

ISBN: 978-607-8833-00-9



TÉCNICAS DE AISLAMIENTO, CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE

CEPAS DE HONGOS

EN EL LABORATORIO



GERARDO MATA • DULCE SALMONES

EDITORES

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C.
CENTRO PÚBLICO DE INVESTIGACIÓN
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Dr. Miguel Rubio-Godoy
Director General

Dr. Víctor Manuel Bandala Muñoz
Secretario Académico

Dr. Mario Enrique Favila Castillo
Secretario de Posgrado

M.R.T. Alberto Risquez Valdepeña
Secretario Técnico

Lic. Rubey Baza Román
Director de Administración

TÉCNICAS DE AISLAMIENTO, CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE

CEPAS DE HONGOS

EN EL LABORATORIO

GERARDO MATA • DULCE SALMONES
EDITORES

EDITORES
Gerardo Mata
Dulce Salmones

DISEÑO Y FORMACIÓN
Alternativa, Gráfica Digital

e-ISBN: 978-607-8833-00-9
ISBN: (en trámite)

© INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C.
Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, Xalapa, Veracruz, CP 91073
www.inecol.mx

Reservados todos los derechos. No se permite la reproducción total o parcial de este libro, ni el almacenamiento en un sistema informático, ni la transmisión de cualquier forma o por cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopia, registro u otros medios sin el permiso previo y por escrito del titular de los derechos patrimoniales.

Esta obra fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través del proyecto fordecyt 273647: Estrategia para fortalecer la competitividad de la cadena agroalimentaria microbiana emergente de los hongos comestibles, funcionales y medicinales, en los Estados de Puebla, Veracruz y Oaxaca, mediante el desarrollo e implementación de procesos biotecnológicos para la producción de semilla mejorada.

1ª. edición, 2021
Impreso en México

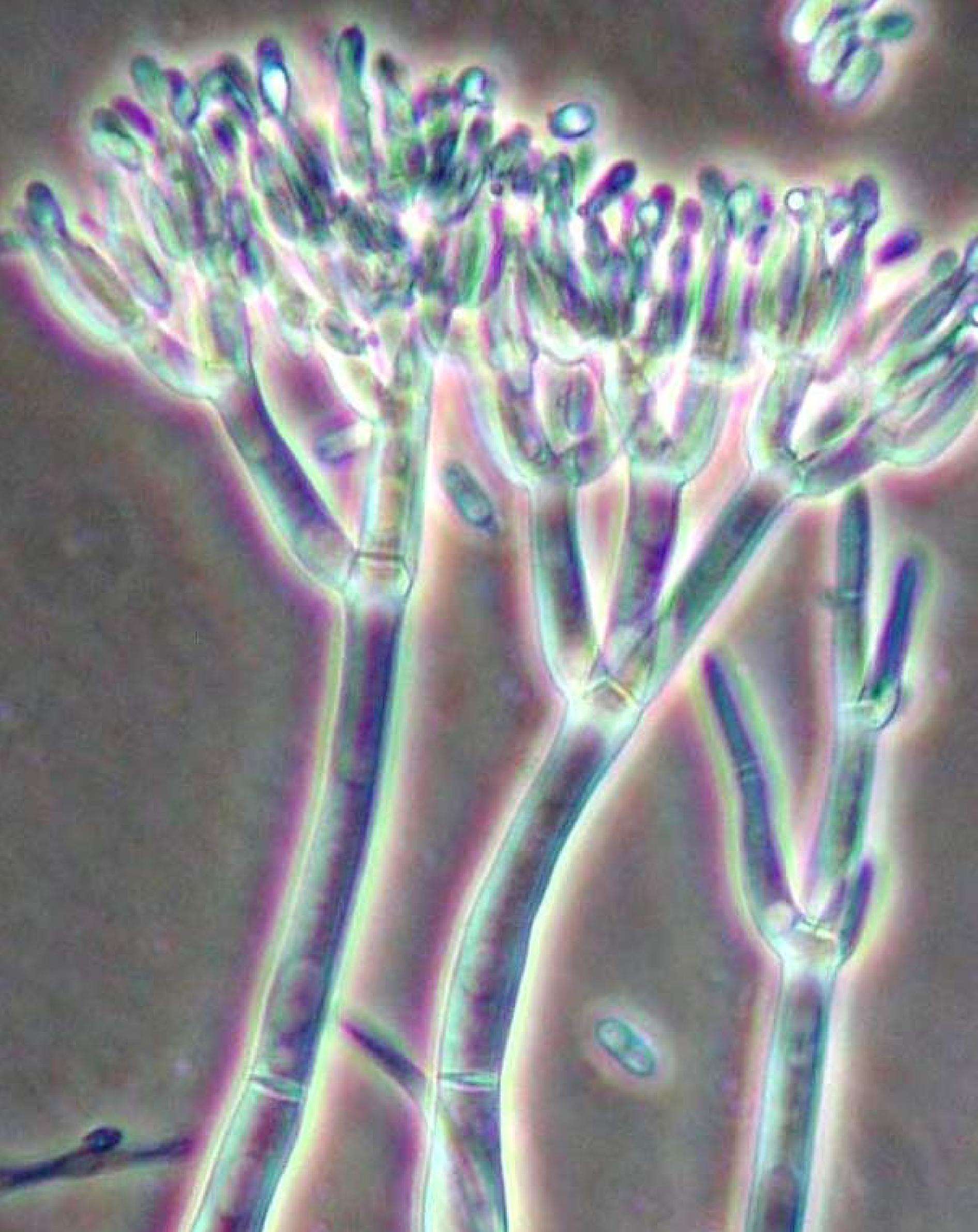
Tiraje: 300 ejemplares

Foto de portada:
Gerardo Mata

Cita bibliográfica:
Mata, G., D. Salmones (eds.), 2021. Técnicas de aislamiento, cultivo y conservación de cepas de hongos en el laboratorio. Instituto de Ecología, A.C., Xalapa, México. XX pp.

CONTENIDO

	PRÓLOGO <i>Daniel Martínez-Carrera</i>	7
I	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS <i>Dulce Salmones, Gerardo Mata</i>	11
II	CICLO DE VIDA Y TIPO DE AISLAMIENTO <i>Gerardo Mata, Dulce Salmones</i>	23
III	CARACTERIZACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE HONGOS COMESTIBLES CULTIVADOS <i>Rigoberto Gaitán-Hernández</i>	37
IV	TÉCNICAS BÁSICAS DE CONSERVACIÓN DE CEPAS DE HONGOS <i>Gerardo Mata y Dulce Salmones</i>	47
V	HONGOS SAPRÓTROFOS DEL SUELO <i>Gabriela Heredia Abarca</i>	59
VI	HONGOS ENTOMOPATÓGENOS, MICOPARÁSITOS Y NEMATÓFAGOS <i>Gloria Carrión, Daniel López-Lima, Zelene Durán Barradas</i>	73
VII	AISLAMIENTO DE CEPAS DE HONGOS ECTOMICORRIZICOS Y PRODUCCIÓN DE INÓCULO FORESTAL <i>Faustino Hernández-Santiago, Magdalena Martínez Reyes, Jesús Pérez-Moreno, Anaitzi Carrera Martínez, José Leonardo García-Rodríguez</i>	87
VIII	HONGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES <i>Dora Trejo Aguilar</i>	101
IX	HONGOS ENDÓFITOS <i>Rosario Medel-Ortiz, Elmira San Martín, Pedro Ríos Cortes, Ma. Emilia Belingheri Lagunes</i>	115
X	IMPORTANCIA DE LAS COLECCIONES <i>EX SITU</i> DE HONGOS <i>Dulce Salmones, Gerardo Mata</i>	125
	PROTOCOLOS DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	131
	GLOSARIO	155
	LECTURAS RECOMENDADAS	163



PRÓLOGO

Los avances de la biotecnología en los últimos cuarenta años han sido realmente sorprendentes. Hemos sido testigos privilegiados de una serie de innovaciones que permitieron, en un período relativamente corto de tiempo, el desarrollo y la aplicación de las herramientas más poderosas creadas por la humanidad. Me refiero a las tecnologías que permiten extraer, purificar, secuenciar, estudiar, transformar, editar, y sintetizar el ácido desoxirribonucleico (ADN), pasando de su simple caracterización y expresión a la transformación genética y la biología sintética, con altos niveles de precisión, eficiencia y rapidez, a costos cada vez más accesibles. Otros avances paralelos en diferentes campos de conocimiento acompañan y potencian significativamente estas tecnologías, tales como la bioinformática o el supercómputo. El creciente impacto de las aplicaciones biotecnológicas se observa en prácticamente todas las facetas de la actividad humana, en la salud, la alimentación, la agricultura, el ambiente, la industria e, incluso, en la cultura. En las próximas décadas, la nueva era de la bioeconomía fortalecerá el desarrollo de aquellas naciones que logren posicionar a la biotecnología como una de sus prioridades, generando bienes y servicios en beneficio de la sociedad, a partir de sistemas y procesos biológicos orientados a la sustentabilidad y desarrollados en un contexto de mayor reflexión en los campos de la bioética, la bioseguridad y la legalidad.

Los países con mayor diversidad biológica cuentan con el patrimonio más valioso, los recursos genéticos de origen animal, vegetal y microbiano que conforman el fundamento del trabajo biotecnológico. El valor real o potencial de sus unidades y componentes funcionales (genes, secuencias genéticas, nucleótidos, aminoácidos, bibliotecas de genes, mecanismos moleculares de acción), representan la gran riqueza que las naciones, cada vez en mayor medida, deben aprender a conservar, identificar, defender, caracterizar, mejorar, manejar y utilizar para desarrollar su bioeconomía. En México, país donde converge una amplia diversidad cultural, biológica y ecológica, ya se han implementado acciones relevantes en esta dirección, firmando y ratificando los principios y acuerdos de la Convención sobre Diversidad Biológica (1993) y el Protocolo de Cartagena (2003). También se ha creado la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Sin embargo, es necesario reconocer que existen en la actualidad diversas amenazas reales a la gran oportunidad que representa la bioeconomía. Los efectos adversos del cambio climático (menor disponibilidad de agua, mayores temperaturas, fenómenos me-

teorológicos extremos) sobre los ecosistemas naturales constituyen el mayor reto a nivel global, seguido por la creciente devastación antropogénica de los hábitats naturales, la pérdida del conocimiento tradicional, la biopiratería, las especies invasoras, y la escasa capacidad de conservación *in situ* e *in vitro* (infraestructura, recursos humanos especializados, técnicas, atención a regiones estratégicas). Se requiere entonces del establecimiento de nuevas acciones urgentes y a mayor profundidad para evitar la pérdida irreparable de los recursos genéticos en cada país.

En este contexto emerge la presente obra, abordando uno de los Reinos más interesantes y complejos de la naturaleza. El Reino Fungi incluye una amplia diversidad de organismos esenciales en la naturaleza y fundamentales para mantener la vida en nuestro planeta. Su condición microscópica retrasó durante siglos el estudio sistemático de los hongos, prácticamente hasta el advenimiento del microscopio en el siglo XVII. Durante los siglos XIX y XX, los cultivos axénicos *in vitro* y las técnicas de criopreservación permitieron desarrollar colecciones importantes para la conservación de los hongos en todo el mundo, profundizando la generación de conocimiento con diversos protocolos complementarios, clásicos y moleculares. En este caso, los autores procedentes de diversas instituciones y expertos en diferentes campos de conocimiento, abordan de manera integral las principales técnicas para el aislamiento, estudio, producción, y conservación *in vitro* de hongos comestibles cultivados; hongos saprotrofos del suelo; hongos entomopatógenos, micoparásitos y nematófagos; hongos ectomicorrízicos; hongos micorrízicos arbusculares; y hongos endófitos. También presentan una guía práctica para la elaboración de diversos medios de cultivo, un glosario con las definiciones más relevantes, así como un listado con la bibliografía recomendada por capítulo. En su conjunto, el presente libro integra y sintetiza la valiosa experiencia de años de trabajo de cada uno de los grupos de investigación. Su impacto será significativo no sólo en la educación de licenciatura y postgrado, sino también en la investigación científica, así como en la recolección, la conservación, la identificación, la caracterización, y el mejoramiento de los recursos genéticos del Reino Fungi, contribuyendo así al desarrollo de aplicaciones biotecnológicas que generen beneficios sociales, económicos y ecológicos en México.

Dr. Daniel Martínez-Carrera

Profesor investigador titular

*Centro de Biotecnología de Hongos Comestibles,
Funcionales y Medicinales (CP-SADER-CONACYT)
Colegio de Postgraduados, Campus Puebla, México*

Junio, 2021





CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS HONGOS

Dulce Salmones, Gerardo Mata

Red Manejo Biotecnológico de Recursos, Instituto de Ecología, A.C.
Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya C.P. 91073, Xalapa, Veracruz, México
dulce.salmones@inecol.mx

Los hongos son un grupo de organismos que constituyen el reino Fungi (hongos en latín), cuya delimitación ha sido difícil de precisar debido a su variabilidad de formas y características heterogéneas, que no siempre muestran relaciones filogenéticas definidas. Son organismos eucariotas, que se caracterizan por presentar una **nutrición heterótrofa** y se diferencian de otros grupos por contener quitina en sus paredes celulares (Figura 1). Son pluricelulares y sus células se agrupan formando hifas, las cuales son filamentos tabicados en la mayoría de las veces, o no tabicados, como en algunos mohos. Un conjunto de hifas se entrelaza formando el **micelio**, estructura de aspecto generalmente algodonoso, que penetra en el sustrato en que se desarrollan.

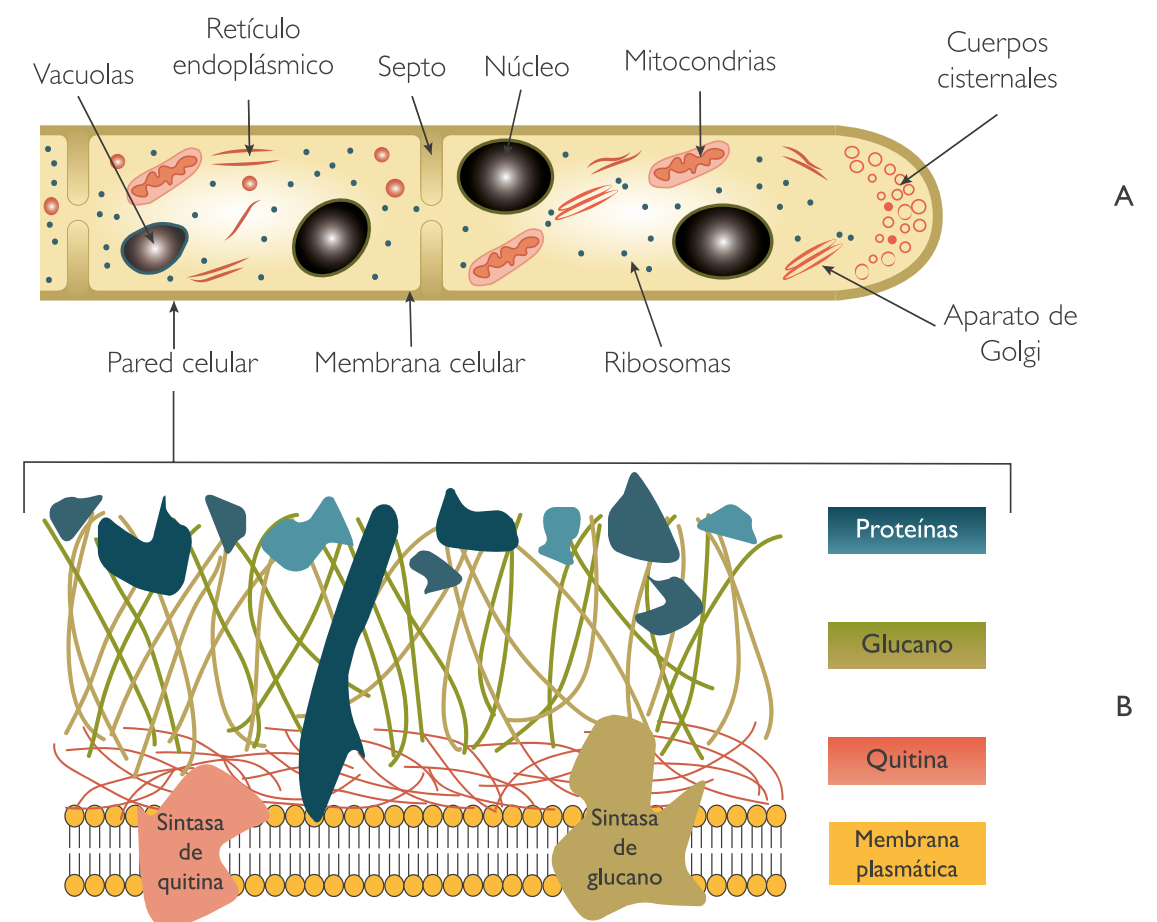


Figura 1. A: Componentes celulares de un hongo, destacando las capas de polisacáridos y proteínas de la pared celular B: que dan lugar a una estructura rígida, de gran plasticidad, que controla la permeabilidad de la célula y su interacción con el medio externo.

Se han descrito alrededor de 120,000 especies de hongos, pero se calcula que podrían existir más de 1.5 millones, aunque probablemente una gran parte se extinguirá antes de que la ciencia los descubra, debido al rápido deterioro que están sufriendo los diferentes ecosistemas terrestres y acuáticos en que habitan.

Los hongos son considerados los principales descomponedores de materia orgánica en la naturaleza. De acuerdo con el tipo de sustancias orgánicas que aprovechan y de la dependencia con otros organismos vegetales o animales, se les clasifica en **saprobios**, **parásitos** o **simbiontes**.

Las especies saprobias, las más abundantes, se alimentan de materia orgánica inerte o en descomposición, mientras que las especies parásitas se alimentan de células vivas de sus hospedantes; éstos pueden ser animales, incluso el hombre, aunque la mayoría ataca a especies vegetales, muchas de ellas de gran importancia económica. El tercer grupo se caracteriza por asociarse con especies vegetales para vivir en simbiosis, con mutuos beneficios para las especies involucradas (Figura 2).

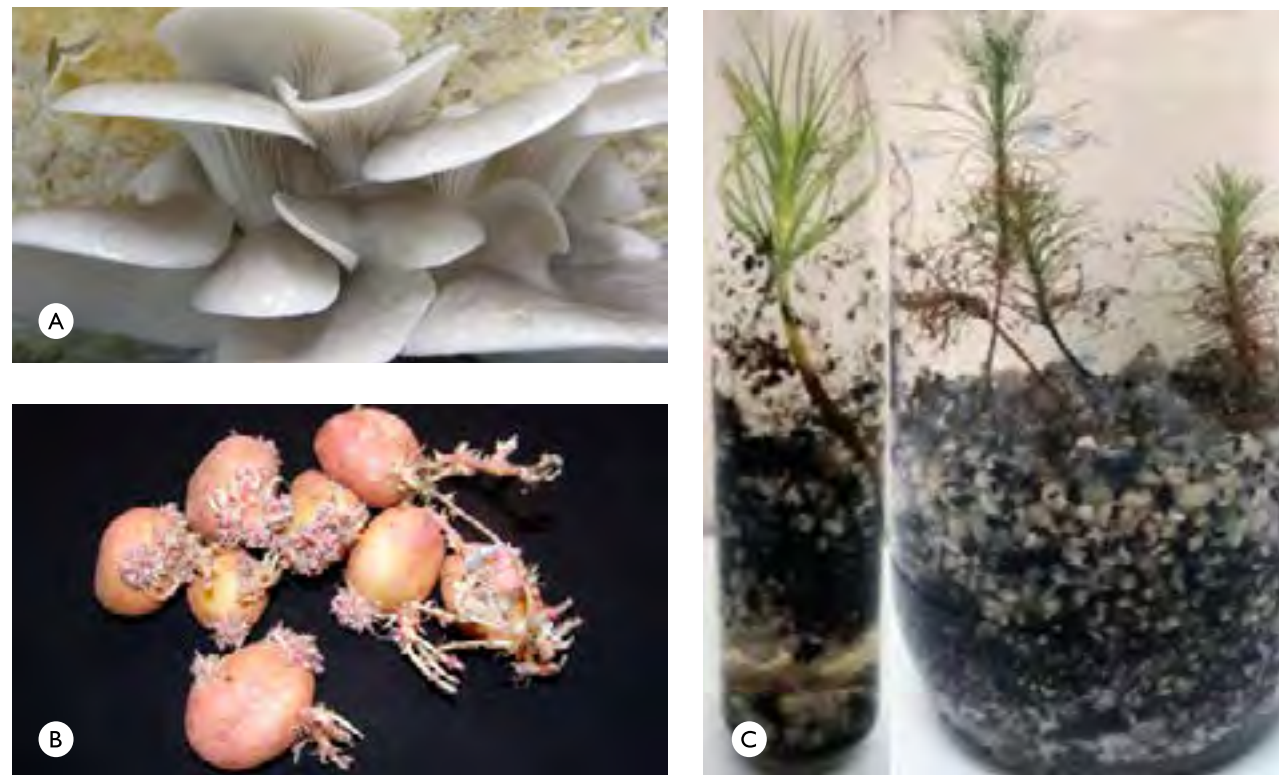


Figura 2. Tipos de nutrición en hongos. **A:** saprobia, *Pleurotus pulmonarius* (setas) cultivado en paja. **B:** parásita, *Fusarium ventricosum* creciendo en raíces de papa. **C:** simbiote, *Boletus* sp. asociado a una plántula de *Pinus montezumae*.

Aunque muchas especies, especialmente parásitas y simbióticas, tienen una distribución restringida o **endémica** porque su supervivencia depende de otros organismos, los hongos constituyen un grupo de organismos ampliamente diverso y predominante en el planeta, ya que sus características morfológicas y fisiológicas han favorecido su distribución cosmopolita. Además, la característica saprobia resulta altamente ventajosa para su propagación y conservación en condiciones de laboratorio.

El micelio de los hongos presenta diferentes características morfológicas y fisiológicas, entre las que destacan: i) tamaño, ya que pueden medir desde pocos milímetros (microscópicos) hasta varios metros (macros-

cópicos), en este último caso formando cordones o anillos en los restos vegetales en que crecen; ii) por su forma, ya que puede ser amorfa o definida, como el micelio que se cultiva *in vitro* en el laboratorio, que generalmente muestra un crecimiento circular; iii) por la presencia o ausencia de **septos**, en este último caso las hifas tabicadas son separadas por estructuras transversales; iv) por su posición en el sustrato, aéreo o rastrero, del micelio aéreo generalmente se forman las estructuras reproductivas; v) por su aspecto, ya que pueden ser algodonosos, aterciopelados, crostosos, terrosos, cerosos, entre los más comunes; vi) por su color, aunque la mayoría son blanquecinos o **hialinos**, algunas especies generan pigmentos que se fijan en el protoplasma y pueden presentar tonalidades rojas, amarillas, rosadas, verdes, azules, violáceas, grisáceas, parduzcas, incluso negras; vii) por su función, ya que los micelios de la etapa vegetativa deben secretar diversas enzimas extra e intracelulares para la absorción y asimilación de los nutrientes del sustrato, mientras que los micelios de la etapa reproductiva forman las estructuras en donde se presentan los elementos que permiten la perpetuidad del organismo. Durante mucho tiempo, algunas de las características del micelio anteriormente descritas fueron consideradas importantes para la identificación de las especies, sin embargo, la mayoría no son estables y pueden variar dependiendo del ambiente en que crecen. Esta variabilidad es aún más notoria en los cultivos *in vitro*, ya que la modificación de los factores de crecimiento puede inducir cambios en las características del micelio (Figura 3).

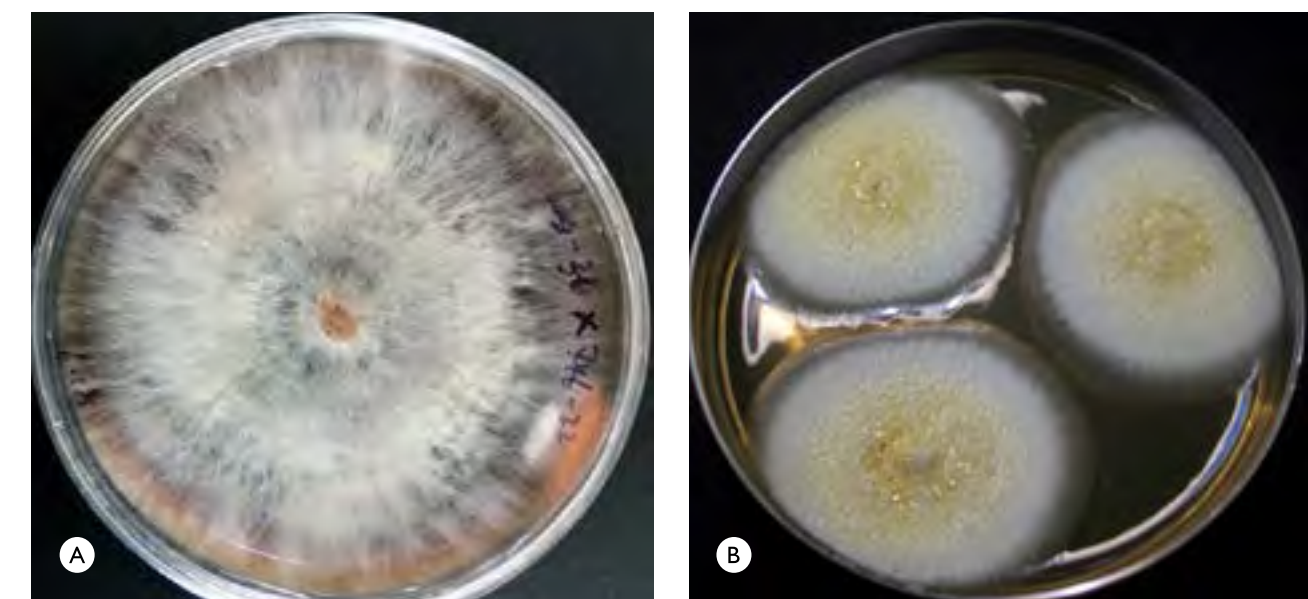


Figura 3. Micelio de hongos creciendo *in vitro* en medio de cultivo. **A:** *Agaricus bisporus* (champiñón, comestible). **B:** *Aspergillus* sp. (parásito).

CONDICIONES AMBIENTALES DE CRECIMIENTO

Al igual que otros organismos, los hongos también requieren que las condiciones físicas y químicas del ambiente en que crecen sean las adecuadas para su desarrollo. Estos factores, denominados **abióticos**, pueden variar dependiendo de las condiciones de cultivo, es decir, *in vitro* o *in situ*, así como de la etapa en que se encuentren de su ciclo de vida. Los principales factores **abióticos** que influyen en el desarrollo de los hongos se describen a continuación:

Agua

Todos los hongos necesitan agua para tomar los nutrientes a través de la pared celular, así como llevar a cabo ciertas reacciones enzimáticas. Es por ello, que la cantidad de agua existente en el ambiente y en los sustratos es uno de los factores importantes para el desarrollo de los hongos. Sin embargo, no sólo influye la cantidad de agua sino también la forma de presentación de la misma, es decir, si se encuentra en forma libre o en forma combinada. El total del agua disponible para el crecimiento de un organismo se denomina actividad de agua (*aw*, por sus siglas en inglés). Todos los organismos requieren un mínimo de agua disponible para llevar a cabo sus procesos metabólicos, en el caso de los hongos, una *aw* de 0.7 es el valor mínimo en que pueden crecer y un *aw* de 0.96 es el óptimo para su crecimiento.

Además, la turgencia de las hifas está influenciada por el movimiento del agua intracelular y el transporte de iones, principalmente K^+ , Na^+ y Cl^- , a través de la membrana celular.

pH

Los hongos toleran un gran intervalo de pH (2.5-7.5), aunque de manera general soportan mejor el medio ácido que el alcalino. Es interesante destacar que estos organismos tienen la capacidad de modificar el pH del medio utilizando los ácidos orgánicos presentes.

El pH también influye en la disociación y la solubilidad de muchas moléculas, la disponibilidad de los nutrientes como amonio y fosfato y la movilidad de los metales pesados tóxicos, como el cobre. Por ejemplo, los iones Mg y los fosfatos son solubles en condiciones ácidas, pero a pHs básicos se reduce su disponibilidad.

Temperatura

Los hongos, al igual que otras formas vivientes, se pueden agrupar dependiendo de los intervalos de temperatura en que se desarrollan. La mayoría de los hongos son mesófilos, es decir, pueden crecer entre 10 a 40 °C, con un intervalo de crecimiento óptimo entre 25 y 30 °C, por lo que pueden crecer en una gran variedad de ambientes naturales, así como en condiciones de laboratorio. Por el contrario, las especies psicrófilas no pueden crecer a temperaturas mayores de 20 °C, ya que su crecimiento óptimo es entre 0 y 15 °C. Existen diferentes ambientes naturales en que crecen las especies psicrófilas, como las regiones polares y los océanos, aunque en las actividades cotidianas también es posible estar interactuando con estos organismos, por ejemplo, especies del género *Penicillium*, conocidos comúnmente como mohos, se encuentran frecuentemente creciendo en restos de comida en refrigeración (≈ 4 °C), incluso *Penicillium expansum* y *P. cyclopium* son capaces de crecer a 0 °C.

Por el contrario, los hongos termófilos presentan un mínimo de temperatura de crecimiento a 20 °C y un máximo a 60 °C, con un intervalo óptimo entre 40 y 50 °C. Uno de los ambientes más comunes en que se pueden encontrar las especies termófilas es en la preparación de las compostas, ya que durante la degradación de la materia orgánica se presenta una etapa termófila que favorece la proliferación de especies termotolerantes, como son algunas del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. candidus* y *A. fumigatus*), que pueden crecer sin problemas hasta los 55 °C.

Luz

La luz visible y cercana al espectro ultravioleta influye poco en el crecimiento vegetativo de los hongos, aunque el uso de luz azul puede inducir la pigmentación del micelio. Por el contrario, una larga exposición a la luz ultravioleta es letal para el hongo. Las condiciones de luz tienen un mayor efecto durante la etapa reproductiva de las especies (Figura 4), ya que en muchas especies de hongos **basidiomicetos** las condiciones de iluminación, aunado a bajas concentraciones de CO_2 , inducen la formación de los basidiomas o cuerpos fructíferos. La luz también tiene efecto de **fototropismo** en las ascas de algunos **ascomicetos** y en la acción de mecanismos de esporulación de diversas especies, por ejemplo, el género *Pilobolus* tiene un mecanismo expulsor del **esporangio** que actúa por acción de la luz y arroja las esporas a distancias de hasta dos metros. Otros hongos, como es el caso de *Neurospora*, muestra un ritmo diario de crecimiento y esporulación en respuesta a la alternancia de luz solar indirecta y oscuridad nocturna, que se manifiesta en el micelio presentando anillos morfológicamente distintos.

Oxígeno y dióxido de carbono

La mayor parte de los hongos son **aerobios** y por lo tanto necesitan oxígeno para el desarrollo de sus reacciones metabólicas. Por ejemplo, los cultivos de *Aspergillus nidulans* a una presión parcial de oxígeno reducida (0.02 bar) provocan la formación de células levaduriformes, mientras que en *A. niger* la velocidad de producción de ácido cítrico aumenta con una presión parcial de oxígeno hasta 0.8 bar. La carencia de oxígeno condiciona el crecimiento de los hongos y la ausencia total puede llegar a producir la muerte de éstos.

Aunque la mayoría de los hongos son aerobios obligados, los requerimientos de oxígeno varían entre las especies, las condiciones de crecimiento y los diferentes estados fisiológicos del organismo. Los hongos aerobios usan oxígeno como receptor final de electrones en el proceso de la respiración, lo que proporciona la energía necesaria para la oxidación de los compuestos orgánicos. Existen especies **aerobias facultativas**, como *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus fumigatus*, que también pueden crecer en condiciones anaerobias, tomando la energía de la fermentación de azúcares presentes en el medio, aunque este tipo de respiración proporciona un menor rendimiento que las condiciones aerobias.

Por otra parte, todos los hongos necesitan el dióxido de carbono, ya que es un compuesto que se requiere para llevar a cabo las reacciones de **carboxilación** que generan estructuras como los ácidos grasos, entre otros. Es importante destacar que los hongos que pueden crecer en condiciones anaerobias son favorecidos por altas concentraciones de CO_2 en el medio, al contrario de las especies aerobias que pueden inhibir su crecimiento bajo estas condiciones de cultivo.



Figura 4. Variaciones de color observadas en los basidiomas de una cepa de *Pleurotus djamor* cultivada bajo diferentes condiciones de iluminación.

En condiciones aerobias, los hongos convierten la glucosa a dióxido de carbono y agua. El CO₂ es mucho más soluble que el O₂ en el agua, ya que se disuelve en forma de ácido carbónico que rápidamente se disocia en iones bicarbonato (HCO₃⁻). El equilibrio entre estas dos moléculas puede variar dependiendo del pH del medio, ya que estudios en cultivos de laboratorio han mostrado que los hongos son más sensibles al ion HCO₃⁻ que al ácido carbónico, inhibiendo su crecimiento. Si a ello se agrega la mayor solubilidad del CO₂ en el agua, se producen condiciones de cultivo desfavorables para óptimo desarrollo de los cultivos. Es por ello recomendable proporcionar aireación a los cultivos de hongos en medios líquidos.

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LOS HONGOS

Macroelementos esenciales

Carbono

Este elemento orgánico es utilizado como material estructural del micelio y para el suministro de energía en los procesos de oxidación. Considerando que la mayor parte del peso seco del hongo es carbono, los hongos requieren mayor concentración de este elemento, en comparación con otros componentes estructurales.

La mayoría de los hongos utilizan monosacáridos como fuente de carbono, especialmente glucosa. Este azúcar es fácilmente difusible a través de la membrana celular. La utilización de otras fuentes de carbono, como disacáridos, amino azúcares (glucosamina) ácido azúcares (ácido galacturónico) y alcohol azúcares (manitol), dependerá de la presencia de transportadores de membrana adecuados, así como de la capacidad de secretar enzimas específicas para la degradación y aprovechamiento de la glucosa, ya que antes de entrar a la célula, las estructuras complejas deberán desdoblarse enzimáticamente.

Nitrógeno

Es un elemento estructural requerido por el hongo para llevar a cabo satisfactoriamente su crecimiento micelial, ya que es metabolizado para proveer proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular. Todos los hongos pueden utilizar el ácido glutámico como fuente de nitrógeno, ya que a partir de este aminoácido y por medio de reacciones de transaminación, pueden producir el resto de los aminoácidos esenciales.

La mayoría de los hongos pueden utilizar amonio (NH₄) como fuente de nitrógeno y combinarlo con ácidos orgánicos para producir los aminoácidos ácido glutámico y/o ácido aspártico por reacciones de transaminación. Sin embargo, no es recomendable adicionar amonio a cultivos *in vitro* porque puede haber un intercambio de iones hidrógeno y eso produce un pH ácido (4 o menos), que afecta el crecimiento de ciertas especies de hongos.

Muchos hongos también pueden utilizar nitratos como fuente de nitrógeno y convertirlos a amonio con la acción de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa. Sin embargo, estos organismos siempre tendrán preferencia por utilizar preferentemente amonio como fuente de nitrógeno.

En condiciones de cultivo, los hongos prefieren consumir nitrógeno orgánico, por lo que algunos medios de cultivo contienen urea, extractos de origen animal (carne, cerebro, hígado, etc.) o vegetal (peptona, soya, papa, harina de maíz, etc.), así como hidrolizados de caseína que contienen diversos aminoácidos que favorecen un rápido crecimiento micelial. En medios de cultivo que contienen compuestos de nitrógeno inorgánico, es recomendable agregar aminoácidos como el glutamato y la asparagina, para que se realicen procesos de transaminación a partir de éstos.

Fósforo

Los hongos, como otros organismos, necesitan fósforo en la forma de fosfato para la producción de azúcares fosfatados, ácidos nucleicos, ATP y fosfolípidos, entre otros. A diferencia de las plantas, que tienen dificultad de extraer este elemento del suelo, los hongos tienen varios caminos para obtenerlo, incluso almacenándolo como polifosfatos en las vacuolas. Es por ello que resulta tan beneficiosa la asociación simbiótica llamada micorriza, existente entre ciertas especies de plantas y hongos.

Microelementos esenciales

El azufre constituye aminoácidos azufrados y vitaminas, el potasio y el sodio son reguladores osmóticos intracelular y el magnesio participa como regulador de diversos procesos metabólicos, como la cadena respiratoria. El hierro es esencial como donador o aceptor de electrones en los procesos celulares, incluyendo el sistema citocromo, que participa en el transporte de energía química, respiración aeróbica y metabolismo oxidativo de los compuestos xenobióticos. El calcio participa en la mitosis celular y estimula la formación de esporas. Zinc, manganeso y cobre son esenciales para la actividad de algunas enzimas ligninolíticas, como las oxidasas; además el Cu aporta pigmentación a las esporas.

Vitaminas

Son compuestos orgánicos que funcionan como enzimas o son parte de ellas, catalizando importantes reacciones químicas del metabolismo de los hongos. Todos los hongos necesitan vitaminas, aunque los requerimientos pueden variar entre especies, incluso entre cepas. Algunos hongos pueden sintetizar las vitaminas a partir de fuentes nitrogenadas o minerales, pero no todas las especies las producen en cantidades suficientes para alcanzar su crecimiento óptimo, por lo que es recomendable la adición de estos compuestos al medio de crecimiento, especialmente la tiamina (B1) ya que su deficiencia afecta el aprovechamiento de los azúcares y la actividad ligninolítica del organismo. Biotina, riboflavina, piridoxina (B6), ácido pantoténico y ácido fólico son otras vitaminas importantes que requieren los hongos para su crecimiento.

Composición y preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo son una disolución de nutrientes que permiten aislar y cultivar microorganismos, en este caso hongos, en el laboratorio. Dependiendo de los elementos que incorporemos en el medio de cultivo, los organismos podrán variar su morfología y comportamiento fisiológico (Figura 5).

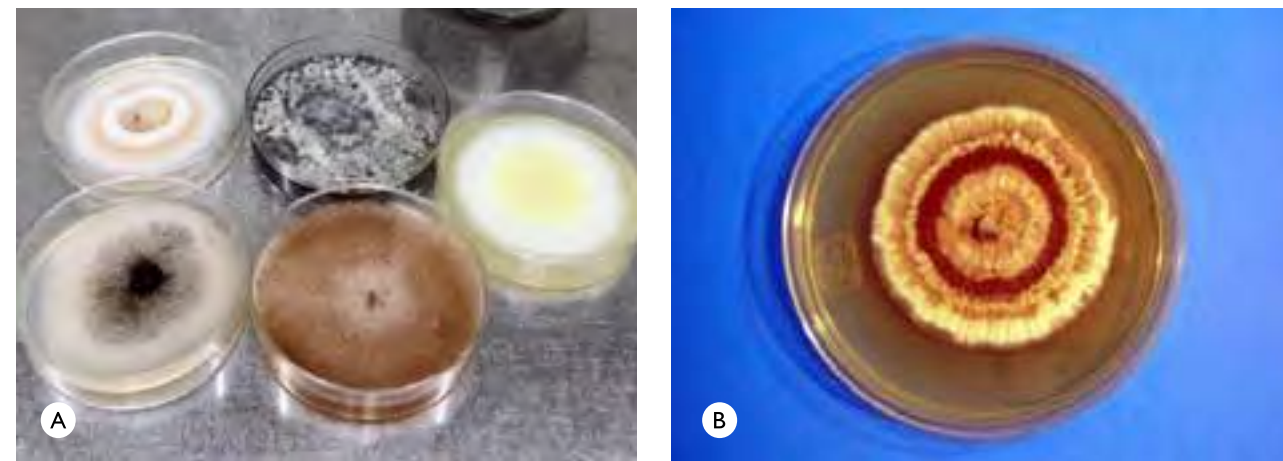


Figura 5. Diferentes morfologías presentadas por los micelios de hongos *in vitro*.

A: hongos entomopatógenos en diversos medios de cultivo. B: formación de zonas concéntricas en una cepa de *Boletus* sp. cultivada en el laboratorio.

Los medios de cultivo se pueden clasificar considerando diversos criterios, pero de manera general se pueden catalogar por su composición química, estado físico y finalidad. Con respecto a su composición química, se clasifican en definidos o sintéticos, aquellos en que se utilizan compuestos de alta pureza por lo que se conoce cualitativa y cuantitativamente su composición química; mientras que los medios de cultivo indefinidos se preparan con extractos de origen vegetal, microbiana o animal, por lo que su composición química exacta puede variar, dependiendo del origen y calidad de los extractos empleados.

Los medios de cultivo también se clasifican por el estado físico que presentan: sólido, líquido o semisólido. A los medios sólidos se les agrega un componente solidificante, generalmente agar, un polisacárido extraído de las algas, cuya función es inmovilizar las células para favorecer un crecimiento en forma de masas algodonosas; mientras que los medios líquidos, comúnmente llamados caldos, se utilizan para obtener una determinada concentración de componentes fúngicos, como pueden ser las esporas y/o el micelio (Figura 6).

En los cultivos semisólidos se incorpora una menor concentración de agar (menor al 15 %) para que se logre esta consistencia. De acuerdo con su finalidad, los medios de cultivo pueden ser generales, enriquecidos, selectivos, diferenciales y especializados. Los medios generales se preparan con los componentes orgánicos e inorgánicos mínimos que favorecen el crecimiento de diversas especies de hongos. Papa, dextrosa, y agar, y extracto de malta y agar son los medios generales más utilizados para el cultivo de hongos. En los medios enriquecidos se incorporan complementos nutricionales, entre ellos algunos hidrolizados de origen vegetal, microbiano o animal, que favorecen el crecimiento de algunas especies de hongos. El medio de agar de Littman con bilis de buey, suplementado con estreptomycin, se utiliza para el aislamiento y cultivo de hongos dermatofitos. Los medios selectivos contienen compuestos que inhiben selectivamente el crecimiento de algunos microorganismos, para favorecer el desarrollo de otros. Esto se logra porque pueden contener sustancias inhibitorias como son los antibióticos, siendo el cloranfenicol y la gentamicina los antibacterianos más usados. Por ejemplo, el medio de PDA favorece el crecimiento de hongos del género *Fusarium*, incluso logrando diferenciar las especies por la variación en la coloración del micelio, ya que en cultivos de *F. oxysporum* se observa color rosa con tonos violáceos, en *F. solani* rojizo y en *F. roseum*, rojo intenso.

Los medios diferenciales ayudan a la identificación del hongo, ya que se añaden componentes **cromógenos** o indicadores de pH que permiten detectar reacciones químicas particulares que ocurren durante el crecimiento del organismo. Como ejemplo, el medio de agar infusión cerebro corazón (BHI) es recomendado para el aislamiento de los hongos causantes de micosis profunda, como la histoplasmosis. Finalmente, los especializados contienen alguna sustancia que permite identificar o aislar algún componente específico del hongo, como el medio de Czapek-Dox modificado, que es utilizado para cultivar hongos con capacidad de utilizar el nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno.

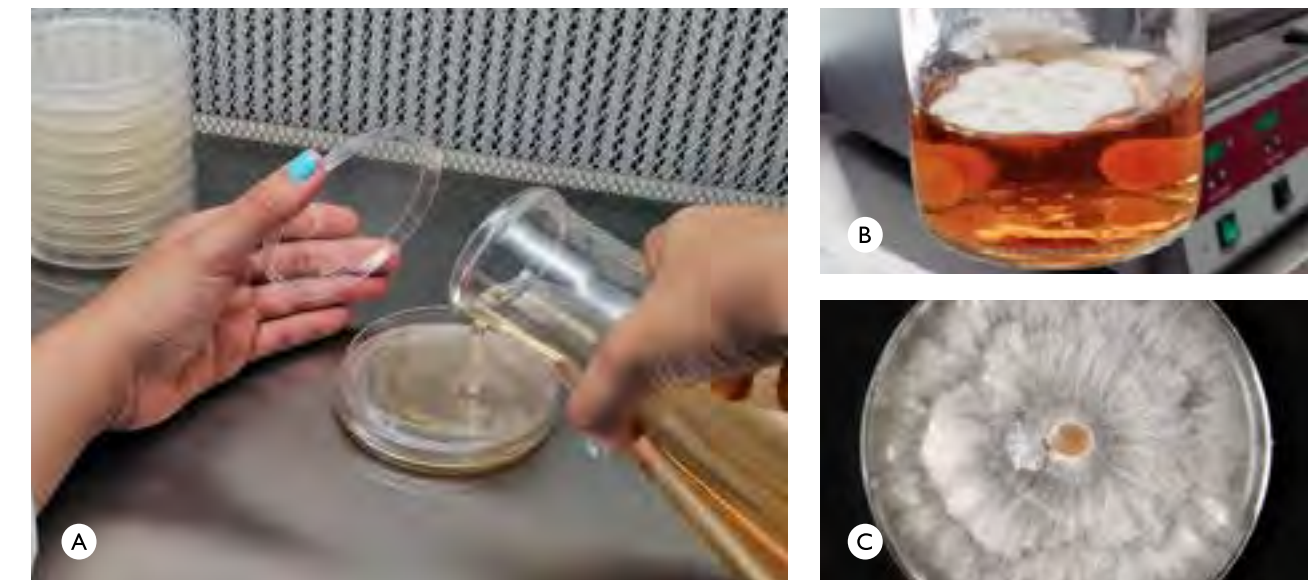


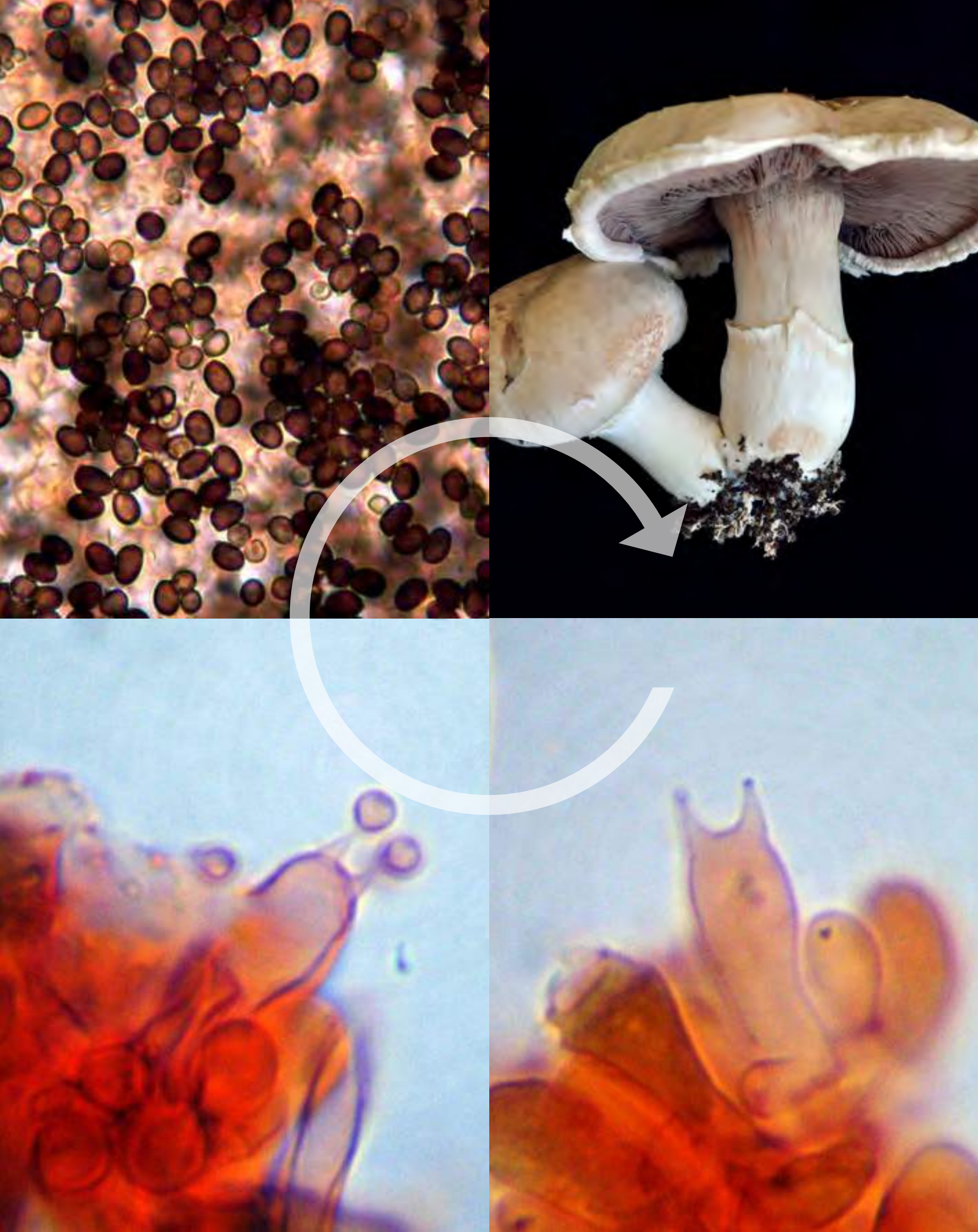
Figura 6. A. Vaciado del medio de cultivo en cajas de Petri y desarrollo de un cultivo.

B. En medio líquido. C. En medio sólido.

En la actualidad, existen diferentes laboratorios comerciales que proveen la mayoría de los medios de cultivo. Generalmente, los componentes vienen liofilizados, por lo que sólo es necesario rehidratar en agua destilada, siguiendo las instrucciones del fabricante. Si es necesario adicionar alguna sustancia termolábil al medio de cultivo, ésta deberá esterilizarse por filtración y agregarse después que la disolución haya sido esterilizada y enfriada a temperatura ambiente. En el caso de medios sólidos, deberá tenerse precaución de adicionar la sustancia antes de la solidificación del agar. Alternativamente, se pueden preparar algunos medios de cultivo con compuestos de menor costo y fácil disponibilidad, como papa, levadura, malta, trigo, pajas de gramíneas, jugo de verduras, entre otros, aunque en este caso la composición química final podría variar dependiendo del origen y pureza de los ingredientes. Dependiendo de la finalidad del proceso, los medios de cultivo pueden prepararse en tubos de ensayo, cajas de Petri, matraces Erlenmeyer, frascos de cultivo, etc. Es muy importante seguir las recomendaciones de preparación del proveedor y llevar a cabo un proceso de esterilización a la temperatura y tiempo indicados, para evitar el crecimiento de otros microorganismos. Los medios de cultivo enriquecidos pueden ser fácilmente contaminados por otros organismos antagonistas durante el proceso de preparación y siembra del hongo, por lo que se recomienda establecer medidas estrictas de asepsia, tanto en el área de inoculación como en el personal encargado del proceso (Figura 7).



