proteínas o glicoproteínas, mientras que las toxinas fúngicas son metabolitos de bajo peso molecular.

Los componentes fúngicos pueden causar alergias a través de la inhalación, ingestión o contacto. Las alergias por exposición ocupacional de la familia de *Boletus* han sido raramente reportadas, sin embargo, se ha mostrado que algunas especies pueden inducir alergia mediada por los anticuerpos del tipo de las inmunoglobulinas E (IgE), por lo que es necesario contar con herramientas que nos permitan distinguir las diferentes especies. Los estudios moleculares han estado desarrollándose para identificar especies que no produzcan alergias y que sean importantes comercialmente como las trufas negra y blanca, y para detectar los fraudes alimentarios (Mello *et al.*, 2006).

Los métodos para llevar a cabo estudios de taxonomía, filogenia y ecología en hongos son mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Estos estudios consisten en el análisis de un gen o de una región del genoma, ejemplo, el Espacio Transcrito Interno (ITS) que se encuentra repetidamente entre los genes del ARN ribosomal de la subunidad mayor y menor del ADN nuclear. Estas regiones pueden ser amplificadas mediante el uso de primers o iniciadores universales o específicos.

Esta técnica puede separar muchas especies relativamente rápido y ayudará a obtener inóculos fúngicos nativos para producir las asociaciones en viveros o en plantaciones maduras en pequeñas áreas geográficas con un propósito final de reforestación y producción de hongos comestibles (Ruiz-Diez *et al.*, 2006; Martin, 2007)

La bibliografía consultada muestra tallas variables del fragmento ITS que va de 500 a 1200 pares de bases de acuerdo al hongo y planta huésped, donde los primers universales nombrados ITS1 e ITS4 son los más utilizados para la amplificación del Espacio Transcrito Interno, con el cual se puede caracterizar e identificar molecularmente los hongos ectomicorrizógenos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Distintas tallas de la región ITS en algunos hongos ectomicorrízicos.

Tamaño ITS (pb)	Primers	Hongo	Planta huésped	Autor/Año
540-600	ITS1 e ITS4	<i>Tuber melanosporum</i>	<i>Quercus pubescens</i> , <i>Quercus ilex</i> y <i>Corylus avellana</i>	Baciarelli <i>et al.</i> , 2006
500	ITS1 e ITS4	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	Hortal <i>et al.</i> , 2006
515-558	ITS1-F e ITS4	<i>Boletus edulis</i> , <i>B. Aereus</i> y <i>B. Pinophilus</i>	No registrado	Mello <i>et al.</i> , 2006
750-898	ITS1-F e ITS4	<i>Boletus edulis</i>	No registrado	Leonardi <i>et al.</i> , 2005
1200	ITS1 y NL4	Diferentes especies de <i>Botryosphaeria</i> sp.	<i>Quercus suber</i> (España), <i>Populus</i> <i>nigra</i> (Portugal), <i>Ribes</i> sp. (USA), <i>Vitis</i> <i>vinifera</i> (Portugal)	Alves <i>et al.</i> , 2005
676-872	ITS1 e ITS4	Boletales : <i>Rhizopogon</i> . <i>Rubescens</i> , <i>Suillus bovinus</i>	<i>Pinus nigra</i> (Francia)	El Karkouri <i>et al.</i> , 2005b
672-700	ITS1 e ITS4	<i>Suillus collinitus</i>	<i>Pinus halepensis</i>	El Karkouri <i>et al.</i> , 2004
511-861	ITS1F e ITS4	<i>Cantharellus cibarius</i> , <i>C. Lateritius</i> , <i>C. Minor</i> , <i>C. Cinereus</i> , <i>C. cinnabarinus</i>	<i>Quercus</i> spp., <i>Pinus</i> <i>picea</i> , <i>P. pseudotsuga</i> spp., <i>P. abies</i> ,	Guevara <i>et al.</i> , 2004
594-609	ITS1-F e ITS4-B	<i>Lactarius Sanguifluus</i> y <i>Lactarius vinosus</i>	No reportado	Nuytinck y Verbeken., 2003

460	5SA y CNL12	<i>Tricholoma matsutake</i>	<i>Pinus densiflora</i> (Japon)	Guerin-Laguet <i>et al.</i> , 2002
560-750	ITS1 e ITS4	<i>Rhizopogon nigrescens</i> , <i>R. reaii</i> , <i>R. roseolus</i> , <i>Laccaria laccata</i> y <i>Suillus sp.</i>	<i>Pinus caribaea</i> , <i>P. patula</i> , <i>P. resinosa</i> , <i>Quercus</i> y <i>Eucalyptus sp.</i>	Gomes <i>et al.</i> , 2002
650-700	ITS1-F e ITS4	<i>Russula nigricans</i> , <i>Villosuli</i> , <i>Lactarius</i> y <i>Thelephora terrestris</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i> y <i>Betula papyrifera</i>	Sakakibara <i>et al.</i> , 2002
Aproximadamente 650	ITS1 e ITS4	<i>Lactarius rufus</i> , <i>Pisolithus tinctorius</i> y <i>L. tabidus</i>	No reportado	Manian <i>et al</i> 2001.,
614-820	ITS1-F e ITS4	<i>Laccaria montana</i> , <i>russula integra</i> y <i>cortinarius calochrous</i>	<i>Picea</i> , <i>Abies</i> , <i>Salix</i> y <i>Dryas</i> (Canada)	Kernaghan, 2001
720-775	ITS1-F e ITS4	Diferentes especies de <i>Lactarius</i> y <i>Russula</i>	<i>Abies lasiocarpa</i> y <i>Picea engelmannii</i>	Kernaghan <i>et al.</i> , 1997

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS

2.0 HIPÓTESIS

En este trabajo se plantean las siguientes hipótesis:

Los *Pinus* son susceptibles de ser colonizados *in vitro* por varias especies de basidiomicetes ectomicorrizógenos de interés alimentario, ecológico y económico.

Así mismo, el análisis del ITS sirve como herramienta para la caracterización e identificación del micobionte, fitobionte o la asociación micorrízica, para control de calidad del inóculo micelial y su propagación para la producción de hongos comestibles.

CAPITULO 3

OBJETIVOS

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Para probar las hipótesis, el objetivo general de este estudio es:

Evaluar la interacción entre algunas cepas de hongos ectomicorrizógenos nativos del Estado de Hidalgo con especies de *Pinus* e identificar el hongo simbiote mediante técnicas moleculares basadas en la PCR, con el fin de seleccionar hongos que puedan usarse para preparar inoculantes en programas de producción de hongos comestibles nativos.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar el crecimiento vegetativo de algunos hongos ectomicorrízicos nativos en medio líquido y/o sólido.
- Obtener plántulas de especies de *Pinus* nativos con raicillas para la inoculación micorrízica.
- Establecer un sistema para la síntesis *in vitro* de micorrizas.
- Identificar el micobionte a través de la secuenciación del fragmento ITS.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico

4.1.1 Material fúngico

Los hongos utilizados en este estudio fueron *Russula* sp., y *Tricholoma magnivelare*, proveniente del municipio de Singuilucan, Hgo., *Laccaria laccata* proveniente del bosque de encino-pino en el municipio de El Chico, Hgo., aislados a partir de esporocarpos asociados a *Pinus teocote* o *Quercus* (Carranza-Díaz, 2006), dichos hongos se encuentran en el cepario del laboratorio de biotecnología del ICAP-UAEH, igualmente se utilizaron los esporocarpos de *Cantharellus* sp. provenientes del municipio de Zacualtipán Hgo. y la cepa *Lactarius deliciosus*, donada amablemente por la M. en C. Zamora M. (INIFAP). Los micobiontes pertenecen a la división amastigomycota, subdivisión basidiomycotina y clase homobasidiomycetes, familias Russulaceae Tricholomataceae y Cantharellaceae.

