

SÍNTESIS IN VITRO DE LA MICORRIZA DE
PISOLITHUS TINCTORIUS Y *PINUS MONTEZUMAE*

por Guadalupe Santiago-Martínez *,
Lucía Varela ** y
Arturo Estrada-Torres *

SYNTHESIS IN VITRO OF THE MYCORRHIZAE BETWEEN
PISOLITHUS TINCTORIUS AND *PINUS MONTEZUMAE*

SUMMARY

The ability of one strain of *Pisolithus tinctorius* from Oaxaca to form mycorrhizae with *Pinus montezumae* was evaluated. The germination of the plant and its confrontation with the fungus was performed in Ingestad medium. The obtained mycorrhizae had simple, dichotomous or coralloid morphology, golden brown color and abundant mycelial strands. Cross section revealed a thick and crowded fungal sheath, with a large amount of projecting hyphae and a Hartig net surrounding from two to three outer layers of cortical cells.

RESUMEN

Se evaluó la capacidad de un aislamiento de *Pisolithus tinctorius* procedente del estado de Oaxaca para formar micorriza con *Pinus montezumae*. La germinación de la planta y su confrontación con el hongo se realizó en medio nutritivo de Ingestad. La micorriza obtenida fue de color café dorado metálico, con abundantes rizomorfos y presentó una morfología simple, dicotómica o coraloide; microscópicamente se observó un manto grueso y denso, con abundantes hifas emanantes y una red de Hartig que abarcó de 2 a 3 capas de células corticales.

INTRODUCCIÓN

Pisolithus tinctorius es un hongo ectomicorrizógeno de amplia distribución que se asocia a una gran cantidad de plantas, incluyendo especies de *Abies*, *Arbutus*, *Arctostaphylos*, *Betula*, *Carya*, *Eucalyptus*, *Larix*, *Pinus* (Marx, 1977), *Populus*, *Pseudotsuga*, *Quercus*, *Salix* y *Tsuga* (Molina y Trappe, 1982). Entre las especies que forman ectomicorriza, ha sido una de las más estudiadas por la facilidad de obtener aislamientos a partir de sus carpóforos, su crecimiento rápido en condiciones axénicas y la facilidad de

* Laboratorio de Micología, Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas (C.I.C.B.), Universidad Autónoma de Tlaxcala (U.A.T.) Tlaxcala, Tlax.

** Laboratorio de Ecología Microbiana, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (E.N.C.B.), Instituto Politécnico Nacional (I.P.N.), Carpio y Plan de Ayala, 11340, México D.F.

Trabajo financiado por DGICSA, convenio C 90-01-0441 con número de registro 900439.

producir inoculantes a partir de su crecimiento en sustratos inertes (Molina y Palmer, 1982).

En México, *Pisolithus tinctorius* ha sido reportado en 19 de las 32 entidades de la República (Guzmán, 1973; Guzmán y Herrera, 1973; Welden y Guzmán, 1978; Ayala y Guzmán, 1984; Esqueda-Valle *et al.*, 1990; Pardavé, 1991), encontrándose desde Baja California Norte y Nuevo León en el Norte, hasta Veracruz y Oaxaca en el Sur.

Aún cuando *P. tinctorius* ha sido utilizado en viveros mexicanos en ensayos que han arrojado resultados prometedores (Valdés *et al.*, 1983; Estrada-Torres y Valdés, 1986; Quintos y Valdés, 1987) todos éstos se han llevado a cabo usando cepas extranjeras y hasta el momento no se ha probado la capacidad de ninguna cepa mexicana para formar micorriza, ni su efectividad al asociarse con plantas nativas. Debido a lo anterior, el propósito del presente trabajo fue evaluar la capacidad de un aislamiento de *P. tinctorius* (Pers.) Coker catalogado como TLAX 13 en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT) para formar micorrizas con *Pinus montezumae* Lamb., especie frecuentemente empleada en los programas de reforestación de la región central de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Las semillas de *P. montezumae* utilizadas en el ensayo procedieron de la región de San Juan Tetla, Puebla y fueron proporcionadas por el INIFAP, Coyoacán, México, D.F.