Figura 7. El aislamiento, identificación y mantenimiento de las cepas es un proceso laborioso, que deberá realizarse en un área estéril, con medidas estrictas de orden y limpieza.



CICLO DE VIDA Y TIPO DE AISLAMIENTO

Gerardo Mata, Dulce Salmenes

Red Manejo Biotecnológico de Recursos, Instituto de Ecología, A.C.
Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya C.P. 91073, Xalapa, Veracruz, México
gerardo.mata@inecol.mx

El conocimiento de la biología y el ciclo de vida de un organismo en particular, son fundamentales en el manejo y aprovechamiento de las diferentes especies en favor de la humanidad. Los hongos son organismos extraordinariamente diversos que presentan ciclos de vida complejos y muy diferentes, según sea el grupo taxonómico al que pertenezcan. La reproducción de los organismos se considera como un proceso por el cual se forman nuevos individuos que conservan las características típicas de la especie. De manera general se puede decir que los hongos presentan dos tipos de ciclo de vida o sistema de reproducción: a) reproducción asexual y b) reproducción sexual. La mayoría de los hongos pueden llegar a presentar los dos tipos de reproducción, aunque con frecuencia las condiciones ambientales no son propicias para que se expresen ambos tipos de reproducción. En ambos sistemas reproductivos, el **talo** completo del hongo puede o no formar parte de los órganos reproductores del mismo, de tal forma que se designan hongos **holocárpicos** aquellos en los que el talo completo se transforma en uno o varios órganos de reproducción. Por otra parte, los hongos **eucárpicos**, entre los que se encuentran la gran mayoría de las especies de hongos, son aquellos en los que solamente una parte del micelio se transforma en órganos especializados en la reproducción y el resto del micelio mantiene su **estado vegetativo**.

REPRODUCCIÓN ASEJUAL

Este tipo de reproducción se caracteriza porque no hay unión de micelios sexuales ni de órganos especializados. En muchas especies de hongos, la reproducción asexual tiene mayor importancia que la reproducción sexual, dada la capacidad que tiene para generar un gran número de individuos adaptados a un ambiente en particular y con posibilidades de colonización eficiente. La reproducción asexual de los hongos, principalmente mohos y levaduras, se lleva a cabo mediante tres procesos:

a) **Fisión**. Este proceso se lleva a cabo en hongos unicelulares como las levaduras del género *Schyzosaccharomyces*, a través de la elongación de la célula, la cual ad-

quiere una forma cilíndrica y posteriormente se forma un septo que terminará por dividir en dos a la célula a través del proceso de esquizolisis del septo.

b) Gemación. En este proceso de reproducción, que se presenta en la mayoría de las levaduras, se forma una especie de brote o yema en la pared de la célula madre el cual aumenta de tamaño hasta que se forma un septo que divide a las dos nuevas células.

c) Formación de esporas. La esporulación o formación de esporas, es el método que se encuentra con mayor frecuencia en la reproducción de los hongos. En algunas ocasiones, las esporas se pueden formar directamente en cualquier parte del micelio, dependiendo del grupo taxonómico que se trate o se pueden formar en estructuras llamadas esporóforos o esporomas. Según la especie de hongo, las esporas varían en color, forma, tamaño y en el número de células de las cuales están compuestas. También hay variaciones en el arreglo de las células que soportan las esporas y la manera en la cual se obtienen. La combinación de estas características genera una gran cantidad de tipos de esporas y estructuras y algunas especies de hongos son capaces de producir más de un tipo de espora asexual. Las estructuras más comunes que albergan esporas asexuales son los esporangios y los conidios. Por otra parte, es frecuente encontrar estructuras de resistencia que permiten a los hongos sobrevivir a los cambios en el entorno para germinar cuando las condiciones del medio sean adecuadas. Entre este tipo de estructura las más frecuentes son: oídios, clamidosporas y esclerocios.

REPRODUCCIÓN SEXUAL

La reproducción sexual tiene implícito el intercambio de información genética entre los individuos considerados como parentales. Entre los diferentes grupos de hongos se pueden observar una gran cantidad de pequeñas variaciones en los sistemas de reproducción. Sin embargo, pese a la diversidad, se podría decir que la reproducción sexual en los hongos presenta tres eventos fundamentales:

- a) **Plasmogamia**, se refiere a unión de dos micelios haploides y compatibles.
- b) **Cariogamia**, fusión de los núcleos diferentes de los micelios, lo que genera un breve estado diploide.
- c) **Meiosis**, que es la división de los cromosomas que generará nuevamente núcleos haploides (Figura 8).

La reproducción sexual aporta variación genética a las especies ya que genera diversidad en los individuos, lo que permitirá que algunos presenten mayor resistencia a las condiciones del medio. Se puede considerar que la reproducción sexual en los hongos puede presentar dos tipos de patrones con base en el sistema de apareamiento de cada especie: **a) homotalismo y b) heterotalismo.**

Las especies que presentan un patrón de sexualidad homotático son consideradas autofértiles ya que son capaces de completar el ciclo de vida a través del crecimiento del micelio que proviene de la germinación de una sola espora. Entre las especies de hongos comestibles cultivados, *Volvariella volvacea* es considerada una especie homotática. Otra especie tradicionalmente considerada homotática o pseudo-homotática es

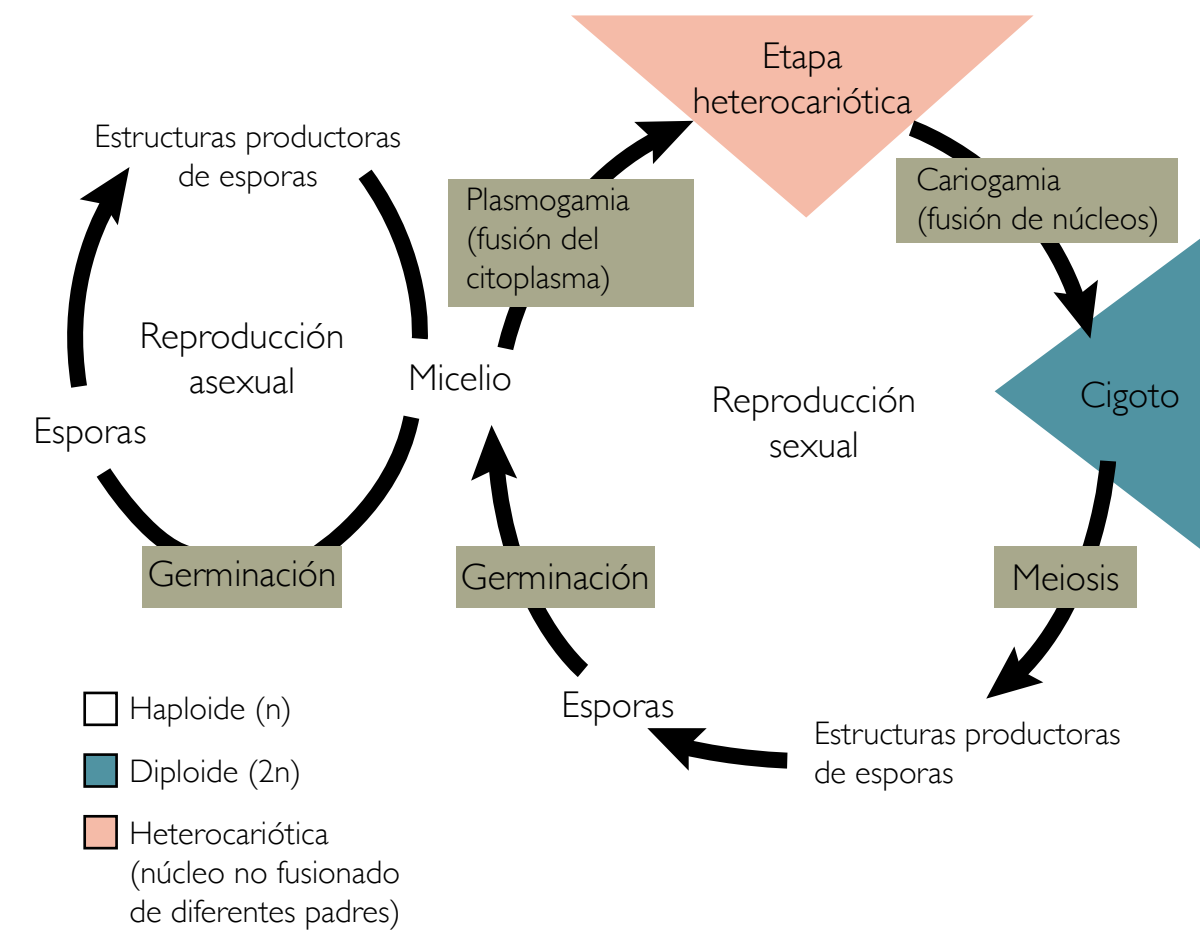


Figura 8. Ciclo de vida de un basidiomiceto común.

Agaricus bisporus, cuya principal característica es formar dos esporas en cada basidio, las cuales contienen 2 núcleos cada una. Sin embargo, el caso específico de *A. bisporus* es más complejo como se verá más adelante.

Por otra parte, las especies heterotáticas son aquellas que requieren del entrecruzamiento de dos micelios compatibles sexualmente para poder completar su ciclo de vida. La compatibilidad es controlada por uno o varios genes y limita el proceso de la plasmogamia, es decir, solamente las hifas compatibles genéticamente podrán fusionarse. Este control genético de la plasmogamia se debe a la interacción de los alelos de uno o varios **loci** lo que da como resultado dos tipos de incompatibilidad:

a) Heterotalismo unifactorial o bipolar. En este tipo de sexualidad existe un solo factor de incompatibilidad, generalmente llamado factor A que tiene múltiples alelos. La fusión de dos hifas compatibles genera por lo tanto micelios dicarióticos de tipo A1 A2. En este caso solamente los micelios tipo A1 serán compatibles con los micelios tipo A2 lo que producirá 2 tipos de esporas compatibles, de ahí el nombre de heterotalismo bipolar.

b) Heterotalismo bifactorial o tetrapolar. Este tipo de compatibilidad depende de dos factores de compatibilidad que son conocidos como A y B, los cuales tienen múltiples alelos y se encuentran situados en

cromosomas diferentes. Los micelios dicarióticos deben portar la conformación A1B1A2B2. Las esporas producidas pueden presentar en consecuencia cuatro tipos distintos de compatibilidad: A1B1, A1B2, A2B1 y A2B2, de tal forma que únicamente serán compatibles las esporas A1B1 con A2B2 y las esporas A1B2 con A2B1 formando los 4 tipos de incompatibilidad.

En la mayoría de los basidiomicetos pueden llegar a existir más de un patrón de sexualidad a la vez. Este tipo de comportamiento sexual se conoce como **anfitalismo**. En el caso del champiñón, *Agaricus bisporus* var. *bisporus*, los basidios son generalmente bispóricos (de ahí el nombre de la especie), sin embargo, se pueden producir un pequeño porcentaje de basidios trispóricos y tetraspóricos. De esta forma, en el champiñón se producen mayoritariamente esporas heterocarióticas (con dos núcleos diferentes en cada una) y un pequeño porcentaje de esporas homocarióticas (con un solo núcleo cada una). En el caso de *A. bisporus* var. *burnetti*, la mayoría de las esporas son homocarióticas. Ambas variedades son genéticamente compatibles, pero se encuentran geográficamente separadas.

CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de los hongos, como ya se dijo, varía según el grupo taxonómico al que pertenecen. Con el fin de ilustrar el ciclo de vida de un hongo, a continuación, se describe el caso de la especie comestible y cultivada *Pleurotus ostreatus*, conocida popularmente en México como **setas**. El ciclo de vida de *P. ostreatus*

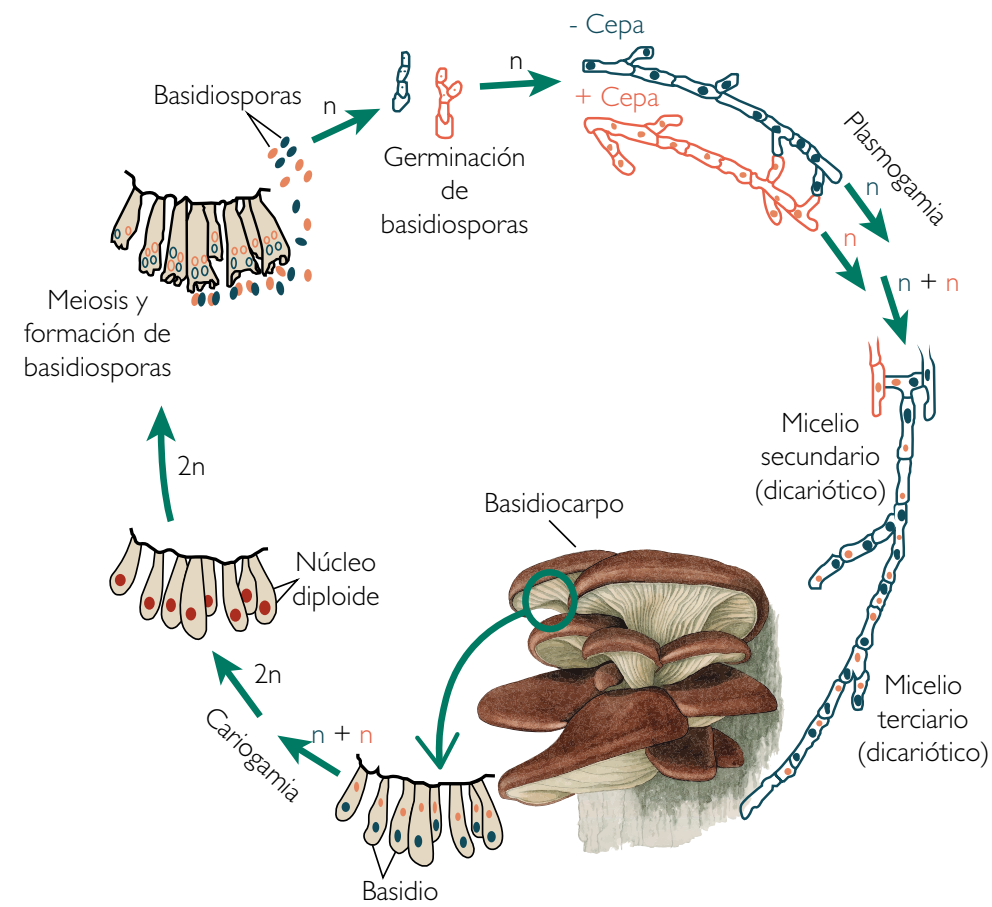


Figura 9. Ciclo de vida de *Pleurotus ostreatus*.

(Figura 9) comienza con la germinación de las esporas, cada espora produce un micelio que contiene un solo núcleo (monocariótico) y es por lo tanto haploide (n). Para continuar el ciclo de vida es necesario que un micelio monocariótico pueda fusionarse con otro, también monocariótico pero sexualmente compatible. A esta unión de los micelios se le conoce como plasmogamia, la cual producirá un micelio con dos núcleos en cada célula llamado micelio dicariótico (n + n). Este estado dicariótico es una particularidad de los hongos ya que, los núcleos de las células se mantienen separados durante todo el tiempo en que el micelio continúa su desarrollo.



Figura 10. Fíbulas en el micelio de *Pleurotus ostreatus* (señaladas con flechas).

El crecimiento de los hongos es apical y los núcleos pasan a las nuevas células del hongo a través de una estructura con forma de gancho llamada **fíbula** (Figura 10), que conecta dos células del micelio dicariótico. Al menos en teoría, si el hongo no necesitara reproducirse sexualmente, el crecimiento del micelio dicariótico podría continuar de manera indefinida.

En el caso de las especies del género *Pleurotus*, así como en la mayoría de los hongos superiores (Basidiomicetos y Ascomicetos), únicamente el micelio dicariótico es capaz de producir las estructuras especializadas en donde se realizará la reproducción sexual y la formación de las esporas, dichas estructuras son llamadas basidiocarpos o **basidiomas** y corresponden a lo que cotidianamente se conoce en las especies comestibles como hongo. En el basidiocarpo se forman las láminas o **himenio**, que se encuentran en la parte inferior de píleo o sombrero (Figura 11). En *P. ostreatus* dichas láminas son de color blanco y decurrentes sobre el pie. En las láminas se forman los **basidios** que continúan siendo células dicarióticas hasta que se realiza la fusión de los dos núcleos, evento llamado cariogamia, lo que produce una célula diploide (2n). El estado diploide en el basidio es realmente un estado efímero ya que de inmediato se realiza la división nuclear conocida

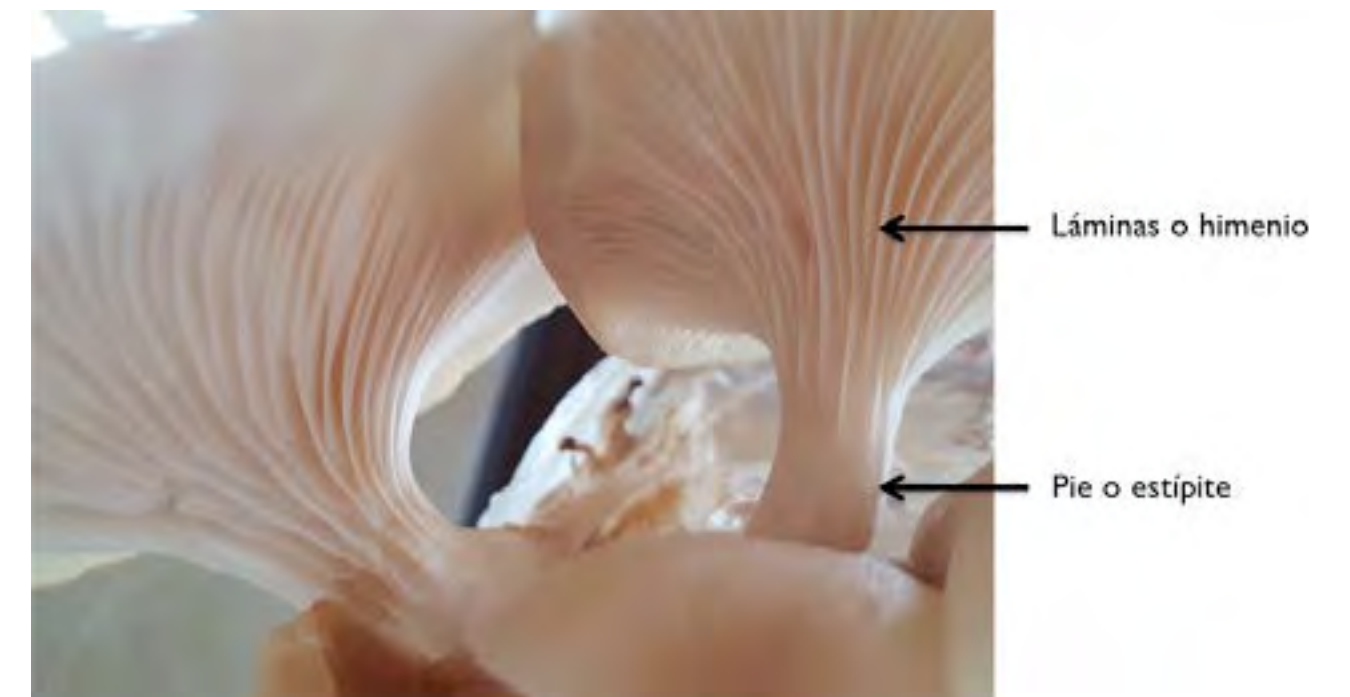


Figura 11. Estructura de un basidiocarpo de *Pleurotus ostreatus*.

como **mitosis**, lo que genera 4 nuevos núcleos que son producto de la reproducción sexual y la combinación de las características genéticas de los dos núcleos iniciales contenidos en los micelios monospóricos. Los nuevos núcleos producidos por la mitosis migrarán hacia la parte externa del basidio para formar las nuevas esporas con las que el ciclo sexual de *P. ostreatus* iniciará nuevamente.

En la figura 12 se presenta el proceso de formación de las basidiosporas de *Pleurotus ostreatus* y la conformación de los tipos de incompatibilidad genética. Después de que ha ocurrido la cariogamia, se lleva a cabo una mitosis lo que genera 4 nuevos núcleos que migrarán a las 4 esporas que se producen en el basidio. Al germinar las esporas, los micelios resultantes requerirán encontrar otro micelio, genéticamente compatible, para realizar la plasmogamia.

Como ya se mencionó los factores de incompatibilidad están controlados, en las especies heterotálicas, por los factores A y B con sus alelos A1A2 y B1B2. Las cruza posibles serán, por lo tanto, únicamente aquellas que permitan obtener un juego completo de alelos, es decir A1B1A2B2. De esta forma se generan cuatro tipos de apareamiento que suelen denominarse como: tipo I (A1B1), tipo II (A1B2), tipo III (A2B1) y tipo IV (A2B2). En este modelo los tipos de apareamiento compatibles serían el tipo I con el tipo IV y el tipo II con el tipo III.

OBTENCIÓN DE CEPAS

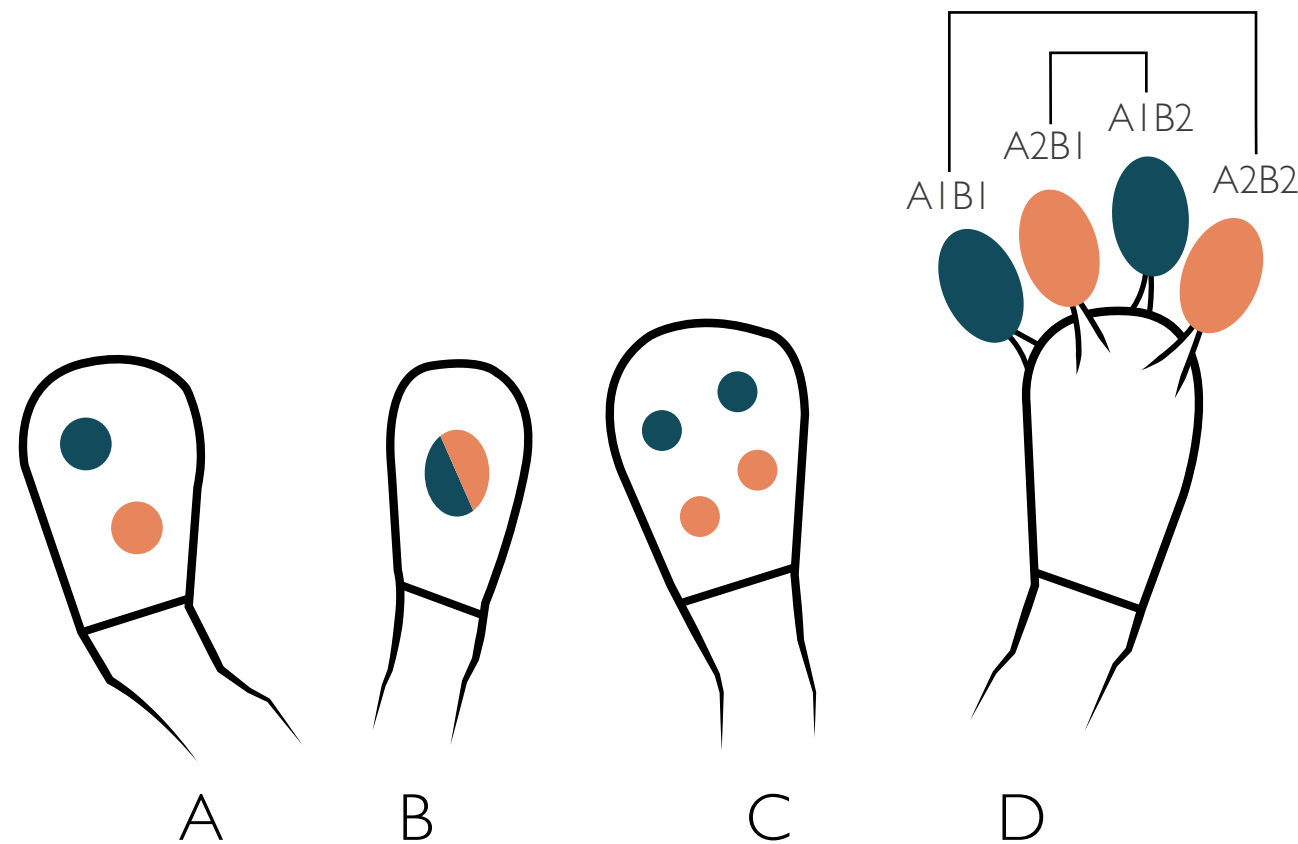


Figura 12. Formación de las basidiosporas y tipos de apareamiento en *Pleurotus ostreatus*. **A:** basidio dicariótico (en estado $n + n$). **B:** cariogamia (estado diploide $2n$). **C:** mitosis, generación de 4 núcleos haploides (n). **D:** Producción de las esporas, cada una con un núcleo post meiótico, y de los tipos de incompatibilidad.

Las cepas son el material básico para el desarrollo de cualquier especie de hongo a nivel de laboratorio. Una cepa es el cultivo puro de un hongo y debe mantener constantes sus características genéticas y fisiológicas. Para obtener una cepa es necesario contar con el tejido vivo del hongo que se quiere reproducir. De manera general una cepa se puede obtener a partir de dos métodos: a) aislamiento vegetativo y b) aislamiento esporico. Con la finalidad de ejemplificar el proceso para la obtención de cepas, se presentarán algunos casos basados en especies de hongos comestibles cultivadas como las setas (*Pleurotus spp*), shiitake (*Letinula edodes*) y el champiñón (*Agaricus bisporus*).

a) Aislamiento vegetativo. Este método consiste en tomar un pequeño fragmento de tejido de un basidioma y colocarlo directamente en un medio de cultivo adecuado para el desarrollo del micelio. Se debe poner especial atención al espécimen seleccionado, cuando se trata de un ejemplar silvestre se debe seleccionar un basidioma en buen estado, fresco, turgente, joven y libre de parásitos. El aislamiento de la cepa se debe realizar siguiendo medidas estrictas de higiene y de preferencia utilizando una cámara de flujo laminar para evitar, hasta donde sea posible, la contaminación por organismos indeseados (Figura 13). Antes de iniciar el aislamiento se recomienda limpiar el basidioma, con un cepillo pequeño de cerdas suaves, para retirar impurezas como hojarasca o suelo. Con una navaja estéril se corta de manera longitudinal el basidioma y con unas pinzas o agujas de disección, también estériles, se toma un fragmento del tejido del hongo y se coloca en una caja de Petri con medio de cultivo, se pueden colocar 5-6 fragmentos de tejido por cada caja de Petri (Figura 14). La caja se sella con plástico adherente, se marca con la fecha y algún número asignado al ejemplar y se coloca en una incubadora para favorecer el desarrollo del micelio (Figura 15). Las cajas se revisan diariamente para corroborar que no haya presencia de contaminantes y que el desarrollo del micelio sea normal. Para el aislamiento de cepas de setas y shiitake se recomienda el uso de medio de cultivo PDA o EMA, para el caso de las cepas de champiñón es mejor utilizar el medio de compost. Cuando se trabaja aislando cepas a partir de ejemplares silvestres, se recomienda utilizar un medio de cultivo adicionado con antibiótico. Se puede utilizar cualquier tipo de antibiótico de amplio espectro, como la penicilina, a razón de 1 gL^{-1} , disolviendo el contenido de una cápsula o pastilla en el medio de cultivo después de esterilizar y antes de que se enfríe por completo.

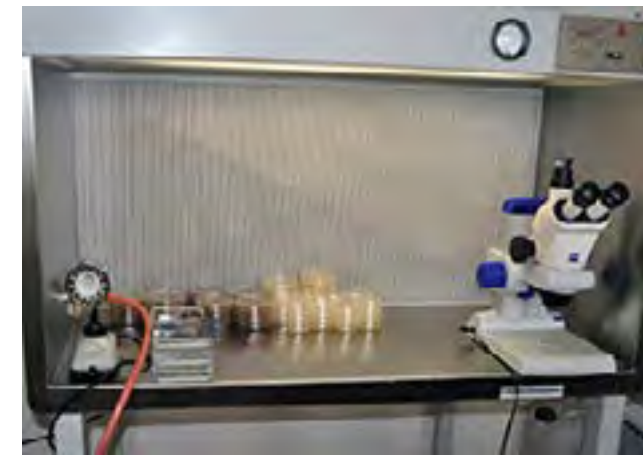


Figura 13. Cámara de flujo laminar utilizada para realizar aislamientos de hongos. Nótese el esterilizador usado para agujas de disección y pinzas, cajas de Petri con distintos tipos de medio de cultivo y un microscopio estereoscópico.

b) Aislamiento esporico. Este tipo de aislamiento se realiza a partir de las esporas del hongo y por lo tanto, lo primero que debe obtenerse es una esporada. Para obtener una esporada se utiliza un papel esterilizado en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos (colocar el papel en un recipiente de vidrio para evitar que se moje). Se debe seleccionar un basidioma adecuado y en buen estado, se retira el estípite o pie y el píleo o sombrero se coloca sobre el papel estéril con las láminas hacia abajo (tomar la precaución de limpiar con alcohol la superficie en donde se colocará el papel). Con la finalidad de que el hongo descargue adecuadamente las esporas sobre el papel, es importante colocar una berrera física para evitar corrientes de aire, esto se logra tapando el papel y el píleo del hongo con un recipiente de vidrio o una caja de Petri (Figura 16).

Después de unas 4 o 5 horas en el papel se notará claramente la descarga de esporas cuya intensidad va-

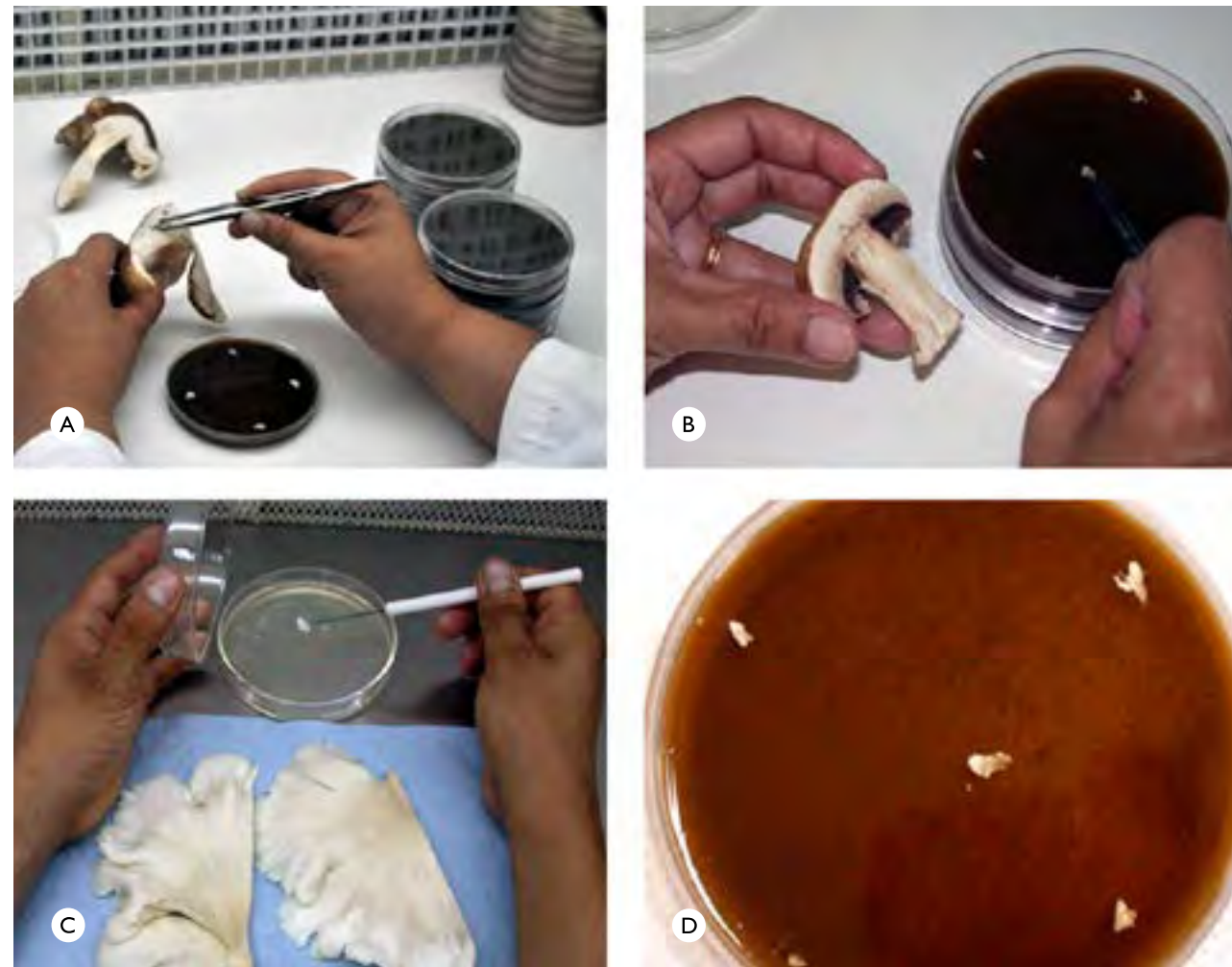


Figura 14. Aislamiento vegetativo de cepas de diferentes especies. **A.** Aislamiento de *Lentinula edodes*. **B.** Aislamiento de *Agaricus bisporus*. **C.** Aislamiento de *Pleurotus pulmonarius*. **D.** Fragmentos de tejido de *A. bisporus* en medio de cultivo adicionado con compost.

riará de acuerdo con el color y la cantidad de las esporas de esporas descargadas. La esporada se colocará en una caja de Petri estéril al interior de una incubadora a 28-30 °C durante 24 horas para facilitar que el papel se seque. Para almacenar la esporada, se recomienda colocarla en una bolsa nueva de plástico transparente la cual se sellará y se marcará con los datos importantes del hongo utilizado y la fecha de obtención (Figura 17).

Una vez realizada la esporada, para obtener una cepa es necesario trabajar en condiciones de asepsia en una cámara de flujo laminar. Con una navaja estéril se corta un pedazo de 1 cm² de la esporada, procurando tomar del área que tenga mayor descarga de esporas, y con pinza de disección se introduce el fragmento de esporada en un vaso de precipitado con 100 mL de agua destilada estéril y fría. De inmediato el agua tomará un aspecto turbio, debido a la presencia de esporas que se dispersarán en el líquido. Con ayuda de una pipeta o jeringa estéril de tomará 0.5 mL de la solución de esporas y se colocará en una caja de Petri con medio PDA o EMA (Figura 18). La caja de Petri se sella y se coloca



Figura 15. Cajas de Petri en incubación.

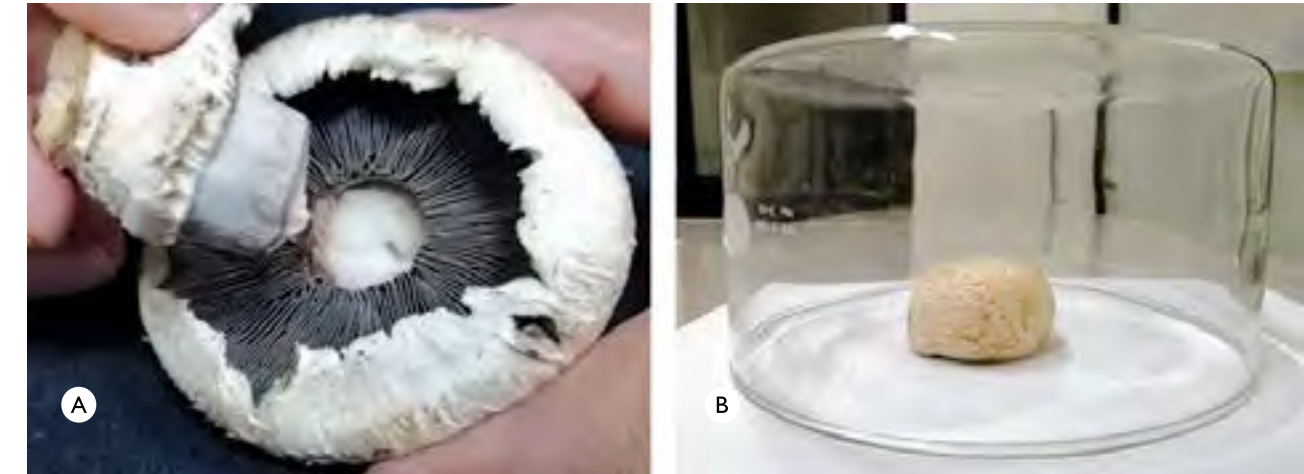


Figura 16. Obtención de una esporada a partir de un basidiomiceto. **A:** eliminación del estípite del basidioma. **B:** pleo colocado con las láminas hacia el papel para permitir la descarga de esporas.



Figura 17. Esporadas de diversas especies de hongos comestibles. **A:** *Agaricus bisporus* **B:** *Pleurotus djamor* **C:** *A. subrufescens*

en una incubadora a 25 °C en condiciones de oscuridad. Después de una semana se podrá observar la germinación de las esporas y el crecimiento de los micelios. Es necesario realizar observaciones cuidadosas del contenido de la caja de Petri para asegurarse que no hay indicios de contaminación. Finalmente, para obtener la cepa se toma un fragmento de medio de cultivo con micelio y se coloca en una nueva caja de Petri. Es necesario marcar la caja con los datos de la cepa y haciendo notar su origen multiespórico.

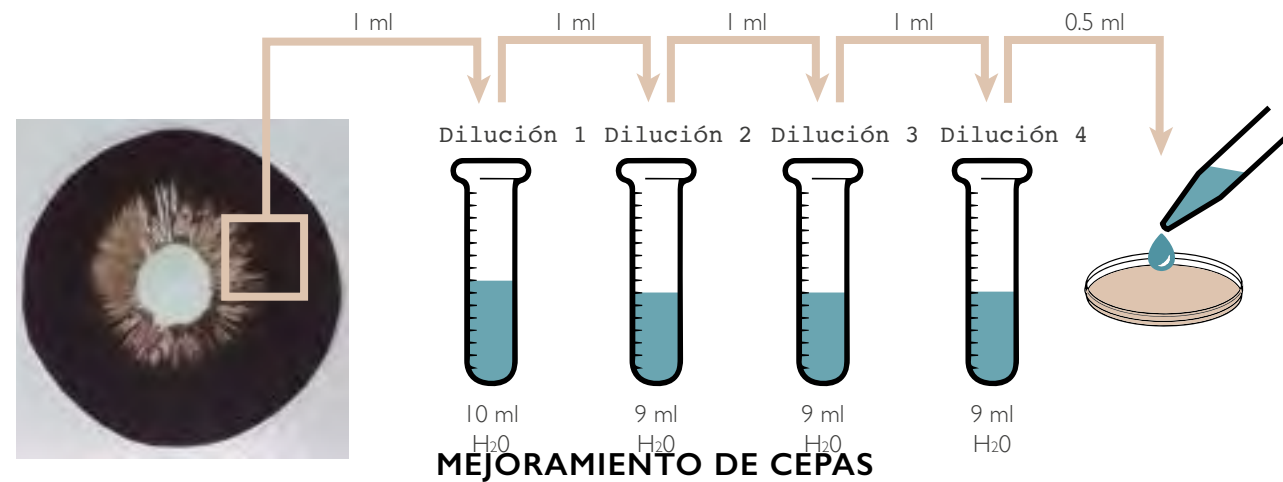


Figura 18. Método de obtención de una cepa a partir de diluciones de esporas.

Utilizando el mismo método de obtención de cepas por la vía esporica, es posible obtener los micelios que provienen de la germinación de una sola espóra. Para esto es necesario hacer múltiples diluciones hasta asegurarse que la concentración de esporas/mL de dilución sea muy baja. Se toman 0.5 mL de la dilución de esporas y se colocan en cajas de Petri con medio de cultivo de agua y agar. Para facilitar la observación de las esporas cuando inicia la germinación, se recomienda teñir el medio de cultivo con algún colorante vegetal de los que son utilizados comúnmente en pastelería, los tonos verde-azules permiten visualizar mejor las esporas que generalmente son hialinas. Es necesario observar diariamente las cajas de Petri con la ayuda de un microscopio estereoscópico para poder aislar las esporas en cuanto germinan (Figura 19).

Figura 19. Esporas de *Pleurotus ostreatus* germinando en medio de cultivo de agar agua



Cuando se detecta la germinación de una espóra, debe tomarse el fragmento de medio de cultivo en el que se encuentra creciendo la espóra y colocarlo en nueva caja de Petri con medio de cultivo PDA. Cuando el micelio haya crecido suficiente se debe tomar una muestra del mismo y observarlo en un microscopio compuesto para corroborar la ausencia de fíbulas, lo que confirmará que se trata de un micelio monospórico. Se recomienda aislar entre 20 y 30 micelios monospóricos para tener material suficiente que permita determinar los tipos de apareamiento. Los tipos de apareamiento se determinan utilizando 12 micelios monospóricos numerados arbitrariamente del 1 al 12. Se colocan fragmentos de los micelios monospóricos por pares para permitir que al crecer dichos micelios se toquen y en caso de ser compatibles se realice la plasmogamia, lo que generará un micelio dicariótico (Figura 20).

En el caso de *Pleurotus ostreatus* los micelios dicarióticos deben presentar fíbulas. Se realizarán todas las cruces posibles entre los 12 micelios monospóricos seleccionados y la presencia (+) o ausencia (-) de fíbulas se

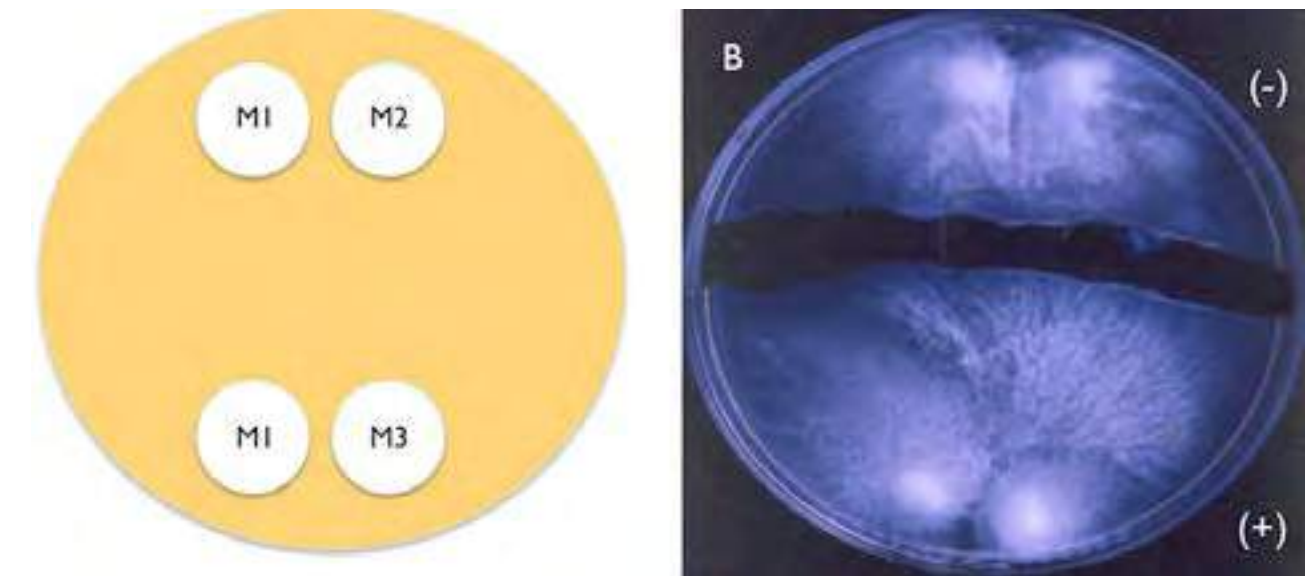


Figura 20. Método de siembra para el cruzamiento de micelios monospóricos. **A:** Ejemplo de la posición de los micelios para realizar la cruz entre todos los monospóricos (micelio 1 = M1, micelio 2 = M2, micelio 3 = M3). **B:** Resultado de la cruz de micelios monospóricos. (-) micelios incompatibles, nótese la raya de incompatibilidad que se forma entre los dos micelios. (+) micelios compatibles, nótese el nuevo micelio que crece a partir de los dos micelios monospóricos.

anotará en una tabla para poder organizar los tipos de apareamiento. En la Tabla 1 se muestra un ejemplo de los tipos de apareamiento obtenidos con una cepa de *P. ostreatus*. De acuerdo con las cruces positivas obtenidas, los monospóricos 1,3 y 9 (tipo I) serán compatibles con los monospóricos 2, 6 y 12 (tipo IV), mientras que los monospóricos 4,7 y 10 (tipo II) serán compatibles con los monospóricos 5, 8 y 11 (tipo III). Una vez que se conocen los tipos de apareamiento de una cepa es posible realizar cruces de manera selectiva, utilizando los monospóricos compatibles para generar nuevas cepas mejoradas con características adecuadas al tipo de cultivo que se pretende realizar.

DIFERENCIAS ENTRE CEPAS VEGETATIVAS Y MULTIESPÓRICAS

Los métodos de obtención de cepas mencionados en este capítulo producen resultados sustancialmente diferentes. En virtud de que los hongos no tienen tejidos altamente especializados, cuando se obtiene una cepa a través de un aislamiento vegetativo, en realidad se obtiene un clon el cual debe ser genéticamente idéntico al organismo del que se obtuvo. Considerando que este sistema consiste en tomar un fragmento del tejido de un cuerpo fructífero del hongo y brindar las condiciones adecuadas para el crecimiento del micelio, la cepa que se obtiene debe mantener las mismas características genéticas del parental. Por otra parte, la obtención de una cepa a través de la vía esporica implica forzosamente un proceso de reproducción sexual en el cual ha habido recombinación de caracteres al fusionarse los núcleos para dar origen a las esporas. De esta forma un aislamiento esporico puede ser genéticamente muy similar al parental o parentales, pero no igual. El sistema de reproducción heterotálica, en el cual se requiere de la combinación

de dos micelios genéticamente compatibles, brinda a los hongos una mayor variabilidad genética. Es muy importante tener en cuenta las diferencias de ambos sistemas de obtención de cepas cuando se quiere obtener material genético para su cultivo comercial.

Tabla 1. Ejemplo de las cruzas obtenidas con una cepa de *Pleurotus ostreatus* mostrando las combinaciones compatibles e incompatibles, así como la conformación de los tipos de apareamiento

	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
2		+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
3			+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
4				+	-	-	+	-	-	-	+	-
5					+	-	-	-	+	-	-	-
6						+	-	-	+	-	-	-
7							+	-	-	+	-	-
8								+	-	+	-	-
9									+	-	-	+
10										+	-	-
11											+	-
12												+

TIPOS DE APAREAMIENTO			
I	II	III	IV
A1B1	A1B2	A2B1	A2B2
1,3,9	4,7,10	5,8,11	2,6,12

CONSIDERACIONES FINALES

Conocer el ciclo de vida y las características reproductivas de un hongo que se pretende estudiar es fundamental para su manejo en el laboratorio. Cuantos más datos se tengan de una especie, mayor será la posibilidad de éxito en su conservación. La reproducción de los hongos es un tema muy amplio, pero sin duda es parte de la información fundamental para entender el comportamiento de los hongos en el laboratorio y por lo tanto, para seleccionar las técnicas adecuadas para su manejo y control. Es muy importante registrar los datos del origen de las cepas y considerar las características de las mismas cuando son aisladas a partir del método vegetativo o esporico. La información presentada en este capítulo puede también servir de base metodológica para iniciar un programa de selección de cepas con características agronómicas especiales. Sin embargo, el tipo de sexualidad que presentan los hongos puede ser una limitante o condicionante para su aislamiento, conservación y manejo en el laboratorio.



CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DEL CRECIMIENTO MICELIAL DE HONGOS COMESTIBLES CULTIVADOS

Rigoberto Gaitán-Hernández

Red Manejo Biotecnológico de Recursos, Instituto de Ecología, A.C.
Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya C.P. 91073, Xalapa, Veracruz, México
rigoberto.gaitan@inecol.mx

EL CRECIMIENTO DE LOS HONGOS

Los hongos tienen el potencial de incrementar su biomasa por división o alargamiento celular. A este incremento en masa se le llama crecimiento. El crecimiento de los hongos es apical y en el ápice de las hifas es donde existe la mayor actividad fisiológica. Este es un proceso muy complejo que requiere la **traslocación** de sustancias de las porciones viejas o iniciales de micelio hacia el ápice, donde se forman estructuras dinámicas que hacen posible el crecimiento apical. Es decir, el **protoplasma** en esta zona es estructural y funcionalmente diferente del resto de la hifa. El micelio que se propaga en un medio de cultivo con **agar** presenta un crecimiento radial y tiende a formar zonas circulares, pero si el medio de cultivo es líquido, el crecimiento del hongo se presenta de forma esférica, sobre todo si se trata de un cultivo en agitación.

Existen varios métodos para determinar el crecimiento de los hongos en el laboratorio, la elección de la técnica dependerá de los objetivos y condiciones de cultivo, por ejemplo, si se emplean medios de cultivo sólidos, generalmente se pretende medir el desarrollo radial del micelio en un periodo de tiempo. Otro método consiste en medir el peso seco del micelio o la biomasa producida, para ello el hongo se propaga en un medio de cultivo líquido y después de un periodo de tiempo, el micelio resultante se separa del medio de cultivo por filtración o centrifugación, se seca y pesa. También existen técnicas para determinar el efecto de ciertos factores físicos, químicos o biológicos en el crecimiento del micelio. A nivel *in vitro* pueden realizarse ensayos en cajas de Petri, tubo de ensayo, frascos de vidrio u otros recipientes o contenedores, donde es posible colocar como sustrato de crecimiento para los hongos de estudio, medios de cultivo, sólidos y líquidos y sustratos orgánicos, entre otros.