El medio nutritivo empleado para la obtención del inóculo fue Biotina Aneurina-Ácido Fólico (BAF), (Moser, 1960), a 26°C, y con agitación de 120 rpm cuando se creció en medio líquido. Para la conservación de los micobiontes, se llevó a cabo una transferencia periódica de cepas aisladas en el mismo medio nutritivo.

4.1.2 Material Vegetal

Para la síntesis *in vitro* de ectomicorrizas se utilizaron semillas de *Pinus greggii* y *P. pseudostrobus* provenientes del vivero de la UAEH. Las semillas fueron tamizadas en una malla de 0.8 pulgadas de diámetro en cada orificio. Se desinfectaron según el protocolo de Vaario *et al.*, (2006), se lavaron superficialmente con agua corriente, y se desinfectaron sumergiéndolas durante 15 minutos en etanol al 70%, se retiró el etanol y se lavaron repetidamente con agua destilada estéril, posteriormente se adicionó peróxido de hidrógeno al 30% durante 30 minutos manteniéndose con agitación suave, se lavaron abundantemente con agua destilada estéril y se dejaron remojando durante 12 horas con agitación suave (Figura 11).

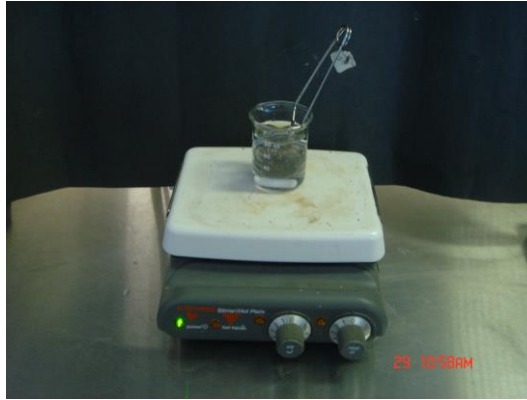


Figura 11. Desinfección de semillas de *P. greggi* y *P. pseudostrobus* provenientes del vivero de la UAEH.

Finalmente, se sembraron las semillas de *Pinus* en 100 vasos de unicel (250 g de capacidad) conteniendo 150 mL de mezcla estéril de turba (20%) y vermiculita (80%), preparada de acuerdo al protocolo de Courbot (1999), (Figura 12). El periodo de germinación fue aproximadamente de 15 días a temperatura ambiente.



Figura 12. Mezcla de turba-vermiculita preparada de acuerdo a Courbot, (1999), para la germinación de *P. greggii* y *P. pseudostrobus*.

4.2 Síntesis *in vitro* de la micorriza

El ensayo de micorrización se realizó en un sistema de vasos de unicel con la plántula germinada de 1 mes de edad, (longitud de 2,6 cm) con el sustrato descrito anteriormente, el cual se enriqueció con 10 mL de medio líquido BAF.

El micelio de *Laccaria laccata* crecido durante 15 días en medio líquido BAF se transfirió al sistema de micorrización en un volumen de 3 mL a 1.5 cm de profundidad del sustrato, realizándose 10 repeticiones para esta cepa, como control se utilizaron

plántulas de pino sin inocular y se incubaron durante 2 meses a medio ambiente. El desarrollo del crecimiento de la plántula se evaluó midiendo la longitud del tallo, se observó semanalmente hasta encontrar las primeras raíces secundarias y se observó el morfotipo de las raíces en un esteremicroscopio como indicador de micorrización (Figura 13).



Figura 13. Inoculación de plántulas de *Pinus pseudostrobus* con *Laccaria laccata*.

4.3 Extracción de ADN de hongos

La extracción de ADN total se realizó con el Kit de purificación WIZARD® (Promega, Madison, Wis), el cual consta de tres etapas que son:

1. Rompimiento de células fúngicas, donde se libera el ADN-proteínas
2. Separación y eliminación de proteínas celulares por precipitación
3. Separación y resuspensión de ADN

La extracción del ADN fué a partir de 150 µg de micelio crecido en medio nutritivo BAF o de los esporocarpos tanto congelados como herborizados, de *Tricholoma magnivelare*, *Lactarius deliciosus* y *Cantharellus* sp. El tejido se congeló en nitrógeno liquido, posteriormente se trituró y se siguieron las instrucciones del proveedor del kit WIZARD® (Promega, Madison, Wis). Finalmente el ADN extraído se rehidrató en 100 µL de agua destilada estéril y se conservó a -20 °C para su posterior utilización.

4.4 Determinación de la concentración y grado de pureza del ADN

El ADN es una molécula que tiene la capacidad de absorber un haz de luz a una longitud de onda de 260 nm. Existe una relación para calcular la concentración de ADN midiendo simplemente su absorbancia, donde una solución de ADN de concentración 50 µg/mL a 260 nm tiene una Absorbancia igual a 1, por lo que no es necesario elaborar una curva patrón (Samborook y Russel, 2001).

La concentración y grado pureza del ADN se midió en un NanoDrop® ND-1000 de UV/Vis, (Figura 14). Este equipo permite realizar medidas de espectrofotometría en un amplio rango de longitudes de onda (220-750 nm) sin necesidad de utilizar celdas de cuarzo ni de hacer diluciones, ahorra tiempo y costos y mide un rango de 2-3700 ng/ µL (dsDNA). Para llevar acabo la medición fue necesario calibrar el equipo con una gota de agua destilada, posteriormente se colocaron 2 µL de extracto de ADN o fragmento de PCR en el pedestal. La información es transmitida al ordenador a través de un cable de fibra óptica para finalmente obtener los resultados en formato electrónico.



Figura 14. Determinación de la concentración y grado de pureza del ADN, en un NanoDrop® ND-1000 de UV/Vis.

4.5 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis es una técnica para la separación de moléculas (proteínas o ácidos nucleicos) sobre la base de su tamaño molecular, forma y carga eléctrica. Los ácidos nucleicos disponen de una carga eléctrica negativa, que los dirige al polo positivo, Para la separación se usa un gel de agarosa. Al colocar la muestra de ADN y aplicar un campo eléctrico, las moléculas se mueven y pasan a través del gel, por lo que las

pequeñas se moverán más rápidamente y las más grandes quedarán cerca del lugar de partida (Clark y Russell, 2000)

La electroforesis en gel de agarosa se realizó en una cámara de electrofóresis (BIORAD MINI-SUB® Cell) (Figura 15), a una concentración de 1.5% de agarosa, que contenía buffer TBE 1X a pH 8.1. Los fragmentos de ADN fueron colocados en los pocitos del gel, sometiéndose a un campo eléctrico. Los ácidos nucleicos migran hacia el polo positivo, el gel actúo como una malla que limita el paso de moléculas grandes, permitiendo así que las moléculas más pequeñas migraran fácilmente.

En cada pozo se colocó 1 μ g de ADN y 3 μ L de colorante azul de carga (Blue/Orange loading Dye). Se utilizó un voltaje constante de 35 V, durante 2 horas aproximadamente.