La cepa de *P. tinctorius* fue aislada de una nogalera ubicada cerca de la ciudad de Oaxaca y fue proporcionada por el CIIDIR, IPN.

Obtención de las plántulas. Las semillas de *P. montezumae* fueron desinfectadas superficialmente con peróxido de hidrógeno al 30 % durante 15 min, enjuagándolas después con agua destilada estéril (Piché y Fortin, 1982). Se colocó una semilla por cada tubo de ensayo de 200 X 30 mm conteniendo 40 ml de agar nutritivo de Ingestad inclinado (Mason, 1980), dejándose por 16 semanas (hasta notar la aparición de raíces secundarias) a temperatura ambiente y con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad (Piché y Fortin, 1982). Se adicionó agua destilada estéril cada vez que era necesario. Los tubos en los que se presentó contaminación por hongos o bacterias fueron desechados antes de la inoculación del hongo ectomicorrizógeno.

Preparación del micelio del hongo. Se sembraron de 5 a 8 cuadros de 5 X 5 mm de micelio de *Pisolithus tinctorius* crecido en papa dextrosa agar en matraces Erlenmeyer que contenían medio líquido de Melin y Norkrans modificado y pequeños trozos de vidrio. Los dispositivos se incubaron a 25°C durante 4 semanas, agitándolos manualmente cada tercer día (Marx y Bryan, 1975).

Inoculación. Las plántulas contenidas en los tubos se inocularon con 20 ml de micelio suspendido en el medio líquido.

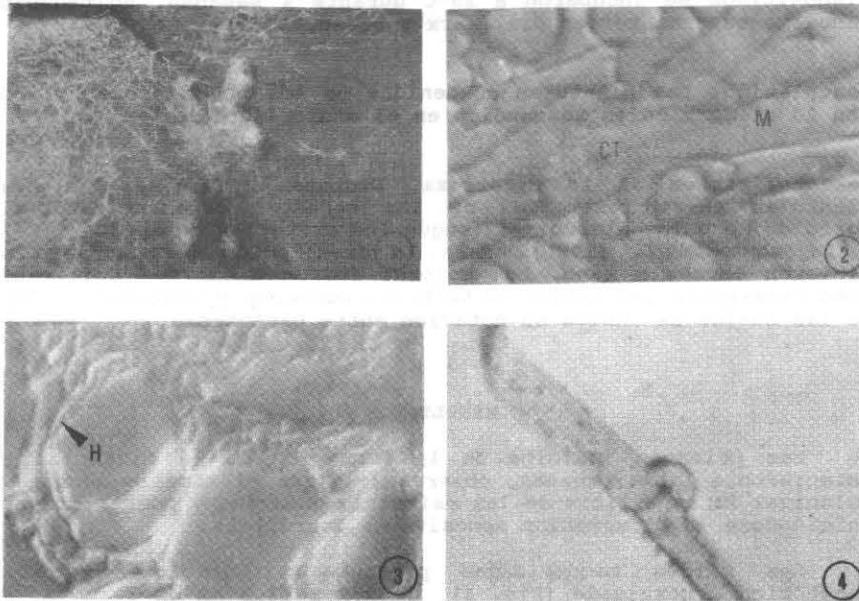
Caracterización de la micorriza. Después de 12 semanas, las plántulas fueron extraídas de los tubos, caracterizando la morfología de las micorrizas, según los criterios de Agerer (1987) e Ingleby *et al.* (1990). Para la descripción microscópica se hicieron cortes a mano. Los colores fueron descritos utilizando como referencia las tablas de Methuen (Kornerup y Wanscher, 1978), de las cuales se indica su notación entre paréntesis.

RESULTADOS

Los primeros indicios de la formación de la micorriza se detectaron a las 8 semanas, observándose que el micelio comenzó a colonizar la superficie de las raíces secundarias y posteriormente iniciándose la bifurcación sucesiva de los ápices.