Neolentinus lepideus fructificando en condiciones *in vitro*

ESTUDIOS SOBRE LA CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE HONGOS

La caracterización del cultivo de un hongo en particular permite identificar las condiciones apropiadas para su propagación y ha sido ampliamente documentada para diversas especies de interés biológico y biotecnológico. Existen antecedentes de la caracterización de **cepas** de hongos a nivel *in vitro*, donde se describen sus cualidades de desarrollo en medios de cultivo o sustratos, bajo diferentes condiciones de crecimiento, como temperatura, pH, humedad, intensidad de luz, fuentes de carbono, entre otros.

Es importante destacar que las cepas de hongos, al igual que otros microorganismos, pueden modificar su morfología y tasa de crecimiento dependiendo de los nutrientes y temperatura en que se desarrollan.

Cuando se desconoce qué factores favorecen el crecimiento de una especie de hongo en un determinado medio de cultivo, un ensayo de la estimación del crecimiento micelial *in vitro* permitirá generar información que favorecerá el manejo de las cepas bajo condiciones controladas. La velocidad del crecimiento del micelio, medios de cultivo favorables, temperatura de incubación, entre otros, son parámetros que se deben considerar para una adecuada conservación y manejo *in vitro* de una cepa. Por ejemplo, una cepa de *Schizophyllum commune* cultivada en diferentes medios de cultivo, como son Papa Dextrosa Agar (PDA) y Extracto de Malta Agar (EMA), e incubadas a 18 y 26 °C, muestra mejor crecimiento en PDA a 26 °C. Ensayos como éstos, permiten determinar las condiciones favorables de crecimiento para alguna especie o cepa de hongo en particular.

Además de la caracterización morfológica, la variación de factores de crecimiento permite identificar, aislar e incluso promover la formación de diferentes componentes orgánicos por el hongo, ya que estos organismos al presentar una **nutrición heterótrofa** tienen la capacidad de absorber, degradar y producir, bajo ciertas condiciones de cultivo, una gran variedad de compuestos de interés biotecnológico.

FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO DE LOS HONGOS

Los hongos están formados por filamentos ramificados llamados hifas, las cuales forman el **micelio** y en condiciones adecuadas, este micelio puede desarrollar estructuras reproductoras que se denominan **esporóforos**. Para su crecimiento, los hongos necesitan, principalmente, fuentes de carbono, minerales, vitaminas, aminoácidos, nitrógeno y oxígeno. Los factores ambientales también son determinantes para su adecuado desarrollo, como el O₂, la humedad y la temperatura.

A continuación, se describen algunos factores que tienen un efecto en el crecimiento micelial de los hongos, considerando como ejemplo el grupo de los **basidiomicetes**, tanto en su etapa vegetativa (micelio), como en su etapa reproductiva (formación de esporóforos).

Temperatura

La temperatura afecta el metabolismo de las células, influyendo tanto en la capacidad enzimática del hongo, como en la fluidez de los lípidos de la membrana celular. La sensibilidad a la temperatura no solo varía

entre especies y cepas, sino también dentro de una misma cepa, según su etapa de desarrollo. Cuando la temperatura es demasiado alta, las proteínas del hongo pueden desnaturalizarse y perder su viabilidad. Por el contrario, cuando la temperatura es demasiado baja, el hongo no absorbe nutrientes, su **actividad metabólica** disminuye y su **tasa de respiración** se hace más lenta. Todo lo anterior, causa una disminución en el crecimiento del micelio. Cada especie de hongo o incluso cada cepa tiene su temperatura óptima de crecimiento, pero en general oscila entre 20 a 28 °C. Aunque también hay cepas que pueden crecer en un amplio intervalo de temperatura, de 10 a 32 °C. El micelio de muchas especies de hongos deja de crecer; cambia de color y muere por encima de los 40 °C, sobre todo, si se mantiene bajo esta condición por largos periodos de tiempo.

Humedad

El contenido de humedad influye directamente sobre el desarrollo de los hongos porque afecta la disponibilidad de nutrientes, ya que éstos necesitan ser disueltos en agua para ser absorbidos por el micelio. Es importante proporcionar y mantener la humedad óptima en el sustrato de crecimiento del hongo. Mantener una humedad del 60 al 70 % en los cultivos permite una mejor protección a la desecación superficial del micelio.

Tamaño de partícula del sustrato

El tamaño de partícula del sustrato empleado para el crecimiento del hongo afecta la accesibilidad del micelio a los nutrientes, al agua y al oxígeno. Un tamaño de partícula muy pequeño dificulta la aireación necesaria para la respiración del hongo y un tamaño muy grande es inadecuado porque se compacta el sustrato y, por tanto, se dificulta el acceso del micelio a los nutrientes.

pH

El **potencial de hidrógeno** (pH = nivel de acidez o alcalinidad) del medio de cultivo donde crece un hongo tiene una influencia directa sobre éste, porque incide en el carácter iónico del medio que ejerce un efecto sobre las proteínas de la membrana y sobre la actividad de las **enzimas** ligadas a la pared celular. El intervalo óptimo de pH para muchas especies de hongos es de 4.5 a 6.0. El pH inicial de un sustrato normalmente es de 5-6, pero a medida que el micelio crece sobre éste, se producen ácidos orgánicos que provocan una disminución del pH.

MEDICIÓN DEL ÁREA DE CRECIMIENTO MICELIAL EN MEDIO DE CULTIVO

Existen diversos procedimientos para determinar el crecimiento de un hongo *in vitro* basados en la medición del área micelial. A continuación, se describen algunas de las técnicas más utilizadas:

Se preparan cajas de Petri (90 x 15 mm) con 20 mL de PDA, EMA o un medio de cultivo adecuado para el desarrollo del tipo de hongo a estudiar; también se pueden emplear suplementos mezclados con el agar;

con la finalidad de evaluar el efecto de dichos suplementos en el crecimiento micelial (Figura 21).

En cajas de Petri también se puede colocar sustrato orgánico fragmentado (1.0 a 1.5 cm de largo) con una humedad de 60 a 70 % (Figura 22). Una vez esterilizadas las cajas (15 min a 121°C), a cada una se le coloca en el centro un fragmento de agar con micelio (**implante**) de preferencia con un diámetro menor a 1 cm². El crecimiento del micelio se evalúa con base al área de desarrollo. El método consiste en procesar imágenes en un software para computadora que establece una escala ("n" pixeles = "n" cm²) y mediante la selección manual del área deseada, determina la medida (en cm²). Para ello se toman fotografías del micelio en las cajas de Petri a un tiempo determinado, de preferencia cuando el hongo haya cubierto ²/₃ de la superficie total. Es importante, que al momento de la fotografía se agregue al campo de visión de la imagen una medida conocida para la estimación de la escala, por ejemplo, una línea de 1 cm. Esta fotografía se procesa usando el software disponible en línea "ImageJ". En lugar de una fotografía, también se puede dibujar el contorno de avance del área del micelio y se calca en papel para su medición posterior, usando el mismo programa citado (Figura 22).

Por otra parte, si en lugar de medir el área del micelio se desea evaluar el crecimiento en mm (milímetros), en determinado tiempo, entonces se realiza lo siguiente. Cada caja de Petri se rotula en la parte del anverso con dos ejes perpendiculares "X" y "Y", sobre los cuales se mide el diámetro de crecimiento micelial cada 24, 48 o 72 h y se calcula el promedio de crecimiento sumando el valor de los dos ejes y dividiendo el resultado entre dos (Figura 23). Con estos datos se estima la **tasa de crecimiento** (*K_r*), la cual se explica en la siguiente sección.

MEDICIÓN DEL ÁREA DE CRECIMIENTO MICELIAL EN SUSTRATO ORGÁNICO

Se coloca sustrato húmedo (60-70 % de humedad) dentro de tubos de ensayo de 22 x 150 mm, a 120 mm del volumen de cada tubo, a partir de la base. El sustrato previamente se fragmenta a un tamaño de partícula de 1.0 a 1.5 cm de largo, para favorecer el adecuado acomodo y compactación en el tubo. Los tubos con sustrato se esterilizan durante 90 min a 121 °C, posteriormente se enfrían y en condiciones de asepsia en una campana de flujo laminar, a cada tubo se le agrega 1 g de inóculo o semilla del hongo a evaluar. El inóculo se elabora con semillas de sorgo (*Sorghum vulgare*) ajustadas a 55 % de humedad y colocadas en bolsas de polietileno resistentes a alta temperatura para su esterilización. Bajo condiciones de asepsia, el sorgo se inocula con micelio desarrollado en medio de cultivo y se incuban de 25-28 °C hasta que el micelio cubra total-

Figura 22. A) Esquema de evaluación del área micelial en la caja de Petri con sustrato orgánico para su medición con el programa ImageJ. B) Crecimiento progresivo del micelio a partir un implante.



Figura 23. Medición de la tasa de crecimiento (mm), basándose en dos ejes rotulados sobre la tapa de la caja de Petri.

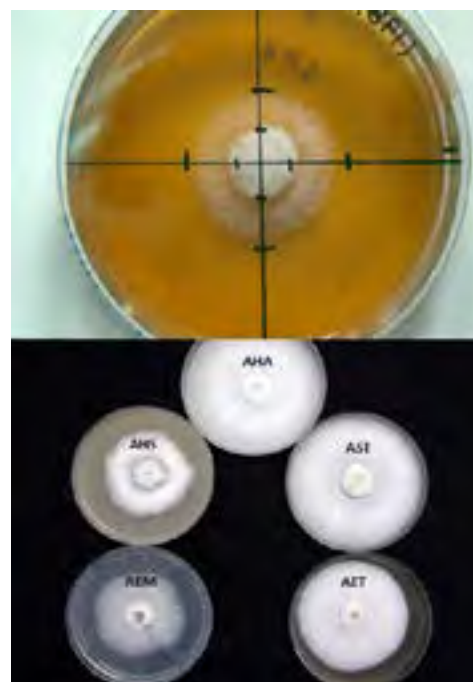


Figura 21. Método para estimar el crecimiento micelial en medio de cultivo y caracterización morfológica de una cepa del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* (setas) cultivada en agar suplementado con: harina de avena (AHA), harina de soya (AHS), salvado de trigo (AST), extracto de malta (EMA) y extracto de trigo (AET).



mente la semilla. A cada tubo se le coloca un tapón de algodón estéril para permitir el intercambio gaseoso (Figura 24) y se incuban en condiciones de oscuridad a una temperatura promedio de 25 °C, aunque ésta dependerá de la especie de hongo a evaluar. La tasa de crecimiento (*K_r*) del micelio se calcula ajustando la función de crecimiento lineal $y = K_r X + c$ (donde *y* es la distancia y *X* es el tiempo), el factor *c* asumido como el valor de *y* cuando *X* = 0; y se expresa en milímetros por día (mm/día). A cada tubo se le rotulan dos líneas longitudinales opuestas "A" y "B" y sobre éstas se mide el crecimiento del micelio cada 24, 48 o 72 h, durante 6 a 12 días, dependiendo del desarrollo acelerado o lento del micelio, hasta que éste cubra el sustrato por completo. Los datos obtenidos se concentran en una matriz para su posterior procesamiento (Tabla 2).

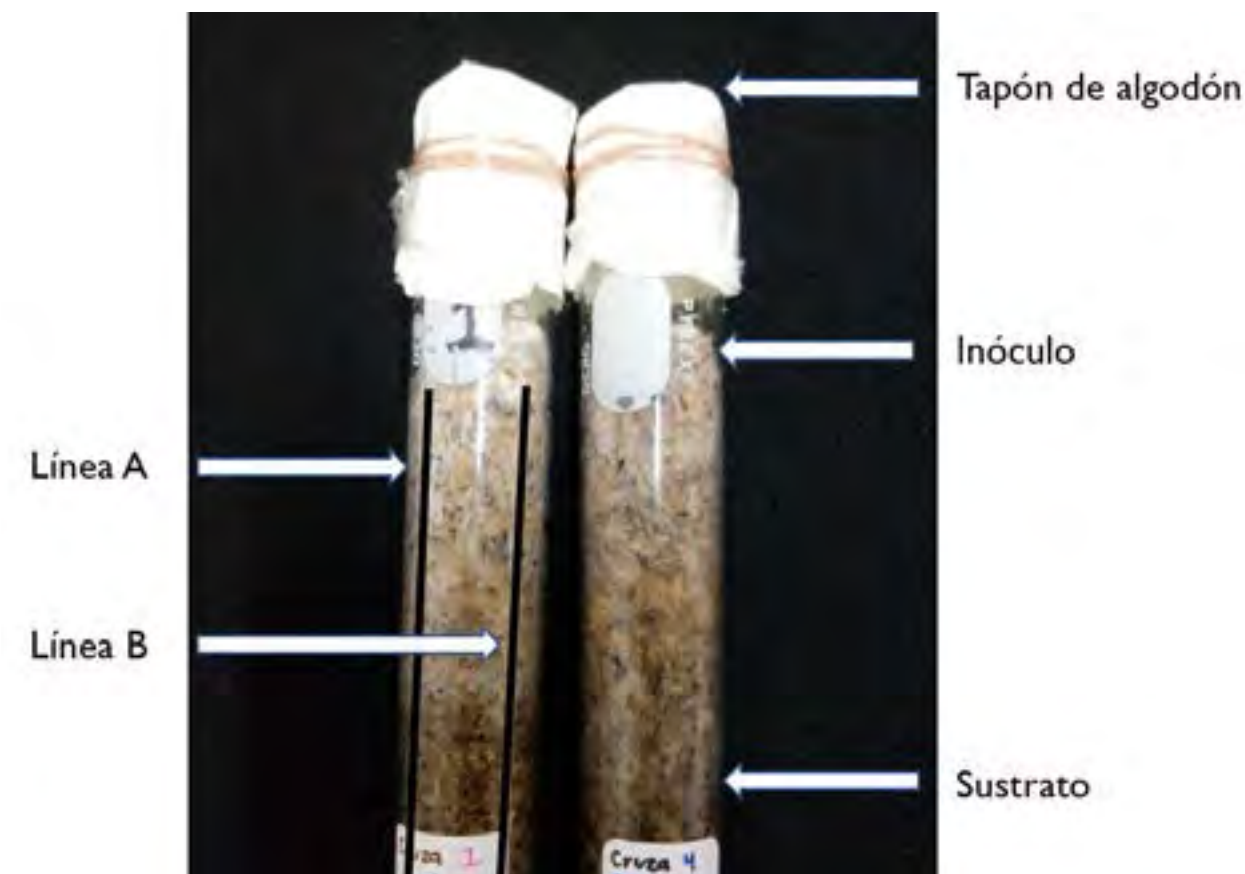


Figura 24. Esquema de la forma de evaluar el crecimiento del micelio en tubos de ensayo.

Observaciones:

Los ensayos de evaluación del crecimiento micelial se pueden realizar considerando las siguientes variables: Cepa, especie, medio de cultivo, sustrato, temperatura o pH, entre otros.

Para realizar un ensayo del efecto del pH en el crecimiento micelial de alguna cepa, se realiza lo siguiente:

Inicialmente se ajusta el pH del medio de cultivo a los valores a evaluar. Se prepara el medio de cultivo y

antes de esterilizarlo, el pH se ajusta, por ejemplo a 6, 7 y 8. Para ello, al medio se le añade una solución de fosfato de sodio dibásico ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) (0.066 M) y fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) (0.066 M). El medio de cultivo se esteriliza 15 min a 121 °C y posteriormente se colocan 20 mL en cajas de Petri. Cada caja se inocula con un implante del hongo a evaluar, como se describió previamente. Las cajas se incuban en oscuridad a la temperatura óptima de crecimiento de la especie objeto de estudio (20 a 28 °C) y se estima la *Kr* como previamente se describió. La forma de preparar la solución reguladora 0.0066 M (Molar) y las condiciones con la que se pueden preparar medios de cultivo ajustados a determinado pH, se presentan en la Tabla 3.

Tabla 2. Formato de registro del crecimiento del micelio. Se considera el valor cada 48 h y su incremento, para obtener el crecimiento diario alcanzado en mm

Fecha:		Especie:							Cepa:						
Muestra	Eje	Crecimiento							Incremento de crecimiento						
		Días							Días						
		0	2	4	6	8	10	12	0	2	4	6	8	10	12
1	a	0							0						
	b	0							0						
Media		0							0						
2	a	0							0						
	b	0							0						
Media		0							0						
3	a	0							0						
	b	0							0						
Media		0							0						
4	a	0							0						
	b	0							0						
Media		0							0						
5	a	0							0						
	b	0							0						
Media		0							0						
Media		0							0						
Observaciones:															

Tabla 3. Forma de preparar el regulador de fosfatos 0.066 M* para los ensayos de efecto del pH en el crecimiento micelial

Solución A	
Fosfato de potasio monobásico	8.98 g
Agua destilada, aforar a	1000 mL
Solución B	
Fosfato de sodio dibásico	23.63 g
Agua destilada, aforar a	1000 mL
pH 5.0: 294.6 mL sol A + 5.4 mL sol. B pH 5.8: 1102.8 mL sol. A + 97.2 mL sol. B pH 7.0: 117.66 mL sol. A + 182.4 mL sol. B pH 8.0: 16.5 mL sol. A + 283.5 mL sol. B	

*La molaridad (M) es el número de moles de soluto contenido en un litro de solución. Por ejemplo, una solución 3 molar (3 M) es aquella que contiene tres moles de soluto por litro de solución.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL MICELIO EN MEDIO DE CULTIVO

Al final del periodo de incubación de los cultivos, se pueden registrar cambios morfológicos del micelio desarrollado, así como del color del medio de crecimiento, datos que complementarían a la información de velocidad de crecimiento de la cepa evaluada. Por ello, es recomendable registrar características como la textura y la densidad del micelio, además de color con el apoyo de alguna guía o clave de colores, la presen-

Tabla 4. Registro de las características macroscópicas de una cepa cultivada en el laboratorio

Temperatura	Medio de cultivo	Color M ¹ MC ²	Textura	Densidad	Exudado	Periodo de incubación
26°	PDA	blanco amarillo (M ₀₀ A ₂₀ M ₀₀)	afieltrado	muy alta	café rojizo (N ₆₀ A ₉₀ M ₉₉) y verde amarillento (N ₂₀ A ₇₀ M ₁₀)	9
	EMA	blanco amarillo claro (N ₀₀ C ₀₀ A ₁₀)	afieltrado	alta	amarillo (N ₀₀ A ₄₀ M ₁₀)	12
30°	PDA	blanco amarillo (M ₀₀ A ₂₀ M ₀₀)	lanosa	muy alta	amarillo (N ₀₀ A ₄₀ M ₁₀)	9
	EMA	blanco amarillo claro (N ₀₀ C ₀₀ A ₁₀)	lanosa	alta	ausente	12

M¹: micelio y MC²: medio de cultivo.
Registro de colores, de acuerdo con atlas de colores (ver sección de bibliografía).

cia de exudados u otras características distintivas que se consideren relevantes. En la Tabla 4 se ejemplifica el llenado de un formato con los valores de crecimiento micelial y características morfológicas del micelio del hongo comestible *Schizophyllum commune* cultivado en dos medios de cultivo e incubado a dos temperaturas diferentes. El registro de esta información permite determinar el medio de cultivo y temperatura favorable para el desarrollo del micelio, así como las posibles variaciones morfológicas que puede presentar.

En la Tabla 5 se presentan las características morfológicas del micelio de 3 especies de *Pleurotus* cultivadas en medios de cultivo suplementados. El formato sugerido permite anotar las diferencias en el tipo de densidad (alta, regular o baja) y textura (aterciopelada, lanosa, sedosa y vellosa) dependiendo de la especie y medio de cultivo empleado.

Tabla 5. Variaciones en la densidad y textura de los micelios desarrollados por tres especies de *Pleurotus* cultivadas con diferentes nutrientes

Medios de cultivo de agar con:	<i>P. pulmonarius</i>		<i>P. citrinopileatus</i>		<i>P. ostreatus</i>	
	Densidad	Textura	Densidad	Textura	Densidad	Textura
Extracto de malta	regular	sedosa	baja	vellosa	baja	rala
Salvado de trigo	alta	aterciopelada	alta	algodonosa	alta	aterciopelada
Harina de avena	alta	aterciopelada	alta	lanosa	alta	lanosa
Extracto de trigo	alta	aterciopelada	regular	sedosa	alta	aterciopelada
Harina de soya	alta	aterciopelada	regular	lanosa	alta	aterciopelada

Establecer una terminología adecuada y uniforme para describir la apariencia de un micelio es una tarea compleja y discutible, ya que mucho depende del criterio y experiencia de la persona que toma la información. Además, los términos aplicados han sido traducidos mayoritariamente de bibliografía anglosajona, por lo que es importante hacer una interpretación adecuada de los mismos. A continuación, se describe una clave para la caracterización del crecimiento del micelio de hongos en medio de cultivo y otra clave para identificar la densidad del micelio.

CLAVE PARA IDENTIFICAR LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y DE CRECIMIENTO DEL MICELIO DE HONGOS EN MEDIOS DE CULTIVO

Características del micelio:

I. Crecimiento

- Sumergido.* Creciendo dentro del agar, con nulo crecimiento aéreo
- Rastrero.* Micelio postrado en la superficie del agar
- En relieves.* Micelio postrado en el agar con zonas concéntricas distinguibles de mayor y menor crecimiento

2. Micelio aéreo

- Ausente.* El micelio crece sólo sumergido, la superficie del agar parece una gamuza
- Velloso.* Con hifas finas, cortas y erectas, por lo que la masa de micelio puede dejar pasar la luz, es decir, es transparente
- Farináceo.* De aspecto harinoso, polvoriento

- Granular.* Cubierto con pequeños gránulos o agregaciones hifales
- Sedoso.* Con hifas largas radiadas paralelamente, más o menos postradas, de aspecto brillante
- Algodonoso.* Hifas largas creciendo en todas direcciones
- Lanoso.* Hifas medianas entretrejidas o grupos de hifas en abundancia
- Flocoso.* Las hifas forman pequeños penachos hifales o verticales, es decir, varias hifas salen de una misma estructura, creciendo hacia afuera del agar
- Plumoso.* Grupos de hifas cortas o largas forman penachos de micelio radiales, en forma de abanico
- Ralo.* Micelio escaso, creciendo adherido a la superficie del medio
- Afieltrado.* Micelio algodonoso a lanoso, que llega a formar agregaciones hifales
- Aterciopelado.* Densos colchones de hifas rectas, generalmente cortas
- Costroso.* Las hifas forman una cubierta o costra de aspecto sólido y duro
- Lacunoso.* Crecimiento deficiente y discontinuo del micelio, con menos volumen
- Zonado.* Micelio con bandas concéntricas o presentando segmentos de diferente textura

CLAVE PARA IDENTIFICAR LA DENSIDAD DEL MICELIO EN UN MEDIO DE CULTIVO

1a Hifas que se observan a simple vista hasta su parte apical	2
1b Hifas largas que se pueden observar en su parte apical sólo con microscopio estereoscópico	densidad muy baja
2a Micelio que cubre completamente el medio de cultivo	3
2b Micelio que crece dejando algunos espacios o huecos en el medio, se observa a simple vista	densidad baja
3a Micelio que presenta escaso crecimiento sin formar agregaciones hifales	densidad regular
3b Micelio que presenta escaso crecimiento y agregaciones hifales	densidad alta
3c Micelio que presenta abundante crecimiento y agregaciones hifales	densidad muy alta

CONSIDERACIONES FINALES

Existen varias formas de estimar o evaluar el crecimiento del micelio de un hongo, por ejemplo, por extensión radial o lineal, biomasa generada, incluso respiración (generación de CO₂) y metabolismo celular, entre otros. El seleccionar un método o técnica, dependerá del objetivo de dicha medición, del organismo y de las condiciones de trabajo con que se cuente, por ejemplo, insumos, equipos e instalaciones.

Para el caso particular del micelio de especies de hongos comestibles y medicinales, ya sea cultivados o silvestres, es esencial determinar inicialmente la velocidad de invasión del micelio en un medio de cultivo o sustrato, por lo que lo más común es aplicar el método de crecimiento radial o lineal del micelio. Como anteriormente se ha explicado, la técnica es relativamente sencilla y es adecuada para trabajar con diferentes variables, por ejemplo, medio de cultivo, sustrato, temperatura, pH, O₂, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, entre otras. El efecto de cada uno de los factores citados se podrá determinar con base a los valores obtenidos de crecimiento, en función del tiempo, en las formas descritas en el presente capítulo.



IV

TÉCNICAS BÁSICAS DE CONSERVACIÓN DE CEPAS DE HONGOS

Gerardo Mata, Dulce Salmenes

Red Manejo Biotecnológico de Recursos, Instituto de Ecología, A.C.
Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya C.P. 91073, Xalapa, Veracruz, México
gerardo.mata@inecol.mx

La conservación de cepas de hongos por largos períodos de tiempo es, sin duda, uno de los retos más importantes que se enfrentan en los laboratorios de investigación y enseñanza, así como en las colecciones de hongos vivos, también llamadas ceparios. Después del aislamiento de las cepas, los esfuerzos se deben orientar a mantener y conservar las características propias de cada una de ellas. Las cepas pueden tener propiedades importantes para diferentes aplicaciones en las industrias alimentaria, agronómica, biotecnológica, forestal, química, farmacéutica, etc. y por tal motivo, evitar el envejecimiento natural de las células de los hongos y mantener dichas características por períodos de tiempo largos, es fundamental. Durante el almacenamiento de las cepas pueden ocurrir eventos que afecten el desarrollo de las mismas y que deterioren sus características deseables. Los factores más importantes que condicionan o limitan el desarrollo de las cepas son: el medio de cultivo utilizado, la temperatura, el pH y la concentración de oxígeno. Generalmente el envejecimiento de las cepas está ligado a la variación de alguno o varios de estos factores (agotamiento de nutrientes en el medio, variaciones bruscas de temperatura y pH) y se expresa a través de la disminución del crecimiento del micelio y con frecuencia el cambio de color en el mismo, la secreción de líquidos de color oscuro y apariencia aceitosa, lo que puede derivar en la muerte del micelio. Cada vez que los nutrientes del medio de cultivo se agotan, es necesario transferir el micelio del hongo a un medio de cultivo nuevo y favorecer las condiciones ideales de desarrollo de la especie que se esté cultivando. A la acción de transferir el micelio de una cepa de un medio de cultivo agotado a otro nuevo, se le conoce como resiembra.

Con el aumento de las resiembras periódicas del micelio a lo largo del tiempo, aumenta el riesgo de que se presenten variaciones en el micelio (**mutaciones**) y contaminaciones en el medio de cultivo que pueden afectar la pureza de las cepas. Los contaminantes más frecuentes son bacterias y hongos (en general de los llamados mohos) que tienen requerimientos nutricionales muy similares a la mayoría de los hongos cultivados.

El éxito de un cepario está ligado principalmente a la experiencia del grupo de trabajo que se encarga de su mantenimiento y a la disponibilidad del equipo adecuado para realizar las labores necesarias. Cuanto mayor sea el número de cepas resguardadas, mayor será la inversión necesaria en personal y equipo especializado para el mantenimiento de cepas. En colecciones pequeñas, un laboratorio básico será suficiente, pero en colecciones grandes, de 100 cepas en adelante, será necesario contar con equipos de laboratorio específicos, áreas destinadas exclusivamente al mantenimiento de la colección, así como personal capacitado.

Con la finalidad de conservar y mantener las cepas de hongos, se han desarrollado diversos métodos que pueden utilizarse según las necesidades de cada colección. De manera general, los métodos de conservación de cepas pueden clasificarse en métodos de corto plazo y métodos de largo plazo. La selección del método adecuado para cada colección depende de muchos factores, pero principalmente de la disponibilidad de equipo y financiamiento para el resguardo de la colección. A continuación, se presentan los métodos más comúnmente utilizados para el mantenimiento de cepas de hongos.

ALMACENAMIENTO A CORTO PLAZO

En esta categoría se pueden incluir los métodos que permiten mantener a las cepas de hongos por períodos cortos de un máximo de 2 años, dependiendo de la especie.

Resiembras continuas

Este método, también llamado método tradicional, consiste básicamente en hacer transferencias de un medio de cultivo en donde el hongo está a punto de agotar los nutrientes a otro medio nuevo que permitirá al micelio continuar su crecimiento. Evidentemente cuanto más frecuentes son las resiembras, más alto es el riesgo de contaminación y aumenta también la posibilidad de que se presente algún error de tipo humano. En el método tradicional el éxito está fuertemente ligado a los tres factores que influyen en la preservación de las cepas: a) frecuencia de las resiembras, b) medio de cultivo utilizado y c) temperatura de almacenamiento. En este método generalmente se utilizan cajas de Petri pequeñas (6 cm de diámetro) con medio de cultivo sólido, usualmente PDA o EMA, o cualquier otro medio recomendado para la especie de hongos en estudio. Para la preparación de las cajas de Petri se deben seguir los procedimientos citados en el Capítulo I y trabajar en condiciones de esterilidad, utilizando una cámara de flujo laminar. Para realizar la resiembra de una cepa se deben cortar pequeños fragmentos de micelio, de la parte apical del mismo, con la ayuda de una navaja estéril o de un tubo de cobre esterilizado (Figura 25). Tanto las navajas como los tubos de cobre se deben esterilizar antes de su uso en una autoclave a 121 °C durante 15 minutos o en un horno convencional a 150 °C durante 3 horas. Con la ayuda de una aguja de disección (esterilizada en la flama de un mechero) se toma un fragmento del micelio con medio de cultivo y se coloca en una nueva caja de Petri con el medio de cultivo adecuado. Las cajas se pueden sellar con plástico adherente para evitar problemas posteriores de contaminación. Después se colocarán en una estufa de incubación, preferentemente de forma invertida (con el medio de cultivo hacia arriba) para evitar problemas de condensación de agua en la caja de Petri. La temperatura adecuada de crecimiento del micelio depende de la especie de hongo, pero en general, durante este período de incubación la temperatura utilizada es de 25 °C. Antes de que el micelio cubra completamente el medio de cultivo en la caja de Petri, ésta se coloca dentro de una bolsa de plástico

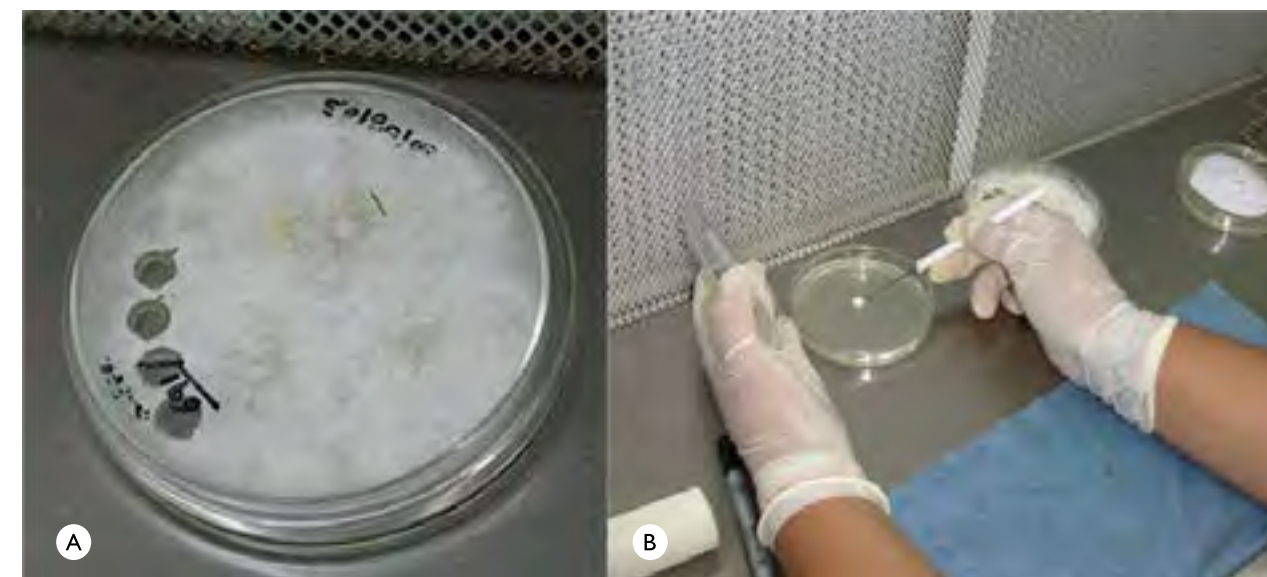


Figura 25. Resiembra de una cepa en medio de cultivo. A. Caja de Petri con micelio a la que se le han extraído algunos implantes. B. Colocación de un implante en una nueva caja de Petri con medio de cultivo.

pequeña, con todos los datos necesarios (número de cepa, medio de cultivo utilizado, fecha de resiembra, etc.) y se almacena a 5 °C. La frecuencia de resiembra varía entre las distintas especies de hongos, pero de manera general se puede decir que va de los 3 a los 12 meses.

La mayoría de las especies de hongos comestibles cultivados se pueden mantener con este método. Las especies de los géneros *Agaricus*, *Auricularia*, *Flammulina*, *Lentinula* y *Pleurotus* muestran recuperación adecuada cuando se les almacena a 5 °C en medio de cultivo. Sin embargo, algunas especies como *Volvariella volvacea*, no soportan las temperaturas bajas y, por lo tanto, después de la resiembra se deben incubar a 32 °C y después mantenerse a temperatura ambiente (no menos de 20 °C) y resembrarse cada 2 o 3 meses, lo que dificulta su mantenimiento.

En nuestro laboratorio, en el INECOL, se ha desarrollado un método de resiembras continuas que utiliza semillas esterilizadas de sorgo (*Sorghum vulgare*) o mijo (*Panicum miliaceum*) en lugar del medio de cultivo. Las semillas son hidratadas, remojándolas durante 6 h, hasta que aumenten su peso en aproximadamente un 30 % y después colocadas en frascos de vidrio o bolsas de plástico para ser esterilizadas en autoclave a 121 °C durante 90 minutos. Después de enfriarse, las semillas se colocan en cajas de Petri estériles y son resembradas con pequeños fragmentos de micelio. Esta variante del método de resiembras continuas facilita y economiza el manejo cuando se trabaja con un gran número de cepas, ya que las resiembras se realizan tomando una o varias semillas cubiertas con el micelio del hongo, que se colocarán nuevamente en otra caja de Petri con semillas esterilizadas (Figura 26). Otra ventaja de esta variante del método de resiembras continuas es que muchas cepas se han logrado recuperar hasta después de 24 meses.

Aunque no se puede saber con precisión cuantas veces se puede resembrar una cepa utilizando el método de resiembras continuas, sí es posible detectar algunos indicadores del envejecimiento del micelio. Las características que se pueden observar con mayor facilidad son: a) cambio en la coloración del micelio. Esto se



Figura 26. Cepas desarrolladas en semillas de sorgo para su conservación en condiciones de refrigeración. **A.** Inicio del desarrollo del micelio en las semillas. **B.** Semillas completamente colonizadas por el micelio del hongo.

puede notar generalmente con un oscurecimiento del medio de cultivo, el cual está asociado al agotamiento de nutrientes en el mismo; b) formación de exudados. Estos exudados, casi siempre de color oscuro y aspecto oleoso, están asociados a la producción de enzimas del grupo de las oxidasas que se relacionan con el envejecimiento micelial; aunque también se pueden formar como respuesta a la presencia de otros hongos contaminantes; c) formación de estructuras en el micelio. Con el envejecimiento se pueden presentar **agregaciones hifales, primordios o pequeños esporóforos**; d) cambio en la textura y/o color del micelio. A causa del envejecimiento o el agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo el micelio puede cambiar drásticamente su aspecto y tornarse en un micelio postrado, oscurecido y de muy lento crecimiento.

Esporadas

Cuando se obtienen **esporadas** de hongos frescos, éstas pueden convertirse en un banco de germoplasma interesante y útil dada la facilidad de obtención y el poco espacio y recursos necesarios para su mantenimiento. Una vez que las esporadas están secas, se colocan en una bolsa de plástico transparente. Al interior de la bolsa se pone un pequeño sobre de gel de sílice, comercialmente llamado sílica gel, con la finalidad de mantener baja la humedad y evitar la germinación de las esporas. Cada bolsa debe contener los datos de la cepa y la fecha de obtención de la esporada. Las bolsas se colocan en un recipiente plástico con cierre hermético y se mantienen en condiciones de refrigeración a 5 °C (Figura 27). Sin embargo, las esporadas de *Volvariella volvacea* se deben mantener a una temperatura no menor de 20 °C. Tanto la obtención de las esporadas como la germinación de las esporas se detalló en el capítulo 2. Bajo las condiciones descritas en este método, algunas esporadas se han logrado conservar viables alrededor de 2 años.

Almacenamiento a largo plazo

En esta categoría se pueden incluir varios métodos que permiten mantener a las cepas de hongos por períodos superiores a un año y con muy buena respuesta en la recuperación de los micelios.

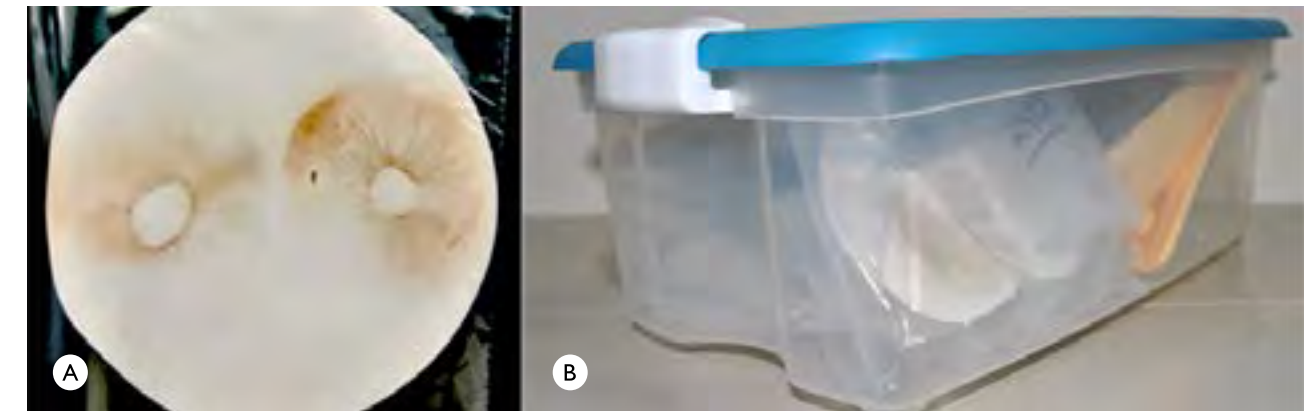


Figura 27. Conservación de esporadas. **A.** Esporada de *Pleurotus djamor* var. *roseus* colocada en bolsa de plástico para su conservación. **B.** Colección de esporadas mantenida en condiciones de refrigeración.

Conservación en aceite mineral (método de limitación de oxígeno)

Este es un método bastante simple y muy económico que consiste en la adición de aceite mineral en tubos de ensayo o viales que contienen medio de cultivo y en los que se ha desarrollado el micelio de la cepa a conservar. El objetivo del método es limitar el acceso al oxígeno por parte del micelio lo que reducirá el metabolismo del mismo y retardará su envejecimiento. Para llevar a cabo este método es necesario colocar medio de cultivo PDA o EMA en tubos de ensayo o viales, tomando la precaución de adicionar solamente el 40 % del volumen de tubo o vial. Esterilizar los tubos con el medio de cultivo en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Antes de que se enfríe el medio de cultivo, colocar los tubos de manera inclinada para permitir la adecuada solidificación del mismo (Figura 28). Inocular el hongo dentro del tubo de ensayo e incubar a la temperatura adecuada. Antes de que el micelio cubra completamente el medio de cultivo, adicionar aceite mineral (densidad 0.8) previamente esterilizado en autoclave (121 °C durante 15 minutos) y enfriado, hasta cubrir completamente el micelio dentro del tubo de ensayo (Figura 28). Los tubos se pueden resguardar de esta manera en refrigeración a 5 °C y se tienen datos de que las muestras se pueden conservar hasta por 6-8 años, aunque generalmente las cepas se resguardan únicamente por 2 años. Para recuperar las cepas, es necesario escurrir el aceite mineral y tomar un pedazo pequeño de medio de cultivo con micelio y resembrarlo en una nueva caja de Petri con medio de cultivo. La caja se debe colocar en incubación de manera

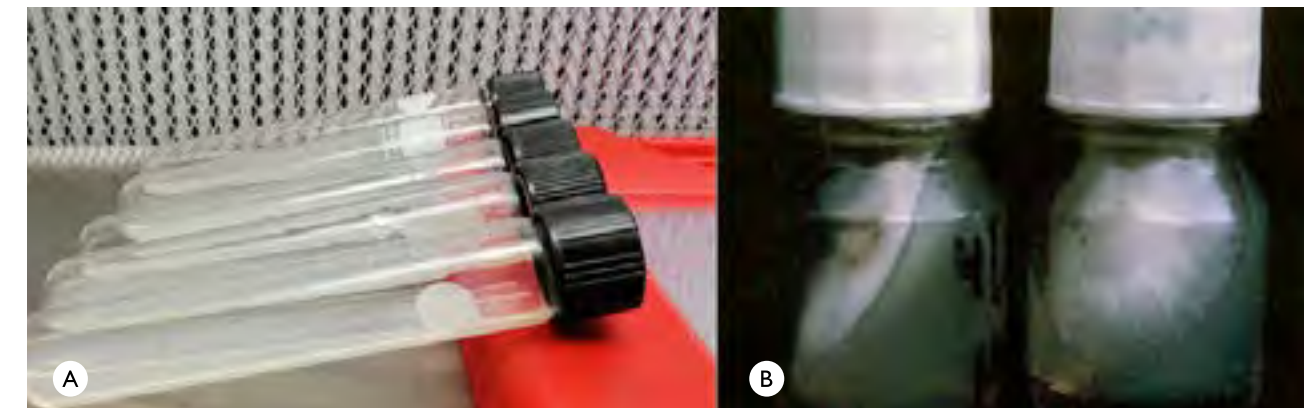


Figura 28. Material utilizado para el método de limitación de oxígeno. **A.** tubos inclinados con medio de cultivo sólido. **B.** viales con micelio listos para agregar el aceite mineral.

que esté ligeramente inclinada hacia un lado para permitir que escurran los restos de aceite mineral. Una vez que se recupere el micelio será necesario resembrarlo en otra caja de Petri para facilitar su completa recuperación.

Existe una variante de este método de limitación de oxígeno y consiste en utilizar agua estéril en lugar del aceite mineral. En este caso, los tubos de ensayo con agua destilada se esterilizan a 121 °C durante 15 minutos y una vez que se han enfriado, se agregan pequeños fragmentos de medio de cultivo con el hongo que se va a conservar. Los tubos se almacenan en condiciones de refrigeración a 5 °C. Con este método las cepas se pueden resguardar entre 5-7 años.

Liofilización

Este método también es conocido como “secado en frío” o “secado por congelación” (freeze-drying, en inglés). El proceso de liofilización consiste en la congelación de la muestra y su secado posterior a través del proceso de **sublimación**, retirando el agua congelada con la ayuda de una potente bomba de vacío. Los equipos comerciales disponibles en el mercado funcionan a base de tres componentes básicos: un mecanismo de congelamiento, una fuente de vacío y una trampa para recapturar el vapor de agua. Generalmente este método es utilizado para la conservación de hongos que esporulan en el micelio, ya que las hifas tienen baja capacidad de sobrevivencia. Los factores que afectan la sobrevivencia en este método son: a) el tipo de crioprotector; b) la velocidad de congelación, c) la velocidad y temperatura de secado, d) las condiciones de almacenamiento y e) el procedimiento de rehidratación. La liofilización es recomendada para preservar soluciones de esporas, las cuales deben colocarse en un líquido que les brinde protección al momento de la congelación. La leche descremada al 10 % es el protector más comúnmente utilizado. Se agrega 1.0 mL de la solución de esporas con el protector en pequeños tubos o viales de polycarbonato y se colocan en un ultracongelador a -80 °C durante 24 h. Después las muestras se introducen en el liofilizador en donde se llevará a cabo el secado de las mismas. Una vez que se ha retirado toda el agua de las muestras, los viales se cierran con cuidado y se almacenan a 5 °C. La recuperación de las muestras se realiza agregando 1.0 mL de agua destilada estéril en el vial que contiene las esporas y esperando 30 minutos para favorecer la rehidratación de las mismas. Después se colocan 0.5 mL de la solución recuperada en cajas de Petri con medio de cultivo sólido y se incuban a la temperatura adecuada para el hongo estudiado. Al cabo de 5-7 días se podrá observar la germinación de las esporas. Con este sistema de conservación se ha reportado que algunas cepas pueden mantener su viabilidad por más de 20 años.

Criopreservación

El método de conservación a temperaturas ultrabajas conocido como criopreservación, es actualmente el sistema más utilizado para la conservación de cepas por largos períodos de tiempo ya que se ha demostrado que el micelio puede mantener su viabilidad y características principales. Este método se basa en la utilización de nitrógeno líquido el cual se encuentra a una temperatura de -196 °C, la congelación de las células a temperaturas tan bajas implica la reducción prácticamente total del metabolismo y el envejecimiento, al menos teóricamente, se detiene. Aunque es un método relativamente sencillo, es necesario realizar un proceso de protección de las células para evitar daños que podrían resultar irreversibles durante la

congelación. Por tal motivo, se utilizan sustancias llamadas crioprotectores que tienen la finalidad de evitar la formación de grandes cristales de hielo al interior de la célula para disminuir el riesgo de rompimiento de la membrana celular. Los principales crioprotectores utilizados son el glicerol (GLI) y el dimetil sulfóxido (DMSO), ambos preparados generalmente al 10 %. En el proceso de preparación de las muestras, las etapas más críticas son: el tiempo de contacto del micelio con el crioprotector para permitir la penetración del mismo en las células, el método y la velocidad de congelación, así como el tiempo y temperatura de descongelamiento. Para la congelación de las cepas se utilizan viales de polycarbonato que son acomodados en cajas del mismo material, que se introducen directamente en un contenedor de nitrógeno líquido (Figura 29).

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un método que permite la recuperación de casi el 100 % de las muestras utilizando semillas de sorgo como vectores para la congelación del micelio. Dicho método ha sido probado con éxito en cepas de los géneros *Agaricus*, *Auricularia*, *Lentinula*, *Pleurotus* e incluso *Volvariella*. Las semillas de sorgo son hidratadas, remojándolas durante 6 h (hasta que aumenten su peso en aproximadamente 30 %) y después colocadas en frascos de vidrio para ser esterilizadas en autoclave a 121°C durante 90 minutos. Después de enfriarse, las semillas se colocan en cajas de Petri estériles y son resembradas con pequeños fragmentos de micelio. Cuando el micelio ha cubierto completamente las semillas de sorgo, se colocan 20 semillas en viales de polycarbonato con 2 mL de glicerol al 10 %, los cuáles fueron previamente esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Es necesario dejar las semillas en el glicerol durante una hora para permitir la penetración del crioprotector en las células del hongo. Después los viales se colocarán en una caja de polycarbonato dentro de un ultracongelador a -80 °C, durante 24 h. Pasado este tiempo, las muestras se depositarán directamente para su resguardo definitivo en un contenedor de nitrógeno líquido (Figura 29).

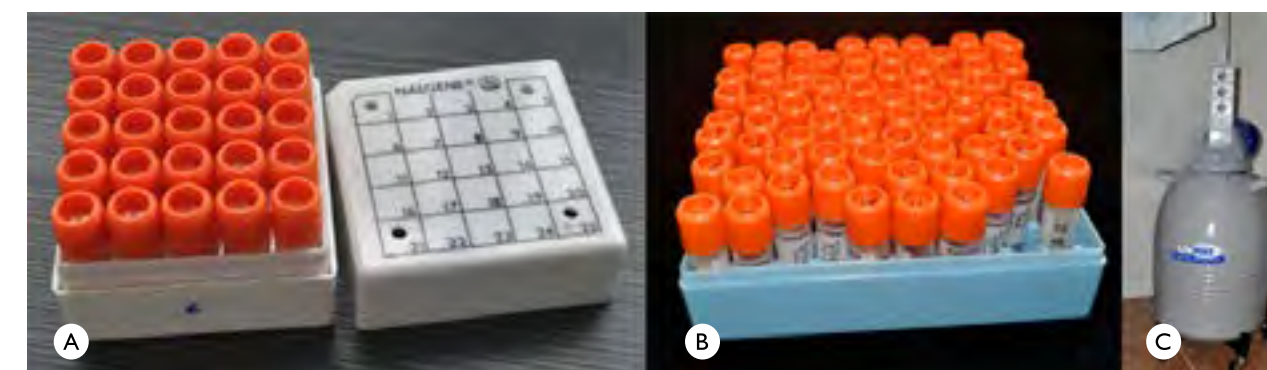


Figura 29. Muestras para su resguardo en condiciones de congelación en nitrógeno líquido. A. Caja de polycarbonato con 25 muestras. B. Caja de polycarbonato con 100 muestras. C. Depósito de las muestras directamente en un contenedor de nitrógeno líquido.