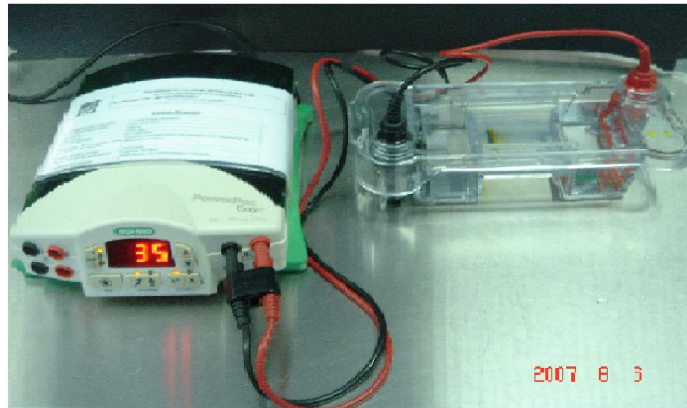


Figura 15. Cámara de electrofóresis (BIORAD MINI-SUB® Cell), y fuente de poder (BIORAD) utilizada para la corrida del gel.

Se utilizaron marcadores de tamaño conocido (ladder Promega®, de 1 kb), de tal forma que es posible saber el tamaño de un fragmento de ADN desconocido por comparación de tallas.

Al finalizar la migración, el gel se colocó en bromuro de etidio (ETBr) durante 20 min con la finalidad de teñirlo, ya que este se une al ADN y fluoresce al ser expuesto a luz

UV. Una vez teñido el gel, se visualizaron las bandas de ADN en un procesador de imágenes KODAK Gel Logic1500 Digital Imaging System (Figura 16).



Figura 16. Sistema de documentación de geles KODAK Gel Logic1500 Digital Imaging System.

4.6 Amplificación del fragmento ITS.

Mediante la técnica de la PCR se amplificó el fragmento del espacio transcrito interno nuclear (ITS) que se debe encontrar en el ADN que hemos aislado. Para llevarla a cabo, el ADN aislado anteriormente se utilizó como template en una dilución de 1:500, los primers ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990) sintetizados por Sigma Aldrich Química S.A. de C. V. En cada serie de amplificaciones se realizó un control negativo sin ADN que sirvió para detectar la presencia de contaminantes en los reactivos, las proporciones de los componentes se muestran en el Cuadro 10, el volumen de reacción fue de 25 μ L.

La secuencia de los primers utilizados en este trabajo fue la siguientes:

ITS1 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'

ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'

Cuadro 10. Componentes de la PCR.

Componente	Volumen	Concentración
PCR Master Mix® ,2X (Promega Corporation, Madison WI)	12.5 µL	1X
Upstream Primer ITS1,10 µM	0.25 µL 2.5 µL	0.1-1.0 µM
Downstream Primer ITS4,10 µM	0.25 µL 2.5 µL	0.1-1.0 µM
ADN template	1-5 µL	<250 ng
Aforar con Agua libre de nucleasas para	25 µl	N.A.

NA, no aplica

4.7 Parámetros de la PCR

La amplificación se realizó en un Termociclador de gradiente Mastercycler® ep Eppendorf AG Hamburg (Figura 17), con los parámetros que se encuentran en el Cuadro 11.



Figura 17. Termociclador de gradiente Mastercycler® ep Eppendorf AG Hamburg.

Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa al 2% con el marcador de 1.kb (Promega Corporation, Madison, Wis), después de teñir el gel con bromuro de etidio durante 20 min, éste se visualizó con luz UV en el sistema de documentación de geles.

Cuadro 11. Parámetros de amplificación en termociclador.

Ciclos	Temperatura	Etapas de:
A) 1 ciclo		
3 minutos	95°C	Desnaturalización inicial
B) 30 ciclos		
1 minuto	95°C	Desnaturalización
30 segundos	52°C	Alineamiento de primers
1.5 minutos	72°C	Síntesis de ADN
C) 1 ciclo		
10 minutos	72°C	Síntesis final de ADN

4.8 Purificación del fragmento ITS amplificado.

Con el objetivo de eliminar contaminantes e impurezas (sales, fragmentos no específicos, dNTPs, etc) que pueden influir en el análisis de secuenciación del fragmento ITS, fué necesario purificarlo mediante el kit (QIAquick gel extraction kit; Quiagen Inc.). El sistema QIAquick combina la eficiencia de la tecnología de columnas-spin con las propiedades selectivas de enlace de una membrana de sílica gel. Los buffers especiales optimizan la eficiente recuperación del ADN y la remoción de contaminantes. En el primer paso el ADN se adsorbe a la membrana de sílica en la presencia de alta concentración de sales, con un pH óptimo mientras que los contaminantes pasan a través de la membrana; las impurezas son eficientemente lavadas y el ADN puro se diluye con buffer o agua. El rendimiento de purificación de ADN depende del volumen de disolución, el buffer, la columna y el tiempo de incubación del buffer en la columna.

Se siguió la metodología de acuerdo al proveedor (Quiagen, Inc.) con una dilución final de 30 µL de agua destilada estéril, el producto purificado se visualizó en un gel de agarosa al 1% y se digitalizó en el Sistema de documentación de geles KODAK Gel Logic1500 Digital Imaging System para ser enviado a secuenciación en una dirección

usando un analizador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyzer de Perkin-Elmer Applied Biosystems. Los electroferogramas fueron revisados en el software Chromas 2.3 Technelysium Pty Ltd., y se realizó la búsqueda de similitud de las secuencias de nucleótidos en el Banco de datos usando el BLAST, que se encuentra en el Centro Nacional para la Información Bioteconológica (NCBI), para la identificación del fragmento producto de PCR.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Material biológico

Se obtuvieron plántulas de *P. greggii* y *P. pseudostrobus*, con un índice de germinación de 70 y 80% respectivamente, el periodo de germinación fue de 15 días a temperatura ambiente (Figura 18). Sin embargo, después de la germinación algunas plántulas se marchitaron rápidamente presentando daños en la parte mas cercana a la superficie del sustrato en la parte de cuello y tallo de la planta. Alarcón *et al.* (2001) describe estas características como el “Damping off” o ahogamiento de las plantas, que origina que éstas se doblen y mueran como consecuencia de la falta de transporte de nutrimentos y agua a la parte aérea de la planta, dicha enfermedad es ocasionada por los hongos *Pythium*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, que se desarrollan cuando la humedad del sustrato es alta.



Figura 18. Sistema para Germinación de semillas de *Pinus greggii* y *P. pseudostrobus* con turba y vermiculita como sustrato.

El inóculo micelial líquido de *Laccaria laccata* de un periodo de 15 días de crecimiento (Figura 19), se adicionó en un volumen de 20 mL al sistema de micorrización por tres

ocasiones, en un periodo de 1 mes, que contenía una plántula con raíces secundarias. De la misma forma se inoculó con la cepa en medio nutritivo sólido, de 28 días, el cual se cuadrículó con un bisturí estéril, cortando fragmentos de 5 mm por lado, los cuales se transfirieron a los contenedores de unicel. La biomasa micelial de la cepa de *L. laccata* en el medio líquido produjo la mayor cantidad (10.7 mg) siendo diferente con los valores de biomasa obtenidos cuando es crecida en medio sólido (8.1 mg). La biomasa de las cepas de *Russula* sp y *Lactarius deliciosus* no fue suficiente para la inoculación.