Las raíces micorrizadas presentaron morfología simple, dicotómica o coraloide (Fig. 1), de 0.9 a 11.9 mm de largo total con puntas de 0.5 a 0.7 mm de largo y ejes de 0.2 a 0.7 mm de diámetro; las puntas fueron rectas, de color café dorado metálico (6D7) y fibrosas; se presentaron rizomorfos color café dorado (6D7), conectados con el manto en un solo punto y hasta de 0.1 mm de diámetro. También se observaron abundantes hifas emanantes. Algunas raíces llegaron a dicotomizarse sin formar micorriza.

Microscópicamente se presentó un manto grueso y denso hasta de 41 μm de ancho, la superficie con abundantes hifas emanantes de 3.5 a 4.5 μm de diámetro, septadas, con fíbulas, con pared delgada y frecuentemente anastomosadas; en la parte externa se encontró un prosénquima afelpado que al ir madurando formó bandas paralelas y un sinénquima con células tortuosas (Fig. 2); las hifas de ambos pseudotejidos, eran lisas y con pared delgada. La red de Hartig se encontró envolviendo de 2 a 3 capas de células corticales (Fig. 3). Los rizomorfos estaban formados por hifas de 2.5 a 6.0 μm de diámetro, de color amarillo claro con pared delgada, algunas de ellas incrustadas (Fig. 4).



LEYENDA DE LAS FIGURAS

Figs. 1 - 4. Micorriza formada entre *Pisolithus tinctorius* y *Pinus montezumae*.
1. Ramificación dicotómica X 25. 2. Manto (M) con algunas células tortuosas (CT) X 1250. 3. Red de Hartig (H) X 500. 4. Hifas de los rizomorfos con incrustaciones y fíbulas X 1250.

DISCUSIÓN

La morfología dicotómica a coraloide de la micorriza de *Pisolithus tinctorius* y *Pinus montezumae* corresponde a la forma típica de las micorrizas formadas por el género *Pinus* (Zak, 1973). Molina y Trappe (1982) ya habían establecido que las ectomicorrizas de *P. tinctorius* se distinguen por el color amarillo brillante que cambia al madurar a café dorado, la superficie del manto con abundantes hifas emanantes y rizomorfos, y la red de Hartig envolviendo de 2 a 3 capas de células corticales, características encontradas en la micorriza obtenida, salvo por el color que desde el principio era café dorado y que corresponde al color de la cepa mexicana utilizada. La morfología de la micorriza de *P. tinctorius* y *Pinus pinaster* también es semejante a la descrita, salvo que el color del manto se describe como blanco y no se menciona la presencia de rizomorfos (Azevedo, 1982). López-Olivarez y Fierros-González (1990) describieron una micorriza que atribuyeron a *P. tinctorius*, que fue obtenida a partir de muestras de raíces de *Pinus caribaea* Mor. var. *hondurensis* Barr. et Golf en una plantación del estado de Oaxaca. La micorriza aquí caracterizada se diferencia de la descrita por López-Olivarez y Fierros-González por presentar un color más oscuro, un manto fúngico de mayor espesor y la presencia de abundantes hifas emanantes y rizomorfos.

Aunque se ha comprobado que algunas cepas de *P. tinctorius* han formado micorriza con *Pinus montezumae* en ensayos de vivero (Valdés et al., 1983; Estrada-Torres y Valdés, 1986), dichos ensayos se han realizado usando cepas procedentes del extranjero. Por otro lado, solamente se tienen datos de un ensayo de síntesis de ectomicorriza *in vitro* usando plantas mexicanas (Marx, 1975), encontrándose que 6 especies de pino (*Pinus ayacahuite* Ehrenb., *P. leiophylla* Schiede & Deppe, *P. michoacana* Martínez, *P. pseudostrobus* Lindl., *P. rudis* Endl. y *P. teocote* Schiede & Deppe) formaron micorriza con una cepa extranjera de *P. tinctorius*. De esta forma, ésta es la primera vez que se logra la síntesis *in vitro* de una micorriza formada entre una planta nativa de México y una cepa de un hongo ectomicorrizógeno aislada en nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Biól. Patricia Sánchez del CIIDIR, IPN Unidad Oaxaca por la donación de la cepa de *Pisolithus tinctorius*, así mismo al Ing. Jaime Carrillo Sánchez del Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias del D. F. por la donación de semillas de *Pinus montezumae*.