Para asegurar la estabilidad de las cepas, se debe suministrar periódicamente cierta cantidad de nitrógeno líquido. Cada contenedor de nitrógeno tiene una **tasa de evaporación** específica que puede variar con el uso y el número de veces que se abre dicho tanque. En esta etapa, mantener los niveles ideales de nitrógeno líquido dentro del tanque será fundamental para asegurar la sobrevivencia de las cepas. La etapa más delicada del proceso es, sin duda alguna, la descongelación de las muestras, ya que los cambios bruscos de temperatura pueden producir daños irreversibles en las células. Para lograr una recuperación adecuada,

las muestras se deben retirar del contenedor de nitrógeno líquido sin agitarlas demasiado y colocarlas directamente en baño María a 30 °C durante 10 minutos. Después, el contenido completo de los viales se verterá en una caja de Petri estéril colocada con una ligera inclinación para permitir el escurrimiento del crioprotector. Finalmente, las semillas se colocarán en cajas de Petri con el medio de cultivo adecuado para el crecimiento del hongo (Figura 30). Es importante revisar diariamente las semillas para registrar la recuperación de los micelios. Con este método se ha obtenido el 100 % de recuperación en cepas de *Pleurotus* después de 8 años de congelación sin ningún cambio en sus características principales como crecimiento micelial y producción de **basidiomas** (Tabla 6). Sin embargo, con *Agaricus bisporus* se ha registrado viabilidad de las cepas después de 10 años de congelación. Cuando se utilizan semillas de sorgo como vectores para la congelación del micelio de hongos comestibles, se ha observado que la recuperación de los micelios después de la congelación con frecuencia inicia a partir del **hilio** de las semillas (Figura 31)

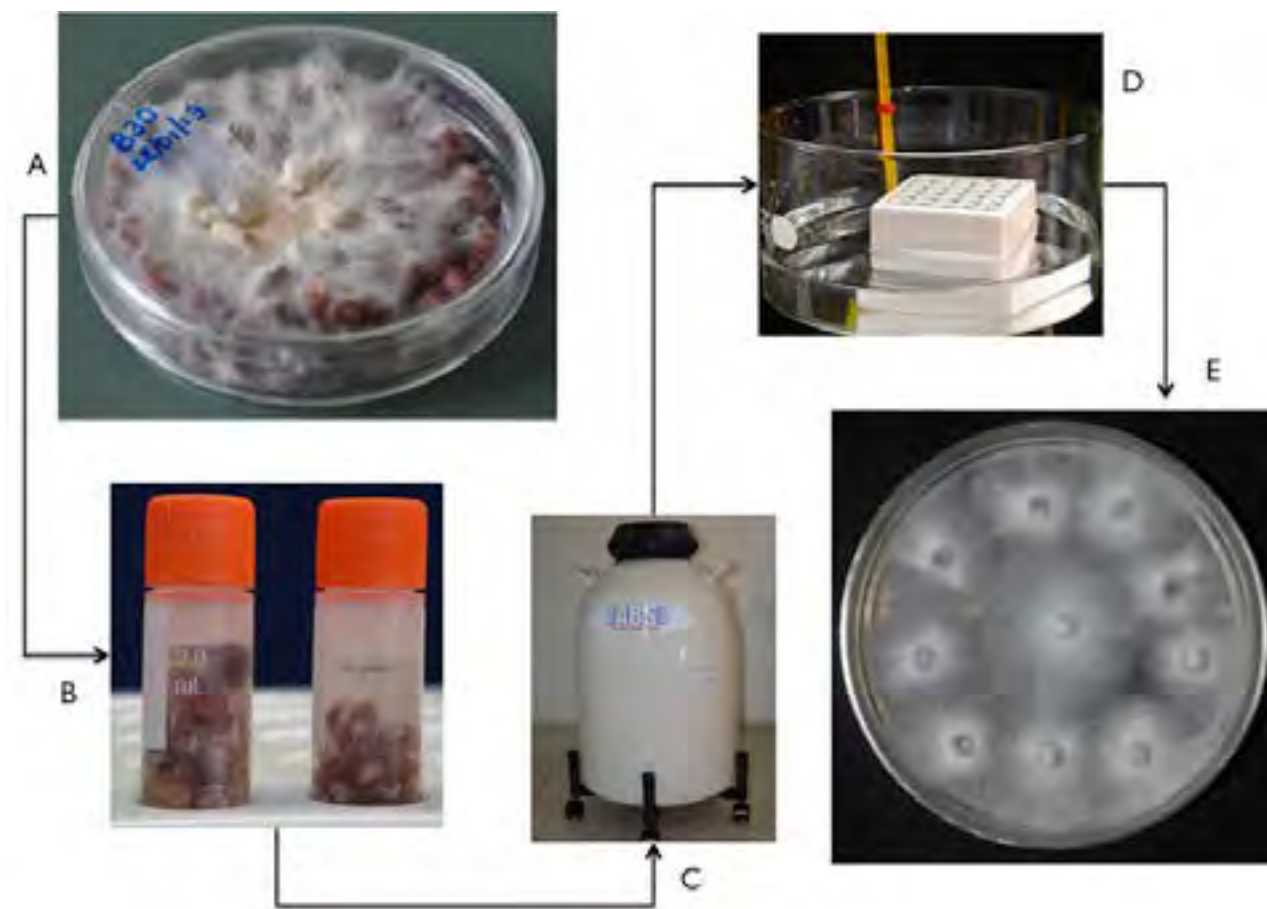


Figura 30. Método para conservar cepas de hongos en nitrógeno líquido. A-C. congelación para la conservación de las cepas. D-E. proceso de recuperación de las muestras. A. crecimiento del micelio en semillas de sorgo esterilizadas. B. semillas con micelio inmersas en glicerol al 10 %. C: congelación dentro de un contenedor de nitrógeno líquido. D. baño María para descongelación de las semillas. E. micelios recuperados después de la congelación.

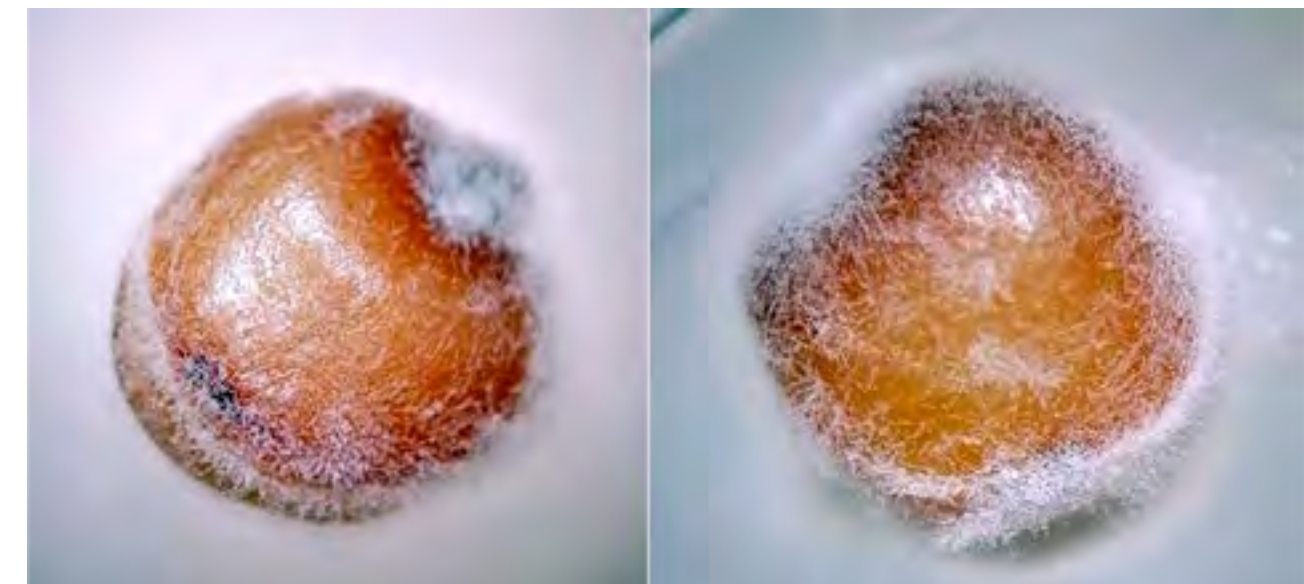


Figura 31. Recuperación del micelio después de la congelación en nitrógeno líquido. Nótese que el micelio crece a partir del hilio o de pequeñas fracturas de la semilla.

Tabla 6. Crecimiento micelial y eficiencia biológica de 4 cepas de *Pleurotus pulmonarius* que se mantuvieron congeladas en nitrógeno líquido durante 8 años

Cepas	Tratamiento	Diámetro del Micelio	Eficiencia Biológica
9	T	66.5 a	57.3 a
	C	67.8 a	64.8 a
115	T	82.6 a	95.8 a
	C	79.2 b	82.2 a
135	T	77.5 a	101.7 a
	C	70.5 b	81.0 a
136	T	80.0 a	99.8 a
	C	80.8 a	103.8 a

Las letras a y b indican diferencias estadísticas significativas en los valores de las columnas.

Una variante de este método y que puede resultar de mucha utilidad, sobre todo cuando no se tiene fácil acceso al nitrógeno líquido, consiste en resguardar las cepas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. El proceso de preparación de las muestras es el mismo descrito con anterioridad, solamente que los viales se resguardarán definitivamente en un ultracongelador. La descongelación se realizará igualmente con los mismos parámetros ya mencionados. Aunque es un método menos utilizado, por lo mismo existe menos información al respecto, sin embargo, se tienen datos de sobrevivencia de cepas por al menos 4 años. Es importante mencionar que con este método si las cepas se congelan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura a la que usualmente se encuentran la mayoría de los congeladores comerciales, las cepas no sobrevivirán y perderán la viabilidad conforme avanza el tiempo. La congelación a dicha temperatura causa daños irreversibles en las células de los hongos.

CONSIDERACIONES FINALES

La selección del método para conservar una colección de cepas de hongos depende mucho de los objetivos de la misma, así como de los recursos materiales y humanos a los que se tenga acceso. Se debe intentar realizar el menor número de resiembras posibles para evitar riesgos de contaminación y envejecimiento natural de las cepas. Es importante considerar que la correcta identificación de las cepas es un elemento fundamental que además aportará valor agregado a la colección. No se debe olvidar que con frecuencia los ceparios resguardan cepas muy importantes y es necesario tratar de mantener sus características por largos períodos de tiempo. Cuando se resguardan grandes cantidades de cepas, se hace necesario sistematizar toda su información para poder llevar un control y evitar confusiones y problemas posteriores. En la actualidad, adicionar secuencias de ADN de los hongos que contiene la colección se ha convertido en una necesidad para robustecer la información de las cepas.



HONGOS SAPRÓTROFOS DEL SUELO

Gabriela Heredia Abarca

Red Biodiversidad y Sistemática, Instituto de Ecología, A.C.
Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya C.P. 91073, Xalapa, Veracruz, México
gabriela.heredia@inecol.mx

El suelo puede considerarse como un ecosistema inmensamente diverso y heterogéneo con multitud de microhábitats que favorecen el desarrollo de una gran riqueza de organismos macro y microscópicos. En particular, los hongos constituyen una gran parte de los componentes bióticos del suelo, en donde forman extensas redes de filamentos llamados micelios; también pueden estar presentes en forma de esporas y estructuras de resistencia como esclerocios y clamidosporas. Se sabe que el micelio constituye la fase metabólicamente activa de los hongos, esto significa que a través de los filamentos se alimentan por absorción, secretan enzimas y producen sustancias de defensa y de desecho. Por su parte las esporas y las estructuras de resistencia permanecen en el suelo en estado de latencia con poca o nula actividad metabólica.

Por su complejidad y riqueza de microambientes, en el suelo se desarrolla la mayor diversidad de especies del Reino de los Hongos, en él es posible encontrar representantes de todas las categorías taxonómicas. En las diferentes capas u horizontes del suelo, la distribución de los hongos varía de la superficie hacia las zonas más profundas.

En forma generalizada, en los suelos se reconocen las siguientes capas u horizontes:

Capa L

Es la capa más externa, compuesta de restos vegetales sin descomponer. La identidad de sus componentes claramente es distinguible.

Capa F

Capa con restos vegetales fragmentados, pero aun reconocibles.

Capa H

En esta capa hay una alta proporción de materiales vegetales muy fragmentados no reconocibles.

Capa A

Capa en la que se encuentran los restos vegetales muy degradados, por lo que existe una alta proporción de materia orgánica y abundante material vegetal, muy fragmentado en piezas pequeñas.

Capa B

En esta capa los fragmentos vegetales casi desaparecen, principalmente se encuentran partículas de suelo con minerales y poca materia orgánica.

Capa C

Es la capa más profunda, está compuesta por la roca parental de la cual se deriva el material mineral.

La distribución de los hongos se centra en las capas superiores y alrededor de las raíces; de esta forma, tenemos que entre los hongos del suelo podemos distinguir los siguientes tipos de comunidades (Figura 32):

1. **Hongos asociados a los restos vegetales:** especies que habitan en las capas L, F y H.
2. **Hongos en partículas de suelo y materia orgánica:** especies que viven en las capas A y B.
3. **Hongos de la rizosfera:** especies que viven en las capas A y B sobre la superficie de las raíces (rizoplasma) y en las áreas adyacentes al sistema radicular (rizosfera).

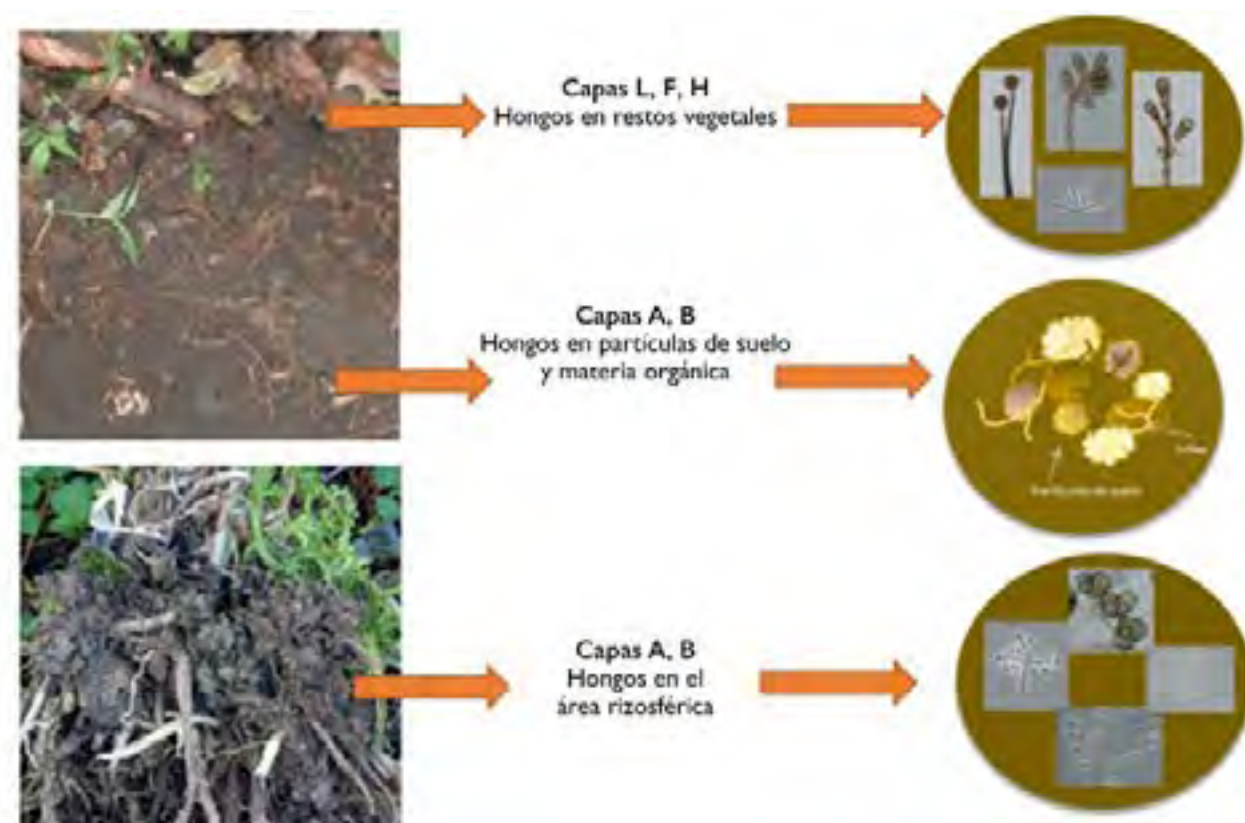


Figura 32. Grupos de hongos saprótrofos que habitan en los horizontes o capas del suelo.

La composición y estructura de las poblaciones de los hongos varía mucho de un suelo a otro, e incluso en una misma área pueden presentarse marcadas diferencias. Las comunidades vegetales y el clima son determinantes en el tipo de material de las capas superficiales y por lo tanto en la composición química de la materia orgánica, el contenido de humedad, la porosidad y la alcalinidad, por mencionar algunos factores físicoquímicos característicos de los suelos. En consecuencia, las poblaciones de los hongos del suelo de agroecosistemas son diferentes a las de las selvas, los desiertos o los bosques templados.

Aunque existen importantes especies **fitopatógenas**, la mayoría de los hongos que habitan en el suelo son **saprótrofos** o sea que se alimentan de materia orgánica inerte. La actividad de los hongos saprótrofos en la naturaleza está íntimamente relacionada con el equilibrio de los ecosistemas. Además de participar en el reciclaje de nutrientes mediante la descomposición de los restos vegetales, los hongos saprótrofos del suelo forman parte esencial de las cadenas tróficas al constituir parte de la dieta de ácaros, colémbolos y milpiés, entre otros organismos de la **mesofauna**. También participan en la mineralización del fósforo y favorecen la formación de agregados de partículas confiriéndole a los suelos una mayor resistencia hacia la erosión.

Así mismo, por su capacidad para producir enzimas y **moléculas bioactivas**, los hongos del suelo son considerados como un importante recurso biotecnológico con aplicación industrial y farmacéutica.

Tomando en cuenta la complejidad del suelo y nuestra incapacidad para detectar a simple vista los hongos que habitan en él, para poder estudiarlos, requerimos de la práctica de metodologías especializadas que nos permitan su manipulación mediante aislamientos en medios de cultivo.

Previamente a su aislamiento es importante tener claro los objetivos que se persiguen. El tipo y número de especies de hongos del suelo que se aíslan, en gran parte depende de la metodología que se emplee. Pequeñas variaciones en las técnicas pueden resultar en marcadas diferencias en la percepción de la abundancia, composición y patrones de distribución de sus comunidades.

Es importante enfatizar que los procedimientos y métodos que a continuación se exponen deben considerarse como una guía y que, en dependencia del tipo de los suelos y materiales vegetales de nuestro interés, se deberán hacer los ajustes y modificaciones que a nuestro criterio consideremos necesarios. Los métodos de aislamiento para los hongos del suelo son un reto a nuestra creatividad, entre más profundicemos en la biología de los diferentes grupos, más podremos experimentar alternativas para su aislamiento y cultivo en el laboratorio.

COLECTA Y TRASLADO DE MATERIAL

Ya sea suelo, restos vegetales o raíces, las muestras deben depositarse y trasladarse preferentemente en bolsas de papel. Cuando el material está muy húmedo, las bolsas se deberán cambiar cuantas veces sea necesario. A continuación, se menciona el procedimiento para la toma de muestras para los diferentes grupos de hongos saprótrofos que habitan en el suelo.

Hongos asociados a los restos vegetales

Es conveniente recoger hojas, pedazos de madera y ramas con diferente grado de descomposición. Dependiendo de los objetivos del estudio, se puede diferenciar el material según su grado de descomposición. En la recolección se debe eliminar el lodo o restos de arena y arcilla adheridas a las muestras. Paralelamente es recomendable tomar muestras o fotografías de las plantas vivas a las que pertenecen los restos vegetales para referenciar los aislamientos con la especie del sustrato en que fueron encontrados.

Hongos en partículas de suelo y materia orgánica

Se deberán retirar las capas superficiales (L, F, H) del suelo. Generalmente las muestras se toman del horizonte A, a una profundidad de 0-20 cm, sin embargo, esto depende del grosor de las capas del suelo del área de estudio. Para extraer el suelo se usan instrumentos de metal (cucharas, espátulas, palitas de jardinería) limpios y desinfectados en alcohol al 70 %. Se recomienda tomar entre 10-30 g de suelo para disponer de suficiente material de referencia y para la realización de análisis edafológicos básicos.

Hongos de la rizosfera

Para la colecta de raíces es conveniente extraer raíces primarias y secundarias, paralelamente se debe tomar el suelo circundante al sistema rizosférico. Se recomienda guardar las raíces junto con el suelo que les rodea para evitar que estas se dessequen o se contaminen.

Traslado del material y almacenaje

En zonas tropicales las muestras se deben transportar en una hielera, para lo cual las bolsas de papel se deberán colocar dentro de bolsas de plástico con cierre hermético. Cuando las muestras están húmedas es necesario eliminar el exceso de agua extendiéndolas por varias horas sobre una superficie limpia en un cuarto debidamente aseado y sin corrientes de viento.

Las muestras deben trabajarse lo antes posible después de su colecta (en horas o máximo 2-3 días). En caso de que no sea posible su procesamiento inmediato, se deberán refrigerar, sin congelarlas y siempre bajo oscuridad. Es importante considerar que cualquier tipo de almacenamiento puede alterar la composición de las poblaciones de los hongos.

AISLAMIENTO

Antes de practicar cualquier método de aislamiento es importante contar con un espacio debidamente acondicionado. El área de trabajo debe mantenerse limpia, sin corrientes de viento y de preferencia con una campana de flujo laminar con suministro de gas para la instalación de mecheros; en caso de que no se cuente con instalaciones para gas, se pueden usar lámparas de alcohol.

Selección de medios de cultivo

En el aislamiento de los hongos del suelo la selección adecuada del medio de cultivo es clave en el tipo de especies que se logre captar. Cuando se busca aislar la mayor diversidad de hongos en muchos de los protocolos se recomienda el uso de medios poco selectivos entre los cuales comúnmente se incluyen papa-dextrosa-agar (PDA), extracto de malta-agar (EMA) y Czapek agar (CZA). Cabe mencionar que, algunos autores consideran que estos medios distan de ser poco selectivos ya que en realidad favorecen el desarrollo de hongos de rápido crecimiento, sobre todo aquellas especies que crecen explosivamente en presencia de azúcares como la sacarosa, dextrosa y la maltosa que se encuentran en altas concentraciones en los medios mencionados.

Una estrategia para atenuar el crecimiento de algunos hongos y de esta forma favorecer el crecimiento de especies de lento desarrollo, es el empleo, en bajas concentraciones, de **sustancias fungistáticas** como rosa de Bengala, ciclosporina A, cicloheximida y dicloran. Tomando en cuenta lo anterior, una opción recomendable para el aislamiento de hongos del suelo es el medio Dicloran-rosa de Bengala-cloranfenicol-agar (DRBC), el cual además de contener una baja concentración de azúcar, incluye antibióticos y retardadores de crecimiento. También es aconsejable el empleo de medios de cultivo pobres en nutrientes, que simulan las condiciones **oligotróficas** del suelo; ejemplos de este tipo de medios son el extracto de suelo agar y carboximetil celulosa agar.

Se considera que el uso de diferentes medios es la manera más efectiva para captar una amplia panorámica de las comunidades fúngicas, sin embargo, esta estrategia es poco factible por su laboriosidad. Muchos medios se han propuesto para aislamientos selectivos ya sea de grupos fisiológicos (p. ej. hongos celulolíticos, queratinolíticos, quitinolíticos), o bien de grupos taxonómicos específicos (basidiomicetos, oomicetos, chytridiomicetos). Complementario al presente capítulo se anexa una lista de referencias en las que se incluyen protocolos de la mayoría de los medios selectivos que son empleados. Cabe mencionar que uno mismo puede crear el medio según las características del tipo de suelo o del grupo de hongos de nuestro interés.

MÉTODOS DE AISLAMIENTO

Los métodos de aislamiento pueden dividirse en métodos directos e indirectos.

I. Métodos directos

Se refiere a la transferencia de un hongo de un sustrato determinado, a un medio de cultivo; aunque es un proceso muy simple requiere de habilidad y conocimiento. A continuación, se describen algunos métodos directos que se emplean para obtener aislamientos a partir de partículas de suelo y de restos vegetales.

I.1. Hongos en partículas de suelo

Con el uso de un microscopio estereoscópico, una vez localizadas las estructuras del hongo (puede ser micelio, **rizomorfos**, **esporóforos** o **esclerocios**), con una aguja de disección previamente esterilizada, se

toman fragmentos de micelio o esporas y se inoculan en cajas de Petri con el medio de cultivo seleccionado. Las cajas de Petri se incuban a 25 °C y se revisan diariamente, los micelios emergentes se transfieren a tubos con medio de cultivo inclinado.

Los métodos directos para aislar hongos del suelo de las capas A y B pueden complementarse con la aplicación de cebos o carnadas colocadas entre o sobre las partículas de suelo. Se utilizan muy diversos tipos de carnadas, su empleo depende del grupo de hongos que se desee aislar; para los hongos **celulolíticos** se aplican pedazos de papel filtro, celofán, semillas y hojas de pastos; para los **queratinolíticos** cabellos, uñas y piel; para los **quitinolíticos** exoesqueletos de artrópodos, escamas de pescado y alas de insectos; para los entomopatógenos, cadáveres de insectos y para los nematófagos, nemátodos vivos.

Los cebos previamente esterilizados se colocan en cajas de Petri con suelo humedecido. Las placas se incuban en la oscuridad a 25 °C y se revisan periódicamente durante 5-10 días.

1.2. Hongos en restos vegetales

Bajo el microscopio de disección, las hojas deben revisarse meticulosamente en el haz y en el envés; en los troncos y ramas, se aconseja inspeccionar las áreas más degradadas, las bifurcaciones y por debajo de la corteza (Figura 33A). De los esporóforos detectados, en forma aséptica, se pescan las esporas y se inoculan en placas con medio de cultivo en cajas de Petri pequeñas (60 mm diámetro). Para la extracción de las esporas se recomienda usar agujas con punta muy fina, previamente esterilizadas y enfriadas.

Preferentemente la inoculación debe hacerse en diferentes medios de cultivo, se recomienda agua-agar, harina de maíz-agar y JugoV8 agar. En la preparación de los medios se puede emplear una infusión obtenida de hojas degradadas provenientes de la zona de estudio.

En los materiales sin esporóforos, para estimular la esporulación es recomendable su incubación en cámaras húmedas. Para lo cual las muestras deben estar libres de lodo, restos de suelo y materia orgánica. Las cámaras húmedas pueden elaborarse con cajas de Petri de cristal o bien en recipientes de plástico con tapas (Figura 33B). Es importante que las tapas permitan el intercambio de aire sin que el material se encuentre directamente expuesto. Para crear un ambiente húmedo, en el fondo de los recipientes se puede colocar papel filtro o toallas secantes esterilizadas y humedecidas con agua estéril. Para evitar la proliferación de organismos **micófagos** y larvas se recomienda aplicar durante los primeros tres días naftalina o paradiclobenceno en cristales y después retirarlos.

El papel debe cubrir todo el fondo del recipiente y no contener exceso de humedad ya que esto podría estimular el crecimiento de bacterias, actinomicetos y hongos del ambiente de rápido crecimiento (p. ej. *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma*). Las muestras se agrupan en hojas, tallos y trozos de madera y se colocan separadamente (33C-D), evitando que los materiales queden amontonados unos con otros. Las cámaras se deben revisar diariamente, en caso de ser necesario humedecer el papel, se debe aplicar con una piseta agua estéril por los costados de los recipientes, evitando mojar las muestras directamente.



Figura 33. Métodos directos para detección de los hongos en restos vegetales. A-B. Revisión de material y extracción de esporóforos. C-D. Preparación de cámaras húmedas en cajas de Petri de cristal.

II. Métodos indirectos o culturales

Son más laboriosos que los métodos directos debido a que las muestras son sometidas a tratamientos específicos previamente a su inoculación en los medios de cultivo. A continuación, se describen los métodos más frecuentemente empleados para la obtención de aislamientos de hongos del suelo.

II.1. Placas de suelo de Warcup

Este método es sencillo y puede dar una idea preliminar de la cantidad de hongos que contienen nuestras muestras. Sin embargo, se corre el riesgo de que proliferen una alta cantidad de colonias que dificulten la obtención de cultivos puros. Con el empleo de medios selectivos y añadiendo retardadores de crecimiento es factible la reducción del número de colonias. Es importante recordar que cuando se trabaja directamente con suelo es necesario aplicar al medio antibióticos para controlar la proliferación de bacterias.

La técnica consiste en los siguientes pasos:

1. Dependiendo del estado de las muestras se eliminan los terrones grandes pasando la muestra en un tamiz limpio (aprox. de 1 mm de abertura) y desinfectado con alcohol al 70 % o hipoclorito de sodio.
2. Con una espátula desinfectada, se espolvorea suelo (0.2-5 mg) en el fondo de una caja de Petri estéril.
3. Se puede añadir una gota de agua destilada estéril para obtener una mezcla homogénea.
4. Posteriormente se añade el medio de cultivo seleccionado ya esterilizado y se rota la caja para que las partículas se distribuyan en toda la superficie. El medio de cultivo debe estar en fase líquida a una temperatura tolerable a nuestra piel. Para evitar que solidifique se puede mantener en un recipiente en baño María (a 45 °C aproximadamente).
5. Las placas se incuban a 25 °C y los hongos que van apareciendo se transfieren a tubos de ensayo con medio de cultivo (p. ej. PDA, EMA)

II.2. Diluciones de suelo en placas

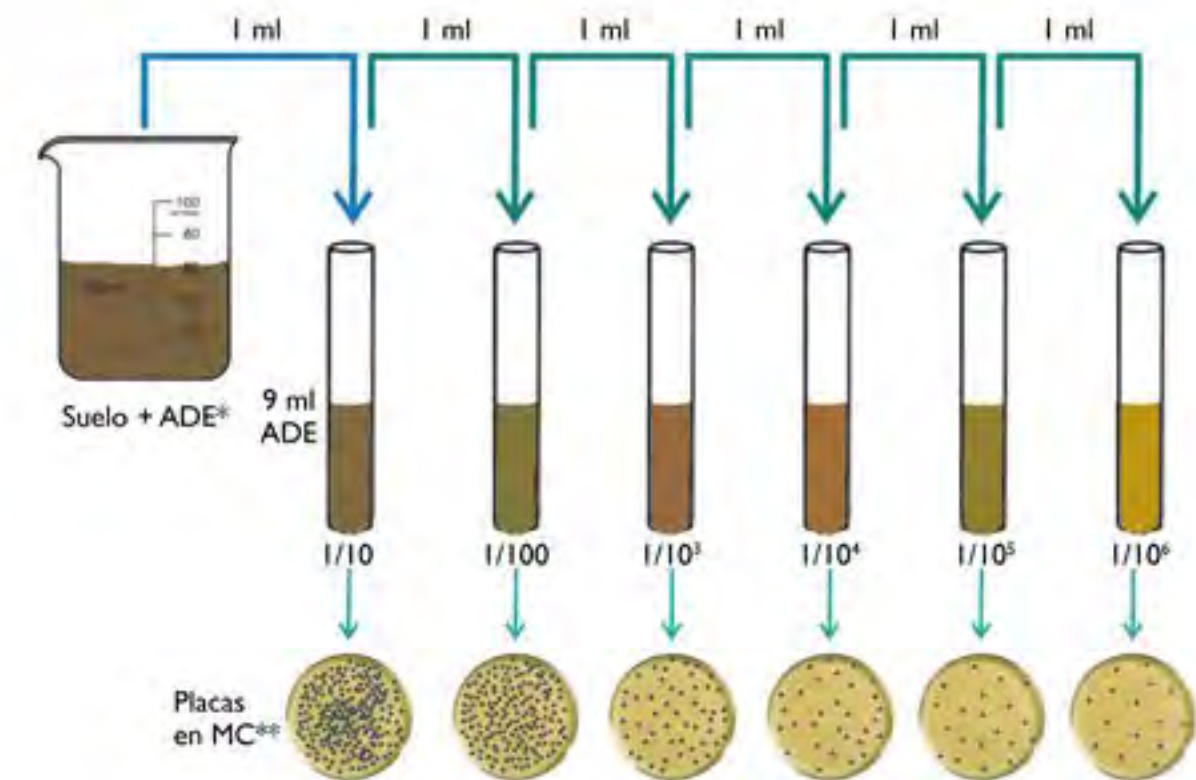
Esta técnica también es nombrada por algunos autores como "Partículas en suspensión" y ha sido ampliamente utilizada en los estudios de hongos del suelo a pesar de que presenta ciertas limitaciones; se ha demostrado que gran parte de las colonias que se obtienen provienen de esporas, por lo que las especies que se encuentran en forma de micelio no son detectadas o bien son subestimadas. Por lo contrario, las especies que producen abundantes esporas y que tienen un crecimiento rápido son sobreestimadas (p. ej. *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp. y *Aspergillus* spp.).

Previo a emprender el procesamiento de muestras a gran escala es recomendable la realización de ensayos para ajustar la dilución más conveniente al suelo en estudio y así poder manipular las colonias emergentes y lograr los aislamientos necesarios.

Mediante esta técnica se pueden obtener datos cuantitativos multiplicando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por el factor de dilución, el resultado es una estimación referenciada a un gramo de suelo. Esta técnica es útil para experimentos comparativos y análisis de comunidades de algún fitopatógeno en especial, ya que permite la aplicación de análisis estadísticos. Se recomienda usar medios de cultivo con antibiótico (p. ej. cloranfenicol, estreptomina o penicilina) para inhibir el crecimiento de bacterias y retardadores de crecimiento.

En la figura 34 se esquematizan los siguientes pasos:

1. Un gramo de suelo (peso seco) se tamiza o pulveriza en mortero (si es necesario) y se le añaden 9 ml de agua destilada estéril (ADE); en vez de ADE también se puede usar agua agar (0.15 %) o carboximetilcelulosa (0.1-0.2 %), para alentar la precipitación de las partículas. La obtención de una mezcla homogénea en este paso es de suma importancia ya que de ella dependerá la concentración de las partículas en las diluciones subsecuentes.
2. La suspensión se mezcla vigorosamente y se toma 1 mL para transferirla a un tubo con 9 ml de ADE, resultando así una solución con 0.01 de dilución del material de origen.



ADE= Agua destilada estéril. MC= Medio de cultivo

Figura 34. Procedimiento para la elaboración de diluciones de partículas de suelo. En la parte inferior se muestra el crecimiento de colonias de hongos en placas con medio de cultivo.

- El proceso se repite para obtener diluciones entre 0.001, 0.0001 y 0.00001 o más si es necesario.
- Un mililitro de la suspensión se inocula en las cajas de Petri, posteriormente se añade el medio de cultivo elegido ya esterilizado y enfriado. Las placas deben moverse pegadas a la plataforma de trabajo dando círculos para dispersar la muestra en toda la superficie de la caja de Petri. Alternativamente las alícuotas se pueden vaciar en placas con medio solidificado y usar una espátula para dispersar las partículas en toda la superficie de la caja.
- Después de 3-6 días, las placas con las diluciones con 10-30 colonias se seleccionan para contar las colonias y realizar los aislamientos en tubos de ensaye con medio de cultivo inclinado. Generalmente las diluciones de 10^{-4} y 10^{-5} se consideran adecuadas para el aislamiento de los hongos, sin embargo, esto puede variar según el tipo de suelo (Figura 35).

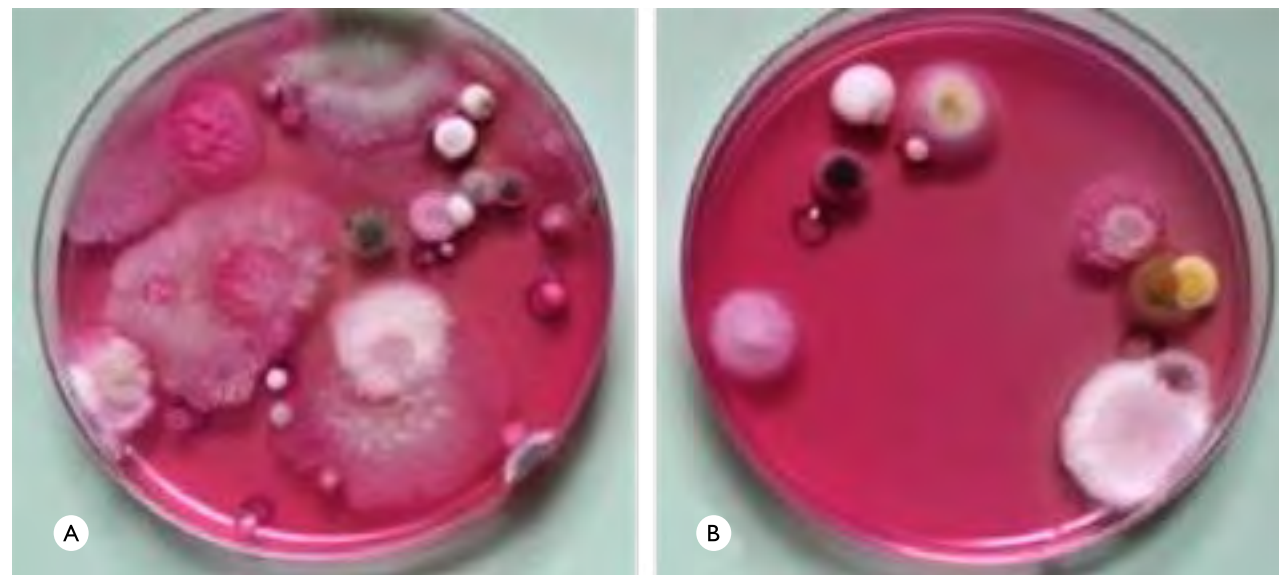


Figura 35. Placas con medio de cultivo DRBC.
A. Colonias desarrolladas a una dilución 10^{-3} . B. Colonias en una dilución 10^{-5} .

II.3. Filtrado de partículas mediante lavado de suelo

Existen diferentes variaciones de esta técnica, en todos los casos el objetivo central es recuperar partículas de suelo con pedazos de micelio, garantizando así que los hongos que se aíslan forman parte de la fase activa del micelio que habita en el suelo. Así mismo, esta técnica disminuye en gran parte las especies de rápido crecimiento y da oportunidad de que se expresen hongos que generalmente no son aislados por las técnicas descritas con anterioridad.

Para el lavado de partículas se han diseñado varios dispositivos, entre estos, el sistema de filtración mediante micro-tamices anillados ("Mini-sieve micro sieve set" en inglés) es una alternativa de fácil adquisición y uso que ofrece buenos resultados. El sistema consta de cuatro tamices con aberturas graduales (1.0 mm, 0.7 mm, 0.5 mm y 0.21 mm). Dependiendo del tipo de suelo o material (p. ej. restos vegetales), en el tercer tamiz se pueden colocar un filtro de polipropileno con $210 \mu\text{m}$ de abertura y en el cuarto uno con $105 \mu\text{m}$ de abertura. La captura de partículas de diferente tamaño ofrece información detallada sobre los hongos

que habitan en los micro-nichos del material edáfico en diferente estado de descomposición, además en suelos con alto contenido de arena permite captar partículas muy finas.

Para lavar las muestras de suelo se requiere la instalación de una toma de agua, un soporte universal, matraces kitazato, mangueras y una bomba de vacío. La instalación de los micro-tamices se muestra en la Figura 36. Antes de procesar las muestras es importante verificar la esterilidad del agua que se usará en los lavados.

El procedimiento consta de los siguientes pasos:

- Se pulveriza el suelo en un mortero previamente desinfectado.
- Se coloca la muestra (1-5 g peso seco) en el primer tamiz del dispositivo y con un chorro fino de agua se inicia el lavado del suelo (Figura 37 A-C). Para el procesamiento de muchas muestras es aconsejable adaptar una bomba de vacío que facilite el flujo del agua durante los lavados.
- La intensidad del lavado depende de la muestra, se recomienda entre 5 a 10 minutos (4-6 litros de agua) de lavado continuo.
- Seguido del lavado, las partículas de suelo que quedan en los filtros de polipropileno se transfieren a círculos de papel filtro esterilizado colocados en un embudo de porcelana conectado a una bomba de vacío (Figura 37 D-E).

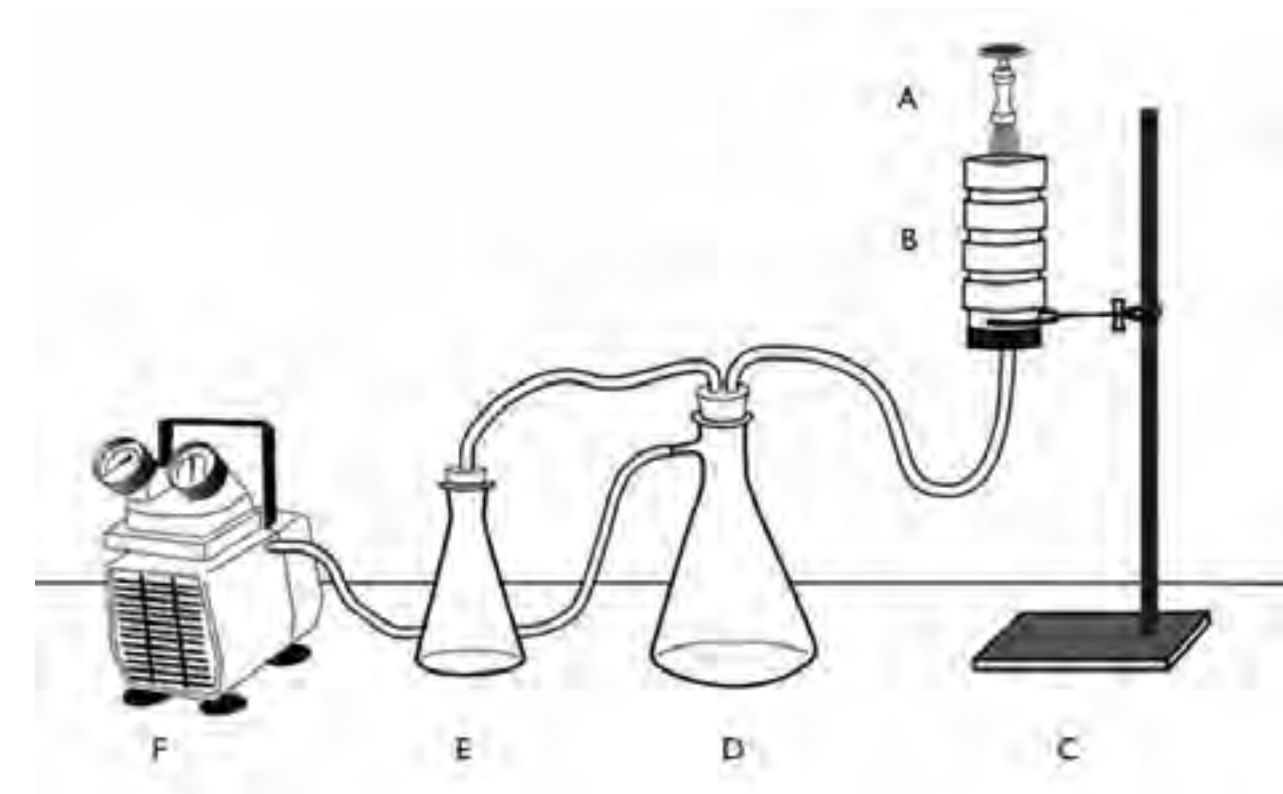


Figura 36. Dispositivo para el lavado de partículas.
A. Toma de agua. B. Sistema de micro- tamices. C. Soporte universal.
D. Matraz kitazato captura de agua y suelo. E. Trampa de agua. F. Bomba de vacío.

5. El papel con las partículas se coloca en cajas de Petri estériles por varias horas hasta que el exceso de agua se evapora (Figura 37 F).
6. Posteriormente de 5-10 partículas se inoculan en placas con el medio de cultivo con antibiótico (Figura 37 G-H).
7. Las placas inoculadas se incuban a 25 °C y se revisan diariamente. Las hifas emergentes de las partículas se transfieren a tubos de ensaye con medio de cultivo (p. ej. PDA, EMA) (Figura 37 I-K)
 - 7a. Alternativamente las partículas también se pueden recuperar en recipientes de cristal (p. ej. tubos de ensaye) o de plástico esterilizados (capacidad 50 ml) con ADE, en los que se sumergen repetidamente los filtros de polipropileno para que las partículas se desprendan y queden en suspensión. Dependiendo de la concentración de partículas se pueden hacer diluciones o bien, inocular directamente alícuotas de 0.1 a 1 ml en las placas de Petri con el medio seleccionado. Este método también permite la aplicación de análisis estadísticos ya que a través de la inoculación de partículas se puede calcular la intensidad de colonización de las especies, mientras que mediante las alícuotas la abundancia de las especies se expresa por volumen.

La autora expresa su agradecimiento a los técnicos Manuel Escamilla y Cesar Vicente Rojas Gómez por el apoyo en la realización de las ilustraciones.



Figura 37. Filtrado de partículas mediante lavado de suelo. **A.** Colocación de la muestra en el tamiz superior. **B-C.** Lavado del suelo. **D.** Recuperación de partículas en tamiz inferior. **E-F.** Concentrado y secado de partículas en papel filtro. **G-H.** Inoculación de muestras en medio de cultivo DRBC. **I.** Colonias emergentes de partículas. **J.** Transferencia de partículas a tubos con medio de cultivo. **K.** Colonias aisladas.



VI

HONGOS ENTOMOPATÓGENOS, MICOPARÁSITOS Y NEMATÓFAGOS

Gloria Carrión¹, Daniel López-Lima², Zelene Durán Barradas¹

¹ Red de Biodiversidad y Sistemática, Clúster Científico y Tecnológico BIOMIMIC®, Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya, C.P. 91073, Xalapa, Veracruz, México

² Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana. Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Lomas del Estadio, C.P. 91000, Xalapa, Veracruz, México C.P. 91073, Xalapa, Veracruz, México

gloria.carrion@inecol.mx

EL MANEJO DE PLAGAS EN LA AGRICULTURA

Las prácticas agrícolas a nivel mundial que venían funcionando sobre el conocimiento empírico de los pueblos nativos (agricultura tradicional), fueron reemplazadas, en los años 1940's, por un sistema agrícola intensivo y extensivo llamado ahora agricultura moderna o convencional. El principal objetivo de este tipo de agricultura es el aumento del rendimiento de los cultivos, dando paso a la llamada revolución verde, sin tomar en cuenta las desventajas que estas prácticas ocasionarían en el suelo y el desequilibrio en las poblaciones de patógenos de plantas. Estos dos puntos de vista de producción de alimentos han tenido su manera de enfrentar el control de plagas y enfermedades en los cultivos, las cuales continúan practicándose en ambos casos. Sin embargo, desde los 1970's se han realizado innumerables estudios sobre la regulación de poblaciones que afectan negativamente a los cultivos y sobre la manera de encontrar un equilibrio en la diversificación y el manejo sostenible. Esto ha sido posible gracias al rescate de conocimientos de la agricultura tradicional, sin perder de vista el mantenimiento de una buena producción en los cultivos (seguridad alimentaria) y lograr un mercado justo para los agricultores, con lo cual se ha generado una nueva visión en las prácticas agropecuarias denominada **agricultura ecológica**. En el manejo sostenible para diversos cultivos se han propuesto distintas alternativas biotecnológicas a los productos químicos, como los extractos vegetales con potencial de inhibir alguna etapa del ciclo de vida de los organismos plaga, o el control biológico que consiste en el aumento de poblaciones de organismos benéficos que de manera natural están presentes en los agroecosistemas y que contribuyen con la regulación de las poblaciones de plagas y enfermedades, a éstos últimos se les conoce como **agentes de control biológico**. El objetivo de este capítulo es dar un panorama general de las complejas etapas que se recorren para llegar a proponer un organismo como agente de control biológico de plagas y enfermedades y de la importancia de realizar los estudios que consideren aspectos biológicos, ecológicos y ambientales.

Los agricultores de diversas partes del mundo han observado por generaciones algunas interacciones entre insectos dañinos y los cultivos de interés para el hombre, ya sea por su importancia en la alimentación o como materia prima. Por ejemplo, el caso de las epizootias de los gusanos de seda en Japón cerca de año 900 DC. En este sentido, se han registrado diversos casos y eventos notables de microorganismos como los hongos, los cuales han sido usados para combatir diversas plagas y agentes causales de enfermedades en cultivos de importancia. Sin embargo, estos fueron desplazados por los diferentes productos químicos que estuvieron disponibles para el control de los diferentes patógenos. En general, los hongos usados como agentes de control biológico pueden agruparse, de acuerdo con la plaga o enfermedad contra la que se utilizan: **entomopatógenos**, cuando se aplican contra insectos; **micoparásitos**, cuando son hongos que pueden crecer sobre otros hongos, sobre todo los parásitos de plantas; y **nematófagos**, los cuales pueden crecer sobre diferentes estadios de nematodos fitoparásitos.

El estudio de los patógenos de plantas, así como el de sus hiperparásitos ha llevado al conocimiento profundo de sus ciclos de vida y de las diversas interacciones entre hospederos-patógenos-hiperparásitos para poder ser considerados como potenciales agentes de control biológico, los cuales conforman complejas redes tróficas. Por lo tanto, el principio básico de la disciplina del Control Biológico es el mantenimiento de las poblaciones plaga-enemigo natural en equilibrio. Es decir, la población del patógeno no será eliminada sino reducida a niveles que no afecten el cultivo en cuestión. En este contexto es importante mantener en perspectiva que los organismos seleccionados para el control de plagas y enfermedades forman parte de una compleja **red trófica**. El uso de diversos organismos como enemigos naturales para el control de plagas a niveles comerciales inició desde los años 1970's y fue incorporado al conjunto de estrategias de Manejo Integrado de Plagas (MIP). Sin embargo, es necesario que los agricultores adopten las prácticas de este tipo de manejo para reducir de manera eficiente la densidad de población de diversas plagas o **parásitos**.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS

Toda investigación en la búsqueda de agentes de control inicia con la colecta de material biológico y el aislamiento de cepas. En el suelo se encuentran gran cantidad de microorganismos y es considerado el reservorio de muchas especies tanto de parásitos como de sus enemigos naturales o de organismos simbióticos y antagonistas. Por lo tanto, la extracción de organismos que estén en contacto con el suelo es muy complejo debido a la gran cantidad de microorganismos que se encuentran relacionados con los organismos que son el objeto de la investigación y el número de cepas que se pueden aislar. Aquí centraremos nuestra atención en los usos para controlar insectos, hongos y nematodos fitoparásitos. El otro punto fundamental en el estudio de los hongos utilizados en control de plagas es el aislamiento de los agentes causales de la enfermedad, ya sea tratándose de virus (cuyos vectores pueden ser insectos), bacterias y hongos o cuando es posible de la cría de los insectos plaga a controlar. Por lo que también tocaremos algunos puntos de las técnicas para aislar los hongos fitopatógenos.