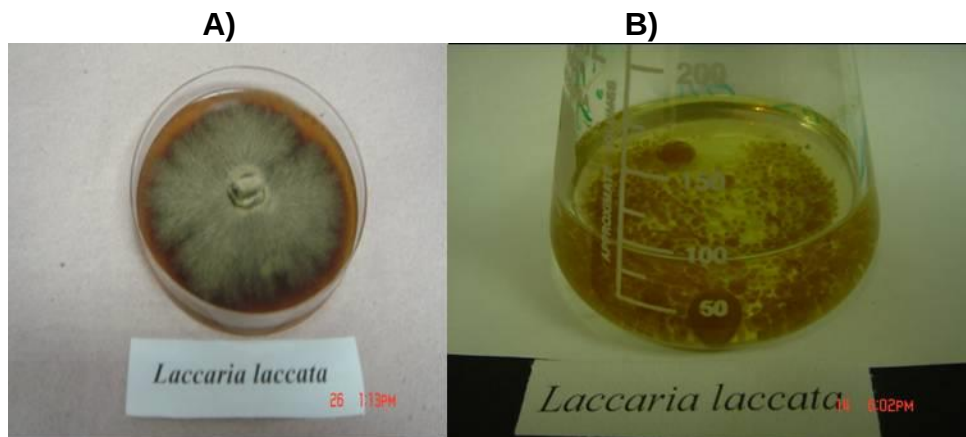


Figura 19. Crecimiento micelial de *Laccaria laccata* en medio sólido A) y líquido BAF, B).

5.2 Síntesis in vitro

En este estudio, las plántulas de *Pinus greggi* a la edad de 1 mes presentaron problemas de contaminación por el hongo *Pythium*; además de esta problemática en cada dispositivo utilizado se presentaron situaciones particulares. La conservación de plántulas de especies forestales en medios axénicos o semi axénicos es difícil debido frecuentemente a falta o exceso de humedad, exceso de calor o problemas de contaminación, pues en ocasiones los contaminantes crecen más rápido que el hongo a probar.

No obstante, se obtuvieron sólo plántulas de *Pinus pseudostrobus* de cuatro meses de edad, la cual en el primer mes de edad presentó pelos absorbentes (Figura 20), posteriormente los pelos absorbentes desaparecieron (característica muy común en la formación de ectomicorizas) (Figura 20b) y el aspecto hinchado de la raíz corta (Figura 20c), hasta formar una estructura que probablemente corresponda a la de una micorriza

no ramificada con terminación recta de acuerdo a los criterios de Agerer y Rambold, (2007) (Cuadros 7 y 8).

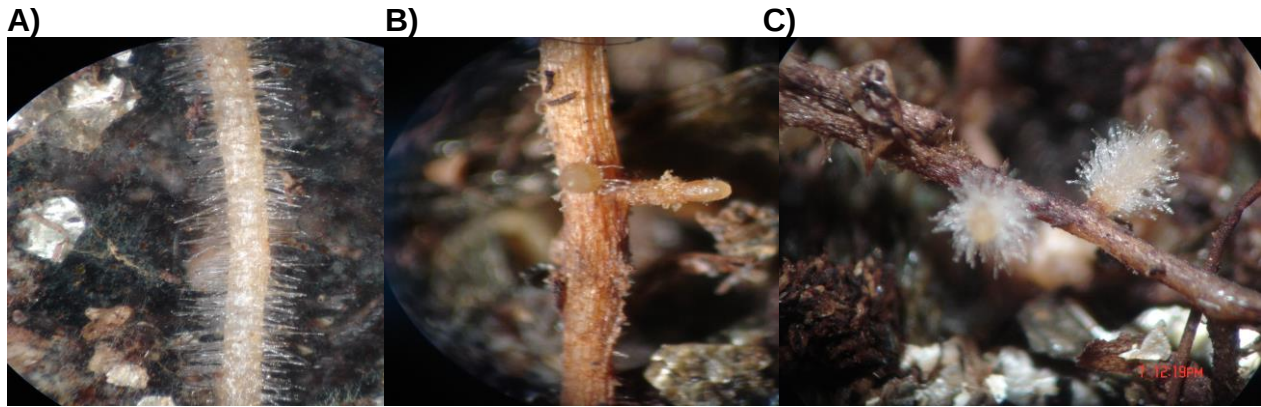


Figura 20. Fotografía tomada en un estereomicroscopio Leica Zoom® 2000 con una magnificación de 45X, de una raíz de *Pinus pseudostrobus* de 1 mes de edad que muestra la raíz alimentadora no micorrizada y con abundantes pelos absorbentes (A) y su posterior desaparición después de cuatro meses de la inoculación con *Laccaria laccata* (B). Raíz corta de *Pinus* con aspecto hinchado (C)

Especies del género *Laccaria*, como *L. bicolor*, siendo hongo cosmopolita, se asocian a una amplia gama de hospederos, entre los que se pueden incluir especies de los géneros *Eucalyptus*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* y *Pseudostruga* (Baar y Kuyper, 1994), por lo que, es muy factible, que la confrontación seleccionada de *L. laccata* con *Pinus pseudostrobus* en este estudio se encuentre en las primeras etapas de formación de una simbiosis.

Si bien la simbiosis micorrízica se puede establecer en más del 80% de las plantas conocidas, también es cierto que algunas de ellas responden de manera diferencial a la inoculación de hongos micorrizicos, ya que algunos hongos tienen crecimiento micelial escaso y tardan más en colonizar las raíces secundarias tal es el caso de *Lactarius deliciosus*, *Laccaria bicolor* y *Tricholoma sp*, entre otros con un periodo de formación de micorrizas de más de 6 meses (Royo *et al.*, 1998; Santiago-Martínez, 2003; Yamada *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2005). En cambio existen otros hongos que colonizan muy rápido, como *Pisolithus tinctorius* y *Cenococcum geophilum* que colonizan en 7

semanas según estudios realizados por Niemi y Häggman (2002), y Vaario *et al.*, (2006).

La medición de la colonización puede realizarse mediante métodos no sistemáticos y sistemáticos. Para la ectomicorriza, los métodos no sistemáticos consiste en comparar el morfotipo de asociación con la arquitectura original del sistema radical de plantas no colonizadas por hongos, con base en la morfología y color de la estructura micorrízica; mientras que para el procedimiento sistemático consiste en contabilizar las puntas con estructuras ectomicorrízicas en las raíces de coníferas.

Cabe mencionar que el muestreo realizado, denominado destructivo al azar, no se puede observar el desarrollo de todas las raíces en periodos cortos, ya que al extraer las plántulas enteras para realizar la caracterización morfológica de la asociación, se pierde la plántula completamente, por lo que es necesario esperar probablemente 4 meses más para contabilizar las puntas y obtener el porcentaje total de micorrización.

Sin embargo, es necesario realizar estudios mas profundos de verificación de la asociación por su anatomía interna a través de cortes transversales y longitudinales, examinada bajo el microscopio.

Al observar algunos cortes longitudinales de este sistema radical, se advierte la anatomía característica de las ectomicorrizas, como el cilindro vascular, las células corticales y células epidérmicas (Figura 21), mientras que en un corte transversal (Figura 21C) con una magnificación de 1000X se alcanza a visualizar entre algunas células corticales un espacio que podría ser la presencia de la red de Hartig (Flecha).