LITERATURA CITADA

- Agerer, R., 1987. *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Einhorn-Verlag. Suabia.
- Ayala, N. y G. Guzmán, 1984. Los hongos de la península de Baja California, I. Las especies conocidas. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 19:73-91.
- Azevedo, N., 1982. Ectomicorrizas del *Pinus pinaster* Sol. Ex. Ait. *Bol. Est. Cen. Ecol.* 11:37-45.
- Esqueda-Valle, M., T. Quintero-Ruiz, E. Pérez-Silva y A. Aparicio-Navarro, 1990. Nuevos registros de gasteromicetos de Sonora. *Rev. Mex. Mic.* 6:91-104.
- Estrada-Torres, A. y M. Valdés, 1986. El crecimiento y la micorrización de plántulas de pino inoculadas con *Pisolithus tinctorius* en el semillero o en el envase de transplante. *Biotica* 11:137-142.
- Guzmán, G., 1973. Hongos mexicanos (macromicetos) en los herbarios del extranjero, II. Especies del Herbario de Farlow, de la Universidad de Harvard, E. U. A. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 7:121-127.
- Guzmán G. y T. Herrera, 1973. Especies de macromicetos citados de México, IV. Gasteromicetos. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 7:105-119.
- Ingleby, K., P. A. Mason, F. T. Last y L. V. Fleming, 1990. *Identification of Ectomycorrhizae*. Institute of Terrestrial Ecology, Londres.
- Kornerup, A. y J. H. Wanscher, 1978. *Methuen Handbook of Colour*. Methuen, Londres.
- López-Olivarez, C. R. y A. M. Fierros-González, 1990. Estudio morfológico de ectomicorrizas en plantaciones de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* en La Sabana, Oaxaca, México. *Micol. Neotrop. Apl.* 3:31-39.
- Marx, D. H., 1975. Mycorrhizae of exotic trees in the Peruvian Andes and synthesis of ectomycorrhizae on Mexican pines. *Forest Sci.* 21:353-358.
- Marx, D. H., 1977. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Can. J. Microbiol.* 23:217-223.
- Marx, D. H. y W. C. Bryan, 1975. Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *Forest Sci.* 21:245-254.
- Mason, P. A., 1980. Aseptic synthesis of sheathing (ecto-) mycorrhizas. In: Ingram D. S. y J. P. Helgeson (eds.). *Tissue Culture Methods for Plant Pathologist*. Blackwell Scientific Publications, Londres.
- Molina, R. y J. G. Palmer, 1982. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: Schenk N. C. (ed.) *Methods and principles of mycorrhizal research*. APS press, San Pablo.
- Molina, R. y J. M. Trappe, 1982. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. *Forest Sci.* 28:423-458.
- Pardavé, L. M., 1991. Gasteromicetos del estado de Aguascalientes. *Rev. Mex. Mic.* 7:71-78.
- Piché, Y. y J. A. Fortin, 1982. Development of mycorrhizae, extramatrical mycelium and sclerotia in *Pinus strobus* seedlings. *New Phytol.* 91:211-220.

- Quintos, M. y M. Valdés, 1987. El desarrollo de micorriza y el crecimiento de plántulas de pino real (*Pinus engelmannii*) al inocularse con *Pisolithus tinctorius*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 29:189-192.
- Valdés, M., F. Piña y R. Grada, 1983. Inoculación micorrícica y crecimiento de plántulas de pino en suelo erosionado. *Bol. Soc. Mex. Mic.* 18:65-70.
- Welden, A. L. y G. Guzmán, 1978. Lista preliminar de los hongos, líquenes y mixomicetos de las regiones de Uxpanapa, Coatzacoalcos, Los Tuxtlas, Papaloapan y Xalapa (parte de los estados de Veracruz y Oaxaca). *Bol. Soc. Mex. Mic.* 12:59-102.
- Zak, B., 1973. Clasificación of Ectomycorrhizae. In: Marks G. C. y T. T. Kozlowski (eds.). *Ectomycorrhizae. Their Ecology and Physiology*. Academic Press, Nueva York.