Para el aislamiento de los hongos existen una gran variedad de medios de cultivo, muchos de ellos disponibles a nivel comercial. En general, los medios de cultivo están diseñados para favorecer el crecimiento de los hongos, por lo que su pH oscila alrededor de 5.4, el cual es el adecuado durante el desarrollo del hongo. Sin embargo, cuando los aislamientos se hacen a partir de sustratos donde existe una gran cantidad de

microorganismos, es recomendable utilizar medios de cultivo de pH ácido (3.5) para evitar el crecimiento de bacterias cuando no se puede hacer uso de antibióticos.

Para el aislamiento de hongos filamentosos, debido a que el pH de los medios comerciales es ≥ 5.4 , se adiciona ácido tartárico al 10 % (1 mL de esta solución por cada 100 mL de medio de cultivo ya estéril y a 50 °C). Los medios no deben calentarse luego de esta acidificación, porque provocaría la hidrólisis del agar y por lo tanto la incapacidad de gelificar.

Sea cual sea el organismo por aislar del suelo, es necesario trabajar con diluciones en agua (1:10, 1:100, 1:1000), para luego tomar 1 mL de la dilución elegida y colocarla en placas del medio selectivo, que con la ayuda de perlas de vidrio (4 mm) se homogeniza en la superficie de la placa. Posteriormente las cajas se sellan con cinta tipo parafilm y se mantienen en incubación en un intervalo de 22 a 25 °C, durante 5 días. Las placas se observan al microscopio estereoscópico para revisar y analizar los hongos de acuerdo con la coloración del micelio, tipo de crecimiento y revisiones al microscopio resultan de interés. Fragmentos de micelio o grupos de esporas de dichos hongos se colocan en cajas Petri con medio de cultivo por separado (primera siembra) para eliminar los organismos no deseados, hasta obtener la cepa pura del hongo de interés. Otro de los procedimientos para estudiar los patógenos del suelo y sus micoparásitos es el aislamiento *in vitro* de los propágulos (hifas activas), mediante el uso de diversas técnicas de lavado del material vegetal e inocularlos en medios selectivos para reducir el crecimiento de otros grupos de hongos.

Aunque el aislamiento de los hongos entomopatógenos, micoparásitos y nematófagos tienen mucho en común, debido a que la mayoría de las especies pueden crecer en medios de cultivo en el laboratorio, la complejidad del aislamiento radica en usar las técnicas adecuadas de colecta, aislamiento y/o extracción del organismo objetivo a controlar junto con sus enemigos naturales. Después del aislamiento de este tipo de hongos, es necesario identificar aquellos organismos con los que se trabajará y para esto hay que reconocer las estructuras que caracterizan los principales géneros de hongos, recurriendo a la literatura especializada en taxonomía. Actualmente, tener un grupo de cepas y determinarlas mediante sus características morfológicas a género, e incluso a especie, no es suficiente tratándose de estudios serios.

Con la ayuda de la biología molecular se han desarrollado herramientas para el estudio genético de los hongos, las cuales son necesarias y complementarias del trabajo morfológico. Dichas herramientas han incidido, incluso en la reclasificación de varios grupos de hongos de importancia económica en el sector alimenticio, agrícola e industrial.

Hongos entomopatógenos

En todos los suelos del mundo se encuentran los hongos entomopatógenos, los cuales funcionan como enemigos naturales de muchos insectos, regulando de alguna manera la densidad de población. Hay hongos entomopatógenos especialistas y generalistas, los primeros pertenecen al Orden Entomophthorales, los cuales además de la dificultad en su manejo pueden causar infecciones en mamíferos. Los generalistas son de la Clase Hyphomycetes en la fase asexual y pertenecen a diversos grupos de Ascomycota en su fase sexual, producen abundante esporulación y por ser saprobios su manejo en el laboratorio es relativamente

fácil. Por esa razón, con algunas especies de estos hongos se ha llegado a elaborar productos (micoinsecticidas) comerciales usados para el control de diversas plagas, las especies más conocidas son *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Se ha demostrado que ambas especies tienen una amplia variedad de insectos hospederos, ya sean escarabajos, avispas, abejas y hormigas (Figuras 38-40, Tabla 7). Actualmente se reconocen más de 100 géneros de hongos entomopatógenos y alrededor de 700 especies. Sin embargo, conforme se continúa con la búsqueda de nuevas alternativas para el control de insectos, los investigadores en taxonomía continúan encontrando y describiendo nuevas especies.

Cuando se requiere aislar cepas de hongos entomopatógenos se pueden tomar varias opciones: 1) usar trampas cebos con larvas de *Galleria mellonella*, 2) exposición de ejemplares de la plaga a controlar al suelo de la zona de colecta y 3) coleccionar ejemplares de la plaga en estudio y colocarlos en cámara húmeda para favorecer la esporulación de los hongos que de manera natural han parasitado los insectos. Con la primera opción se pueden obtener muchas cepas debido a la susceptibilidad de esta larva, sin embargo, la mayoría carecerá de alta patogenicidad hacia la plaga objetivo; con las dos últimas opciones es necesario trabajar con muchos ejemplares de insectos para obtener algunas epizootias con hongos de interés entomopatógeno, ya que sólo se presenta en alrededor del 1 % de los ejemplares colectados. Cuando se trabaja con insectos de tamaño ≈2 mm como la broca del café (*Hypothenemus hampei*), es relativamente fácil ma-



Figura 38. Ejemplar de hormiga obrera de *Atta mexicana* con *Beauveria bassiana*.

Tabla 7. Hongos entomopatógenos más estudiados y usados en la agricultura

Especies	Insectos
<i>Beauveria bassiana</i>	Barrenador del maíz, broca del café, saltamontes, trips
<i>Beauveria brongniarti</i>	Cucarachas
<i>Hirsutiella thompsonii</i>	Ácaros
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Áfidos, mosca blanca y trips
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Cucarachas, larvas de escarabajos, mosca pinta, termitas
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Mosca blanca

nejar los ejemplares y si son de mayor tamaño, es posible extraer el aparato digestivo y/o el contenido del tracto intestinal. Sin embargo, algunos insectos son muy pequeños, como los trips (*Frankliniella* spp., Figura 41), por lo que se trabaja con macerados de sus cuerpos.



Figura 39. Trip parasitado por *Beauveria* sp.

Retomando la idea de que en la naturaleza las interacciones entre los organismos no son unidireccionales, sino que hay toda una red trófica en los ecosistemas naturales; en particular en los agroecosistemas la alta densidad de una población de patógenos se debe a la gran cantidad de alimento y al desequilibrio en algún punto de la red trófica. Aunque los sistemas tiendan a la resiliencia, las prácticas agrícolas son un constante disturbio para las poblaciones de una comunidad. Por ejemplo, los insectos trips se encuentran preferentemente en flores y renuevos foliares de diversas plantas, estos insectos pueden ser fitófagos, que son aquellos que se alimentan de células epidérmicas de plantas; fungívoros, que se alimentan de hongos; consumidores de polen, depredadores y omnívoros. Aunque todos los trips se encuentren en las flores de un tipo de planta, la plaga a controlar sólo será aquella fitófaga que cause la mayor afectación al cultivo.

Preparación de la cámara húmeda. Los insectos expuestos a suelo o colectados en campo para el aislamiento de las cepas, se colocan en condiciones favorables para que el hongo se desarrolle y esporule. Preferentemente los ejemplares de los insectos son colocados en recipientes de manera individual para evitar la contaminación o mezcla de los hongos que produzcan las epizootias con algunos otros hongos que no son de nuestro interés. En particular para los ejemplares de insectos colectados en campo se recomienda desinfectarlos con hipoclorito de sodio al 0.3 % (dependiendo del tamaño o tipo de insecto) durante 10



Figura 40. Microfotografía de un conidióforo de *Beauveria* sp. creciendo sobre un trip inoculado.

Figura 41. Ejemplar del trip *Frankliniella gardeniae*.



segundos a 3 minutos, después se les enjuaga tres veces en agua destilada estéril y se ponen sobre un papel estéril para eliminar el exceso de agua. Posteriormente se colocan en una cámara húmeda, que consiste en una caja de Petri estéril, en donde se coloca al insecto con un papel filtro humedecido con agua destilada estéril, se sella con cinta parafilm y se incuban durante 5 a 10 días a temperatura ambiente. De esta manera se asegura que los hongos que esporulen sean los que venían en el interior del insecto. Los ejemplares se revisan diariamente para el seguimiento del crecimiento micelial, aunque en general es a partir del quinto día que se empiezan a observar estructuras de hongos al microscopio estereoscópico.

Una vez producida la esporulación del hongo sobre el insecto, se toma una pequeña muestra del hongo para observarla al microscopio y realizar el reconocimiento de las estructuras del hongo (conidióforo, células conidiógenas, esporas). Para esto, se pueden usar los reactivos convencionales en micología (azul de algodón, lactofenol, rojo Congo, hidróxido de potasio, etc.). De esta manera se confirma que sea alguna cepa de interés y posteriormente se estudien con mayor detalle las estructuras morfológicas. La siembra del hongo se realiza tomando del ejemplar micozado las esporas con la ayuda de una aguja estéril y colocándolas en cajas Petri con medio de cultivo, el cual puede haber sido acidificado o adicionado con un antibiótico. Es importante que este trabajo se realice con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Los cultivos se incuban durante 5 a 10 días a una temperatura de 22 ± 2 °C. Una vez desarrollado el micelio, las cepas se resiembran para continuar con los estudios.

Micoparásitos

El término micoparasitismo se refiere específicamente al parasitismo de un hongo (el hospedero) por otro (el micoparásito). Entonces un micoparásito es un hongo que a través de la producción de enzimas hidrolíticas tienen la capacidad de penetrar y obtener nutrimentos de otras especies de hongos. El mecanismo de acción de los micoparásitos consiste en el crecimiento de las hifas del micoparásito sobre las diferentes estructuras del hongo patógeno, ya sea el tubo germinativo de las esporas, los **apresorios** y **haustorios**, las hifas y estructuras de reproducción (esporas). Este mecanismo de acción comienza con el reconocimiento del patógeno, el crecimiento de las hifas hacia el patógeno, la adhesión y enrollamiento de hifas y esporas que finaliza con la lisis de la pared celular del patógeno introduciendo sus hifas para nutrirse y liberar metabolitos que provocan la muerte del patógeno. El proceso de micoparasitismo incluye gran cantidad de reacciones bioquímicas donde se involucran enzimas que degradan la pared celular del fitoparásito. El hongo micoparásito una vez dentro del patógeno, provoca la disolución del citoplasma del patógeno y el micoparásito continúa su crecimiento. La secreción de enzimas como las glucanasas, quitinasas y proteasas, envueltas en la lisis de las paredes celulares del patógeno, es una de las principales características de los micoparásitos utilizados en el biocontrol. Aunque diferentes mecanismos ocurren en todas las interacciones

fúngicas en las que interviene un hongo micoparásito, el factor clave de este proceso se determina por la transferencia de nutrientes desde el hospedero al micoparásito. Los hongos micoparásitos pertenecen a grupos taxonómicos como Hypocreales (*Clonostachys*, *Lecanicillium*) y Melanosporales (*Sphaerodes*) y se pueden clasificar en dos principales grupos: biótrofos y necrótrofos (Tabla 8).

Tabla 8. Algunos géneros y especies de hongos micoparásitos

Géneros	Modo de acción
<i>Clonostachys rosea</i>	Necrótrofo
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Necrótrofo
<i>Trichoderma</i> spp.	Necrótrofo
<i>Sphaerodes</i> spp.	Biótrofo

Los micoparásitos biótrofos son aquellos que mantienen vivo a su hospedero para alimentarse, este tipo de hongos pueden encontrarse sobre los cuerpos fructíferos de Agaricales, no son utilizados en la agricultura debido a que generalmente tienen poca patogenicidad hacia los hongos fitopatógenos. Por otro lado, el micelio de los micoparásitos necrótrofos, degradan las hifas del hospedero mediante la producción de toxinas que degeneran el citoplasma del hospedero. La ruptura de las células libera rápidamente nutrientes, que son absorbidos por el hongo. Estos hongos funcionan como parásitos facultativos en los primeros momentos del ataque, y como saprótrofos una vez que el hospedante ha muerto. Los micoparásitos necrótrofos necesitan alimentarse de las células muertas de su hospedero, por lo que generalmente son más patogénicos. Los micoparásitos necrótrofos también son capaces de sobrevivir como saprobios en el suelo y su reproducción *in vitro* también es viable, por lo que son los más utilizados como **agentes de control biológico contra patógenos de cultivos agrícolas**. En este caso, el interés se enfoca en aprovechar las características de estos hongos para disminuir la cantidad de las estructuras reproductoras (esporas) de los patógenos de plantas. En el campo una planta está expuesta a los hongos fitoparásitos tanto en sus partes aéreas (tallos, ramas, peciolo, hojas, flores y frutos) como en sus raíces. Aunque no todos los hongos fitoparásitos son capaces de penetrar a un hospedero, cuando las plantas son susceptibles y están expuestas a una gran cantidad de inóculo del fitoparásito se pueden utilizar algunos hongos micoparásitos para evitar que esas grandes cantidades de esporas puedan dispersarse y llegar a hospederos sanos. Al aplicar el micoparásito puede presentarse la enfermedad en la planta (incidencia) pero en baja intensidad, por lo que no afectará drásticamente la fisiología de la planta y su producción. Por esta razón, en el manejo integrado de plagas los micoparásitos pueden incluirse como parte de las estrategias para prevenir el desarrollo intenso de los fitopatógenos. Entre los géneros de hongos micoparásitos conocidos están *Acremonium*, *Aphanocladium*, *Cladosporium*, *Eudarluka*, *Hainesia*, *Lecanicillium*, *Micropodia*, *Ramularia*, *Ramichloridium*, *Scopinela*, *Scytalidium*, *Simplicillium*, *Trichothecium*, *Tuberculina* y *Zygosporium*. Algunos de estos hongos se pueden aislar directamente de las estructuras reproductoras de los patógenos, tal es el caso de *Lecanicillium* spp. y *Simplicillium* spp. los cuales se encuentran parasitando las esporulaciones de las royas (Uredinales) en algún estadio de su ciclo de vida (Figuras 42 y 43). Es recomendable que en los trabajos realizados con parásitos obligados como las royas se trabaje con medios no enriquecidos y para esto se usa el medio de agar agua.



Figura 42. Hoja de cafeto con pústulas de roya *Hemileia vastatrix* micoparasitadas con *Lecanicillium* sp.

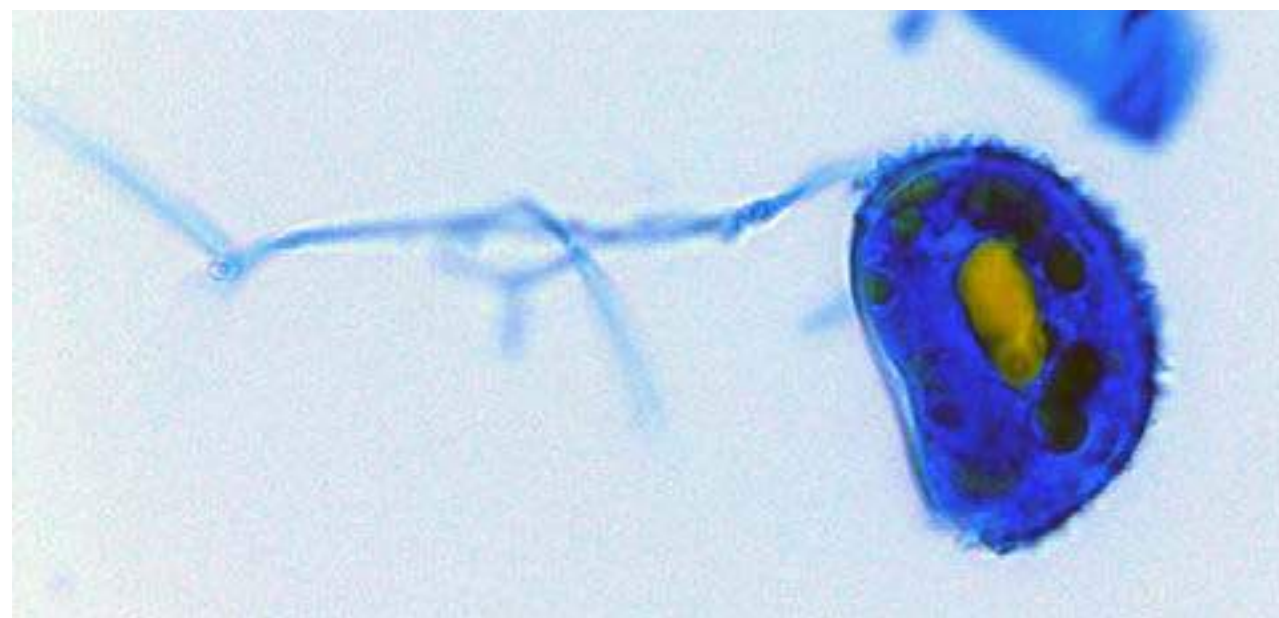


Figura 43. Espora roya del cafeto micoparasitada con micelio de *Lecanicillium* sp.

Uno de los hongos que más se ha utilizado en el sector agrícola para el control biológico de hongos fitopatógenos es *Trichoderma*, entre las especies más estudiadas se encuentran: *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. hamatum*, *T. harzianum* y *T. virens*, que actúan por antagonismo y competición contra patógenos del suelo como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Una vez teniendo las cepas de los fitopatógenos y de los hongos micoparásitos el siguiente paso es la selección de las cepas más eficientes en crecer sobre los patógenos vegetales. Para esto es necesario iniciar estudios de confrontación *in vitro* patógeno-micoparásito.

Aislamiento de hongos patógenos

Cuando se trabaja con hongos fitoparásitos es indispensable aislar tanto los parásitos a controlar como una gran cantidad de cepas a estudiar del agente controlador con la finalidad de seleccionar los mejores candidatos según sea la eficiencia al confrontarlos *in vitro* con los patógenos. En los fitopatógenos cuya esporulación se presenta en las partes aéreas de las plantas, es relativamente fácil su aislamiento, incluso si requiere de medios específicos. El material vegetal con los hongos patógenos colectados se coloca en papel absorbente para conservar las estructuras reproductoras que esporulan en las hojas y evitar que la humedad contenida en el material vegetal estropee los ejemplares.

Los hongos del suelo juegan un papel importante en los procesos de descomposición que mineralizan y reciclan los nutrientes de las plantas, así como en la cadena alimenticia de muchos organismos y hay un sinnúmero de interacciones con las comunidades microbianas (bacterias y pequeños invertebrados). Por esto, para aislar los hongos patógenos que afectan raíces de las plantas, es necesario: 1) lavar la muestra con hipoclorito de sodio durante 30 segundos aproximadamente, 2) realizar enjuagues con agua destilada estéril, 3) una vez escurrida la muestra, hacer cortes longitudinales de las raíces y tomar una pequeña muestra del interior de los vasos conductores de la planta, los cuales están infectados con los hongos. En esta etapa se necesitan coleccionar suficientes muestras de diferentes plantas y diferentes lugares. También se debe tomar en cuenta que habrá más de un patógeno interactuando en ese patosistema y sus enemigos naturales suelen estar en muy baja proporción. Por ejemplo, la enfermedad del tizón de la frambuesa ocasionada por *Didymella applanata*, generalmente se encuentra asociada a *Fusarium equiseti*. Cuando se aíslan estos dos hongos patógenos, el primero se encuentra en su fase asexual, por lo que se obtendrá *Phoma*.

Nematófagos

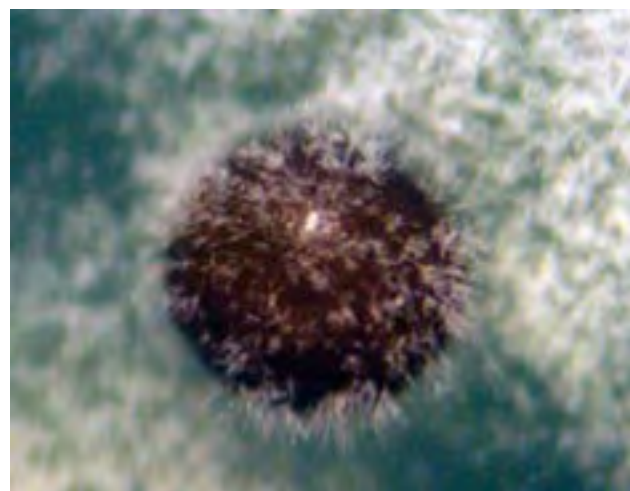
Los hongos nematófagos son organismos que tienen la capacidad de parasitar nematodos, se clasifican en tres grupos, dependiendo del modo en que se desarrollan sobre su hospedero: atrapadores, productores de toxinas y endoparásitos (Tabla 9). Las especies atrapadoras se caracterizan por desarrollar estructuras especializadas para capturar nematodos como redes adhesivas, anillos constrictores o nódulos en el suelo,

Tabla 9. Hongos nematófagos más conocidos y su modo de acción

Géneros	Modo de acción
<i>Arthrobotrys</i> spp.	Atrapador
<i>Stropharia</i> sp.	Atrapador
<i>Nematoctonus</i> spp.	Productor de toxinas
<i>Pleurotus</i> spp.	Productor de toxinas
<i>Metarhizium carneum</i>	Endoparásito
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	Endoparásito
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Endoparásito

donde los nematodos, quedan atrapados y posteriormente los hongos se alimentan de ellos. Los hongos productores de toxinas inmovilizan al nematodo por medio de la secreción de compuestos nematostáticos en el suelo antes de penetrarlo a través de la cutícula con las hifas. Los hongos endoparásitos, se adhieren al nematodo por medio de esporas o micelio y posteriormente penetran la cutícula del hospedero. El desarrollo micelial se lleva a cabo dentro del cuerpo del nematodo, en esta clasificación se encuentran los hongos parásitos de huevos y hembras, que son los más utilizados en la agricultura (Figura 44).

Figura 44.
Hembra de *Globodera rostochiensis* convertida en quiste y colonizada por el hongo nematofago endoparásito *Metarhizium carneum*.



Las especies de hongos nematofagos más estudiadas pertenecen principalmente a dos clases taxonómicas, los Sordariomycetes (*Metarhizium*, *Pochonia*, *Purpureocillium*) y los Orbiliomycetes (*Arthrobotrys*). En la actualidad se conocen alrededor de 700 especies de hongos nematofagos con diferentes capacidades para parasitar a sus hospederos, sin embargo, muchos de estos hongos no son aptos para la aplicación en la agricultura debido a que son muy susceptibles a las perturbaciones en el suelo, principalmente los hongos atrapadores y productores de toxinas, que requieren de un tiempo considerable para establecerse en el suelo y formar las estructuras especializadas para atrapar o inmovilizar a los nematodos. Este tipo de hongos pueden funcionar en agroecosistemas donde la labranza del suelo sea mínima, por ejemplo, en cultivos perennes. Por el contrario, la mayoría de los hongos endoparásitos, tienen la capacidad de sobrevivir en el suelo como saprobios, y no requieren la producción de estructuras especializadas para parasitar a los nematodos, ya que lo hacen a través de las conidiosporas o el micelio. Los hongos nematofagos endoparásitos son los más usados en la agricultura con resultados equiparables a los obtenidos con el uso de nematocidas químicos de alta toxicidad.

Para realizar el aislamiento de este tipo de hongos, existen diversas opciones. La primera es el aislamiento directamente del suelo mediante el método de diluciones. Con este método es posible hacer aislamientos de hongos atrapadores y productores de toxinas debido que sus estructuras se encuentran en el suelo y no dentro del cuerpo de los nematodos. Sin embargo, con este método el número de aislamientos de hongos saprobios del suelo es mayor por lo que la posterior selección de las cepas con potencial nematofago se dificulta. El método más efectivo para obtener cepas de hongos nematofagos es el aislamiento directo de los diferentes estadios de nematodos. De esta manera, es posible obtener los aislamientos de los hongos atrapadores de los nematodos juveniles y adultos en sus estadios móviles y las cepas de los endoparásitos de las hembras adultas no móviles y huevos. Para esto es necesario hacer primero la extracción de los nematodos.

Los métodos más conocidos y usados para la extracción de los nematodos son el embudo Baerman, que permite obtener estadios móviles de juveniles y adultos y cuya extracción se basa en el movimiento de los nematodos, los cuales atraviesan un cedazo y se dirigen por geotropismo hacia el fondo del embudo, sin embargo, no es posible recuperar especies de nematodos de baja movilidad o ejemplares muertos, lo

cual es importante para el aislamiento de hongos nematofagos. Otro método utilizado es el de tamizado-centrifugado con el cual se obtienen tanto juveniles como adultos filiformes, la ventaja de este método respecto al anterior es que se pueden obtener nematodos tanto vivos como muertos y nematodos con baja movilidad (*Criconeematidae*), con este método también es posible recuperar huevos del suelo o tejido vegetal utilizando tamices de 25 µm de apertura o menos. Para el caso de la extracción de hembras maduras formadoras de quistes se utiliza el método de Fenwick, ya que es posible separar por flotación este tipo de nematodos (*Cactodera*, *Heterodera*, *Globodera*), y el método de disección del material vegetal afectado en el caso de géneros como *Meloidogyne*, *Nacobbus*, *Rotylenchulus* y *Tylenchulus*.

Una vez extraídos los nematodos del suelo o del tejido vegetal, los ejemplares deben desinfectarse con hipoclorito de sodio al 3 % y con agua destilada estéril. Este paso es necesario para eliminar los posibles hongos saprobios no deseables para el estudio y que se encuentran en la superficie de los nematodos. Es muy probable que, si el nematodo está parasitado con un hongo nematofago, tenga parte del micelio dentro del cuerpo, por lo que no será afectado por el proceso de desinfección. Los ejemplares desinfectados se colocan por separado en medios como agar avena, agar con dextrosa y papa (PDA) y agar agua adicionados con algún antibiótico, esto para evitar el crecimiento de bacterias. Una vez colocados en los medios, se revisan en intervalos de 12 a 24 h para verificar el desarrollo de micelios sobre el cuerpo de los ejemplares. Se recomienda el uso del medio agar agua debido a que se asegura que los hongos que crezcan sean de los ejemplares extraídos y los que tienen la capacidad de crecer sobre el cuerpo del nematodo, ya que será la única fuente de nutrimentos disponible, por lo cual es más probable que las cepas aisladas de esta manera tengan capacidad nematofaga (Figura 45). Otra estrategia utilizada en el aislamiento es seleccionar ejemplares de nematodos muertos para colocarlos sobre los medios de cultivo. Al seleccionar ejemplares muertos hay mayores posibilidades de recuperar alguna cepa con potencial, ya que es probable que el nematodo, haya muerto por la infección de un hongo. Todos los crecimientos miceliales que provengan del cuerpo del nematodo es conveniente separar y reproducir hasta obtener cultivos puros. Una vez obtenidos los cultivos puros es necesario hacer una selección de las cepas con potencial nematofago.



Figura 45.
Hongo nematofago creciendo sobre un ejemplar de *Helicotylenchus* sp. en medio de agar-agua.

SELECCIÓN DE CEPAS Y PRUEBAS DE EFECTIVIDAD BIOLÓGICA IN VITRO

La selección de cepas tiene como objetivo encontrar aquellas con mayor patogenicidad sobre la plaga a controlar. Por lo tanto, después de que las cepas han sido identificadas, uno de los primeros pasos para la selección de cepas de hongos ya sean entomopatogénos, micoparásitos o nematofagos en el laboratorio, es evaluar la velocidad de crecimiento y esporulación bajo diferentes variables como la temperatura, medios de cultivo, luz-oscuridad, textura del micelio y coloración entre otros, los cuales sirven para la caracterización

morfológica de cada cepa. Las cepas que se consideren con las mejores características serán reproducidas para contar con la suficiente cantidad de esporas para la inoculación de los organismos plaga a tratar. Para hongos entomopatógenos se pueden realizar pruebas de mortalidad donde insectos vivos del estadio de interés se ponen en contacto con esporas o micelios de los hongos aislados. En el caso de insectos este procedimiento se hace colocando los ejemplares vivos en cajas de Petri sin sellar o en contenedores con malla que permitan la circulación de aire para evitar que el insecto muera por asfixia. Los hongos se aplican, ya sea en forma de suspensión de esporas o directamente colocando fragmentos de micelio. La concentración de esporas comúnmente usadas en esta etapa generalmente es de 1×10^6 esporas/mL. El ensayo debe observarse en intervalos de 24 h aproximadamente al menos durante cinco días para corroborar la mortalidad de los insectos. Para verificar que los insectos hayan muerto por la acción de los hongos aplicados, se sigue la metodología de aislamiento, colocando los ejemplares muertos en cámara húmeda y se observa el desarrollo de micelios sobre el insecto. Los hongos entomopatógenos generalmente emergen por las articulaciones de los insectos principalmente en el tórax y abdomen. Los micelios pueden re-aislarse y purificarse para llevar a cabo nuevamente el proceso de identificación y corroborar la identidad de la cepa.

Para los aislamientos de micoparásitos, se realizan dos tipos de pruebas *in vitro*: las confrontaciones, donde el micoparásito y el hongo fitopatógeno se siembran en la misma caja de cultivo a 1 cm o más de distancia, el medio más utilizado es el PDA y se registra el crecimiento de ambas cepas hasta que entran en contacto. Posteriormente se hacen las observaciones al microscopio estereoscópico de la zona de contacto para verificar si el micoparásito detiene el desarrollo del patógeno o muestra crecimiento sobre el micelio del patógeno. También al microscopio óptico se revisa si el patógeno presenta alguna anomalía en su crecimiento o actividad del micoparásito sobre el patógeno. Algunas otras variables que evaluar pueden ser la velocidad de crecimiento, tamaño de halos de inhibición y otras como la producción de exudados. El otro tipo de prueba es la de medios inoculados o también llamada de medios envenenados, consiste en inocular esporas del hongo micoparásito en el medio de cultivo, para esto, el medio debe tener una temperatura que no dañe las esporas del micoparásito (≈ 40 °C) una vez que el medio de cultivo inoculado solidifica, se adiciona en la superficie el hongo patógeno a controlar. Esta prueba emula las condiciones en un campo de cultivo donde previamente inoculamos los hongos benéficos como ocurriría en una aplicación clásica de un agente de control biológico y se puede observar si el hongo patógeno es capaz de desarrollarse en un sustrato en presencia del hongo micoparásito. Se hacen observaciones sobre el hongo patógeno como: velocidad de crecimiento, anomalías en el desarrollo de la colonia como la coloración, formación de halos o de estructuras de resistencia y malformaciones en las hifas. Eventualmente el hongo micoparásito puede crecer sobre el medio de cultivo y se pueden hacer las observaciones como la colonización hacia el hongo patógeno y las anomalías de las estructuras morfológicas.

Para el caso de la evaluación de los hongos nematófagos se realizan pruebas de mortalidad a nivel *in vitro*. Este procedimiento se hace colocando los ejemplares del nematodo a evaluar en cajas de Petri con una capa delgada de agar agua y aplicando el hongo, ya sea en forma de suspensión de esporas o directamente colocando fragmentos de micelio. Se debe evitar utilizar medios acuosos debido a que los nematodos pueden morir por falta de oxigenación. El ensayo debe observarse en intervalos de 12 a 24 h aproximadamente durante cinco días, para corroborar la infección de los nematodos mediante la movilidad de los mismos. Posteriormente, para determinar el mecanismo de acción de los hongos hacia los nematodos se realizan

montajes en lactofenol con azul de algodón para observar la formación de apresorios, anillos constrictores o penetración del micelio en la cutícula.

REPRODUCCIÓN DE HONGOS PARA PRUEBAS DE EFECTIVIDAD BIOLÓGICA

Una vez seleccionadas las cepas con potencial de control biológico de insectos, hongos ó nematodos, es necesario realizar pruebas de efectividad biológica contra los patógenos a controlar. Para esto, los hongos deben reproducirse a niveles piloto para obtener suficiente material para las aplicaciones a nivel de invernadero o de pequeñas parcelas. Para esto existen dos opciones principales: reproducción en sólido y reproducción en medio líquido.

Fermentación sólida: es un proceso sobre un soporte sólido, el cual tiene un bajo contenido de humedad (más o menos 12 %). La fermentación sólida produce una alta concentración de conidiosporas con relativamente poca materia prima, sin embargo, el proceso puede demorar varias semanas dependiendo de la velocidad de crecimiento de los hongos. La fermentación sólida puede llevarse a cabo sobre una variedad de sustratos como arroz, trigo, cascarilla de arroz, u olote de maíz.

Fermentación sumergida: en este tipo de reproducción se utilizan medios líquidos como extractos de avena, papa-dextrosa o malta dextrosa. Esporas de la cepa seleccionada se inoculan en estos medios previamente esterilizados y se colocan en agitación. Para realizar este proceso es necesario contar con un agitador mecánico o un fermentador. Si se cuenta con el equipo necesario, también es posible el control de parámetros como pH, temperatura y nivel de oxigenación, entre otros. La fermentación líquida también permite mayor control de los nutrimentos requeridos por el hongo a reproducir ya que es posible añadirlos a los medios antes mencionados. Asimismo, los procesos asociados con el escalamiento son más simplificados en fermentación líquida. Otra ventaja de esta técnica es la obtención de un gran número de unidades formadoras de colonias de los hongos en pocos días, debido a las mejores condiciones de crecimiento.

CONSIDERACIONES FINALES

Cuando se propone un agente de control biológico hay una serie de trabajos que respaldan esa propuesta, es decir, los estudios de selección de cepas, rango de hospederos del organismo, pruebas de patogenicidad, virulencia, fitotoxicidad. Por otro lado, se ha observado que algunos organismos pueden tener más de una función al aplicarse en el cultivo, y que estos hongos además de estar degradando materia orgánica, por ser saprobios, los productos de su metabolismo en algunas ocasiones actúan como antibióticos, solubilizadores de moléculas complejas o promotores de crecimiento, entre otras. Desde este punto de vista, para algunos agricultores pueden llegar a ser más importantes éstas últimas características, ya que una vez equilibrada la población plaga y al aplicar dosis de mantenimiento del agente controlador, tendrá una ganancia adicional. Todos estos aspectos deben ser abordados por el investigador para que el organismo se pueda usar de manera masiva en un cultivo.



VII

AISLAMIENTO DE CEPAS DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS Y PRODUCCIÓN DE INÓCULO FORESTAL

*Faustino Hernández-Santiago^{1,2}, Magdalena Martínez-Reyes¹, Jesús Pérez-Moreno¹,
Anaitzi Carrera-Martínez¹, José Leonardo García-Rodríguez³*

¹ Edafología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, Texcoco, Estado de México.

² Plantel Tepetlixpa, Universidad Intercultural del Estado de México, Tepetlixpa, Estado de México

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP),

Programa de Plantaciones y Sistemas Agroforestales. CIRNOC, Durango.

jperez@colpos.mx jepemo@yahoo.com.mx

Los hongos obtienen nutrientes de diversas fuentes, entre los que se incluyen la descomposición de sustratos orgánicos, depredación, parasitismo y participación en asociaciones mutualistas. Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre hifas de diversos hongos y las raíces de la mayoría de las plantas vasculares, y constituyen un componente de enorme relevancia en el establecimiento y conservación de los ecosistemas.

Los hongos denominados micorrízicos obtienen nutrimentos carbonados de las plantas con las cuales se asocian, y en retribución les proporcionan a las plantas nutrientes minerales mientras el hongo obtiene compuestos de carbono derivados de la fotosíntesis. Sin embargo, las funciones de los hongos micorrízicos en los ecosistemas son más diversas, dado que incluyen: a) beneficios para las plantas, como el suministro de nutrientes y agua a través de las raíces micorrizadas y protección contra organismos patógenos, b) contribuir al reciclaje y conservación de nutrientes por medio del micelio del suelo, además de ser una importante fuente de alimento para muchos animales, mejorar la estructura del suelo e influir en el transporte de carbono desde las raíces de las plantas a otros organismos del suelo, y c) valor para las personas como uso alimentario, medicinal, estético y como bioindicadores de la calidad ambiental. Los hongos micorrízicos tienen importantes efectos en las poblaciones de las plantas y en la biología de los ecosistemas. Por ejemplo, tienen efectos específicos sobre la dispersión de semillas, el establecimiento de plántulas y la diferenciación del nicho del suelo, así como la competencia inter e intraespecífica y, por lo tanto, controlan la biodiversidad vegetal en los ecosistemas naturales.

Con base en la morfología, beneficios mutualistas, relaciones genéticas e identidad de las plantas con la que se asocian, se reconocen cuatro tipos principales de micorrizas: a) micorrizas arbusculares, b) ectomicorrizas, c) micorrizas ericoides y d) micorrizas de orquídeas. Las ectomicorrizas se caracterizan por la presencia de un manto fúngico diferenciado alrededor de las raíces, por una red que recorre los espacios intercelulares de las células de la corteza de la raíz a la cual se le llama

red de Hartig y por las hifas extraradicales septadas, de escasas a abundantes, las cuales pueden formar rizomorfo y constituir una gran cantidad de biomasa microbiana.

Además del tipo básico de ectomicorrizas, también se incluyen en este grupo ciertos subtipos, que son menos abundantes y que se presentan en grupos muy específicos de plantas. Estas son las: i) ectendomicorrizas, las cuales poseen un manto fúngico delgado así como una colonización intracelular escasa y se establecen entre especies de los géneros *Pinus* y *Larix* con algunos grupos de ascomicetos; ii) micorrizas arbutoides, con un manto fúngico variable y una colonización intracelular escasa; las cuales se presentan en especies de la tribu Arbutae, dentro de la familia de plantas Ericaceae; iii) las micorrizas pirolóides, con manto variable y colonización intracelular intensa; en especies de la tribu Pyroleae, de la familia Ericaceae; iv) las micorrizas monotropoides, que poseen un manto grueso, una colonización intracelular intensa, así como digestión hifal; v) las micorrizas pisonioides, que efectúan su transferencia nutrimental en la red de Hartig en especies del género *Pisonia*, que pertenece a la familia Nyctaginaceae; vi) las micorrizas gnetoides, que son una interfaz simbiótica en forma de dedo sobre la epidermis de la raíz y se presentan en especies del género *Gnetum*, de la familia Gnetaceae; y vii) las denominadas micorrizas "superficiales", las cuales poseen un manto escaso y nulo o escaso desarrollo de la red de Hartig, especialmente en especies de la familia Cistaceae en áreas del mediterráneo.

Algunos hongos ectomicorrízicos tienen una distribución mundial y se han adaptado a una amplia diversidad de hábitats. Sin embargo, se conoce que existen algunos factores del suelo, como el pH, que restringen la distribución de muchos hongos ectomicorrízicos. Se cree que las poblaciones de hongos ectomicorrízicos han ocupado los mismos hábitats del suelo durante millones de años, adaptándose lentamente a los cambios en las condiciones del sitio. Desafortunadamente, por lo general, no se proporciona información sobre las condiciones ecológicas donde se obtuvieron originalmente el material biológico para los aislamientos utilizados en los experimentos. Estos datos son indispensables, ya que permitirían la selección de aislamientos para la producción de inoculantes específicos para su uso en programas de inoculación y para establecer correlaciones entre su taxonomía, fisiología y evolución.

Las propiedades de los hongos ectomicorrízicos, resultantes de sus adaptaciones a los factores del suelo, del ambiente y de las plantas asociadas, resultan útiles para seleccionar aislamientos con fines específicos que incluyen: a) obtención de nutrientes limitantes del suelo en formas orgánicas e inorgánicas, por ejemplo fósforo y nitrógeno, b) mejora de las condiciones adversas del suelo por altas concentraciones de metales pesados, pH extremos, salinidad y desequilibrio de la relación de nutrientes como magnesio y calcio, c) respuestas a condiciones climáticas severas como sequías o inundaciones, d) compatibilidad con diversas especies de árboles, e) tolerancia a las condiciones adversas del suelo por disturbio o competencia microbiana, f) supervivencia y propagación en el suelo por esporas o micelio y g) capacidad de producción de inóculo (inoculante esporal o crecimiento en cultivo micelial estéril).

Asimismo, las propiedades de los hongos ayudan a determinar la eficacia de las asociaciones ectomicorrízicas con las plantas asociadas en donde se incluyen la cantidad de hifas producidas en el suelo o sustrato en relación con el porcentaje de colonización de las raíces, la tasa de crecimiento de las hifas, así como la iniciación de su crecimiento en las raíces.

En la actualidad, uno de los problemas más serios que enfrenta la humanidad es el cambio climático global originado por diversos factores antropocéntricos, entre ellos la masiva deforestación y los incendios forestales. De acuerdo a esto, existe un gran potencial en el conocimiento sobre las asociaciones ectomicorrízicas, para incrementar la productividad de las plantas en las plantaciones forestales, el establecimiento de plantas para recuperar ecosistemas degradados y las reforestaciones exitosas utilizando inoculaciones con hongos ectomicorrízicos.

Los aislamientos de hongos ectomicorrízicos se pueden realizar a partir de esporomas o cuerpos fructíferos, ápices ectomicorrizados, micelio, esclerocios, rizomorfo o esporas sexuales. Los esporomas son las estructuras más utilizadas debido a que a partir de ellos se puede conocer la especie fúngica que se aísla. Para inducir la micorrización en especies de importancia forestal, se han utilizado principalmente tres fuentes de inóculo: tierra de monte (sustrato proveniente de bosques donde la especie de interés es observada), esporas de hongos y micelio. El micelio es una de las fuentes de inóculo que ha recibido mayor atención en las últimas décadas. Es producido en condiciones de cultivo estéril (de laboratorio) y puede ser usado directamente como inóculo o puede mezclarse con diversos acarreadores inertes. La principal limitante de esta técnica es lograr el aislamiento de los hongos ectomicorrízicos específicos. La ventaja del mismo es que podría disponerse de inóculo en cualquier época del año, lo cual facilita su manejo y aplicación práctica.

Para el cultivo y crecimiento de los hongos ectomicorrízicos en el laboratorio, es decir el desarrollo del micelio en cajas de Petri, se deben utilizar determinados medios de cultivo, los cuales deben proporcionar al hongo los nutrimentos requeridos para su crecimiento y desarrollo. Por lo regular se emplean medios de cultivo sólidos con agar, el medio de cultivo que se utilice dependerá de la especie fúngica que se quiere aislar, ya que cada especie tiene sus propios requerimientos nutricionales. Sin embargo, la producción de inoculantes ectomicorrízicos en México es incipiente ya que se trata de un proceso complejo que requiere el desarrollo de la experiencia biotecnológica necesaria junto con los requisitos legales, éticos, educativos y comerciales relacionados.

MÉTODOS DE AISLAMIENTO

I. Recolección de esporomas

Los materiales indispensables para dicha actividad son los siguientes: i) canasta o contenedor poco profundo (20 a 30 cm), que sea lo más amplio posible y ligero. Es necesario considerar la facilidad de su manejo en campo, así como la aireación del material recolectado, ii) papel encerado, bolsas de papel encerado o papel aluminio, ya que otro tipo de material se moja o se pega y el plástico favorece la pudrición de los esporomas, iii) navaja, cúter y/o palas pequeñas de jardín para desenterrar los hongos, iv) brocha para eliminar el suelo o restos de material orgánico adheridos al esporoma, v) se recomienda traer consigo una guía de hongos con fotografías, esto servirá para identificar los hongos que se vayan a recolectar, vi) lápiz, marcador o bolígrafo indeleble para numerar y realizar anotaciones, vii) libreta de campo para anotaciones sobre la localidad y los ejemplares, viii) cámara fotográfica, ix) GPS (Global Position System), para ubicar correctamente los sitios de recolección, y x) etiquetas de tamaño apropiado a la información que se anotará al momento de realizar la recolecta de ejemplares.

Una vez definido el lugar de recolecta, se recomiendan los siguientes pasos para realizar la recolección de los esporomas: i) recolectar varios ejemplares completos de la misma especie, de diferente tamaño y grado de desarrollo, ya que un solo individuo es insuficiente para fines científicos. Se deben descartar ejemplares incompletos con desarrollo avanzado o en descomposición, ii) se recomienda desenterrarlos con la ayuda de una palita de jardín, cuchillo o navaja, iii) una vez recolectados, se colocan los ejemplares en un recipiente, cuidando de no romperlos si estos son carnosos o frágiles, iv) en el contenedor, deberá colocarse una etiqueta con información sobre características que posteriormente sirvan en la descripción de caracteres macroscópicos, v) en el laboratorio, deben describirse los caracteres de los hongos: tamaño, forma, color, consistencia, textura, olor y sabor, y estos deben anotarse en una etiqueta de campo que contenga una descripción completa y ordenada de ellos, vi) realizar fotografías con una cámara de alta definición, de tal forma se capturen las características del esporoma lo más reales posibles y se pueden hacer *in situ*, pero es preferible hacerlas en laboratorio sobre un fondo de color apropiado para obtener un buen contraste de las características del esporoma, y vii) el material recolectado debe ser preservado en condiciones de refrigeración (5 °C) hasta su uso para aislamiento, el cual debe ser lo más pronto posible para evitar deterioro de los ejemplares (Figura 46). Es importante mencionar que en México existe la norma NOM-010-SEMARNAT-1996, de fecha 28 de mayo de 1996, la cual está vigente y establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de hongos silvestres. En dicha norma, se manifiesta que solo deben aprovecharse los esporomas o cuerpos fructíferos en la etapa de madurez de cosecha y que, para esto, se deberá remover suavemente la hojarasca que cubre al hongo, cortar al nivel del suelo el cuerpo fructífero y cubrir el sitio de donde se extrajo, con el objeto de proteger el micelio.

Sin embargo, existen otros criterios que no se incluyen en la norma, es muy importante fomentarlos para la propagación de los hongos y la conservación de los bosques al momento de realizar la recolección con fines de consumo o para realizar aislamientos. Dichos criterios se enuncian a continuación:

A. Criterios para recolección con fines de consumo

1. Identifique correctamente los hongos a recolectar, dado que la salud y la vida misma dependen de ello.
2. Cortar los esporomas con cuchillo o navaja de acero inoxidable al ras del suelo y no extraiga los hongos con micelio vegetativo.
3. Utilizar canastas de mimbre para la recolecta y la dispersión de esporas, las bolsas o botes de plástico además de dañarlos, no permiten la dispersión de esporas de los hongos.
4. Respetar todas las especies de hongos, no cortar, maltratar, pisar o patear las especies que no recolecte o tengan algún uso.
5. Solo recolectar los hongos que se van a consumir o la cantidad permitida.
6. Nunca recoja más de la mitad de los hongos que encuentre.
7. No corte hongos pequeños o inmaduros (menores de 3 cm de altura), déjelos que crezcan y produzcan esporas para su propagación, así habrá más hongos en el bosque. Los hongos deteriorados o muy maduros, tampoco los corte, no le servirán cuando llegue a casa.
8. Limpie los hongos en el lugar de recolecta, esto reducirá el trabajo en casa y no ensuciará a otros al depositarlos en la canasta.



Figura 46. Recolección de hongos ectomicorrízicos para aislamiento. A. Bosque de pino-encino. B. *Amanita basii*. C. *Suillus pseudobrevipes*. D. Corte con cuchillo de esporoma de *Boletus edulis* s.l. E. Foto taxonómica de *Lactarius deliciosus* s.l. F. Almacenamiento de esporoma en papel encerado.

9. No deteriore el hábitat utilizando objetos que puedan dañarlo, como rastrillos u herramientas similares; en la recolecta se debe minimizar el efecto negativo al bosque.
10. No deje basura en el bosque.
11. Respete las áreas donde NO SE PERMITA EL PASO, como áreas de conservación o recuperación de los ecosistemas.

B. Criterios para recolección con fines de aislamiento

1. Los esporomas deben de estar completos y lo más jóvenes posible para tener mayor probabilidad de un aislamiento exitoso, los esporomas maduros tienden a diferenciarse o degenerarse con la edad y se vuelven más susceptibles a bacterias y otros contaminantes.
2. Los esporomas deben limpiarse con una brocha limpia muy cuidadosamente por el exterior, para eliminar las partículas de suelo o materia orgánica adherida, se debe asegurar que el interior no pudiera estar contaminado por suciedad o manipulación y evitar tejido infectado por insectos, larvas, hongos o roedores.
3. Tomar fotografías de los esporomas en campo (*in situ*) de forma general y de manera particular sobre las estructuras importantes y con importancia taxonómica.
4. Guardar cada ejemplar en papel encerado con su respectiva etiqueta de identificación, además en una libreta de campo la relación de los esporomas recolectados para aislamiento y datos como: fecha de recolecta, nombre común o científico, su geoposición utilizando un GPS, altitud, paraje, nombre del recolector, tipo suelo y bosque, exposición, especies arbóreas asociadas y tantos datos como se requieran.

El objetivo de aislar esporomas de los hongos recolectados en el campo es para obtener material vivo purificado de un solo ejemplar de hongo. El aislamiento de esporomas en condiciones asépticas se puede realizar sobre cualquier superficie limpia, sin embargo, es ideal realizarlo en una campana de flujo laminar en laboratorio o en interiores donde la contaminación transmitida por el aire debido al polvo pueda minimizarse.