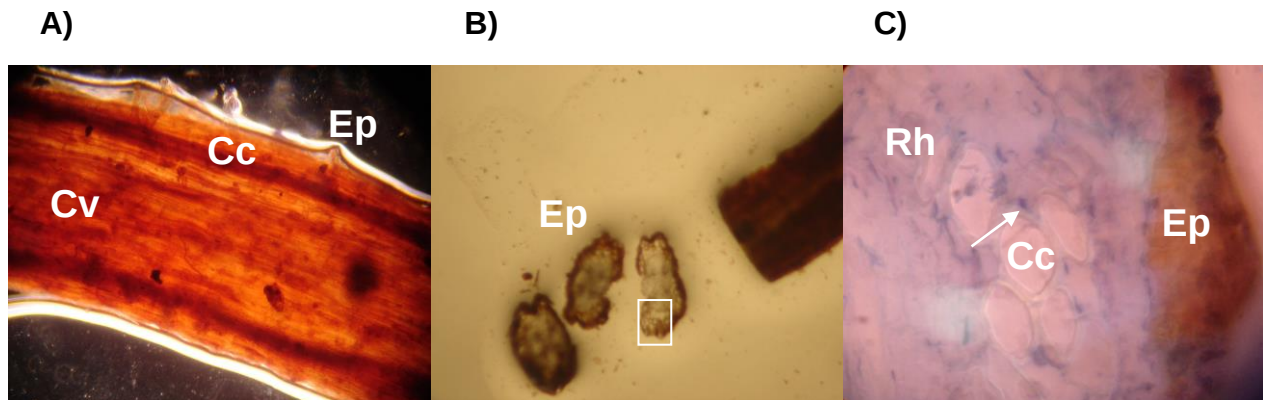


Figura 21. Características del Sistema Radical de *Pinus pseudostrobus* con *Laccaria laccata*, en microscopio óptico A) Corte longitudinal del sistema (100X), B) y C) Corte transversal (400X, 1000X). Cv, cilindro vascular, Cc, células corticales, Ep, epidermis, Rh, Red hartig.

En la bibliografía consultada no se lograron encontrar datos de la asociación de estas especies específicas y teniendo en cuenta que las asociaciones de los hongos y plantas nativos pueden presentar fisiología diferentes a otros organismos de otras latitudes, no se puede conocer el grosor del manto fúngico o su presencia, ni la presencia de la red de Hartig y de los rizomorfos (hifas emanantes del manto, alargadas y con fines exploratorios para la obtención de nutrientes) en esta combinación planta-hongo. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden sugerir que la formación de este tipo de micorrizas requiere de tiempos más prolongados o probablemente el manto fúngico aún no está bien desarrollado.

Brunner *et al.*, (1991) opinan que la ausencia de manto y de red de Hartig se debe a que el hongo no es un fitobionte natural, o que se asocia con hospederos viejos y no con plantas jóvenes, igualmente existe sucesión de especies de hongos en las raíces de los hospederos, existiendo hongos que sólo colonizan las raíces durante los primeros años de vida de la planta y hongos que sólo son capaces de formar micorriza con las raíces de plantas maduras. Se considera que los géneros de *Hebeloma*, *Laccaria* e *Inocybe* son pioneros en un buen desarrollo en estados jóvenes de las plantas de un bosque de coníferas, en bosques maduros la dominancia es de las especies de *Amanita*, *Lactarius* y *Russula*, mientras que la persistencia de uno o pocos hongos dominantes como *Amanitas* y *Tricholomas* entre otros persisten en bosques viejos.

Estos resultados sugieren que *Pinus pseudostrobus*, especie que se encuentra en el Estado de Hidalgo, se asocia a *Laccaria laccata*, pero cabe señalar que los resultados experimentales no siempre reflejan las situaciones de campo y que el hecho de que un hongo logre o no asociarse en un sistema *in Vitro* no significa que éste sea capaz de establecer la relación con estos hospederos en otro sistema de micorrización.

5.3 Extracción de ADN: pureza y concentración

En el perfil electroforético del producto de extracción de ADN se observó claramente una sola banda delgada bien definida en el extremo superior con un ligero barrido, la cual indica que el fragmento que se obtuvo es ADN (imagen no mostrada), con degradación ligera, no obstante como se demuestra posteriormente, el fragmento de interés está intacto.

La pureza y concentración del ADN son factores que se deben considerar basándose en que algunas bio-moléculas como ADN, ARN y proteínas no absorben la luz en el rango visible, pero son capaces de absorber la luz ultravioleta.

Como se observa en el Cuadro 12 las concentraciones obtenidas de ADN van de 3 a 101.22 ng/μL, la concentración más baja (3.24 ng/μL) corresponde a *Cantharellus* “Duraznillo” y la mas alta (101.22 ng/μL) corresponde a *Lactarius* “Enchilado”, lo que explica porque las bandas que se obtuvieron en el perfil electroforético fueron delgadas para *Cantharellus*. Cabe señalar que necesitamos muy poca cantidad para la amplificación de un fragmento específico, por lo que esta concentración es suficiente para los demás análisis.

Cuadro 12. Concentraciones y grado de pureza de las muestras de ADN, obtenidos por el método de espectrofotometría.

Hongo herborizado	Abs 260 nm	Abs 280 nm	260 Abs/280 Abs	Concentración de ADN en ng/μL
<i>Tricholoma</i> sp.(espécimen. 1)	0.812	0.468	1.74	40.60
<i>Tricholoma</i> sp (espécimen. 2)	0.761	0.339	2.26	38.35
<i>Tricholoma</i> sp (espécimen. 3)	0.922	0.569	1.62	46.10
<i>Cantharellus cibarius</i> (espécimen. 1)	0.065	0.027	2.43	3.24
<i>Lactarius deliciosus</i> (espécimen. 1)	0.36	0.116	2.17	18.02
<i>Lactarius deliciosus</i> (espécimen. 2)	2.024	1.142	1.70	101.22

En cuanto a la estimación de la pureza en la solución de ácidos nucleicos la relación 260/280 de absorbancia, obtenida en las diferentes muestras se encuentra en el rango de 1.6-2.46 los cuales están ligeramente fuera del rango característico de un ADN puro que va de 1.7 a 2, a excepción de *Tricholoma* sp (espécimen 1) y *Lactarius* (espécimen. 2), estos valores probablemente se deben a que las muestras contengan residuos de tirosina, fenil alanina y triptofano, aminoácidos capaces de absorber la luz a 280 nm.

5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa permitió multiplicar la región específica del espacio interno transcrito (ITS), que se encuentra repetidamente entre los genes del ARNr de la subunidad mayor y menor del ADN nuclear, mediante el uso de los primers universales ITS1 e ITS4.

La Figura 22 muestra una sola banda bien definida del producto amplificado con una talla alrededor de 750 pb, dichas tallas coinciden con las reportadas por varios autores citados en el cuadro 9 de la revisión bibliográfica. Estos resultados no muestran variaciones aparentes entre estas especies estudiadas, por lo que se requiere

marcadores genéticos para observar una variación inter e intraespecífica entre ellas, el cual, va más allá del objetivo de este estudio.