II. Identificación de los hongos ectomicorrízicos basados en caracteres morfológicos y biología molecular

El uso de los caracteres morfológicos de los ápices ectomicorrizados de las plantas o árboles constituye una herramienta valiosa en la identificación de los hongos que generan su formación. Las características morfológicas y anatómicas que confieren los hongos ectomicorrízicos a las raíces cortas (menores de 2 mm) que se transforman en ectomicorriza, son de gran utilidad para distinguir un hongo de otro. Los ápices ectomicorrizados o morfotipos difieren ampliamente en su anatomía y, de forma general, las características morfológicas que se consideran para caracterizarlos son: a) tipo de ramificación; b) color; c) presencia de rizomorfo; d) tipo de micelio extraradical; e) superficie del manto; e) cistidios, entre otros. La eficacia del uso de este método cualitativo ha sido comprobada con técnicas moleculares, lo que ha permitido conocer la estructura de su genoma, su organización y su función. Con la introducción de técnicas moleculares, basadas desde la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) hasta la secuenciación de segunda generación y los estudios de las denominadas ciencias “ómicas”, incluyendo genómica, metagenómica, proteómica y

transcriptómica se ha profundizado en el conocimiento de los hongos ectomicorrízicos. Los protocolos más utilizados incluyen el estudio de: a) Las regiones hipervariables del rDNA (IGS o espacio intergénico, e ITS (espacio transcrito interno); b) Los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) de los productos de la PCR; c) La amplificación de las secuencias cortas repetidas (microsatélites); y d) La obtención al azar del DNA polimórfico. Las secuencias de estas regiones representan una huella genética para cada especie; por lo que son el principal marcador en la identificación taxonómica de los hongos ectomicorrízicos.

Las técnicas de biología molecular brindan la posibilidad de identificar especies de hongos en condiciones de laboratorio, para después cultivarlos, inocularlos en plantas hospederas, evaluar si forman micorriza y si persisten después del trasplante; además, estudiar el micelio extraradical formado en campo después de cierto tiempo de haber establecido la planta hospedera.

Las herramientas moleculares también se han empleado para determinar la cantidad de micelio fúngico en distintos tipos de suelo. La información generada con trabajos de taxonomía tradicional y biología molecular representan el punto de partida para estudios de ecología.

III. Aislamiento de esporomas frescos

El método más exitoso consiste en extraer asépticamente una pequeña porción de tejido del cuerpo del esporoma fresco con pinzas o bisturí estériles y colocarlo en el medio de cultivo seleccionado (Figura 47). Para ello se sigue el siguiente procedimiento de aislamiento:

- a. En la campana de flujo laminar se debe tomar al esporoma y realizar un corte guía con un bisturí, cuidando de no penetrar demasiado el esporoma, después con los dedos se abre el esporoma. Se debe evitar que el bisturí o los dedos toquen el contexto o parte interna del hongo que se utilizará para el aislamiento. Posteriormente, se toma una fracción o porción de tejido (explante) (aproximadamente 2 mm³) y se extrae con unas pinzas finas esterilizadas y se coloca en el medio de cultivo; se puede colocar de uno a cuatro explantes como máximo por caja de Petri. Se tendrá mayor éxito en el aislamiento si se utilizan explantes del contexto (parte superior del himenio), sin embargo, también puede utilizarse tejido de otros lugares estériles del hongo, como el estípote del hongo (Figura 48).
- b. En esporomas de forma globosa, tuberculada y trufas, el explante se toma del tejido interno inmaduro fértil (antes de que se convierta en polvo en su madurez). En esporomas frágiles o muy pequeños, estos deben dividirse o abrirse cuidadosamente (utilizando un microscopio de disección, si es necesario) para encontrar las áreas más grandes de tejido indiferenciado (a menudo en la base del estípote) o también puede quitarse la capa o tejido superficial para exponer una parte de tejido interno limpio.
- c. Es recomendable utilizar diferentes medios de cultivo para el aislamiento de hongos ectomicorrízicos y se puede seleccionar el mejor para el crecimiento del mismo, ya que los requerimientos varían entre especies. Con frecuencia se trabajan medios de cultivo con y sin antibióticos de amplio espectro para evitar la contaminación por otros microorganismos.
- d. Los aislamientos deben transferirse en placas de Petri y ser subcultivadas repetidamente hasta eliminar los microorganismos contaminantes. La gran mayoría de los hongos ectomicorrízicos son de crecimen-



Figura 47. Aislamiento de cepas de hongos ectomicorrízicos y micorrizas sintetizadas en invernadero. **A.** Corte de contexto del pileo de *Suillus* sp.; **B.** Explante micelial de *Suillus* sp.; **C.** Crecimiento micelial de *Hebeloma mesophaeum*; **D.** Crecimiento micelial de *Suillus pseudobrevipes*; **E.** Ectomicorriza sintetizada entre *Pinus greggii* y *Suillus pungens*; **F.** Corte transversal de ectomicorriza sintetizada en invernadero de *Pinus maximartinezii* mostrando las tres estructuras características de la simbiosis.

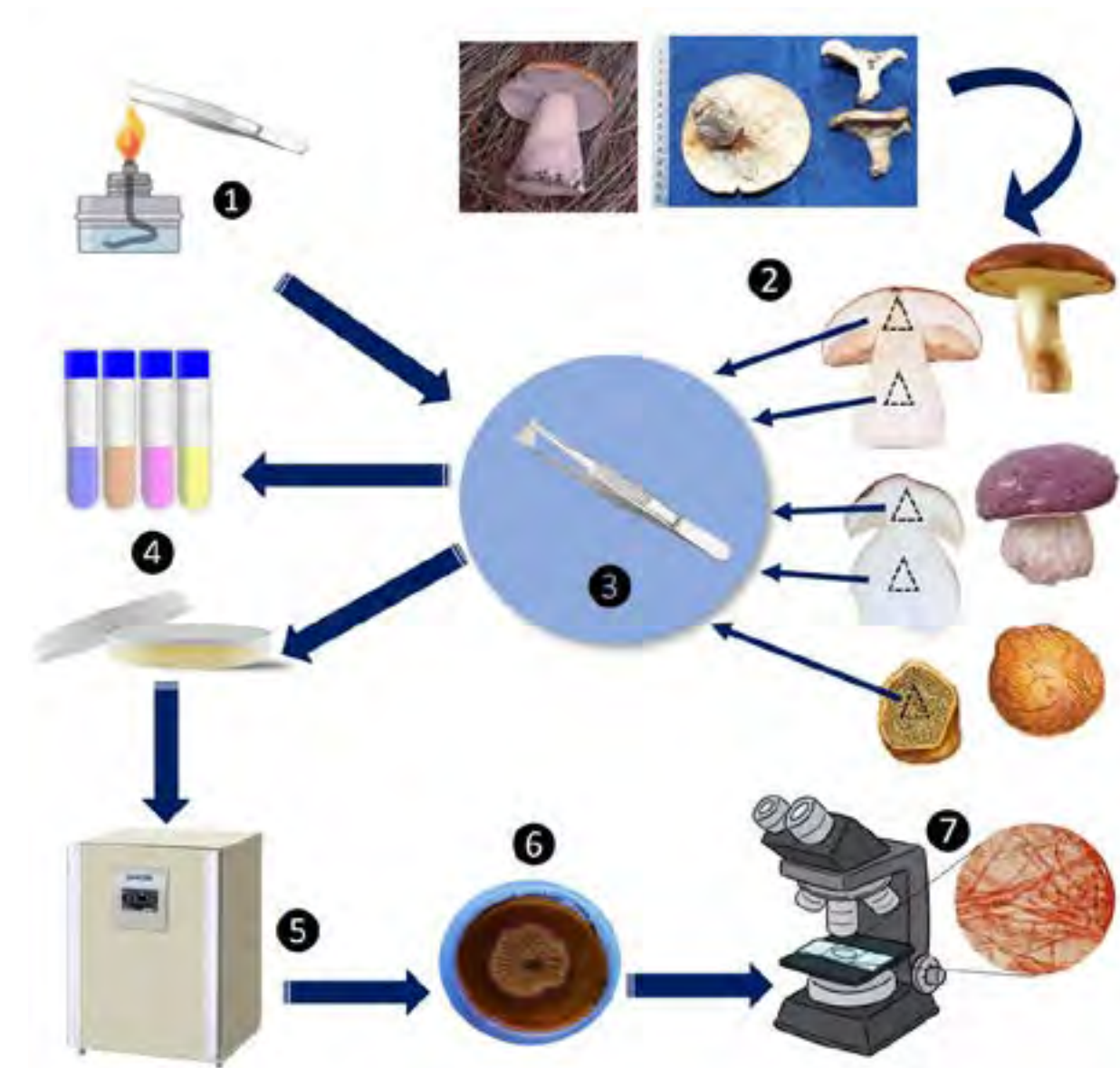


Figura 48. Aislamiento de hongos ectomicorrízicos de cuerpos fructíferos o esporomas. **1.** Pinzas estériles para seleccionar el tejido de esporomas seleccionado. **2.** Fracción elegida que se coloca en la caja de Petri o tubos de ensayo con medio de cultivo. **3.** Este proceso se puede repetir evaluando diferentes tipos de medios de cultivo y porciones del hongo. **4.** Los aislamientos se incuban durante varias semanas. **5.** Los cultivos miceliales resultantes se subcultivan. **6.** Comprobar que los aislamientos no estén contaminados para su almacenamiento. **7.** Corroboración de la identidad de los aislamientos.

- to muy lento y es necesario monitorearlos constantemente, cada tercer día y a veces diariamente, para observar hifas emergentes. Esto se puede realizar observando la placa de Petri bajo un microscopio de disección.
- e. Los cultivos generalmente se incuban de 20 a 25°C, pero las tasas de crecimiento a estas temperaturas normalmente requieren subcultivos frescos, realizados cada 8 a 12 semanas.
 - f. Diversos microorganismos, hongos o bacterias, del suelo pueden causar una contaminación frecuente en el medio de cultivo de los hongos ectomicorrízicos debido a que estos poseen rápido crecimiento y facilidad de esporulación. La contaminación puede detectarse macroscópicamente (si son de crecimiento rápido o tienen colores contrastantes), pero es ideal revisar los cultivos en el microscopio para

detectar la presencia de estructuras contaminantes como hongos conidiales esporulantes o colonias bacterianas. Se recomienda que los aislamientos contaminados se desechen inmediatamente. Sin embargo, los aislamientos con contaminación, por otros hongos o bacterias restringida a alguna parte de la placa, se pueden rescatar subcultivando cuidadosamente la sección no contaminada en placas nuevas con antibióticos. Los esporomas de hongos ectomicorrízicos recolectados en el campo se utilizan con mayor frecuencia para iniciar cultivos puros en medios nutritivos; sin embargo, se pueden realizar aislamientos a partir de raíces micorrizadas, esclerocios, rizomorfos y esporas.

IV. Aislamiento de hongos de raíces ectomicorrizadas

De raíces micorrizadas o ápices ectomicorrizados esterilizados se han aislado cultivos, principalmente de raíces de pino, sin embargo, también pueden utilizarse raíces de otras especies de árboles con ectomicorrizas. En este proceso se debe utilizar un medio de cultivo con antibióticos y fungicida para reducir o evitar la contaminación. El proceso de aislamiento es el siguiente:

- Primero se lavan las raíces micorrizadas seleccionadas de apariencia uniforme con agua corriente hasta que no tengan partículas de suelo. Se puede realizar también una limpieza ultrasónica o con un agitador mecánico para ayudar a limpiar las raíces por agitación vigorosa. Las raíces se pueden encerrar en una bolsa de malla de nailon, contenedor, vial o Eppendorf de plástico con pequeños orificios para facilitar la transferencia entre soluciones. El éxito de esta técnica dependerá de la cantidad de raíces utilizadas.
- Las raíces deben de tratarse con un agente humectante por inmersión en una solución acuosa al 0.2 % de Tween 80 (v/v) u otro detergente, para después lavarse con agua corriente.
- Las raíces se esterilizan en la superficie con H_2O_2 al 30 % (v/v) por 20 segundos, posteriormente se enjuagan en un l de agua estéril. Las etapas posteriores a este proceso se deben realizar en condiciones estériles en una campana de flujo laminar.
- Es recomendable que los fragmentos de raíz se laven vigorosamente en 10 cambios de agua destilada estéril (durante 2 min. cada uno) bajo condiciones axénicas.
- El contenedor con las raíces esterilizadas se coloca en una caja de Petri estéril en la campana de flujo laminar y se abre para extraer las raíces. Cada raíz se puede diseccionar en fragmentos pequeños con una punta fina de pinzas esterilizadas. De manera ideal se debe utilizar el manto interior o la región de la red de Hartig para asegurar que solo un organismo está aislado, pero con el aislamiento de las puntas de las raíces también se puede lograr un aislamiento exitoso.
- Los fragmentos de las raíces se colocan individualmente en agar nutritivo en placas de Petri (5-10 por placa), posteriormente se incuban y deben ser examinados diariamente para eliminar contaminantes y monitorear el desarrollo de la cepa de hongo deseada.

V. Germinación de esporas

La germinación de esporas en cultivo axénico de hongos ectomicorrízicos es menos usual, pero para algunas especies puede ser exitosa. El procedimiento es el siguiente:

- Las esporas se obtienen de una esporada; esta se logra cuando se coloca la parte fértil del esporoma sobre una caja de Petri estéril durante varias horas (para hongos con esporomas pequeños se puede

usar vaselina para pegar la parte fértil del esporoma en la parte interior de la tapa de la caja de Petri). Este procedimiento se repite varias veces para aumentar la probabilidad de que se ha obtenido una muestra de esporas estériles.

- Se debe trabajar en la campana de flujo laminar para que las esporas sean suspendidas en 0.5 mL de agua destilada estéril. La suspensión se diluye con agua destilada estéril adicional para obtener una concentración entre 0.5×10^6 y 2×10^6 esporas/mL. Se debe utilizar una **cámara de Neubauer** o hemocitómetro para contar una submuestra de la suspensión de esporas para determinar cuánta dilución es necesaria para colocar en el medio de crecimiento.
- Posteriormente se esparcen 50 μ L de la suspensión diluida uniformemente sobre la superficie de una caja de Petri que contiene el medio de crecimiento. A continuación, las placas se sellan con papel Parafilm o celofán después de dejarlos durante la noche en la campana de flujo para que el exceso de agua pueda evaporarse.
- La germinación de las esporas se corrobora por observación directa dos veces por semana, también se puede utilizar un microscopio estereoscópico y se debe efectuar una estimación del porcentaje de esporas germinadas.
- También se puede realizar el aislamiento de las esporas que caigan directamente en el medio de crecimiento. Para ello, se suspende un fragmento de la parte fértil del esporoma en la tapa de la caja de Petri que contiene el medio de crecimiento durante varias horas. Posteriormente, se monitorea el cultivo como en los otros métodos descritos anteriormente.

CONSIDERACIONES FINALES

Existe una variedad de tipos de inóculo ectomicorrízico, métodos de preparación de inóculo y técnicas de inoculación para iniciar el desarrollo de ectomicorrizas en plántulas de árboles forestales. La selección de hongos, el tipo de inóculo y el método de inoculación dependen del propósito de la inoculación (Figura 49). Una mejor comprensión de la estructura y el funcionamiento de la simbiosis ectomicorrízica y un mejor rendimiento de las plántulas inoculadas en condiciones de vivero y campo son los objetivos finales de la micorrización artificial y, por lo tanto, es deseable un mayor desarrollo de los métodos de inoculación en condiciones operativas. Aunque las condiciones estériles de laboratorio están lejos de las naturales, las técnicas de síntesis de cultivos puros son necesarias para estudios de compatibilidad, estructurales, fisiológicos, moleculares y de otro tipo.

El éxito de la inoculación depende del tipo y la edad del inóculo utilizado, la dosis de inoculación, el momento de la inoculación, la colocación del inóculo en el medio de cultivo, etc. Además del inóculo y el patrón de inoculación, la variación interespecífica e intraespecífica del fitobionte (o planta asociada) y sus micobiontes (u hongos asociados), las condiciones ambientales, las prácticas de producción de plántulas y otros factores son responsables de la respuesta de las plántulas a la inoculación.

En México se requiere de más investigación sobre la detección de posibles combinaciones de especies y genotipos fitobionte-micobionte y las interacciones fitobionte-micobionte-ambiente para optimizar el efecto de los hongos en plantas. El perfeccionamiento de nuestro conocimiento relacionado con ectomicorrizas, tanto de los hongos como de las plantas, permitirá en un inicio inoculaciones exitosas en especies de ár-



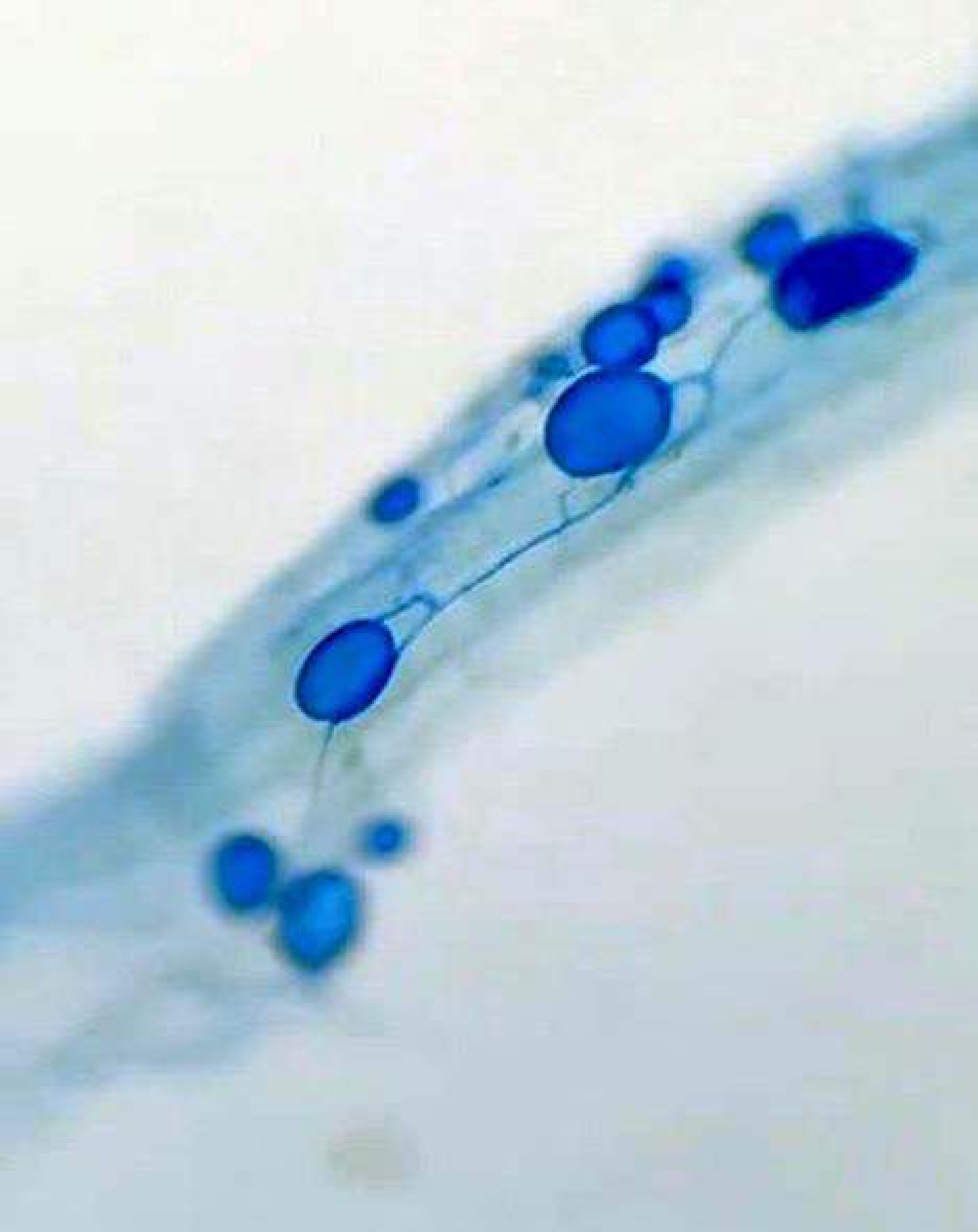
Figura 49. Diagrama de flujo de las etapas para el aislamiento de hongos ectomicorrízicos, selección de aislamientos y desarrollo de métodos efectivos para la inoculación de plantas a gran escala.

boles de importancia forestal, posteriormente el escalamiento de la inoculación de plantas y finalmente las reforestaciones exitosas, plantaciones forestales y rehabilitaciones de ecosistemas degradados, con todos los beneficios asociados con estos procesos ecológicos a nivel global, incluyendo la reducción de emisión de gases de efecto invernadero y la mitigación del cambio global (Figura 50).



Figura 50. Diagrama simplificado de las etapas desde la recolecta de hongos ectomicorrízicos hasta la producción de inóculo a escala comercial.

Los autores del presente capítulo agradecen el apoyo financiero a sus investigaciones por el Proyecto PRO-NACES CONACyT 2021-03 Soberanía Alimentaria 316198 "Los hongos comestibles cultivados y silvestres como promotores de desarrollo rural sustentable, soberanía alimentaria y sistemas agroecológicos".



VIII

HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Dora Trejo Aguilar

Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana.
Lomas del estadio s/n, C.P. 91000, Xalapa, Veracruz, México
dortrejo@gmail.com

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) forman simbiosis aproximadamente con el 90 % de las plantas vasculares y se encuentran en casi todos los tipos de ecosistemas, debido a que se desarrollan en una amplia gama de condiciones climáticas y edáficas. Estos hongos, se ubican en el Phylum Glomeromycota, con 334 especies reportadas, de acuerdo con datos actualizados en febrero del 2020 (http://www.amf-phylogeny.com/amphylo_species.html).

Los HMA proporcionan a las plantas diversos beneficios: el incremento en el suministro de nutrientes vegetales, al extender el volumen de suelo accesible a las raíces; protección contra hongos parásitos y nematodos; tolerancia a la sequía; reducción de daños por insectos y fitotoxicidad por metales pesados. Las plantas micorrizadas presentan cambios fisiológicos a nivel metabólico, pues hay incrementos en niveles de fitohormonas, asimilación de carbono y producción de otros metabolitos. Además del incremento en el crecimiento vegetal, se han reportado cambios de forma de crecimiento en la arquitectura de la raíz, el tejido vascular, en las relaciones hídricas y/o éxito reproductivo.

Estudiar los HMA representa un reto, pues son simbiosiontes obligados que, a diferencia de los demás grupos del Reino Fungi, no pueden ser cultivados en medios de cultivo, pues requieren de un hospedero vivo para reproducirse. Algunas especies de HMA (*Rhizophagus irregularis*, *Glomus claroideum*, *G. clarum*, *G. diaphanum*, *G. irregulare*, *G. proliferum*, *Gigaspora margarita*, *G. rosea*, entre otros) se han logrado propagar en cultivos *in vitro* de manera axénica. La limitada reproducción *in vitro* de este grupo de hongos ha complicado el establecimiento de las colecciones de los HMA. La colección más grande de Glomeromycota, con 35 años de antigüedad y ampliamente conocida es: "The International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi", de la West Virginia University (INVAM, EUA) que cuenta con aproximadamente 80 especies. "La Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota", de la Universidad de Blumenau (CICG, Brasil (www.furb.br/cicg); única en Latinoamérica, que cuenta con 25 especies y "The International Bank the

Glomeromycota” del Institut Nationale de Recherche pour l’Agriculture, l’Alimentation et l’Environnement (INRAE, Francia), con 31 especies.

Anteriormente, la identificación de las especies de HMA se basaba solo en observaciones morfológicas de las esporas, desafortunadamente estas estructuras tienen características limitadas para la identificación por lo que se consideraban solamente 6 géneros. Con la inclusión de técnicas moleculares, el número de géneros de HMA se incrementó considerablemente, y en 13 años, de acuerdo con la nueva clasificación se reportaron 26 géneros en total.

El “Manual para la identificación de hongos micorrízicos vesículo arbusculares” de Schenck y Pérez (1988), resumió 126 especies, aunque en 22 años se triplicó el número. Sin embargo, el conocimiento sobre la identidad de estas especies es aún limitado.

En los últimos 50 años se ha generado un progreso importante en la investigación sobre los HMA, que ha proporcionado una nueva visión de sus interacciones, útil para comprender sus funciones ecológicas y fisiológicas. No obstante, para el aislamiento, reproducción y preservación de estos hongos, se siguen utilizando técnicas de hace más de 50 años, que son eficientes y de bajo costo, ya que no se requiere equipo sofisticado, ni reactivos de precio elevado. Estas técnicas son las referentes al aislamiento y evaluación de esporas presentes en el suelo y tinción de raíces para la observación de las estructuras fúngicas, características de los HMA. En conjunto, permiten contar con evidencia de su presencia en las raíces de plantas hospedadas, así como la determinación del porcentaje de colonización, útiles para realizar trabajos para su propagación. En este documento se presenta una compilación de técnicas clásicas de diversos autores, publicadas en diferentes manuales, pero con variaciones derivadas de la experiencia de la autora.

MUESTREO

Colecta de suelo y raíces

El tamaño de muestra dependerá del objetivo del trabajo, así como del tipo de terreno. En los agroecosistemas, el muestreo puede ser más sencillo que en ecosistemas naturales, debido a que, en los primeros hay una uniformidad del huésped y generalmente de las condiciones edáficas. En cualquier caso, es importante consultar con expertos sobre el tipo de muestreo.

La literatura señala que estos hongos presentan un patrón de distribución agrupada, por tanto es poco probable que todos los hongos presentes puedan ser obtenidos de una sola muestra, por lo que es conveniente tener varios puntos de colecta (Figura 51a). Por otra parte, el tener varios muestreos frecuentes en un lugar determinado a lo largo de un año, puede asegurar la obtención de la mayoría de las especies de hongos nativos (Figura 51b). Las muestras de suelo deben ser tomadas con una pala o barrena, siempre a partir del Horizonte A, que es donde hay una mayor cantidad de propágulos de hongos micorrízicos. Es conveniente colectar en cada punto por lo menos 500 g de suelo (Figura 51c).

Es importante documentar el sitio de muestreo con los datos de localización, clima, tipo de vegetación, manejo del cultivo agrícola (si es su caso) y un análisis de suelo donde se cuente con información como: pH,

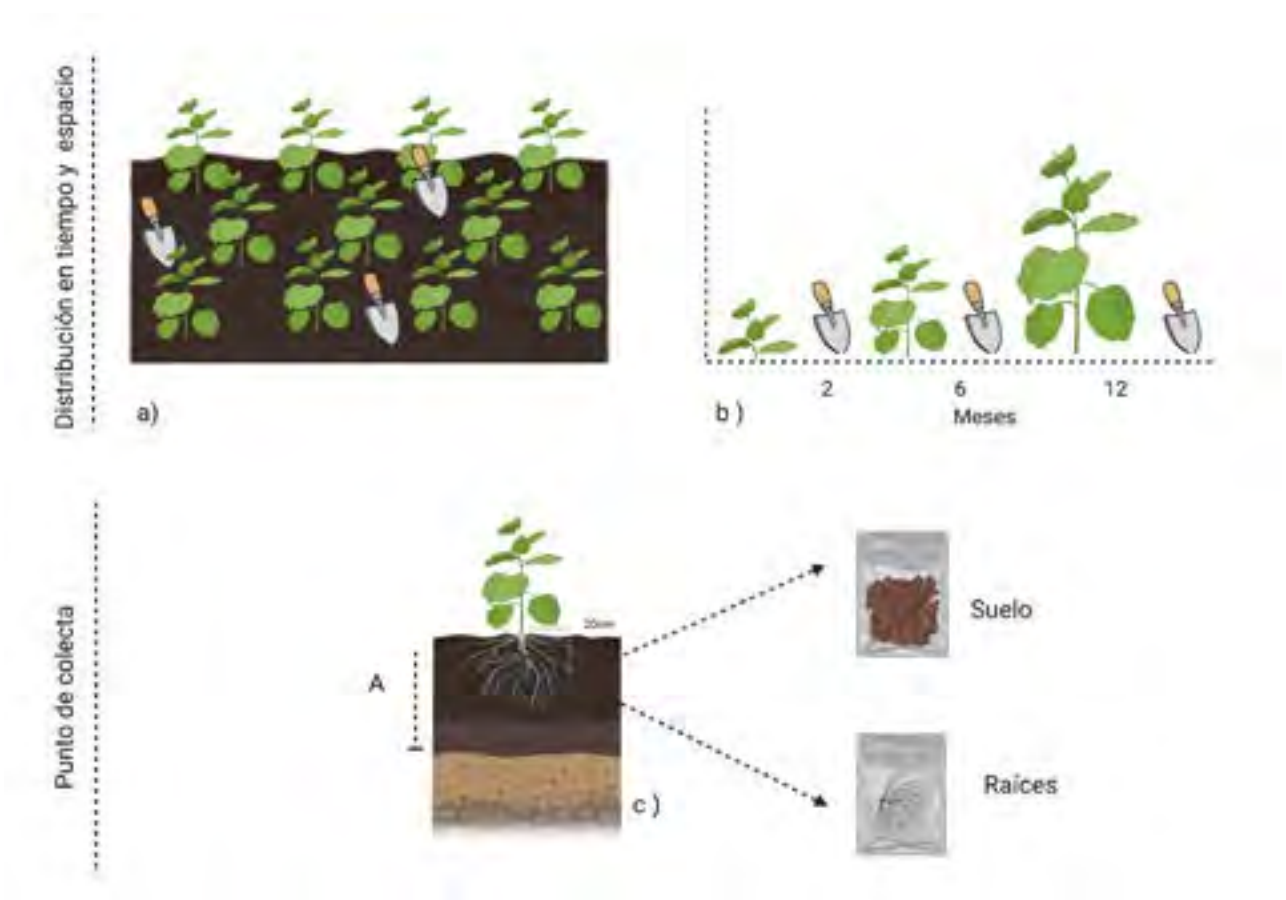


Figura 51. Esquema de colecta para muestras en el estudio de los hongos micorrízicos.

% materia orgánica, P, N y K, porcentaje de arena, arcilla y limo. Durante la colecta, es importante mantener las muestras por abajo de los 50 °C; una vez en el laboratorio, se deben secar en un lugar con sombra y ventilado.

AISLAMIENTO

El suelo generalmente contiene una gran cantidad de propágulos de HMA, mayormente de esporas que son las estructuras indicadoras de la presencia de estos hongos en la muestra, aunque hay que considerar que no todas las especies de hongos esporulan en la misma época del año.

Para tener certeza de que el suelo colectado puede ser útil para el aislamiento, es necesario realizar una extracción de esporas utilizando un método de separación de estas por decantación, el cual consiste en: a) disolver 50 a 100 g de suelo en 1000 mL de agua de la llave, agitar manualmente, esperar 10 minutos, b) pasar la suspensión por una serie de tamices de 750, 250 y 100 µm, c) recuperar el contenido de cada uno de los tamices, lavando con agua de la llave, (es recomendable conectar una manguera al grifo, para contar con agua suficiente, si esto no es factible, se puede utilizar una pizeta), colocar inicialmente el filtrado en un vaso de precipitado y posteriormente pasar a tubos de centrifuga en una proporción 1 a 5 v/v (suelo-agua), d) centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm, e) retirar el sobrenadante, agregar solución de sacarosa al

70 %, en proporción 1 a 5 v/v y remover el precipitado, f) centrifugar 35 segundos a 1500 rpm, g) Pasar a través de un tamiz de 0.045 μm , lavar el filtrado por 2 a 3 min con agua de la llave de manera abundante, con el propósito de retirar perfectamente los residuos de sacarosa de las esporas y así evitar romper su pared celular (los residuos de azúcar pueden romper las esporas). Para realizar el conteo de las esporas, las muestras se transfieren a cajas de Petri, colocando de preferencia las esporas recolectadas en un papel filtro cuadrículado, humedecido con agua destilada (Figura 52).

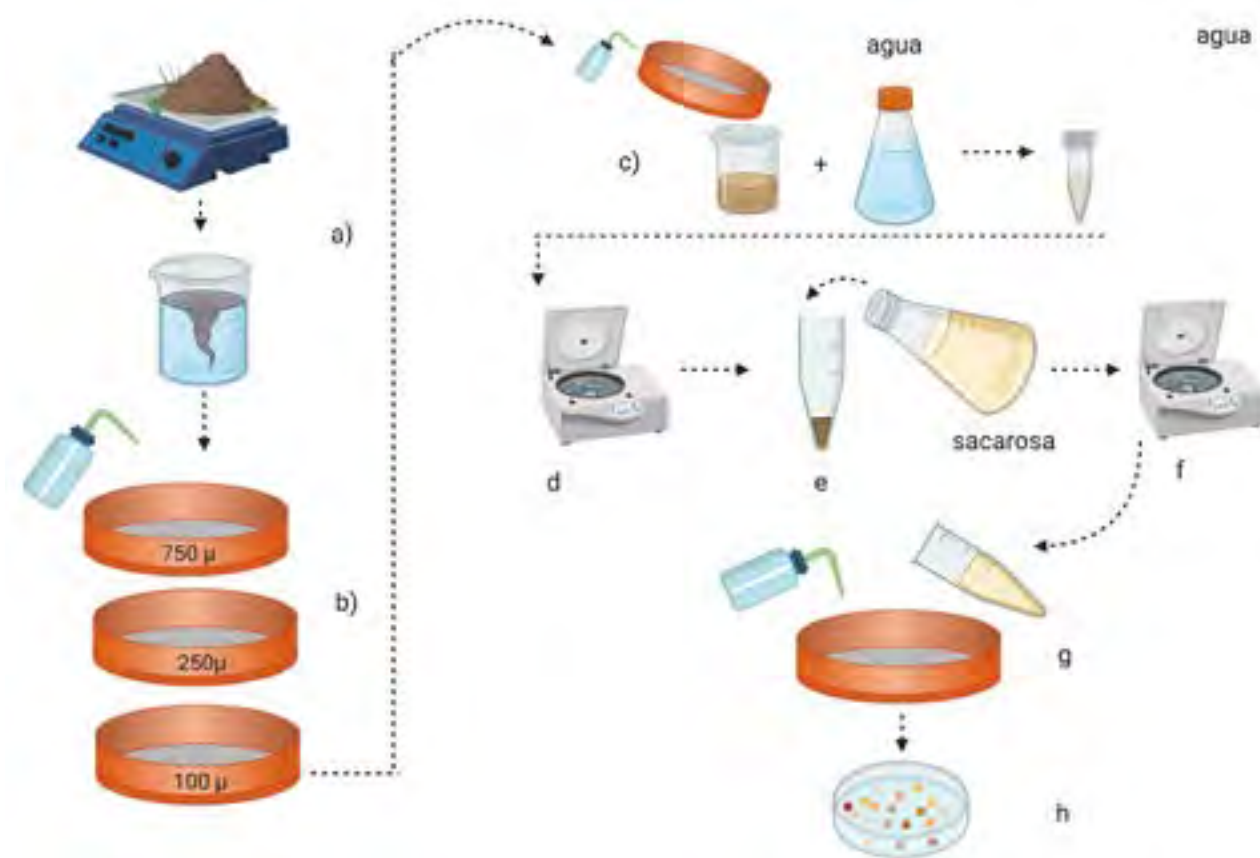


Figura 52. Esquema de extracción de esporas a partir de suelo.

PROPAGACIÓN

La técnica de propagación más utilizada consiste en establecer cultivos trampa, para lo cual es necesario: a) llenar macetas con capacidad de 2 L, con 1 L de arena estéril y sobre ésta, una capa de 250 mL de suelo recolectado, cubrir posteriormente con 500 mL de arena estéril, b) colocar tres repeticiones de las macetas trampa, sembrar semillas de diferentes hospederos en cada una de las macetas (pasto, leguminosa y una compuesta), c) dejar crecer por tres meses regando semanalmente con solución nutritiva de Hoagland deficiente en fósforo (Tabla 10), d) las raíces y suelo rizosférico se transfieren a macetas de mayor volumen (3 L) y se puede utilizar como hospederos plantas de cebolla (*Allium cepa*), "cempasúchitl" (*Tagetes erecta*) o maíz (*Zea mays*), e) tres meses después, se determina el porcentaje de colonización, y se dejan secar de 3 a 6 meses. El periodo de sequía induce a la esporulación y después de tres meses (como mínimo)

se puede obtener un número considerable de esporas, f) realizar el conteo de esporas y que pueden ser utilizadas para la identificación morfológica y molecular, g) pruebas de eficiencia, cultivos monospóricos, y propagación masiva (Figura 53).

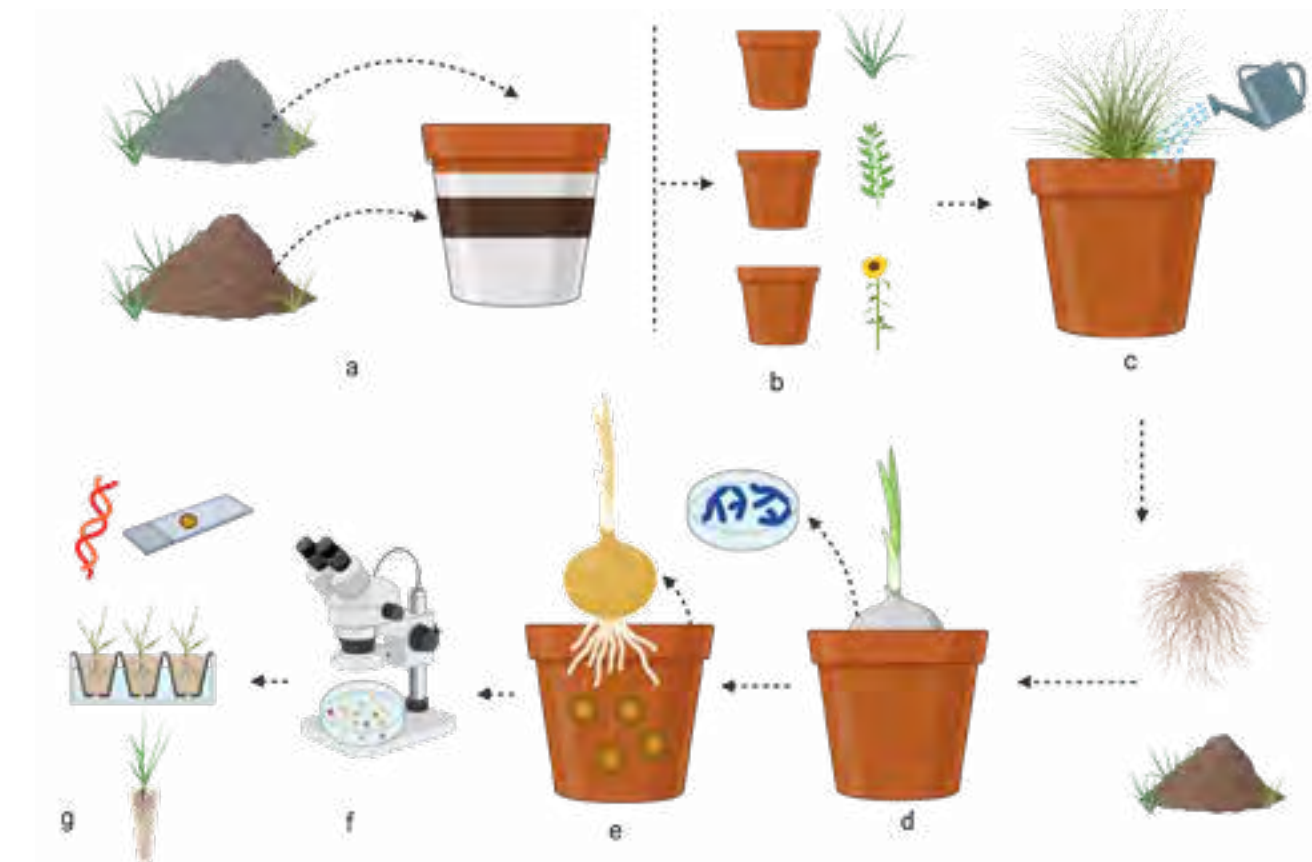


Figura 53. Propagación de hongos micorrízicos a partir de una muestra de suelo.

Cultivos monospóricos

Los cultivos a partir de una espóra aseguran la presencia de una sola especie de HMA en el cultivo de propagación, que puede ser utilizada para producción masiva de un inoculante, o para estudios de identificación molecular y fisiología. Un cultivo monospórico ayuda a comprender el efecto individual de un HMA en el crecimiento de las plantas y el efecto combinado con otros hongos en diferentes cultivos. Esto contribuye a la selección del inóculo apropiado para un cultivo agrícola específico. Además, las esporas nativas pueden presentar la ventaja de ser utilizadas en un entorno nativo y funcionar mejor que las esporas introducidas. Aunque algunos trabajos han demostrado que el uso de consorcios resulta en ocasiones más eficiente en la promoción del crecimiento de las plantas.

El método de cultivo a partir de una sola espóra representa un gran gasto de mano de obra y posiblemente un alto costo económico. Por ejemplo, uno de los métodos más comúnmente usados es el de mini micorizotrófon (minirizotrófon), que consiste en cajas llenas de tierra con paredes transparentes y que permiten visulizar el desarrollo de las raíces sin dañar la planta, el material puede ser vidrio o plástico transparente.

Tabla 10. Componentes de la solución nutritiva Hoagland reducida en fósforo

Para 1L de solución de nutrientes Hoagland	
Nutrientes	Concentración
KNO ₃	0.005M
Ca (NO ₃) ₂	0.005M
KH ₂ PO ₄	0.0001M
MgSO ₄	0.002M
Fe (NO ₃) ₃	0.1mM

Solución stock de micronutrientes	adicionar 1 mL /1L de solución Hoagland
Micronutrientes	Concentración
H ₃ BO ₃	0.046M
MnCl ² * 4H ₂ O	0.009M
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	7.65 x 10 ⁻⁴ M
CuSO ₄ * 5H ₂ O	3.2 x 10 ⁻⁴ M
H ₂ MoO ₄ * H ₂ O	1.11 x 10 ⁻⁴ M
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	4.9 x 10 ⁻⁴ M

Los minirizotrones han contribuido a mejorar nuestra comprensión de los sistemas radiculares, por ejemplo, en lo que respecta al cepellón, la producción y la longevidad de las raíces, las interacciones entre raíces, parásitos e hifas así como en la fenología y distribución de las raíces.

Lograr la germinación de una sola espora a veces resulta difícil, ya que estas pasan por una fase de dormancia y en ocasiones no se logra su germinación. En algunos casos se opta por producir un cultivo monoespecífico que, si bien no procede de una sola espora, si de un conjunto de esporas de la misma especie. Otro método que puede conducirnos a la obtención de un cultivo monoespecífico es seleccionar especies de HMA mediante el uso de hospederos. Este método también requiere tiempo y experiencia en el conocimiento morfológico de las especies de HMA.

Cultivos monospóricos en puntas de micropipeta, llamada técnica de “micropots”

Considerando el tamaño de las esporas (30 a 300 μm) para realizar cultivos monospóricos, es recomendable utilizar pequeños volúmenes de sustrato para asegurar el establecimiento de la simbiosis, por lo que el uso de puntas de micropipeta nos permite estrechar la distancia entre raíz y espora y observar el desarrollo de la raíz de la planta hospedera. El método que a continuación se describe ha sido adecuado para el aislamiento de esporas y establecimiento de colecciones:

a) Llenar puntas de micropipeta de 1 mL con arena o suelo estéril, b) impregnar con agua una caja de puntas de micropipeta y esperar a que por capilaridad suba el agua y la arena se encuentre totalmente húmeda, c) pregerminar semillas de *Brachiaria decumbens* (especie de pasto) sobre la arena a 5 mm de profundidad y una vez que emerge la radícula, colocarle una espora viable con ayuda de una pinza de punta fina, pincel o una pipeta Pasteur, c) colocar tantas repeticiones como sea posible hasta llenar la caja de puntas con la finalidad de asegurar el éxito, d) después de 5 semanas cortar horizontalmente las puntas de micropipeta con la planta inoculada en dos mitades para facilitar el crecimiento de las raíces, e) trasplantar directamente a macetas más grandes (350 mL) con tierra estéril, f) mantener los cultivos durante 14 meses antes de comprobar la colonización en las raíces y formación de esporas, g) seleccionar cultivos que presenten evidencia de colonización micorrízica (arbusculos y vesículas), así como esporas de la misma especie (Figura 54).

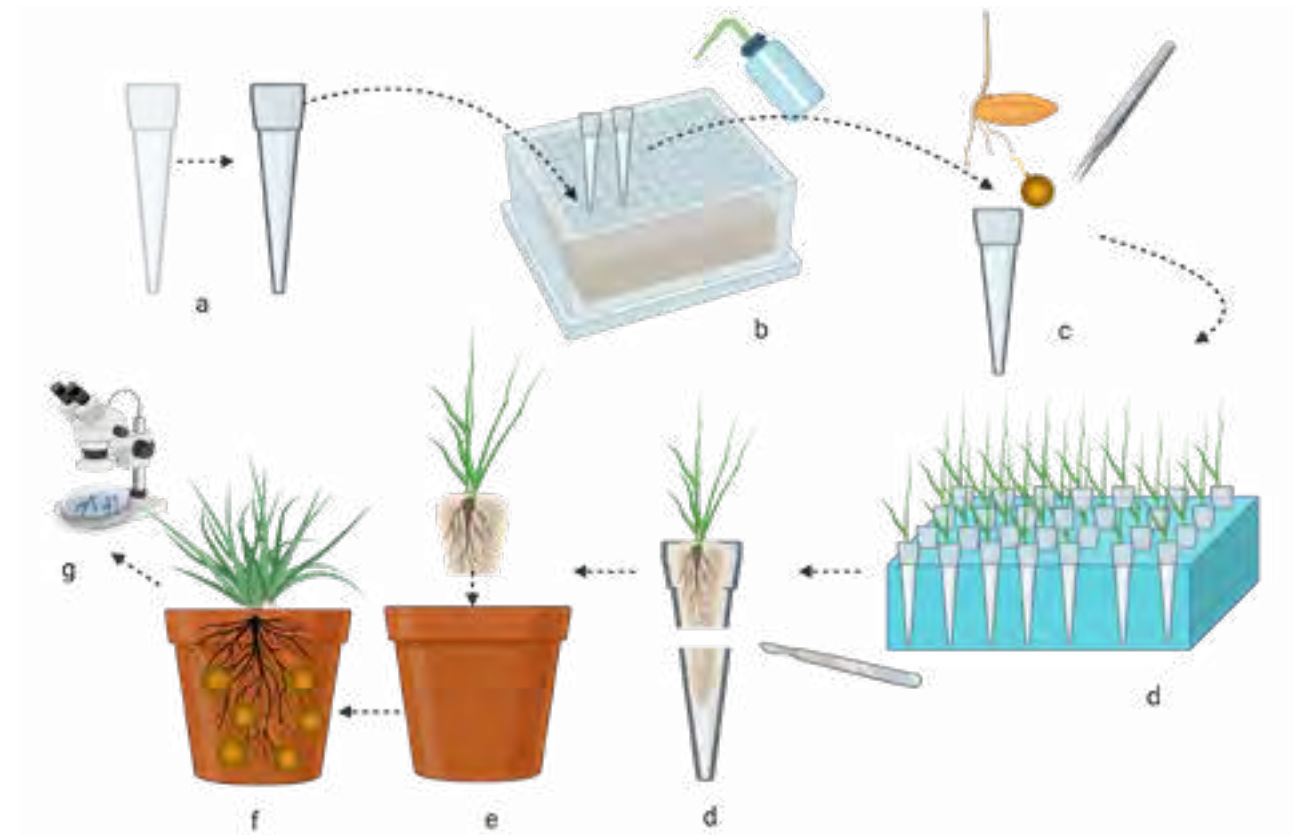


Figura 54. Producción de cultivos monospóricos en "micropots".

Técnica de cultivos monospóricos empleando charolas

La multiplicación de los HMA a partir de una sola espora es difícil, sin embargo, se han generado diversas metodologías para el establecimiento de cultivos monospóricos con éxito, utilizando sustratos inertes y minirizotrones para visualizar el contacto de la raíz con la hifa bajo el microscopio. Los resultados de la técnica que a continuación se describe, es un método factible y rentable para producir en masa esporas de FMA para su aplicación a gran escala. Las esporas de HMA obtenidas con este método pueden colonizar eficazmente las raíces de las plantas y pueden introducirse fácilmente en el nuevo entorno.

a) Seleccionar esporas turgentes y sanas, recién aisladas bajo el microscopio, b) desinfectar semillas del pasto forrajero "híbrido sorgo x Sudán grass" sumergiéndolas en etanol al 70 % por dos min, y después en hipoclorito de sodio al 1 % durante 3 min, enjuagándolas de 7 a 10 veces en agua destilada, c) transferir las semillas a cajas de Petri conteniendo un papel filtro estéril y humedecido en agua destilada, d) mantener las semillas en cámara de crecimiento por 3 días a 25 °C con 12 h de luz y 12 h de oscuridad a 20 °C, con 70 % de humedad, e) en un papel filtro doblado se coloca cada semilla germinada y se inocula con una sola espора cerca de la raíz, f) los papeles con la semilla y espора se colocan en charolas de 32 cavidades con vermiculita estéril, aplicando riego durante 15 días, posteriormente se toma una muestra de las raíces y se realiza una tinción para detectar la presencia de estructuras de HMA, g) se transfiere la vermiculita a macetas de 200 mL, con suelo de campo estéril y se siembran nuevamente semillas de "Híbrido Sorgo x Sudán grass" y se dejan desarrollar durante un mes, h) transferir el contenido a macetas de 1 L sin alterar el "cepellon", añadiendo tierra estéril para complementar el volumen de la maceta, estas muestras deben mantenerse bajo condiciones controladas (25 °C, 12 h día/noche y humedad relativa ~70 %) en el invernadero durante 120 días (primer ciclo). Se recomienda regar las macetas semanalmente con solución nutritiva de Hoagland, 15 días antes de finalizar el primer ciclo se dejan de regar las plantas para producir un estrés hídrico, a fin de inducir a la producción de esporas. Para el segundo ciclo se deben utilizar macetas de 2 L, removiendo las plantas viejas y sembrando nuevas semillas de pasto como se explicó en el paso g, h) finalmente se repetirá el proceso utilizando macetas de 2.5 L, durante otros 120 días, repitiendo el proceso señalado en el paso g (Figura 55).

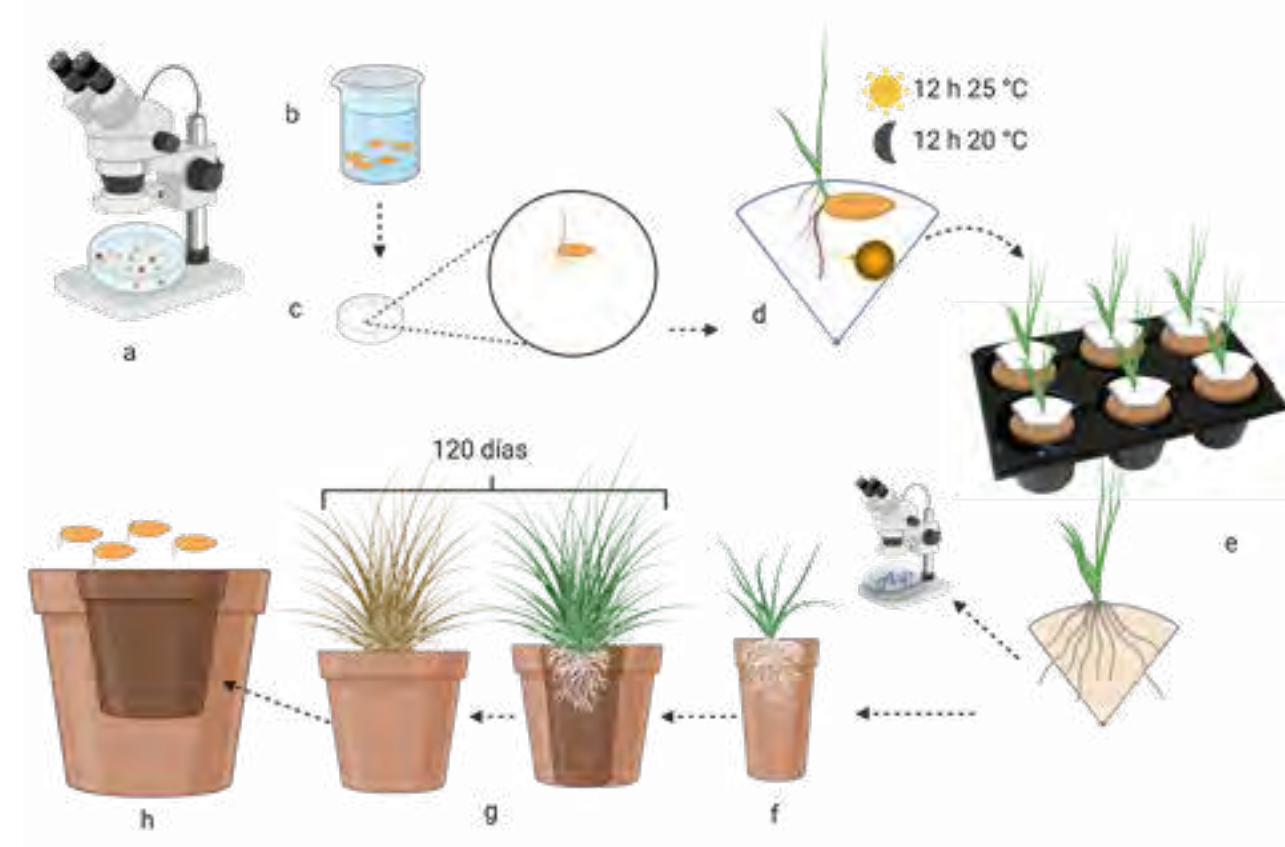


Figura 55. Propagación de cultivos monospóricos en charolas.

Cultivos mono-específicos en minirizotron

Los cultivos a partir de una sola espора asegura la obtención de un cultivo puro, sin embargo es necesario contar con muchas repeticiones, ya que las esporas al ser estructuras adaptadas para la dispersión y supervivencia, durante largos períodos de tiempo, durante condiciones desfavorables, entran en periodo de dormancia, por otra parte, muchas de las especies de HMA responden de manera diferente a diversos factores tales como: humedad, pH, contenido de fósforo, preferencia del hospedero. Aunque se seleccionan las esporas turgentes y sin rastro de parasitismo, muchas de estas, pueden haber perdido su viabilidad, lo que puede ocasionar frecuentemente un fracaso en el aislamiento. Una alternativa cuando se cuenta con experiencia en la diferenciación de esporas a nivel morfológico, es la selección de un conjunto de esporas con características idénticas para realizar cultivos mono-específicos, mediante la técnica que a continuación se describe:

a) Pre-germinar semillas del pasto *Brachiaria decumbens* y separar esporas sanas y turgentes por morfotipos, b) tomar una caja de Petri de plástico y realizar un corte con un exacto o bisturí en un extremo de esta, a fin de dejar espacio libre para que crezca una plántula, rellenar con una mezcla 3:1 vermiculita-suelo estéril, humedecer y colocar la semilla pre-germinada y de 8 a 10 esporas idénticas morfológicamente, c) cubrir las cajas con una lámina de cartón oscuro y colocar en posición vertical sobre un trozo de unicel con hendiduras que sirvan de soporte a las cajas (minirizotróton), regar cuidadosamente con una jeringa de 10 mL una vez por semana, manteniendo los cultivos en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 12 horas luz/obscuridad, durante 3 meses, d) posteriormente tomar una muestra de raíces y comprobar la evidencia de la colonización micorrízica, buscando estructuras típicas de los HMA (vesículas y arbusculos), para asegurar el éxito del cultivo, si se encontraron estructuras, tomar el sustrato y raíces del minirizotróton e) transferir a macetas de 250 mL, conteniendo la misma mezcla del sustrato inicial, f) sembrar una planta perenne (pasto, *Brachiaria decumbens*) y una anual (jitomate, *Solanum tuberosum*), mantener por 3 meses y dejar de regar, después de 60 días evaluar la cantidad de esporas presentes (Figura 56).

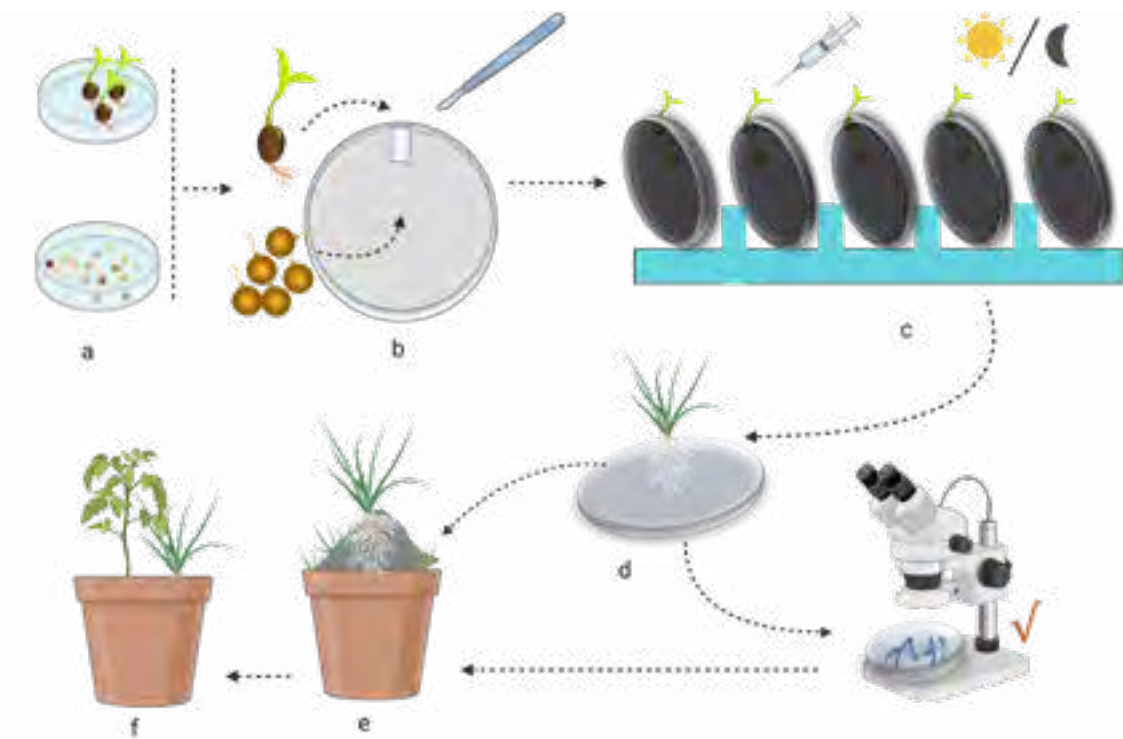


Figura 56. Propagación en minirizotróton para un cultivo mono-específico.

Técnica de clareo y tinción de raíces

Una de las técnicas tradicionalmente utilizadas para corroborar la presencia de los HMA en las raíces micorrizadas, es la del clareo y tinción, mediante la cual es posible observar el micelio dentro de las raíces, así como vesículas y arbuscúlos. Durante el proceso de aislamiento y propagación de estos hongos es indispensable incluir esta técnica para poder corroborar el desarrollo de los HMA. Dicha técnica consiste en: a) lavar todas las raíces con agua; seleccionar raíces finas y sanas, cortar en fragmentos de un centímetro, b) colocar los fragmentos en una solución formol, ácido acético y alcohol (FAA), bajo esta condición las raíces pueden estar almacenadas a temperatura ambiente hasta el proceso de tinción. Este procedimiento puede variar dependiendo del tipo de hospedero, ya que existen raíces muy lignificadas o pigmentadas que requieren un mayor tiempo para la extracción de los pigmentos de la raíz, para lograr un clareo adecuado. Si las raíces son de consistencia suave y provienen de hospederos tales como: pastos, frijol, maíz, jitomate, cebolla etc., se debe seguir la ruta 1 (Figura 57). En cambio, si las raíces son de consistencia dura, oscuras o muy lignificadas, provenientes de hospederos como el café, cítricos, aguacate, leguminosas arbóreas o coberteras, se recomienda seguir la ruta 2 (Figura 57).

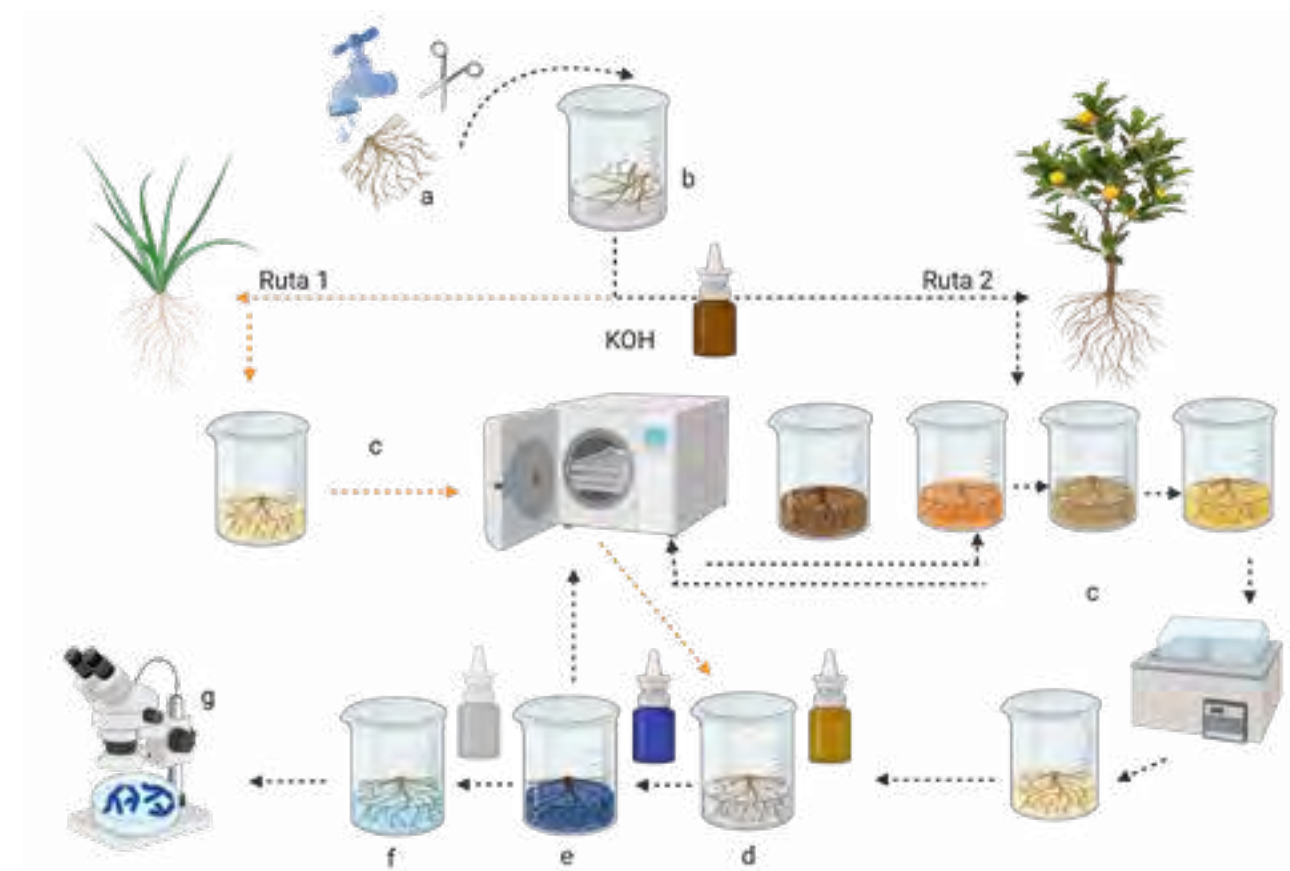


Figura 57. Clareo y tinción de raíces micorrizadas

Ruta 1: c) lavar 5 veces con agua corriente los segmentos de raíz fijados en FAA y transferirlos a un vaso de precipitado con KOH al 10 %, cubriendo el vaso con una capa de papel bond y otra de papel aluminio. Calentar la muestra en una olla de presión a 10 lb in-2 durante 5 a 10 min. Si el líquido se torna ligeramente amarillo, continuar al paso d). Si el líquido se torna amarillo muy oscuro, seguir la ruta 2.

Ruta 2: c) lavar 5 veces con agua corriente los segmentos de raíz fijados en FAA. Transferir a KHO al 10 % y dejar 24 horas a temperatura ambiente, escurrir el KOH y agregar nueva solución, calentar en la olla de presión a 0.351 K.cm² durante 5 mins, nuevamente cambiar el KOH y llevar a baño maria a 60 °C y realizar como máximo 4 veces el proceso de KOH, hasta lograr eliminar los pigmentos de la raíz, cuidando de no destruir el tejido (cuando se observa que el tejido se empieza a fragmentar, detener este proceso), d) retirar el KOH (10 %) y agregar peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 10 % por tres mins. Enjuagar con agua destilada y sumergir en ácido clorhídrico (HCL) al 10 % por 1 min, e) colocar las raíces en una solución de azul tripano al 0.05 % durante 5 mins, a 0.175 K.cm² de presión. f) eliminar el colorante y pasar a lactoglicerol limpio, donde pueden mantenerse hasta su observación. Observar al microscopio estereoscópico (Figura 57).

CONSERVACIÓN DE HMA

Existen varios métodos propuestos para la conservación de este grupo de hongos, como los cultivos axénicos, aunque limitado a un número reducido de especies, así como la criopreservación y liofilización. Por otra parte, considerando que estos hongos requieren una planta para desarrollarse, las colecciones vivas, son una excelente elección para la preservación, cuidando la viabilidad, identidad, pureza y estabilidad. Esta opción requiere infraestructura y personal especializado, ya que sin las condiciones óptimas se corre el riesgo de contaminación por hongos patógenos, nematodos o algunos insectos, así como la pérdida o la contaminación de otras especies de HMA que se encuentren dentro del mismo invernadero.

Los métodos de conservación de este grupo de hongos tienen dos enfoques importantes: el ecológico para la conservación de la diversidad y el económico cuando se requiere patentar para su reproducción comercial. El depósito de materiales en el proceso de registro de patentes es un paso necesario y este tipo de servicios son limitados en el mundo. Una de las colecciones más importantes es el Laboratorio de micología de la Université Catholique de Louvain, en Bélgica, ya que cuenta con la certificación ISO 9001: 2015 para el ingreso, control, preservación, almacenamiento y suministro de hongos micorrízicos arbusculares, así como información relacionada sobre depósitos públicos, depósitos seguros y depósitos de patentes. En este tipo de instituciones no es posible recibir material preservado en suelo, ya que se corre el riesgo de introducir microorganismos no deseables.

ALMACENAJE

Almacenaje en seco

Un método sencillo y práctico, consiste en: a) dejar de regar las macetas donde se tuvieron los cultivos trampa (en nuestra experiencia de 3 a 6 meses de secado), b) cortar la planta hospedera, separando las raíces y el suelo (Figura 58). A partir de este paso se pueden seguir 2 rutas:

Ruta 1: c) seleccionar el suelo o mezcla de sustrato, proveniente del cultivo trampa, d) colocar en bolsas "zip-lock" (libres de humedad), etiquetadas con los datos correspondientes, como la fecha de colecta, lote, número de esporas, porcentaje de colonización, etc. y e) se guardan en refrigeración a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ruta 2: c) seleccionar cultivos trampa propagados en arena de cuarzo, d) se dejan secar y se transfieren a botes de plástico, e) se almacenan en un lugar seco y a temperatura ambiente ($21\text{ a }36\text{ }^{\circ}\text{C}$), guardados en una gaveta de laboratorio (Figura 58). Bajo estas condiciones, hemos probado su viabilidad hasta después 8 años de almacenamiento.

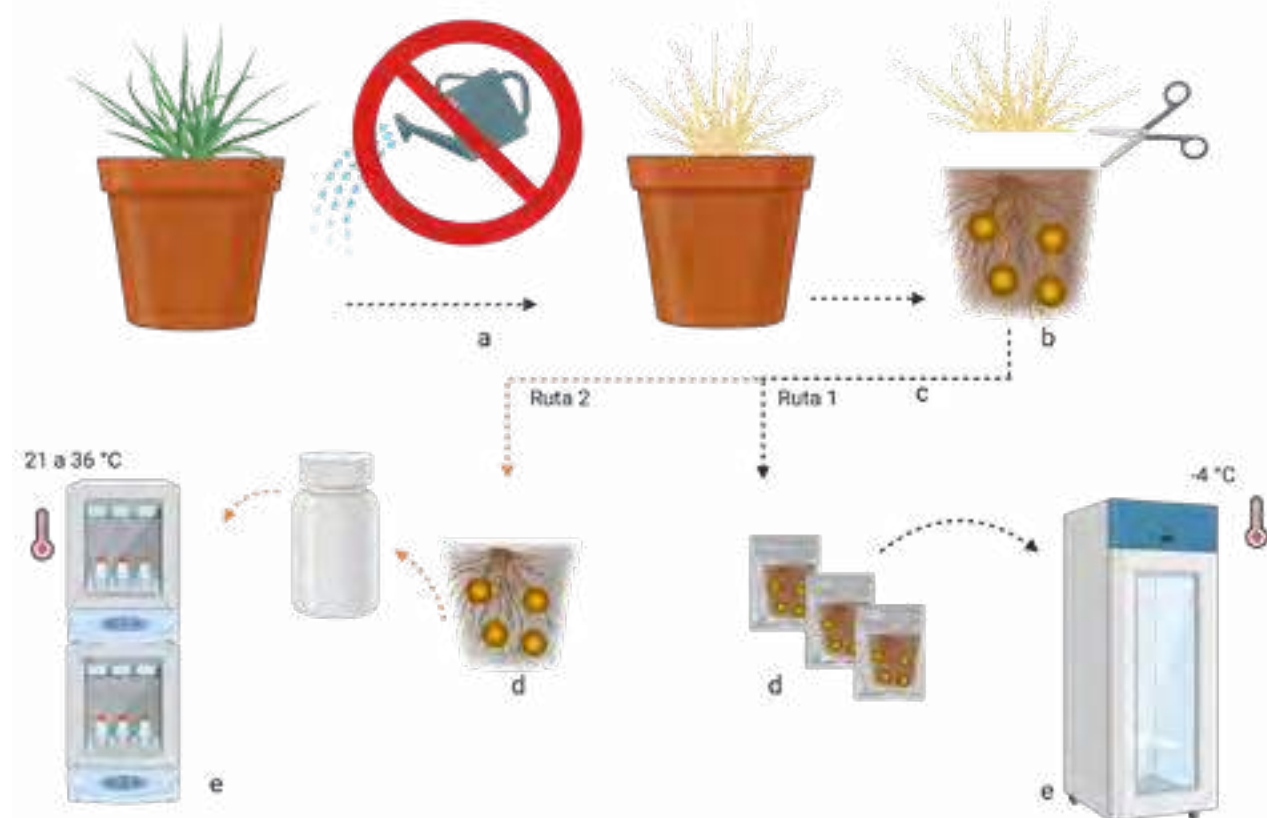


Figura 58. Proceso de almacenaje de hongos micorrízicos arbusculares a partir de cultivos trampa.



IX

HONGOS ENDÓFITOS

*Rosario Medel-Ortiz, Elmira San Martín, Pedro Ríos Cortes,
Ma. Emilia Belingheri Lagunes*

Centro de Investigación en Micología Aplicada, Universidad Veracruzana.
Médicos 5, Colonia Unidad del Bosque, C.P. 91010, Xalapa, Veracruz, México
romedel@uv.mx

En la naturaleza existen asociaciones entre organismos que pueden ser o no benéficas, y tratándose de plantas, hay organismos que habitan dentro y/o sobre ellas. Generalmente existen tres tipos de asociaciones naturales: 1) Organismos saprobitos, los cuales se alimentan de materia orgánica muerta, 2) Los patógenos, organismos capaces de causar enfermedades y 3) Los hongos endófitos, catalogados como asociaciones mutualistas y referidos en términos reales como "simbiontes" siendo esta asociación benéfica para cada uno de los organismos que la integran.

Endófito literalmente significa "dentro de la planta" y con este nombre se conoce a varios organismos, entre ellos hongos que habitan, durante un período de tiempo, el tejido interno de las plantas sin causarles daño aparente. Así, los endófitos pueden considerarse una etapa en la planta, que no se sabe con certeza cuánto tiempo permanece activa.

Por lo general, estos hongos endófitos son formas asexuales o anamorfos de otros hongos (principalmente del grupo de los Ascomycetos) y, más que nada, se trata de hifas que se establecen entre los espacios intra o intercelulares o en los tejidos vasculares.

La manera en que éstos llegan al interior de las plantas es a través de los estomas de las hojas o, en ciertos casos, poseen la capacidad de penetrar en las semillas, como sucede en el caso de los pastos. Se ha estimado que los endófitos están presentes en infinidad de plantas (pinos, musgos, helechos) e incluso algas, y que existen al menos 3-4 endófitos asociados a cada una de las especies vasculares conocidas. Existen endófitos en la mayoría de los órganos de las plantas (hojas, tallo y raíz), pero los que más han llamado la atención son los de las hojas.

Por principio, para realizar un buen aislamiento de hongos endófitos se debe tomar en cuenta la recolección del material a estudiar, así como las técnicas adecuadas de aislamiento de los hongos endófitos.

RECOLECCIÓN DE MATERIAL

Independientemente del tipo de estudio que se desee realizar, el muestreo de hongos endófitos es similar en todos los casos, ya que se deben recolectar partes vegetales que no exhiban daños físicos de ningún tipo (clorosis, daños mecánicos, necrosis, daños causados por insectos, etc.), así también, deben seleccionarse tejidos completamente sanos, para evitar que en el aislamiento pueda crecer cualquier otro hongo. El proceso incluye el aislamiento y cultivo, el monitoreo de los aislamientos y finalmente la identificación. En la Figura 60, se muestra el esquema general de un estudio de endófitos desde la colecta del material hasta su identificación.

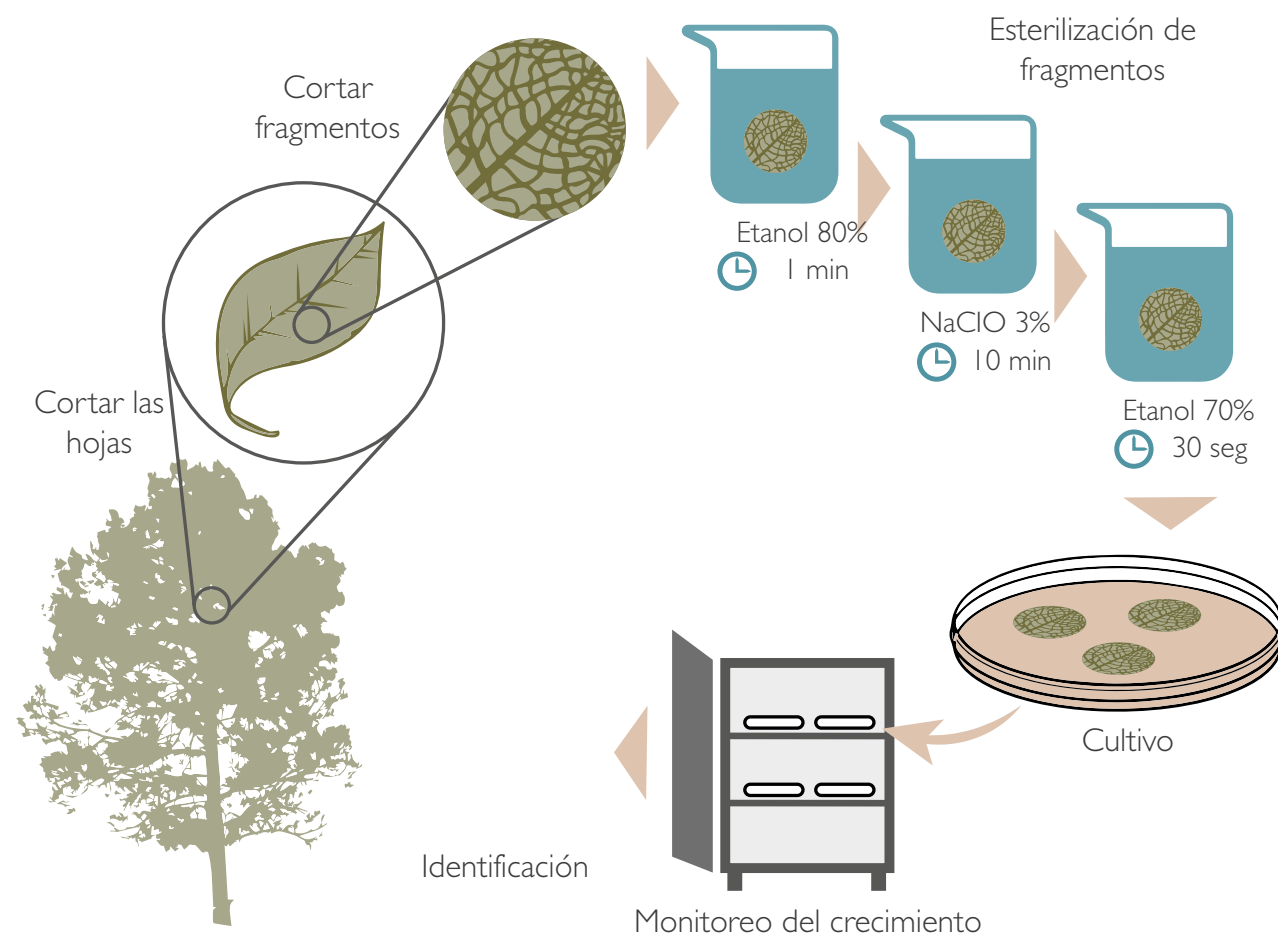


Figura 60. Esquema general del aislamiento de endófitos.

Existe una técnica "estándar" (Figura 61) para aislar hongos endófitos, la cual puede variar dependiendo de diversos factores como son: tipo de material (hojas delicadas o gruesas), procedencia del tejido (hojas, raíces o tallos) y dureza del material (muy lignificado o no), esto particularmente hace difícil cortar el tejido en pequeñas porciones, es claro que estos son solo algunos aspectos que considerar y que pueden significar variaciones a la técnica estándar de aislamiento, así como en la colecta y traslado del material.

HONGOS ENDÓFITOS

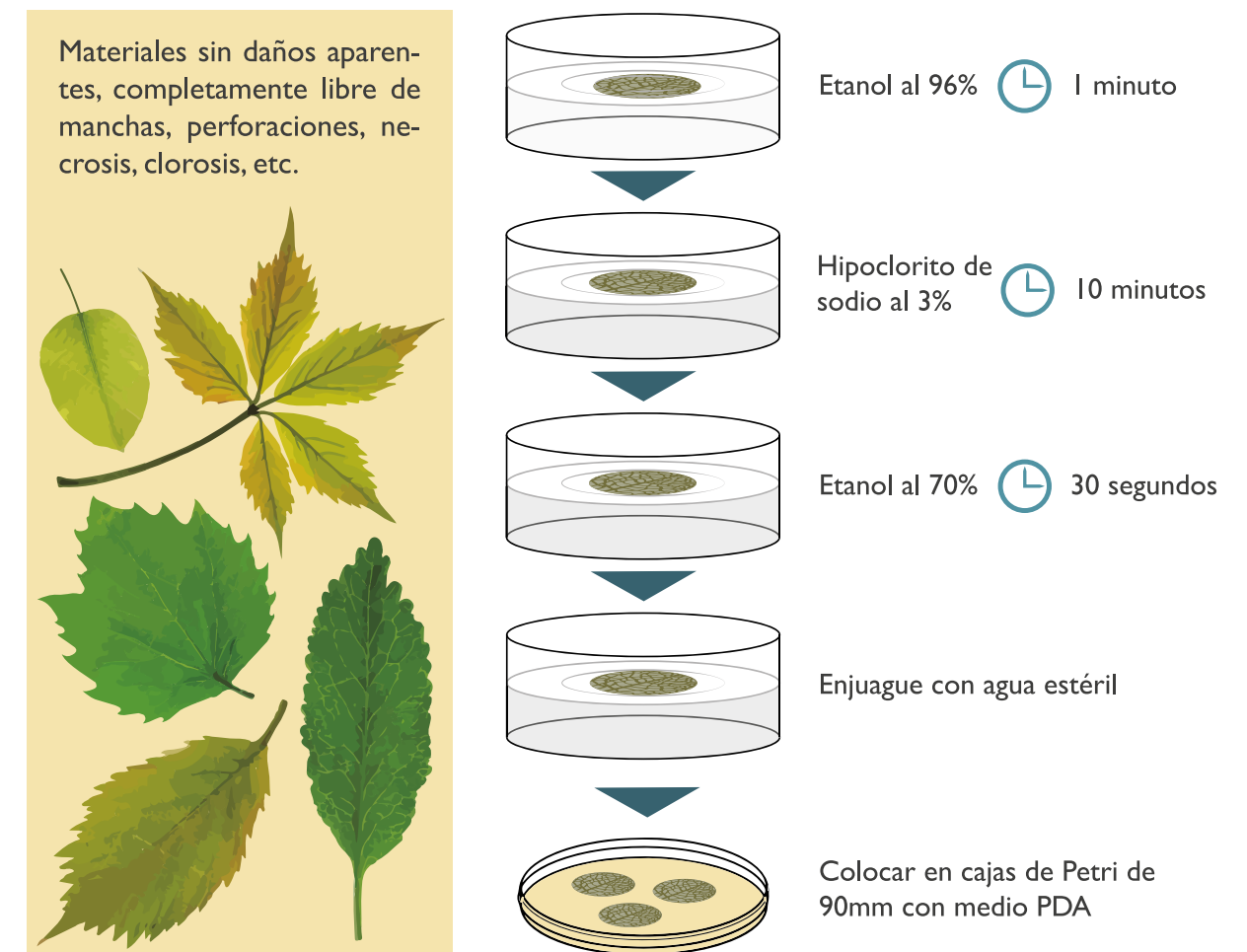


Figura 61. Técnica estándar de aislamiento de hongos endófitos.

COLECTA Y TRASLADO DE MATERIAL

Colectar hojas para estudios de endófitos es relativamente sencillo y depende de lo que se desee estudiar, ya que se pueden tomar muestras por estratos o abarcando las diferentes partes de la planta. Previamente se han mencionado algunos criterios para realizar la colecta y traslado del material, pero también hay que considerar el tamaño las hojas, ya que dependiendo de este carácter se elegirá el tipo de contenedor para su transporte al laboratorio, comúnmente las muestras se depositan en bolsas de papel en un contenedor de plástico suficientemente grande para evitar que éstas se rompan. Las muestras se deben procesar lo más rápido posible con la finalidad de evitar realizar el aislamiento de hojas marchitas. Si por alguna razón no se puede procesar el material el mismo día (horario de llegada al laboratorio), se deben guardar en el refrigerador a 4 °C, pero no se deben dejar más de 12-36 h en almacenamiento. Los tallos herbáceos se procesan muy parecido a las hojas y se sugiere el mismo procedimiento en cuanto a tiempo de procesamiento. Los tallos lignificados y las raíces se deben depositar en bolsas de plástico o papel suficientemente grandes para su traslado. Debido a su consistencia lignificada, estos materiales resisten más el traslado y el tiempo de procesamiento, no así tallos y raíces herbáceas o tallos y raíces delicadas, que deben ser tratadas de la misma forma anteriormente descrita para hojas.

AISLAMIENTO DE HONGOS ENDÓFITOS

Una técnica estándar para el aislamiento de hongos endófitos en hojas se ilustra en la Figura 62. Esta metodología fue propuesta por Petrini y Fisher (1990), y consiste básicamente en la desinfección de la superficie de la hoja mediante una serie de lavados, que se deben realizar en un área aséptica equipada con una cámara de flujo laminar. Las muestras son inicialmente seccionadas en fragmentos de aproximadamente 1 cm² (hojas, tallos o raíces) o en porciones adecuadas al tamaño de tejido a estudiar. Posteriormente se sumergen en etanol al 96 % por un minuto y con ayuda de unas pinzas de disección, se retiran del alcohol y se transfieren a una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 10 minutos. Nuevamente con ayuda de las pinzas se introducen en etanol al 70 % durante 30 segundos y para finalizar, los fragmentos se enjuagan con agua estéril. Una vez terminada la desinfección del tejido, éstos se colocan en cajas Petri de 90 mm con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) añadido con antibiótico de amplio espectro, por ejemplo, cloranfenicol. Esta parte del aislamiento es muy importante para evitar que esporas del aire entren en contacto con el medio de la caja de Petri, por lo que se recomienda realizar este paso en la cámara de flujo laminar con 2 mecheros de alcohol, uno a cada lado del área de inoculación. Se recomienda depositar un máximo de 4 fragmentos por caja. Las cajas se incuban a una temperatura de 23-25 °C durante 8-10 días o hasta que empiecen a crecer los micelios, los cuales deberán ser reaislados separadamente, para lograr obtener un cultivo puro de cada hongo diferente que aparezca en cajas de Petri independientes. Nuevamente se incuban a 23-25 °C durante 8-10 días o hasta que el micelio llene las cajas de Petri y/o aparezcan indicios de los conidióforos. Los cultivos puros o individuales se guardan en cajas Petri, tubos de ensayo o viales con medio PDA y se almacenan a 4 °C.

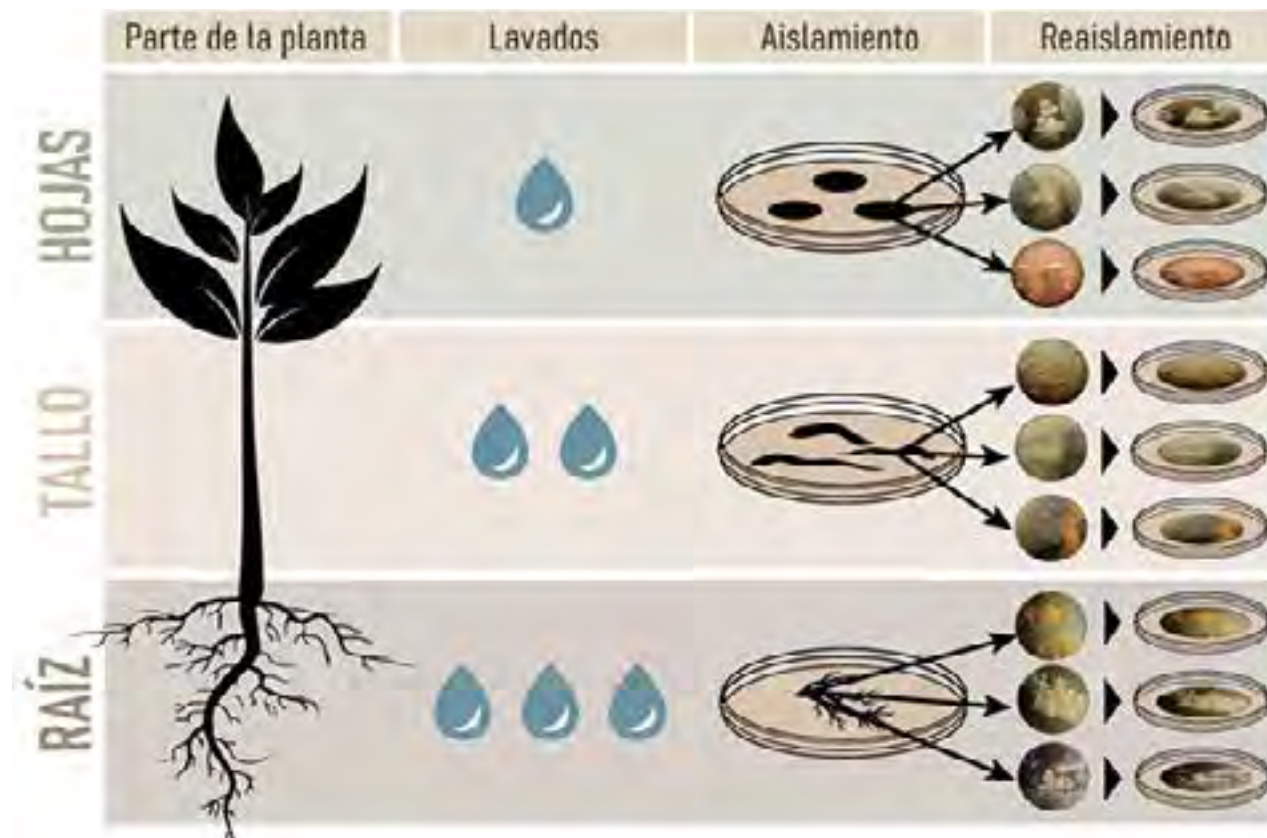


Figura 62. Técnica general de aislamiento según la parte vegetal que se desea aislar.

VARIANTES EN LA TÉCNICA DE AISLAMIENTO

Las variantes que tiene la técnica se pueden dividir a grandes rasgos en cinco aspectos los cuales se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Técnicas utilizadas para el aislamiento de endófitos en diversas partes vegetales

Estructura	Tratamiento previo	Lavados y porcentaje de concentración	Medio de cultivo	Temperatura y tiempo de incubación
Hojas Petrini y Fisher (1990)		Etanol 96 %, 1 min. Hipoclorito de sodio 3 %, 10 min Etanol al 70 %, 30 s Enjuagar con agua destilada estéril	PDA 50 µg mL cloranfenicol	23-25 °C 8-10 días
Raíz Khan et al. (2016), Shah et al. (2019)	Sumergir en Tween 20 %, 8 min	Agua destilada, 20 min. Etanol 70 %, 1 min Hipoclorito de sodio 3 %, 10 min. Etanol 90 %, 30 s Enjuagar con agua destilada estéril, 10 min.	PDA 50 µg mL cloranfenicol	25 °C 7 días
Semillas Geisen et al. (2017)	Sumergir en agua destilada estéril, 5 min	Etanol 70 %, 5 min. Enjuagar con agua destilada estéril	Agar 1,6 % de H ₂ O-agar pH 6,7 50 µg/ml de estreptomina. PDA ph 6,7	25 °C 7 días
Tallos Fisher y Petrini (1987), Liu et al. (2009)	Lavar 8-10 veces en agua destilada	Etanol 70 %, 1 min. Cloruro de mercurio 0.1 %, 8 min. Enjuagar 10 veces con agua destilada	PDA	28 °C 15 días
Pastos Qin et al. (2009), Sarangthem y Momota (2012), Potshangbam, et al. (2017)	Lavar 10 veces con agua de grifo y sumergir 10 min en 1 L de agua destilada estéril con 1 mL de Tween al 80 %	Lavar el material dos veces con agua destilada estéril Etanol 80% 1 min, el tallo 2 min y la raíz 3 min Hipoclorito de sodio 4%, Etanol al 70 %, 1 min Lavar 10 veces con agua destilada estéril y secar en condiciones estériles.	PDA, CMA, MEA y OMA	28 °C 14 días

Tratamientos previos

Dependiendo del origen (hoja, tallo o raíz), grosor del tejido (muy delgado, delgado, grueso) o consistencia (coriácea o blanda), puede haber variantes en el tratamiento de los materiales, antes de iniciar la esterilización. Estas variantes consisten en lavados con agua destilada estéril o aplicación de una solución de Tween, químico usado como detergente o emulsionante, que se prepara con una sustancia llamada polisorbato 20 y agua de grifo.

Reactivos

Las soluciones de hipoclorito de sodio se pueden utilizar en concentraciones desde 0.8-al 4 %. Se puede elaborar usando blanqueador comercial (se revisa a qué concentración inicial está la presentación y a partir de esta se prepara la solución según el porcentaje deseado). De igual manera, las soluciones de etanol se preparan en concentraciones desde 70-96 %. La decisión de que concentración de reactivo se debe usar dependerá del grosor del tejido.

Número de lavados

Generalmente hay un lavado final con agua destilada estéril, aunque algunos trabajos mencionan hasta 10 lavados en agua estéril al final de la serie de lavados con etanol y cloro.

Tiempo de lavado

Existen variaciones en cuanto a los tiempos de lavado y los porcentajes a los que se utiliza el hipoclorito de sodio, el etanol y el Tween. Generalmente se utilizan lavados en agua estéril de un minuto, pero pueden repetirse hasta 10 veces. Los tiempos de enjuague también pueden variar entre uno a 10 min.

Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de hongos endófitos (variante con o sin antibiótico, como cloranfenicol 500 mg/L)

- AV8 (Jugo V8 y agar)
- CMA (Harina de maíz agar)
- EMA (Extracto de malta y agar)
- MPY (Malta peptona extracto de levadura)
- OMA (Harina de avena y agar)
- PDA (Papa Dextrosa y agar)

Tiempo de incubación

Existe una variación en general respecto de la temperatura de incubación, la cual va de 23-30 °C en oscuridad, con un tiempo de incubación entre 7 hasta 30 días. Aquellos micelios que no esporulen tras la incubación en los diferentes medios de cultivo después de 30 días se considerarán como micelios estériles. La no esporulación de colonias es un evento común en los aislamientos de endófitos.

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE ENDÓFITOS EN DIVERSOS GRUPOS Y PARTES DE PLANTAS

Aislamiento de endófitos en pastos

Para este caso tomar en cuenta que las muestras no pueden estar más de 24 horas sin procesar, debido al riesgo de contaminación. Se puede utilizar la técnica estándar para pastos pequeños o se puede iniciar con 10 lavados con abundante agua del grifo. Posteriormente se deposita el material en un recipiente que contenga 1 L de agua destilada estéril y 1 mL de Tween al 80 %, las muestras se dejan remojando durante 10 minutos, posteriormente se enjuagan con agua destilada estéril, se lava con etanol al 80 %, según la estructura de que se trate: hojas 1 min, tallo 2 min y raíz 3 min. Acto seguido se deben colocar en solución de hipoclorito de sodio al 4 % un min y enjuagar posteriormente con etanol al 70 % durante un min. Por último, lavar 10 veces con agua destilada estéril y secar en condiciones estériles.

Aislamiento de endófitos a partir de tallos I

Esta es una variación de la técnica propuesta por Unterseher y Schnittler (2009), la cual se describe a continuación (Figura 62): inicialmente, se debe de seleccionar el tallo de la planta de interés, éste debe estar libre de lesiones o deformaciones. Posteriormente lavar directamente en agua del grifo por 10 min para eliminar contaminantes y partículas no deseados, de ser necesario se puede utilizar un cepillo de cerdas suaves, luego cortar en fragmentos pequeños de aproximadamente 1-2 cm, si el tallo es leñoso eliminar la corteza con ayuda de un bisturí o navaja, continuar con un lavado en etanol al 75 % por 1 min, seguido por un enjuague de agua estéril, después se realizan 3 lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 2-3 % intercalado con enjuagues con agua estéril. Los fragmentos de tallo de secan en una superficie con papel absorbente estéril y se inoculan en medio PDA o EMA con antibiótico al 0.1 %. Por último, se incuban a 24-26 °C de 8 a 10 días hasta obtener un crecimiento uniforme, el cual se resiembrará nuevamente para obtener un cultivo puro. Finalmente, para resguardar el cultivo, se resiembran en tubos de ensaye, viales o cajas de Petri pequeñas con medio PDA o AEM y se almacenan a 4 °C.

Variante de la técnica para aislar hongos endófitos a partir de tallos II

Inicialmente se lavan las muestras con abundante agua destilada de 8 a 10 veces, se continúa con lavado de etanol al 70 % durante un min, posteriormente coloca en cloruro de mercurio al 0.1 % durante 8 min (debido al manejo y toxicidad de esta sustancia, se recomienda sustituirlo por una solución de cloro al 5 %), enjuagar 10 veces con agua destilada estéril, por último, secar los tallos en condiciones estériles.

Técnica estándar para el aislamiento de endófitos en raíz I

Otra variación de la técnica propuesta por Unterseher y Schnittler (2009) para el aislamiento a partir de raíz se describe a continuación (Figura 62): las raíces deben separarse del resto de la planta y lavarlas con abundante agua de la llave. Sumergir la raíz unos segundos en una solución de etanol al 70 % y seleccionar al azar cinco fragmentos de raíces laterales, de aproximadamente 5 cm de largo, estos fragmentos se desinfectan superficialmente, mediante un lavado con agua destilada estéril durante 15 s en agitación manual,

luego colocar en una solución de hipoclorito de sodio 10 % por 15 min, seguido de 15 min en una solución de antibiótico (0.05 % p/v de penicilina, 0.05 % p/v de ampicilina, 0.05 % p/v de estreptomina ó 0.05 % p/v de tetraciclina). Para finalizar, realizar tres lavados con agua destilada estéril.

Los fragmentos de raíz desinfectados se reservan en cajas de Petri con papel absorbente estéril con el fin de eliminar el agua excedente, se colocan 3-4 fragmentos de la raíz en cajas Petri con medio PDA, V8 o Agar Extracto de Malta (AEM) y se incuban en oscuridad a 25 °C. Una vez que se obtenga un crecimiento uniforme resembrar nuevamente hasta obtener un cultivo puro, para conservar, trasladar el cultivo a tubos de ensaye, viales o cajas de Petri pequeñas con medio PDA, MV8 o EMA. Se almacenan a 4 °C.

Aislamiento de endófitos asociados a raíz II

Las raíces de la planta se cortan con cuchillo estéril y se depositan en bolsas de plástico con cierre hermético para inmediatamente trabajarse en el laboratorio. Mantener las raíces a 4 °C durante 12 h antes del aislamiento de hongos endófitos, transcurrido este tiempo lavar la raíz con Tween al 20 % durante 8 min, después hacer enjuagues en agua destilada durante 20 min, luego lavar con etanol al 70 % durante un min, pasar por hipoclorito de sodio al 3 % durante 10 min y etanol al 90 % por 30 segundos, después lavar en agua destilada estéril durante 10 min. Finalmente inocular en medio PDA o V8 con antibiótico de amplio espectro.

Aislamiento de endófitos en semillas

En esta técnica las semillas se esterilizan mediante dos protocolos de desinfección; 1) inicia con un enjuague con agua destilada estéril durante 5 min, o 2) esterilización completa remojando las semillas en una solución de cloro o blanqueador doméstico al 5 % durante 5 min, seguida de lavado en etanol al 70 % por 3 min y lavado con agua destilada estéril. Posteriormente se colocan en Cajas de Petri conteniendo 1.6 % de agua-agar pH 6.7 añadiendo 50 µg/mL de estreptomina. Los cultivos aislados deben mantenerse con medio de PDA, pH de 6.7.



IMPORTANCIA DE LAS COLECCIONES EX SITU DE HONGOS

Dulce Salmones, Gerardo Mata

Red Manejo Biotecnológico de Recursos, Instituto de Ecología, A.C. Carretera antigua a Coatepec
351, El Haya, C.P. 91073, Xalapa, Veracruz, México
dulce.salmones@inecol.mx

Las colecciones de organismos vivos representan una fuente biológica y genética invaluable para la ciencia, ya que preservan material para realizar estudios taxonómicos y de diversidad biológica, así como de uso en diversos procesos biotecnológicos. El principal objetivo de las colecciones es conservar los microorganismos *ex situ* manteniéndolos puros y con estabilidad genética, morfológica o fisiológica, de tal manera que puedan conservar sus características originales (Figura 63). Algunas colecciones también proveen otros servicios como son: el resguardo de cultivos de referencia utilizados para diferentes ensayos en laboratorios microbiológicos y sanitarios o la recepción de organismos que forman parte de productos biológicos patentados o citados en publicaciones.



Figura 63. La conservación de material genético de interés biotecnológico es uno de los objetivos de los ceparios. **A:** *Ganoderma* sp. hongo medicinal ampliamente cultivado en diferentes regiones del mundo. **B:** *Neolentinus lepideus* especie comestible muy apreciado en algunas regiones de México.

Generalmente la creación de una colección no se planea, sino surge como consecuencia del aislamiento de material genético de interés para determinado estudio, enseñanza o línea de investigación. A diferencia de las colecciones de organismos muertos, que con las debidas **prácticas curatoriales** pueden mantenerse por varios años (Figura 64), en las colecciones vivas se requieren aplicar métodos de conservación que garanticen la estabilidad genética y fisiológica de los cultivos, lo que implica contar con un financiamiento permanente que permita cubrir los gastos de reactivos, equipos e instalaciones utilizados, así como la disponibilidad de personal especializado.