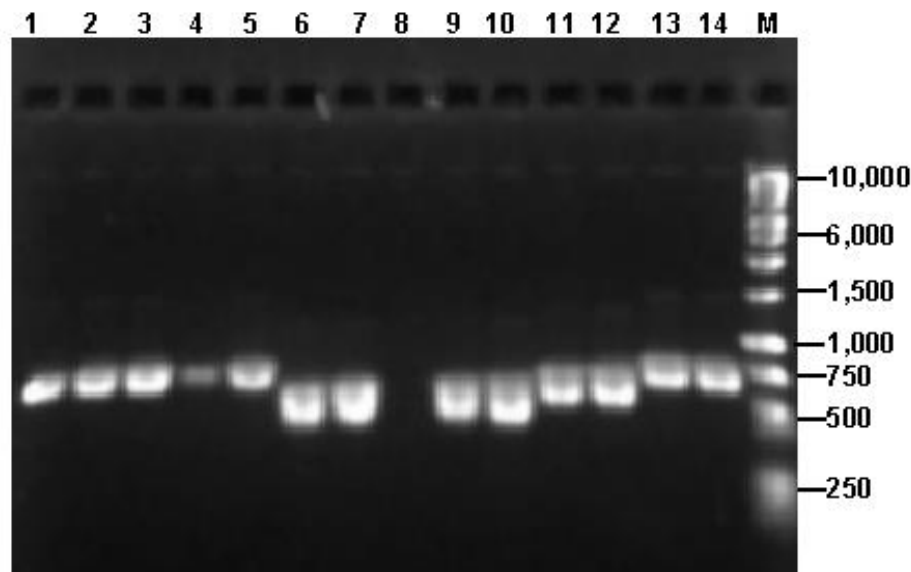


Figura 22. Perfil electroforético del fragmento ITS de varios aislados fúngicos, utilizando el set de primers ITS1 e ITS4. Carril 1 *Tricholoma*, 2 *Tricholoma*, 3 *Tricholoma*, 4 *Cantharellus*, 5 *Lactarius*, 6 *Lactarius*, 7 *Tricholoma* 9-14 muestras de repeticiones y M marcador 1kb Promega®.

5.5 Secuenciación nucleotídica del fragmento ITS

La concentración de los fragmentos purificados ITS amplificados de los diferentes especímenes fúngicos se muestra en el Cuadro 13, donde podemos observar una concentración mínima de 13.89 a una máxima de 27.5 ng/μL. La concentración necesaria para ser secuenciados en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM está entre 20 y 60 ng/μL, por lo cual se enviaron 4 muestras con mayor concentración, *Tricholoma* espécimen 1 y 3, *Russula* y *Lactarius*.

Cuadro 13. Concentraciones del fragmento ITS de varios especímenes fúngicos purificados.

Muestras purificadas	Concentración ng/μL de ADN
<i>Tricholoma</i> sp. espécimen 1	27.5
<i>Tricholoma</i> sp. espécimen 2	13.89
<i>Russula</i> espécimen 3	26.69

<i>Tricholoma sp.</i> espécimen 3	18.46
<i>Lactarius deliciosus</i> espécimen 2	18.26
<i>Boletus sp.</i>	17.18

Las muestras purificadas se verificaron en un gel de agarosa al 2% utilizando un marcador de talla 1 kb, donde se distinguió una banda bien definida, teniendo resultados satisfactorios en dos muestras, como se observa en el siguiente Cuadro.

Cuadro 14. Resultado del BLAST del ITS con mayor correspondencia.

Espece fúngica de este estudio/Lugar de recolecta	Espece homóloga	Numero de accesoión	Identidad (%)	Referencia Genbank®
<i>Tricholoma sp</i> especimen 1 y 3 /Singuilucan, Hgo. Méx.	<i>Tricholoma matsutake</i>	AB036891	98	Murata, H., 2000
	<i>Tricholoma magnivelare</i>	AF309530	98	Chapela, I., 2004
	<i>Tricholoma magnivalare</i>	AF309527	98	Chapela, I., 2004
	<i>Tricholoma matsutake</i>	AB188557	97	Matsushita, N., 2004

Se procesaron las secuencias nucleotídicas de acuerdo a los electroferogramas de las muestras de este estudio y las secuencias de mayor homología, acomodándose las ambigüedades e inserciones/deleciones en las secuencias, obteniéndose la ubicación y talla de los fragmentos secuenciados (Cuadro 15), cabe mencionar que la secuenciación sólo fue generada por un extremo dando secuencias incompletas de los segmentos ITS, por lo que será necesario en estudios posteriores secuenciarlos por los dos extremos.

Cuadro 15. Ubicación y talla de las regiones espaciadoras separadas por el gen 5.8S ADNr en las secuencias de este trabajo con respecto a secuencias publicadas en Genbank®.

ADN secuenciado	ITS1 (pb) (Posición nt)	5.8 (pb) (Posición nt)	ITS2 (pb) (Posición nt)	Talla secuenciada del fragmento ITS
<i>Tricholoma</i> sp. espécimen 3 / este trabajo	242 (16-257)	152 (258-409)	98 (410-507) (39%)	521
<i>Tricholoma</i> sp. espécimen 1 /este trabajo	243 (16-258)	53 (259-311)	-	311
<i>Tricholomja matsutake</i> TM4 / Murata <i>et al.</i> , 2000	242 (69-310)	152 (311-462)	252 (463-714)	872

nt= nucleótido

Las secuencias en formato FASTA de los fragmentos ITS1 e ITS2 están subrayadas respectivamente en el espécimen 3 y solo el fragmento ITS1 en el espécimen 1, como se muestra a continuación:

> *Tricholoma* sp. (especimen.3)

Caccagtggtcattattgaataaagtttggttaggttggtcgctggctctccggggcatgtgcacgcctgacgccaatcttttcaccacctgtgcaccttttgtaggcttgataaaatatgtctcgaggagctcgggttgaggactgctgtgctgcaaaaggccaggcctttccttgatattttccagcctatgcattttattatacactcgggtatgtcttggaatgttattttggttggttaattgccagtaaaccttatacaactttcaacaacggatctcttggtctctcgcatcgatgaagaacgcagcgaaatgcgataagtaatgtgaattgcagaattcagtgaatcatcgaaatctttgaacgcaccttgcgctccttggtattccgaggagcatgcctggtttgagtggtcatgaaattctcaaccttttcagctttttggtgaataggattggattttgggagttggtgacaggcttcctcaaaattctgctctccttaaatgaaaaacgggggaac

> *Tricholoma* sp. (especimen.1)

ccccctaggtcattattgaataaagtttggttaggttggtcgctggctctccggggcatgtgcacgcctgacgccaatcttttcaccacctgtgcaccttttgtaggcttgataaaatatgtctcgaggagctcgggttgaggactgctgtgctgcaaaaggccaggcctttccttgatattttccagcctatgcattttattatacactcgggtatgtcttggaatgttattttggttggttaattgccagtaaaccttatacaactttcaacaacggatctcttggtctctcgcatcgatgaagaacgca

Estos resultados señalan que es posible identificar satisfactoriamente algunos especies mexicanas de hongos ectomicorrizógenos comestibles, como *Tricholoma magnivelare*, con la amplificación del fragmento ITS a partir de carpóforos liofilizados o en fresco, validando nuestras técnicas de extracción de ADN, amplificación del ITS y secuenciación del mismo.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

Se logró un porcentaje de germinación (80%) en este dispositivo semiaxénico, con una invasión mínima del hongo simbiote.

Se obtuvo una micorriza no ramificada que se encuentra en el inicio de la etapa de desarrollo de la simbiosis de acuerdo al método no sistemático para la medición de la colonización, observándose modificaciones de la raíz. Sin embargo, es posible que se requiera estar mayor tiempo en el sistema controlando la humedad y evitar la contaminación en este periodo.

Se validaron los protocolos de aislamiento del ADN total de *Tricholoma* sp a partir de los esporocarpos, tanto fresco como liofilizado, con una concentración de 40.50 y 46.10 ng/μl respectivamente, con un grado de pureza de acuerdo a la relación A_{260}/A_{280} dentro del rango característico de un ADN puro.

La talla del fragmento obtenido por amplificación fue alrededor de 750 pb, rango obtenido en otros hongos ectomicorrizógenos. La concentración del fragmento puro estuvo en el rango de 18.46 ng/μl a 27.5 ng/μl, para *Tricholoma* sp., suficiente para su secuenciación y la realización posterior de marcadores genéticos.

No se mostró variación aparente entre estas especies estudiadas a partir del ITS, por lo que se requiere marcadores genéticos para observar una variación inter e intraespecífica entre éstas especies fúngicas.

Se obtuvo la secuencia completa del fragmento del espacio transcrito 1 y el gen 5.8S, así como la secuencia parcial del fragmento del espacio transcrito 2 del ADNr, con un 98% de identidad con *Tricholoma matsutake*. Estos resultados señalan que es posible identificar satisfactoriamente hongos ectomicorrizógenos comestibles nativos tales como *Tricholoma magnivelare*, con la amplificación del fragmento ITS a partir de carpóforos herborizados o en fresco.

CAPÍTULO 7
PERSPECTIVAS

7.0 PERSPECTIVAS

A corto plazo, la optimización del protocolo de aislamiento del ADN será indispensable para aumentar su concentración y pureza. Igualmente, es imprescindible tener marcadores moleculares para observar la existencia de una variación inter y/o intraespecífica de especies de importancia ecológica, económica y nutricional, y ser capaces de identificarlos y justificarlos si es el caso en la lista de especies protegidas por la Norma Oficial Mexicana. Estos resultados darán la posibilidad de realizar una discriminación entre especies fúngicas para su consumo seguro y su identificación precisa.

A mediano plazo, se debe continuar con el estudio de sistemas para la asociación hongo-planta *in vitro* y seleccionar la pareja más adaptable en viveros. A la par, será necesario clonar el o los fragmentos amplificados obtenidos de las diferentes especies fúngicas de la región hidalguense.

A partir de estos estudios, a largo plazo, se continuará con la ruta biotecnológica con ensayos en viveros de plantas forestales y pequeñas parcelas, para que los productores forestales tengan un ingreso extra en la recolecta de hongos ectomicorrizógenos comestibles.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

8.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Agerer, R., Rambold, G., 2007. DEEMY – An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae (<http://www.deemy.de> – München, Germany. Última fecha de acceso:10/08/07).
2. Alarcón, A., Almaraz, J.J., Ferrera-Cerrato, R., González-Chávez, M.C.A., Lara, M.E., Manjarrez, M.J., Quintero, L., Santamaría, S., 2001. Manual: Tecnología de hongos micorrízicos en la producción de especies forestales en vivero. Ferrera-Cerrato, A., Alarcón, A., Lara, M.C.A. (eds). Cologio de Posgraduados. Montecillo. SEMARNAT-PRONARE. México. p 98.
3. Alves A., Phillips A.J.L., Henriques I., 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.
4. Baar, J. O., Kuyper., 1994. Spatial distribution of *Laccaria bicolor* genets reflected by sporocarps alter renewal of litter and humus layer in a *Pinus sylvestris* forest. Mycological Research (98):726-728.
5. Baciarelli-Falini, L., Rubini, A., Riccioni, C., Paolocci, F., 2006. Morphological and molecular analyses of ectomycorrhizal diversity in a man-made *T. melanosporum* plantation: description of novel truffle-like morphotypes. Mycorrhiza 1-12
6. Boa, E., 2004. Wild edible fungi a global overview of their use and importance to people. (<http://www.fao.org/docrep/007/y5489e/y5489e00.htm#TopOfPage>. Última fecha de acceso: 07/07/07).
7. Brunner, I., Amiet, R., Schneider, B., 1991. Characterization of naturally grown and in vitro synthesized ectomycorrhizas of *Hebeloma crustuliniforme* and *Picea abies*. Mycol. Res. 95: 1407-1413.
8. Bruns, T. D., White T. J., Taylor J. W., 1999. Fungal Molecular Systematics. Annual Review of Ecology and Systematics (22): 525-564.
9. Bruns, T. D., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking in to the black-box. Molecular Ecology (10):1855-1871.
10. Bruns, T.D., Bidartondo, M. I., Taylor, D. L., 2002. Host Specificity in Ectomycorrhizal Communities: What Do The Exceptions Tell Us. Integ and Comp. Biol.(42):352-359.

11. Brundrett, M. C., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., Malajczuk, N., 1996. Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research Monograph 32, Canberra. p 374.
12. Brundrett, M., 2004. Diversity and classification of Mycorrhizal associations. Biol. Rev, (79): 473-495.
13. Buscot, F., Munch, J.C., Charcosset, J.Y., Gardes, M., Nehls, U., Hampp, R., 2000. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the function of these symbioses in ecosystems. FEMS Microbiology Reviews 24(2000): 601-614.
14. Calonge, D., 1990. Setas. Mundi-Presa. México. 2da. Ed. pp 26-53.
15. Carranza-Díaz, Z., 2006. Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido. Tesis de licenciatura. Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
16. Castellano, M. A., Molina, R., 1989. Manual de viveros para la producción de especies forestales en contenedor. Department of Agricultura, Forest Service. pp. 96-147.
17. Clark, D.P. y Russell, L. D., 2000. Molecular Biology made simple and fun. 2da edición. Cache River Press. pp 101-102.
18. Courbot, M., 1999. Contribution a l'étude d'une Mn-SOD de *Paxillus involutus*: clonage et expression. Diplôme d'Etudes Approfondies. UHPNI. Pp 5-9.
19. Chapela, I.H., Garbelotto, M., 2004. Phylogeography and evolution in matsutake and close allies inferred by analyses of ITS sequences and AFLPs. Mycologia 96 (4, 730-741. Base de datos GenBank de NCBI. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Última fecha de acceso: 23/10/07).
20. Gomes, E.A., Kasuya, M.C.M., de Barros, E.G., Borges, A.C., Araujo, E.F., 2002. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. Genet. Mol. Biol. 25 (4): 477-483.
21. Guevara, G. G., Garza, O. F. y Cazares, G. E., 2004. Estudio del ITS nuclear en algunas especies del genero *Cantharellus* de México. Ciencia UANL. 7(3):371-378.

22. Guerin-Laguette, A., Matsushita, N., Kikuchi, K., Iwase, K., Lapeyrie, F., Suzuki, K., 2002. Identification of prevalent *Tricholoma Matsutake* ribotype in Japan by rDNA IGS1 spacer characterization. *The British Mycological Society* 106(4): 435-443.
23. Guerin-Laguette, A., Shindo, K., Matsushita, N., Susuki, K., Lapeyrie, F., 2004. The Mycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake* simulates *Pinus densiflora* seedling growth in vitro. *Mycorrhiza* (14): 397- 400.
24. Guerin-Laguette, A., Matsushita, N., Lapeyrie, F., Shindo, K., Susuki, K., 2005. syssessful inoculation of mature pine with *Tricholoma matsutake* . *Mycorrhiza* (15):301-305.
25. El Karkouri, K., Martin, F., Douzery. J.P.E., Mousain, D., 2005a. Diversity of ectomycorrhizal fungi naturally established on containerized *Pinus* seedlings in nursery conditions. *Microbiological Research* (160): 47-52.
26. El Karkouri, K., Martin, F., Mousain, D., 2004. Diversity of ectomycorrhizal symbionts in a disturbed *Pinus halepensis* plantation in the Mediterranean region. *Ann. For. Sci* (61): 705-710
- Hall, I. R., Yun, W., Amicucci, A., 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends in Biotechnology*. 21 (10): 433-438.
27. El Karkouri, K., Selosse, M.A., Mousain, D., 2005b. Molecular markers detecting an ectomycorrhizal *Suillus collinitus* strain on *Pinus halepensis* roots suggest successful inoculation and persistence in Mediterranean nursery and plantation. 1-14.
28. Harley, J.L., Smith, S.E., 1983. *Mycorrhizal simbiosis*. Academic Press, Londres. 105-233.
29. Hortal, S., Pera, J., Galipienso, L., Parlade, J., 2006. Molecular identification of the edible ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus* in the symbiotic and extraradical mycelium stages. *J. Biotechnol.* (20): 1-12
30. Horton, T. R. y Bruns, T., 2001. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box.(10):1855-1871.
31. Kernaghan, G., Currah, R.S., Bayer, R. J., 1997. Russulaceos ectomycorrhizae of *Abies lasiocarpa* and *Picea engelmannii*. *Can. J. Bot.* (75):1843-1850.
32. Kernaghan, G., 2001. Ectomycorrhizal fungi at tree line in the Canadian Rockies. *Mycorrhiza* (10):217-229.

33. Leonardi, M., Paolocci, F., Rubini, A., Simonini, G., Paocioni, G., 2005. Assessment of inter- and intra-specific variability in the main species of *Boletus edulis* complex by ITS analysis. FEMS Microbiology Letters (243): 411-416.
34. Leoni, G., Ferreri, B., 1998. Cómo conocer las mejores setas comestibles. "Guía del buscador de setas". VECCHI, S.A., pp.7-26.
35. Manian, S., Sreenivasaprasad, S., Mills, P.R., 2001. DNA Extraction method for PCR in mycorrhizal fungi. Letters in Applied microbiology, (33): 307-310.
36. Martin, K.J., Rygielwicz, P.T., 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiology 5:28.
37. Martin, K.J., 2007. Introduction to molecular analysis of ectomycorrhizal communities. Soil. Sci. Soc. Am. J. (71):601-610.
38. Matsushita, N., Kikuch, K., Sasaki, Y., Guerin-Laguette, A., 2004. Base de datos GenBank de NCBI. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Última fecha de acceso: 23/10/07).
39. Mello, A., Ghignone, S., Vizzini, A., Seci, C., Ruiu, P., Bonfante, P., 2006. ITS primers for the identification of marketable boletes. J. Biot. pp. 318-329.
40. Morcillo, M., Sánchez, M., 2007. Por qué es tan difícil cultivar hongos micorrícicos comestibles? (<http://www.aeplanoles.org>. Última fecha de acceso: 08/08/07).
41. Moser, M., 1960. Die gattung Phlehmalum. Die Pilze Mitteleupora's 4 J. Bad Heilbrunn.
42. Murata, H., 2000. No. de Acceso AB036891 Base de datos, GenBank de NCBI. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> Última fecha de acceso: 23/10/07).
43. Niemi, K., Häggman, H., 2002. *Pisolithus tinctorius* promotes germination and forms mycorrhizal structures in Scots pine somatic embryos *in vitro*. Mycorrhiza (12):263-267.
44. Nuytinck, J., Verbeken, A., 2003. *Lactarius sanglifluss* versus *Lactarius vinosus*-molecular and morphological analyses. Mycological Progress 2(3):227-234.
45. Parlade J., Pera, J., Luque, J., 2004. Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P.sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. Micorrhiza (14):171-176
46. Royo, P., Fernandez, T. M., Fischer, Cr., 1998. Síntesis micorrícica de *Lactarius deliciosus* Fr. Y *Pinus sylvestris* L. Invest.Agr.: Sist.Recur. For 85-93.

47. Ruiz-Diez, B., Rincón M.R., De Felipe, Ma., Fernández-Pascual, M., 2006. Molecular characterization and evaluation of mycorrhizal capacity of *Suillus* isolates from central Spain for the selection of fungal inoculants. *Mycorrhiza* (16): 465-474.
48. Sambrook, J., Russell D.W., 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. COLD SPRING HARBOR LABORATORY. 3ra. Ed. p 8.18
49. Sakakibara, S. M., Jones, M. D., Gillespies, M., Hagerman, S. M., Forrest, M. E., Simard, S. W., Durall, D. M., 2002. A Comparison of Ectomycorrhiza identification based on morphotyping and PCR-RFLP analysis. *Mycol. Res* 106 (8):868-878.
50. Santiago-Martínez, Ma. G., 1992. Pruebas de crecimiento, síntesis *in vitro* y caracterización de 10 cepas de hongos ectomicorrizógenos. Tesis de Maestría. Fac.de Cienc. UNAM. México p127.
51. Santiago-Martínez, Ma. G., Estrada, A., 1999. Hongos ectomicorrizógenos y producción de inoculantes para plantas de interés forestal. Folleto técnico. Fundación Produce Tlaxcala/ Universidad Autónoma de Tlaxcala. 19-20.
52. Santiago-Martínez, Ma. G., Estrada-Torres, A., Valera, L., Herrera, T., 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa *Laccaria bicolor*. *Agrociencia* (37):575-584.
53. Selosse, M.A., Richard, F., He, X., Simard, S.W., 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses? *TRENDS in Ecology and Evolution* 21-11, 621-628.
54. SEMARNAT, 2007. Especies con Usos Maderables en Bosques de Encino-Pino y de Pino-Encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca. Especies forestales no maderables-bibliografía. (<http://www.semarnat.gob.mx/estados/Hidalgo/Pages/inicio.aspx>, Última fecha de acceso: 30/10/07).
55. Tedersoo, L., Pellet, P., Koljalg, U., Selosse, M.A., 2006. Parallel evolutionary paths to mycoheterotrophy in understorey Ericaceae and Orchidaceae: ecological evidence for mixotrophy in Pyroleae. *Ecophysiology* 1-13.
56. Vaario, L.M., Xing, S.T., Lun, Z. M., Li, Y.H., 2006. In situ and in vitro colonization of *Cathaya argyrophylla* (Pinaceae) by ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* (16):137-142.
57. Vedder, C., 1996., Cultivo del champiñón. Mundi-Presa. España. pp.32-34.

58. Villarreal, L., 1996. Los hongos silvestres: componentes de la biodiversidad y alternativa para la sustentabilidad de los bosques templados. Informe Final. Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Edo. de México.
59. Wild, A., 1990. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Rusell. McGRAW-HILL. Edo. de Mexico. p 581-588.
60. White, T.J., Bruns, T., Lee, S., 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.
61. Yamada, A., Ogura, T., Ohmasa, M., 2001. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by *in vitro* mycorrhizal synthesis. I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. *Mycorrhiza* (11):59-66.
62. Yamada, A., Maeda, K., Kobayashi, H., Murata, H., 2005. Ectomycorrhizal symbiosis *in vitro* between *Tricholoma matsutake* and *Pinus densiflora* seedlings that resembles naturally occurring "shiro". *Mycorrhiza* (16) 111-116.
63. Yun, W., Hall, I.R., 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Can. J. Bot. Rev. Can. Bot.* 82 (8) 1063-1073.
64. Zamora, M. G., 2001. Hongos comestibles. Énfasis Alimentación México. FLC. A.A. de C.V., pp 22-28.

CAPÍTULO 9

ANEXOS

9.0 ANEXOS

Anexo 1. Electroferograma de la secuencia nucleotídica para *Tricholoma magnivelare* realizada en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología (UNAM).