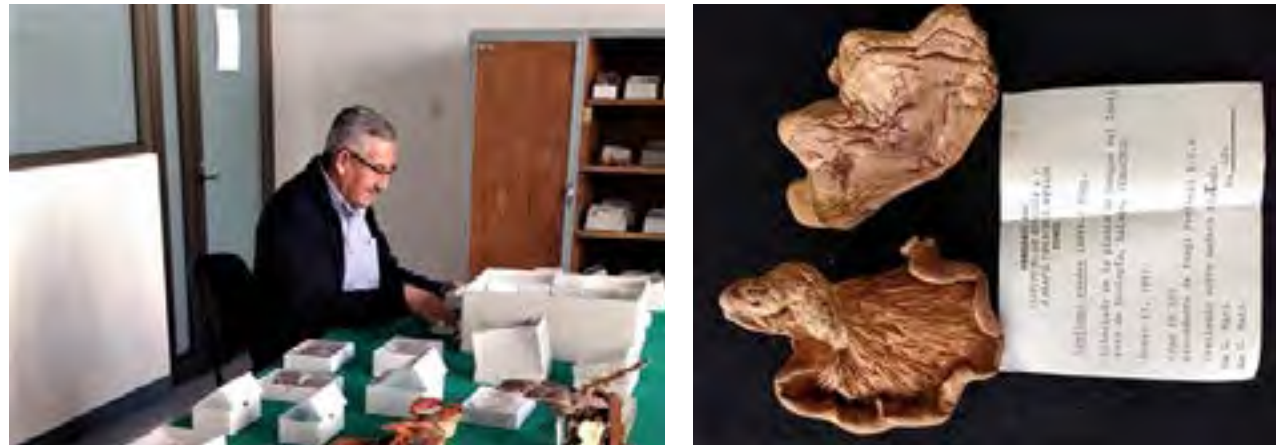


Figura 64. Prácticas curatoriales realizadas en un herbario de hongos. El material biológico se preserva permanentemente deshidratado, bajo condiciones ambientales controladas que eviten su deterioro.

Las colecciones biológicas vivas se responsabilizan de mantener el germoplasma con altos estándares de calidad y pureza, esto con la finalidad de garantizar su viabilidad para realizar actividades de investigación, enseñanza y comerciales. Sin embargo, a pesar del esfuerzo de los especialistas en difundir el papel primordial de las colecciones en la preservación de la diversidad biológica, es innegable que cada institución responsable de una colección tiene la libertad de definir el tipo de organismo cultivable (microorganismo, hongo, planta, animal), o parte replicable o viable de éstos (genoma, plásmido, virus, ADN cromosómico, células humanas, tejidos, etc.) que desea conservar de acuerdo con su especialidad o intereses, por lo que no hay un resguardo equitativo de los recursos genéticos en el mundo.

CARACTERÍSTICAS Y MANEJO DE LAS COLECCIONES DE HONGOS

Las colecciones vivas de hongos resguardan principalmente cepas aisladas de especímenes en la etapa vegetativa (micelio) o reproductiva (esporóforo), aunque también se pueden preservar estructuras de resistencia (esporas) y parte replicable de éstos (ADN cromosómico). Las colecciones de cepas de hongos se denominan ceparios, aunque es un vocablo que se utiliza de manera genérica para las colecciones de cultivo *ex situ* de microorganismos.

Debido a la complejidad del mantenimiento de hongos vivos, es importante estudiar y experimentar procedimientos para el aislamiento, cultivo, caracterización y preservación de los cultivos. En este libro ya se han descrito detalladamente algunas técnicas para aislar y preservar cepas de diferentes tipos de hongos,

aunque por la diversidad de germoplasma silvestre existente, no todos los grupos taxonómicos fueron tratados.

Las actividades de mantenimiento de las cepas demandan un financiamiento a largo plazo, por lo que es recomendable que la entidad responsable analice permanente la cantidad y tipo de cepas a conservar, así como la inclusión de nuevos especímenes, con la finalidad de garantizar la viabilidad y mantenimiento de material genético prioritario, que no afecte los objetivos de la colección, así como la capacidad de almacenamiento y la disponibilidad de personal involucrado en las labores (Figura 65).



Figura 65. El mantenimiento de cultivos *in vitro* es un proceso laborioso, que requiere de insumos, equipo y personal especializado para realizar dicha actividad.

Por otra parte, y a pesar de que actualmente se cuenta con bibliografía sobre los principales métodos empleados para la preservación de la mayoría de los hongos, aún hay especies y géneros que no se tienen antecedentes de su cultivo, por lo que, si los responsables de la colección están interesados en preservar este tipo de especímenes, será necesario realizar ensayos para determinar el proceso y condiciones óptimas de su almacenamiento.

La elección del método de preservación adecuado es uno de los grandes retos del responsable, ya que depende no sólo de las especies almacenadas, sino de múltiples factores ya citados anteriormente, como son: infraestructura, equipamiento, insumos y personal capacitado. La Federación Mundial de Colecciones

de Cultivo (WDCC por sus siglas en inglés) recomienda conservar las cepas usando dos métodos de preservación, pero para el caso de organismos que sólo se conservan con un método, se deben almacenar por duplicado y en equipos con suministro eléctrico diferente. De preferencia, los duplicados deben resguardarse en lugares separados, para evitar que ambas muestras puedan perderse por exposición a riesgos difíciles de controlar, como son: la presencia de plagas o contaminantes, fallas de los equipos e instalaciones o incluso, eventos fortuitos no controlables, como incendios, inundaciones, terremotos o conflictos sociales.

Cada cepa preservada debe tener su registro correspondiente, el cual debe detallar mínimamente toda la información al momento de realizar la identificación y, adicionalmente, debe incluir el método de conservación utilizado, medio de crecimiento óptimo y temperatura. Uno de los papeles fundamentales de las colecciones es promover la interacción con otras personas y organizaciones con intereses afines, por lo que también deberán establecerse regulaciones para la donación o intercambio de materiales. Si una colección recibe material con bajos estándares de calidad y no tiene protocolo de "cuarentena" previo a la incorporación en su colección, pone en riesgo el resto de las cepas preservadas.

La planificación y seguimiento de los procesos de resiembra es uno de los aspectos más importantes para lograr mantener viables los cultivos. Independientemente de los métodos de preservación empleados, el tratamiento del material deberá llevarse bajo estrictas normas de bioseguridad, especialmente cuando se trabaja con especies que pueden producir metabolitos tóxicos o volátiles, así como esporas con reacciones alérgicas.

También es recomendable que la información de la colección se mantenga al día y resguardada electrónicamente. Existen diversos programas de cómputo que permiten la digitalización de las colecciones en formatos compatibles, con la finalidad de poder intercambiar su contenido con otras entidades similares. Cada colección puede incluir la información que considere necesaria para los fines particulares de uso, sin embargo, los siguientes campos son prioritarios y altamente recomendable incluir: número o clave de cepa asignado en la colección, registro original (si es que fue adquirida de otra colección), nombre científico del espécimen, incluyendo género, especie y variedad (si aplica), especialista taxonómico que la identificó, requerimientos de crecimiento (medio de cultivo, temperatura de incubación), fecha de aislamiento, personal que realizó el aislamiento, así como características del espécimen del que se aisló la cepa (zona de colecta, sustrato en que crecía, herbario en que se deposita el ejemplar, etc.).

La identificación taxonómica de las cepas resguardadas es esencial para su uso en publicaciones científicas, así como para evitar duplicaciones innecesarias y gastos de recursos. El proceso de identificación taxonómica lo debe realizar un especialista, basándose en las características macro y microscópicas que presenta el espécimen del cual se obtuvo la cepa y que recomendablemente deberá estar depositado en la sección de hongos de un **herbario**. Pero no siempre las características morfológicas son estables y suficientes para lograr la identificación (Figura 66), ni tampoco el material de herbario está disponible o existe, por lo que uso de herramientas moleculares es altamente recomendable, teniendo además la ventaja de poder trabajar las muestras en su estado vegetativo (micelio). Los datos descriptivos, fotomicrografías, secuencias de ADN y estudios bioquímicos útiles para la identificación de la especie deben quedar almacenados junto con la información general de la cepa.

Una estrategia para darle identidad y difusión a la colección es considerar su incorporación a redes internacionales que promocionan y asesoran a sus miembros, como lo es la WFCC (www.wfcc.info) a nivel global y la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos (FELACC) (felacc.cinvestav.mx) a nivel regional, ya que estas asociaciones permiten participar a sus agremiados en diversas actividades de capacitación y actualización de los métodos de preservación, así como en la adopción de lineamientos homogéneos de calidad e información de los cultivos.



Figura 66. Las especies del género *Agaricus*, entre ellas *A. bisporus* (champiñón comercial), presentan caracteres morfológicos similares, por lo que es necesario utilizar herramientas moleculares en los estudios taxonómicos y de cultivo.

PERSPECTIVAS

A pesar del reconocimiento de la importancia de los ceparios por la comunidad científica y la creciente demanda de servicios para el resguardo de germoplasma de interés biotecnológico, múltiples factores amenazan permanentemente la creación de nuevas colecciones, así como la continuidad de las existentes. Hoy en día, la WFCC es la principal red que agrupa a las colecciones microbianas a nivel mundial, por lo que con base a sus datos se puede establecer un número aproximado de colecciones existentes y el número de cultivos preservados. De acuerdo con la última edición del directorio de la red (2014) (www.wfcc.info/index.php/wdcmdb/), sólo el 27.3 % del total de sus colecciones corresponde a hongos, lo que resulta irónico considerando que estos organismos constituyen uno de los grupos más abundantes en el planeta. Por ejemplo, México tiene registradas 18 colecciones con 9,078 cultivos, lo que representa un valor muy bajo para una región con estimaciones superiores a las 200,000 especies de hongos silvestres. Sin embargo, esta situación no es exclusiva de esta región geográfica.

Por lo tanto, es importante seguir generando información científica y divulgativa que destaque el papel que juegan las colecciones en el quehacer científico y biotecnológico. No debemos olvidar que, ante el deterioro que sufren cotidianamente los diversos ecosistemas a nivel global, las colecciones *in situ* representan una herramienta fundamental para preservar la biodiversidad existente, así como para el estudio de compuestos y procesos que beneficien a la humanidad.



PROTOSCOLOS DE PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

La selección de un medio de cultivo adecuado para el crecimiento y preservación de los hongos es uno de los factores más importantes a considerar en los estudios *in vitro*. Como ya se ha explicado en capítulos anteriores, estos organismos crecen de manera natural sobre diferentes sustratos orgánicos, por lo que en el laboratorio se le deben de proveer los elementos nutritivos y condiciones ambientales adecuadas para lograr su desarrollo.

Si bien la mayoría de los medios de cultivo están disponibles en el mercado bajo diferentes presentaciones y marcas, en algunas ocasiones, la incorporación de alguna fuente adicional orgánica y/o la modificación en el proceso de preparación, permiten tener mejores resultados en el aislamiento y mantenimiento *in vitro* del organismo.

Con la finalidad de que el lector disponga de esta información tan valiosa, a continuación se describen los protocolos de preparación de medios de cultivo proporcionados por los especialistas de los diferentes grupos ecológicos tratados en esta obra.

Debido a que algunos de los medios presentados son utilizados de manera general y se pueden emplear para más de un grupo de hongos, los protocolos se presentan en orden alfabético.

Los protocolos que se muestran a continuación han sido elaborados por los diferentes grupos de trabajo de los autores de los capítulos del libro y reflejan su conocimiento y experiencia en el manejo en el laboratorio de los diversos grupos de hongos en los cuales son especialistas. Se ha puesto atención especial a los procedimientos para elaborar los medios de cultivo con la finalidad de que sean fácilmente reproducibles, además se incluye la referencia bibliográfica en la cual se basa el protocolo.

Micelio de *Lentinula edodes* creciendo en cultivo líquido

MEDIO DE AGUA AGAR (AA)

Ingredientes

Agar bacteriológico	20 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- Incorporar el agar al agua y disolverlo de forma homogénea.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121°C (15 lb) durante 15 minutos.
- Enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.

Referencia

- Smith, D., A.H.S. Onions, 1994. The preservation and maintenance of living fungi, 2ª ed. CAB International, Wallingford.

Elaboró: Zelene Durán Barradas Revisó: Gloria Carrión
Instituto de Ecología, A. C.

MEDIO DE AVENA Y AGAR (AA)

Ingredientes

Avena	30 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- Remojar la avena en agua y poner la suspensión en agitación por 1 hora, posteriormente se cuele la avena y se adiciona el agar; por último, aforar a 1000 mL.
- Esterilizar a 121°C (15 lb) durante 20 min.
- Enfriar a 45 °C, entonces vaciar en cajas de Petri y dejar solidificar.

Referencia

- Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Tenover (eds.), 1999. Manual of clinical microbiology, 7th ed., ASM Press, Washington, DC.

Elaboró: Zelene Durán Barradas Revisó: Gloria Carrión
Instituto de Ecología, A. C.

MEDIO DE CARBOXIMETILCELULOSA Y AGAR (CMCA)

Ingredientes

Carboximetilcelulosa	100 g
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1.0 g
KCl	0.2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- Se mezclan todos los ingredientes y se ponen a calentar lentamente hasta alcanzar la ebullición. Hervir un minuto.
- Esterilizar a 121 °C (15 lb) durante 20 min.
- Enfriar a 45 °C y entonces colocar en cajas de Petri, permitiendo su solidificación.

Referencia

- Atlas, R.M., 2004. *Handbook of microbiological media*, 3rd. ed. CRC Press, Boca Raton.

Elaboró: Dulce Salmones Revisó: Gabriela Heredia
Instituto de Ecología, A. C.

MEDIO DE CZAPEK-DOX

Ingredientes

NaNO_3	2.0 g
KCl	0.5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g
K_2HPO_4	1.0 g
FeSO_4	0.01 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

Este medio microbiológico de uso común se puede preparar fácilmente a partir de medio comercial (46 g L⁻¹), como indica el etiquetado del envase. De lo contrario, seguir el siguiente procedimiento.

- Incorporar todos los ingredientes y disolverlos de forma homogénea.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lbs durante 15 minutos).
- Enfriar a 45° C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.

El pH debe quedar en 7.3. Si se requiere acidificar el medio, prepararlo como ya fue descrito y adicionar 10 mL de ácido láctico al 10 % por cada litro de medio preparado. Bajo estas condiciones, el pH debe bajar a 3.5. Existe otra variante llamada agar Czapek-extracto de levadura (CYA), la cual se prepara con todos los ingredientes enlistados previamente más extracto de levadura.

Referencia

- Eaton, A.D., E.W. Rice, R.B. Baird, 2012. Standard methods for the microbiological examination of water and wastewater. 22nd. ed. American Public Health Association, Washington.

Elaboró: Dulce Salmones Revisó: Gabriela Heredia
Instituto de Ecología, A. C.

MEDIO DE DICLORAN-ROSA DE BENGALA-CLORAFENICOL Y AGAR (DRBC)

Ingredientes

Rosa de Bengala	0.05 g
Glucosa	10.0 g
Peptona bacteriológica	5.0 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.5 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Dicloran (2,6 dicloro-4-nitroanilina)	0.002 g
Clorafenicol	0.1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Este medio microbiológico se puede preparar a partir de medio comercial (32 g L⁻¹), como indica el etiquetado del envase. De lo contrario, prepararlo de la siguiente manera:

Procedimiento

- Se mezclan todos los ingredientes y se ponen a calentar lentamente hasta alcanzar la ebullición. Hervir un minuto.
- Esterilizar a 121 °C (15 lb) durante 20 min.
- Enfriar a 45 °C y entonces colocar en cajas de Petri, permitiendo su solidificación.

Referencia

- Koburger, J.A., 1972. Fungi in foods: effect of plating medium pH on counts. J. Milk Food Technol. 35:659-660.

Elaboró: Dulce Salmones Revisó: Gabriela Heredia
Instituto de Ecología, A. C.

MEDIO DE EXTRACTO DE COMPOST Y AGAR (CEA)

Ingredientes

Semilla de trigo	400 g
Compost fresco	400 g
Glucosa	10 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento**A. Preparación del extracto de compost**

- Colocar 1.2 kg de compost en un recipiente metálico, agregar 4 L de agua destilada y colocar el recipiente a fuego lento. Mezclar bien y hervir durante 20 minutos
- Dejar enfriar; filtrar con una tela y recuperar el filtrado. Esto rinde para aproximadamente 2 L de extracto.
- Esterilizar a 121 °C (15 lb) durante 30 min. Dejar enfriar.
- Llenar recipientes a ¾ partes de su capacidad con el extracto obtenido. Colocar las muestras en congelación a -20 °C.

B. Preparación del medio de cultivo

- Descongelar los recipientes que contienen el extracto de compost sumergiéndolos en baño maría.
- Medir en una probeta 800 mL de extracto de compost y agregarle 200 mL de agua destilada.
- Colocar en un matraz y agregar 10 g de glucosa y 15 g de agar.
- Mezclar bien y calentar en baño maría moviendo frecuentemente durante 15 a 20 minutos hasta fundir el agar.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lb) durante 30 minutos.
- Enfriar a 45° C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.

Referencia

- Koburger, J.A., 1972. Fungi in foods: effect of plating medium pH on counts. J. Milk Food Technol. 35:659-660.

Elaboró: Dulce Salmones Revisó: Gerardo Mata
Instituto de Ecología, A. C.

MEDIO DE EXTRACTO DE MALTA Y AGAR (EMA)

Ingredientes

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Este medio microbiológico de uso común se puede preparar fácilmente a partir de medio comercial (48 g L⁻¹), como indica el etiquetado del envase. De lo contrario, seguir el siguiente procedimiento:

Procedimiento

- Incorporar todos los ingredientes y disolver de forma homogénea.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lb) durante 15 minutos.
- Enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.

Referencia

- Oxoid, 1982. The Oxoid manual of culture media ingredients and other laboratory services. Oxide Limited, Basingstoke, Hampshire.

Elaboró: Faustino Hernández Revisó: Jesús Pérez Moreno
Colegio de Postgraduados

MEDIO DE EXTRACTO DE MALTA, LEVADURA Y AGAR
(SUPLEMENTADO CON DERIVADOS SOLUBLES DE LIGNINA)**Ingredientes**

Indulina alcalina AT	3 g
Extracto de malta	10 g
Extracto de levadura	2 g
Agar bacteriológico	15 g
Agua destilada	~1500 mL

Procedimiento**A. Preparación de la solución de indulina**

- Mezclar 3 g de indulina alcalina AT con 800 mL de agua, calentando con agitación constante hasta la disolución de los ingredientes. Dejar en ebullición durante 5 minutos.
- Dejar enfriar, filtrar la solución con papel filtro Whatman No. 1 y recuperar el filtrado.
- El filtrado se ajusta a un volumen de 1 L agregando agua destilada.
- Medir la concentración de fenoles en la solución de indulina (Box, 1983). Colocar en una cubeta de espectrofotómetro los siguientes reactivos: 2.4 mL de agua destilada, 0.375 mL de CaCO₃ 10 % p/v, 0.125 mL reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma) y 0.1 mL de la solución de indulina. Incubar 1 h a temperatura ambiente, en la oscuridad. Medir en espectrofotómetro a 750 nm. Los resultados se expresan en mMoles.L⁻¹.
- Conocida la concentración de fenoles en la solución de indulina, ajustarla a una concentración final de 2 mMoles L⁻¹, añadiendo el agua destilada necesaria.

B. Preparación de la solución de indulina

- Colocar en un matraz los extractos de malta, levadura y el agar bacteriológico. Agregar 1 L de la solución de indulina preparada en el paso anterior.
- Calentar hasta la disolución de todos los ingredientes. Dejar en ebullición 5 min.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lb) durante 20 minutos.
- Enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.

Referencia

- Mata, G., J.M. Savoie, P. Delpech, 1997. Variability in laccase production by mycelia of *Lentinula boryana* and *Lentinula edodes* in presence of soluble lignin derivatives in solid media. Material und Organismen 31: 109-122.

Elaboró: Dulce Salmones Revisó: Gerardo Mata
Instituto de Ecología, A. C.

MEDIO DE EXTRACTO DE OYAMEL MODIFICADO Y AGAR (AEO)

Ingredientes

Extracto de oyamel (<i>Abies sp.</i>)	50 mL
Glucosa	2 g
Agar	25 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- Para preparar el extracto de las acículas de oyamel, previamente se secan en estufa de aire forzado a 50 °C, se trituran en un molinillo eléctrico y se tamizan con un colador de 1 mm de diámetro de poro.
- Al tamizado de acículas resultante se le añade agua, en la proporción de 1:10 (p:v), se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 min, se filtra y se utiliza la cantidad necesaria.
- Se incorporan los demás ingredientes y se disuelve de forma homogénea.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lb) durante 15 min.
- Enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.

Referencia

- Romero, D.D., H.V. Rivera, B.R. Reyes, J.A. Reyes, A.M. Campos, 2013. Aislamiento y purificación del hongo ectomicorrízico *Helvella lacunosa* en diferentes medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16: 51-59.

Elaboró: Faustino Hernández Revisó: Jesús Pérez Moreno
Colegio de Postgraduados

MEDIO DE EXTRACTO DE PINO MODIFICADO Y AGAR (AEP)

Ingredientes

Extracto de pino (<i>Pinus sp.</i>)	50 mL
Glucosa	2 g
Agar	25 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- Para preparar el extracto de las acículas de pino, previamente se secan en estufa de aire forzado a 50 °C, se trituran en un molinillo eléctrico y se tamizan con un colador de 1 mm de diámetro de poro. Al tamizado de acículas resultante se le añade agua, en la proporción de 1:10 (p:v), se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, se filtra y se utiliza la cantidad necesaria.
- Se incorporan los demás ingredientes y se disuelve de forma homogénea.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lb) durante 15 min.
- Enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.

Referencia

- Romero, D.D., H.V. Rivera, B.R. Reyes, J.A. Reyes, A.M. Campos, 2013. Aislamiento y purificación del hongo ectomicorrízico *Helvella lacunosa* en diferentes medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16: 51-59.

Elaboró: Faustino Hernández Revisó: Jesús Pérez Moreno
Colegio de Postgraduados

MEDIO DE EXTRACTO DE TRIGO, PAJA, MALTA Y AGAR (ETA)

Ingredientes

Semilla de trigo	400 g
Paja de trigo o cebada	100 g
Dextrosa	10 g
Extracto de malta	18.6 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- Las semillas de trigo se hierven en un L de agua y se deja consumir hasta tener 500 mL. Lo mismo se hace con la paja.
- Filtrar ambos extractos y se mezclan en una probeta, aforando con agua destilada a 1000 mL. A este extracto se le agregan los demás ingredientes.
- Calentar la suspensión hasta ebullición, dejando hervir un minuto.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lb) durante 20 minutos.
- Enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.

Referencia

- Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto, L. Guzmán Dávalos, 2013. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

Elaboró: Dulce Salmones Revisó: Gerardo Mata
Instituto de Ecología, A.C.

MEDIO DE GLUCOSA, PEPTONA, EXTRACTO DE LEVADURA Y AGAR (DPYA)

Ingredientes

Glucosa	5.0 g
Extracto de levadura	2.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
Peptona	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
NH ₄ NO ₃	1.0 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.01 g
Oxgall (bilis de buey)	5.0 g
C ₃ H ₅ NaO ₂	1.0 g
Estreptomicina	30 mg
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Este medio microbiológico se puede preparar a partir de medio comercial (65 g L⁻¹), como indica el etiquetado del envase. De lo contrario, prepararlo de la siguiente manera:

Procedimiento

- Disolver todos los componentes en agua destilada y calentar suavemente hasta que la mezcla se presente homogénea.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave por 15 min a 121 °C/15 lb.
- Enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri, hasta su solidificación total.

Referencia

- Booth, C., 1971. Fungal culture media. In: Brooth C. (ed.), Methods in microbiology. Academic Press, Londres.

Elaboró: Dulce Salmones Revisó: Rosario Medel
Instituto de Ecología, A.C. y Universidad Veracruzana

MEDIO DE HARINA DE AVENA Y AGAR (OMA)

Ingredientes

Harina de avena	30 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- Hervir lentamente la harina de avena en el litro de agua destilada durante una hora.
 - Filtrar y aforar a 1 L.
 - Añadir las sales y calentar hasta disolver todos los ingredientes en la suspensión.
 - Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C por 15 min.
5. Enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar. z

Referencia

- Atlas, R.M., 1995. Handbook of microbiological media for the examination of food. CRC Press, Boca Raton.

Elaboró: Dulce Salmones **Revisó:** Rosario Medel
Instituto de Ecología, A.C. y Universidad Veracruzana

MEDIO DE HARINA DE MAÍZ Y AGAR (CMA)

Ingredientes

Harina de maíz	30 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Este medio microbiológico de uso común se puede preparar fácilmente a partir de medio comercial (17 g L⁻¹), como indica el etiquetado del envase. De lo contrario, seguir el siguiente procedimiento:

Procedimiento

- Se colocan todos los ingredientes en un matraz Erlenmeyer y se calientan lentamente hasta alcanzar la ebullición, dejando hervir un minuto.
- Esterilizar a 121 °C (15 lb) durante 20 min.
- Enfriar a 45 °C, entonces vaciar en cajas de Petri y dejar solidificar.

Referencia

- McGinnis, M.R., 1980. Laboratory handbook of medical mycology. Academic Press, Nueva York.

Elaboró: Zelene Durán Barradas **Revisó:** Gloria Carrión
Instituto de Ecología, A.C.

MEDIO DE JUGO DE VERDURAS V8 AGAR (V8)

Ingredientes

Jugo de verduras V8	200 mL
Carbonato de Calcio	3 g
Agar bacteriológico	20 g
Agua destilada	800 mL

Procedimiento

- Se filtra el jugo V8 con un embudo con una gasa hasta recolectar 200 mL, agregándolo a 800 mL de agua destilada tibia.
- Agregar el agar y seguir agitando la mezcla. Calentar a ebullición por un minuto.
- Si fuera necesario, ajustar a pH 6 con una solución de NaOH.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C durante 20 min.
- Enfriar a 45 °C, entonces vaciar en cajas de Petri y dejar solidificar.

Para el aislamiento de Actinomycetes adicionar el carbonato de calcio (CaCO_3) y ajustar el pH a 7.3, empleando una solución de hidróxido de potasio (KOH).

Referencia

- Dhingra, O.D., J.B. Sinclair; 1985. Basic plant pathology methods. CRC Press, Boca Raton.

Elaboró: Zelene Durán Barradas Revisó: Gloria Carrión
Instituto de Ecología, A.C.

MEDIO DE MELIN NORKRANS MODIFICADO (MNM)

Ingredientes 250 mL

CaCl_2	5 g
NaCl	2.5 g
KH_2PO_4	50 g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	25 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15 g
Sequestrene (Fe quelatado)	2.5 g
Tiamina	1.0 mL (solución estéril 0.1 g/L)
Glucosa (Dextrosa)	10 g
Extracto de Malta	3.0 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- Se agregan los seis primeros ingredientes enlistados en un vaso de precipitado con 250 mL de agua destilada y se mezclan en un agitador hasta que la solución esté homogénea.
- Se añade la tiamina.
- Se añade la glucosa y, posteriormente, el extracto de malta, siempre manteniendo la disolución en el agitador.
- El pH de la disolución debe ser 5.8, si se requiere ajustarse debe usarse una solución ácida (HCl a 10 %) o básica (NaOH a 10 %), según sea el caso.
- Se añade el agua destilada, se afora a 1 L y se agita nuevamente.
- Por último, se añade el agar y la disolución obtenida se vierte en un matraz Erlenmeyer y se agita vigorosamente.
- La esterilización se realiza en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lb durante 15 min).
- Enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.

Referencia

- Marx, D.H., 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. II. Production, identification, and biological activity of antibiotics produced by *Leucopaxillus cerealis* var. *piceina*. Phytopathology 59: 411-417.

Elaboró: Faustino Hernández Revisó: Jesús Pérez Moreno
Colegio de Postgraduados

MEDIO DE PACHLEWSKI (PACH)

Ingredientes mg L⁻¹

C ₄ H ₁₂ N ₂ O ₆ (Tartrato de amonio)	500 mg
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	500 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	50 mg
Fe EDTA	20 mg
H ₃ BO ₃	2.8 mg
MnCl ₂ ·2H ₂ O	3.0 mg
ZnSO ₄ ·H ₂ O	0.63 mg
Na ₂ Mo ₄ ·2H ₂ O	0.27 mg
Tiamina HCL	0.1 mL
Maltosa	5 g
Glucosa	20 g
Agar (intervalo)	8.0-15.0 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- Se agrega en un vaso de precipitado o matraz 1000 mL de agua y los nueve primeros ingredientes en el orden que aparecen en el cuadro de composición, y se diluyen con un agitador para que se mezclen de forma homogénea.
- Se añade la tiamina.
- Se añade la maltosa y la glucosa, siempre manteniendo la disolución en el agitador.
- Se mide el pH de la disolución, debe ser 5.4, y si se requiere ajustar se usa una solución ácida (HCl a 10%) o básica (NaOH a 10%), según sea el caso.
- Se añade el agar y la disolución obtenida se vierte en un matraz Erlenmeyer y se agita vigorosamente.
- La esterilización se realiza en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lb) durante 15 min.
- El medio de cultivo se deja enfriar a 45 °C y se vacía en cajas de Petri estériles en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.

Referencia

- Pachlewski R., J. Pachlewski, 1974. Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of pine (*Pinus sylvestris* L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure cultures on agar. Forest Research Institute, Warsaw.

Elaboró: Faustino Hernández Revisó: Jesús Pérez Moreno
Colegio de Postgraduados

MEDIO DE PAJA DE TRIGO Y AGAR (PTA)

Ingredientes

* Paja de trigo	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- La paja de trigo se fragmenta manualmente o con ayuda de una picadora de forraje. Después se seca en estufa de aire forzado a 50 °C y posteriormente se tritura en un molinillo eléctrico, tamizando el material con un colador de 1 mm de diámetro de poro.
 - Disolver la paja de trigo en 1 L de agua destilada.
 - Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lb) durante 20 min.
 - Dejar reposar en oscuridad durante un día.
 - Agregar el agar y esterilizar por 2ª vez, a 121 °C (15 lb) durante 20 min.
 - Enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.
- * Se puede sustituir por paja de cebada.

Referencia

No publicado previamente.

Elaboró: Dulce Salmenes Revisó: Gerardo Mata
Instituto de Ecología, A.C.

MEDIO DE PAPA, DEXTROSA Y AGAR (PDA)	
Ingredientes	
Papa sin pelar	200 g
Dextrosa	20 g
Agar	16 g
Agua destilada	1000 mL
Procedimiento	
<p>Este medio microbiológico de uso común se puede preparar fácilmente a partir de medio comercial (39 g L⁻¹), como indica el etiquetado del envase. De lo contrario, prepararlo de la siguiente manera:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lavar las papas, cortarlas y hervirlas en un litro de agua destilada por 20 min. • Colar y disolver en el extracto líquido de papa, la dextrosa y el agar. • La esterilización se realiza en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lb) durante 15 min. • El medio de cultivo se deja enfriar a 45 °C y se vacía en cajas de Petri estériles en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar. 	
Referencia	
<ul style="list-style-type: none"> • Rebell, G., D. Taplin, 1970. Dermatophytes: their recognition and identification. University of Miami Press, Coral Gables. 	

Elaboró: Faustino Hernández **Revisó:** Jesús Pérez Moreno
Colegio de Postgraduados

MEDIO DE PAPA, ZANAHORIA Y AGAR (PCA)	
Ingredientes	
Papa	20 g
Zanahoria	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL
Procedimiento	
<ul style="list-style-type: none"> • Cortar en trozos la papa y la zanahoria y colocarlos en un matraz Erlenmeyer con el litro de agua y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min. • Filtrar el agua de cocción y aforar a 1 L • Agregar el agar y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min • Dejar enfriar, vaciar en cajas Petri y dejar solidificar. 	
Referencia	
<ul style="list-style-type: none"> • Langeron, M., R. Vanbreuseghem, 1952. Précis de mycologie: mycologie générale, mycologie humaine, et animale techniques. Masson, Paris. 	

Elaboró: Zelene Durán Barradas **Revisó:** Gloria Carrión
Instituto de Ecología, A.C.

MEDIO DE PULPA DE CAFÉ Y AGAR (PCA)

Ingredientes

Pulpa de café	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- La pulpa de café se seca en estufa de aire forzado a 50 °C y posteriormente se tritura en un molinillo eléctrico, tamizando el material con un colador de 1 mm de diámetro de poro.
- Disolver la pulpa en 1 L de agua destilada.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C (15 lb) durante 20 min.
- Dejar reposar en oscuridad durante un día.
- Agregar el agar y esterilizar por 2ª vez, a 121 °C (15 lb) durante 20 min.
- Enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri estériles y en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar.

Referencia

No publicado previamente.

Elaboró: Dulce Salmones **Revisó:** Gerardo Mata
Instituto de Ecología, A.C.

MEDIO DE SPEZIELLER NÄHRSTOFFARMER AGAR (SNA) AGAR ESPECIAL POBRE EN NUTRIENTES

Ingredientes

KH ₂ PO ₄	1.0 g
KNO ₃	1.0 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.5 g
KCl	0.5 g
Glucosa	0.2 g
Sacarosa	0.2 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 mL

Procedimiento

- Colocar todos los ingredientes en un matraz y agitar hasta que presente una forma homogénea.
- Esterilizar en olla de presión o autoclave a 121 °C durante 15 min.
- Dejar enfriar a 45 °C y vaciar en cajas de Petri, permitiendo su solidificación.

Referencia

- Leslie J.F., B.A. Summerell, 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing, Ames.

Elaboró: Zelene Durán Barradas **Revisó:** Gloria Carrión
Instituto de Ecología, A.C.

RECOMENDACIONES GENERALES

- Durante la preparación de los medios de cultivo se deben agitar adecuadamente los ingredientes para una correcta disolución de la mezcla.
- El tiempo de esterilización debe contarse a partir de que el equipo alcanza los 121 °C.
- Al término de la esterilización se debe evitar que disminuya la presión de la olla o autoclave bruscamente, ya que esto puede causar que el medio de cultivo pueda derramarse e incluso romperse el matraz o recipiente utilizado.
- La tapa de algodón que se utiliza para el matraz debe cubrirse con papel aluminio antes de esterilizar para evitar que se moje.
- En caso de utilizar tubos con tapón de algodón, éstos deben taparse con papel aluminio antes de esterilizarse para evitar que se mojen.
- Cuando se quiere preparar el medio de cultivo en tubos o frascos con tapón de rosca, se van llenando los recipientes hasta una tercera parte de su capacidad, con ayuda de un embudo adaptado con un pedazo de manguera de goma en el vástago y unas pinzas que ayuden a controlar el flujo y evitar ensuciar la boca de frasco o tubo. Cuando se realiza este proceso, debe asegurarse que el medio de cultivo se mantenga líquido, por lo que se recomienda mantenerlo caliente en un baño María. Los recipientes se cierran suavemente (sin ajustar completamente) y se esterilizan a 121 °C durante 15 min. Concluido el tiempo de esterilización los tubos se sacan, terminando de cerrar herméticamente la tapa y se colocan de manera inclinada hasta que solidifique el medio de cultivo.
- Algunos antibióticos deben añadirse al medio una vez esterilizado y a la temperatura adecuada, para no ser desactivados por las altas temperaturas de la esterilización.
- Al momento de la colocación del medio de cultivo en las cajas de Petri, primero se flamean las bocas de los frascos, y posteriormente se vierte el medio en el centro de la caja, evitando dejar residuos en las paredes. Se debe levantar la tapa de las cajas sólo lo suficiente para introducir la boca del recipiente, reduciendo así el riesgo de contaminación. Se distribuye a razón de unos 15 a 20 mL de medio en las cajas de Petri de 90 mm de diámetro. Las cajas con medio no deben moverse hasta que solidifique el agar.
- Si no van a ser utilizados ese mismo día, las cajas y tubos preparados se deben guardar en refrigeración (4 °C), previamente protegidos por una cubierta plástica sellada, esto para evitar su contaminación por otros microorganismos o incluso, ácaros.

GLOSARIO

Actividad metabólica. Conjunto de transformaciones físicas, químicas y biológicas que realizan los seres vivos para fabricar y/u obtener los nutrientes indispensables para producir la energía necesaria para realizar sus funciones vitales.

Aerobios obligados. Organismos que requieren oxígeno para llevar a cabo la respiración.

Aerobios facultativos. Organismos que pueden crecer con o sin oxígeno, porque pueden obtener la energía a través de procesos anaerobios, como la fermentación.

Agar. Material gelatinoso obtenido de algas marinas utilizado para solidificar medios de cultivo.

Agregaciones hifales. Masa de micelio que forma protuberancias en la superficie del medio de cultivo o sustrato.

Anamorfo. Etapa reproductiva asexual de los hongos que produce esporas por mitosis y que se presenta especialmente en los Ascomicetos y Basidiomicetos.

Agente de control biológico. Aquel organismo que es capaz de usar alguna fase de otro organismo para su reproducción y con esto reducir su densidad poblacional.

Agricultura convencional. Es un sistema intensivo y extensivo del uso del suelo para la producción de alimentos, con alto consumo de energía debido a la introducción de tecnología y la aplicación de aportes químicos (fertilizantes y pesticidas). Por lo tanto, es un sistema abierto sin diversidad y motivada por patrones de consumo (rendimientos cuantitativos).

Agricultura ecológica. Organiza el proceso de producción de plantas y animales de tal manera que no dilapide los recursos naturales e incluso mejore el medio ambiente, en busca de alternativas ecológicas a las prácticas de la agricultura convencional. Trata de sustentar el desarrollo de sus técnicas en mayor o menor medida en la ciencia ecológica.

Agricultura tradicional. Conjunto de prácticas agrícolas y pecuarias cuyo conocimiento se generó de manera empírica por generaciones para la producción de alimentos diversos de manera sostenible, que abastecen a población local con autosuficiencia y gran arraigo cultural. Generalmente son sistemas cerrados donde los nutrientes circulan en espacio relativamente pequeño y de bajo consumo energético.

Apresorios. Estructuras abultadas formadas a partir del tubo germinativo del hongo y laterales al micelio que le sirven para adherirse a la superficie del hospedero o sustrato.

Arbúsculo. Estructura altamente ramificada producida por los hongos micorrízicos arbusculares dentro de

la célula de su huésped. Los arbúsculos son el elemento clave de los intercambios simbióticos de nutrientes entre la planta y el hongo.

Ascomicetos. Hongos que presentan micelio tabicado y almacenan sus estructuras reproductoras (ascosporas) en unas estructuras llamadas ascas.

Axénico. Cultivo puro en que se desarrolla un solo tipo de organismo, no contaminado ni asociado con otro tipo de forma viviente.

Azul tripano. Colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas. Tiñe las paredes celulares de los hongos.

Basidioma. Cuerpo fructífero de los basidiomicetos, es la estructura especializada en donde se producen las esporas, estructuras indispensables para la reproducción sexual del hongo. También llamados basidiocarpos.

Basidiomicetos. Hongos que se caracterizan por almacenar sus estructuras reproductoras sexuales (basidiosporas) dentro de unas estructuras llamadas basidios.

Carboxilación. Reacción química que produce un grupo carboxilo (COOH) a un compuesto o sustrato, al tratarlo con dióxido de carbono.

Celulolíticos. Organismos capaces de degradar enzimáticamente la celulosa, polisacárido vegetal más abundante en la naturaleza.

Cepa. Es el micelio de un hongo desarrollado en una caja de Petri o un tubo de ensayo, es decir, es un conjunto de hifas crecidas en un medio de cultivo de forma individual, libre de otros microorganismos.

Cámara de Neubauer o hemocitómetro. Instrumento originalmente utilizado para contar células sanguíneas; se usa también para hacer conteos de esporas en volúmenes conocidos, que permiten conocer el número de esporas por mL en una suspensión.

Cepellon. Tierra que se deja adherida a las raíces de los vegetales para trasplantarlos.

Clamidosporas. Estructuras de resistencia formadas por el engrosamiento de las paredes de las hifas.

Clorosis. Condición anormal en el forraje de las plantas que provoca pérdida del color verde.

Colonización. Establecimiento de una comunidad de microorganismos en un sitio específico o ecosistema.

Compuestos xenobióticos. Sustancias que no se encuentran de forma natural en los organismos.

Conidios. Esporas de origen asexual, no móviles, formadas en el ápice o a los lados de una hifa o célula esporógena especializada. También llamados conidiósporas.

Consortio. Dos o más miembros de un ensamble natural en donde cada organismo se beneficia de las actividades de los demás. Esta comunidad logra realizar procesos que de manera individual no podrían llevarlo a cabo cada miembro.

Crioprotector. Sustancia utilizada para proteger las células del proceso de congelamiento. Su función es extraer o desplazar el agua contenida en las células para evitar la formación de cristales de hielo.

Cromógenos. Microorganismos, generalmente bacterias, que pueden secretar material colorante o producir coloraciones.

Dicariótico. Micelio que contiene dos núcleos en cada célula.

Disacáridos. Azúcares que se forman por la unión de dos monosacáridos, mediante un enlace glucosídico y la liberación de una molécula de agua.

Dormancia. Período en el ciclo biológico de un organismo en el que el crecimiento, desarrollo y actividad física se suspenden temporalmente.

Endémica. Término biológico que indica la distribución única y restringida de un taxón o especie en un ambiente geográfico definido. Es decir, no se encuentra de forma natural en otra parte del mundo.

Endomicorriza. Asociación micorrízica en la que hay una penetración intracelular del hongo en las células vivas de la epidermis y corteza de la raíz de la planta hospedante, así como en la parte exterior en el suelo circundante.

Entomopatógenos. Aquellos hongos que se caracterizan por parasitar o causar epizootias en insectos.

Enzima. Es una molécula orgánica producida por las células u obtenida por los alimentos, que actúa como reguladora de las reacciones químicas en los seres vivos, esto es, aceleran la velocidad la velocidad de reacción.

Epizootias. Término usado en veterinaria para hacer referencia a una enfermedad o padecimiento contagioso que afecta simultáneamente a varias especies de animales durante un periodo transitorio. En control biológico se refiere a una enfermedad causada por enemigos naturales, como los hongos entomopatógenos en poblaciones de insectos.

Esclerocios. Estructuras de resistencia producidas por algunos hongos, compuestas por micelio compacto, que a menudo está muy melanizado (con pigmentos oscuros, negros o cafés). La función de estas estructuras es acumular reservas y sobrevivir a condiciones adversas, para posteriormente propagarse cuando exista un entorno adecuado.

Espora. Unidad reproductiva de los hongos, constituida por una o varias células; es una estructura análoga a la semilla de las plantas verdes.

Esporangio. Es una estructura de las plantas, algas y hongos que producen y contienen las esporas.

Esporada. Conjunto de esporas de un hongo que se desprenden del himenio de un esporoma o cuerpo fructífero; es una característica que se usa en la identificación de los hongos macroscópicos. Se produce colocando la parte que produce esporas (el himenio) sobre una hoja de papel, plástico o vidrio, para determinar su color.

Esporóforos. Estructuras en donde se forma las esporas. También llamados esporomas.

Esquizolisis. Proceso de separación o desprendimiento de un septo con la célula contigua.

Estomas. Aberturas o poros microscópicos que se encuentran en la superficie de las hojas de las plantas. Sus funciones fisiológicas principales son: intercambio gaseoso y regulación del movimiento del agua a través de la transpiración.

Eucariota. Organismo que posee núcleos verdaderos rodeados de una doble membrana.

Fitopatógeno. Organismo que ocasiona enfermedad a una planta.

Fototropismo. Capacidad de un organismo a responder a un estímulo luminoso.

Haustorios. Estructuras desarrolladas desde una hifa infectante y que una vez dentro de la célula del hospedero funcionan para absorber los nutrientes y alimentar al hongo. Pueden ser esféricas, claviformes, alargadas, ramificadas.

Herbario. Del latín herbarium, es una colección científica de partes de plantas deshidratadas. En algunos herbarios se consideran secciones en que se preservan otros grupos de organismos, como los hongos.

Hialino. Del griego hyalos= cristal. Transparente o traslúcido. En biología se aplica como adjetivo para estructuras que presentan este aspecto.

Hifa. Filamento longitudinal, frecuentemente ramificado y tubular que constituye el cuerpo vegetativo del hongo.

Hilio. Del latín hilum. Pequeña cicatriz que queda en lo que fue la unión del óvulo al funículo. Actúa como válvula higroscópica, permitiendo el acceso de aire a la semilla.

Histoplasmosis. Enfermedad infecciosa causada por la inhalación de esporas del hongo *Histoplasma capsulatum*.

Hospedero u hospedante. En la relación parásito-hospedero, así se le llama al organismo que en condiciones naturales soporta en su interior o en su superficie a un agente infeccioso.

Huésped. Organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí, ya sea un parásito, un comensal o un mutualista.

Implante. Fragmento de agar con micelio que se utiliza como inóculo en los ensayos in vitro de crecimiento micelial, así como en la resiembra o aislamiento de cepas. La forma puede ser circular o cuadrada y el tamaño puede variar en mm de diámetro o en cm².

In vitro. (Latín: dentro del vidrio), se refiere a un experimento biológico realizado en el laboratorio.

In situ. (Latín: en el sitio), en el laboratorio se refiere a condiciones artificiales y ambiente controlado.

Inóculo. Reproducción masiva de cualquier parte de un microorganismo en condiciones adecuadas para favorecer su crecimiento.

Lactoglicerol. Solución de agua y glicerol al 50% (v/v) para el almacenamiento de la raíz teñida.

Levaduriformes. Crecimiento en forma unicelular globosa, alargada o filamentosa, como las levaduras.

Loci (plural del latín locus= punto). Posiciones específicas en que se encuentran los genes u otras secuencias de ADN en el cromosoma.

Manto fúngico. Capas de hifas de hongos que cubren la superficie de la raíz. Estas hifas forman capas delgadas o gruesas, sueltas o compactas con una variedad de colores y texturas superficiales dependiendo del hongo. Es una de las estructuras características de un tipo de micorriza, llamado ectomicorriza.

Mesofauna. Invertebrados de 0.1 y 2.0 mm de tamaño que viven en el suelo o en las capas de hojarasca.

Micelio. Masa algodonosa formada por un conjunto de hifas.

Micófagos. Organismos que se alimentan de hongos.

Micorriza. Asociación simbiótica entre un hongo y las raíces de plantas vasculares. Existen endomicorizas y ectomicorizas.

Micoparásitos. Aquellos hongos que tienen la capacidad de usar como sustrato para su crecimiento el micelio o alguna estructura de otros hongos.

Mini micorizotrón. Son cajas con paredes de cristal que permiten estudiar el desarrollo de las raíces. Han sido llamados "rizotrones". Etimológicamente del griego "rhizos", que significa raíz y "tron", que significa dispositivo para estudiar.

Moléculas bioactivas. Estructuras químicas de origen biótico con capacidad de producir alteraciones en la fisiología de los organismos.

Monosacáridos. Azúcares que no pueden desdoblarse en compuestos más simples. La glucosa es uno de los monosacáridos más importantes.

Monospórico. Micelio que proviene de la germinación de una sola espora.

Morfotipos. Describe a un género que contiene solo una especie conocida. El término proviene del idioma griego prefijo "μovo-" = "solo, único" y del latín "species" = "clase" o "tipo".

Mutaciones. Cambios en la secuencia del ácido desoxirribonucleico de la célula que producen modificaciones en sus características. No todas las mutaciones pueden ser heredadas a su descendencia.

Nematófitos. Se les denomina así a los hongos que pueden crecer sobre diversos nemátodos. Aunque hay muchas especies de nematófitos, los más estudiados suelen ser los nemátodos fitófagos que causan diversas afectaciones a las plantas de interés económico.

Nutrición heterótrofa. Se presenta en organismos que no pueden producir su propio alimento, por lo que lo toman su energía de compuestos orgánicos de otros seres vivos o muertos.

Oidios. Células hifales pequeñas, libres, que tienen pared delgada. Pueden considerarse esporas asexuales en algunos grupos de hongos, como el género *Coprinus*. También llamados oidiosporas.

Oligotrófico. Ambientes que presentan una baja concentración de nutrientes.

Parasitismo. Interacción que se presenta cuando un individuo vive a expensas de otro al que perjudica.

Parásito o patógeno. Organismo que para desarrollarse se alimenta de otros organismos vivos, sean plantas, animales u hongos, ocasionando algún daño o una enfermedad.

Potencial de hidrógeno. Conocido como pH, se refiere a la concentración de iones hidrógeno en un medio de cultivo o sustrato, es decir, se refiere al carácter iónico de dicho medio e influye directamente sobre la actividad enzimática del hongo y como consecuencia, en su metabolismo.

Porcentaje de colonización. Relación de raíces colonizadas por hongos endomicorrícicos arbusculares entre el número de raíces interceptadas sin presencia de estructuras colonizantes observadas en una cuadrícula, multiplicado por 100.

Prácticas curatoriales. Procesos a los que se somete un organismo desde su colecta hasta su incorporación a una colección científica. Así también, los procesos para su preservación permanente.

Propágulo. Estructura de un organismo, producido sexual o asexualmente, capaz de desarrollarse de manera separada para dar lugar a un nuevo organismo

Primordios. Estado inmaduro de desarrollo de los esporóforos.

Queratinolíticos. Organismos capaces de metabolizar la queratina, una proteína presente en la capa externa de la epidermis de los vertebrados.

Quitinolíticos. Organismos que tienen la capacidad de degradar enzimáticamente la quitina, un polímero estructural de invertebrados y hongos.

Radícula. Parte del embrión de una planta que al desarrollarse da lugar a la raíz.

Red de Hartig. Es una red de hifas que se extiende entre las células epidérmicas o corticales de la raíz, sin penetrarlas. Esta red es el sitio de intercambio de nutrientes y agua entre el hongo y la planta hospedera. Es típica de las ectomicorrizas.

Red trófica. Cadenas alimentarias interrelacionadas en una comunidad biológica y es la manera en que la materia y energía fluye en el ecosistema.

Rizomorfos. Conjunto de hifas especializadas, compactas y agregadas orientadas paralelamente, con un aspecto macroscópico similar a las raíces de las plantas. Estos funcionan como conductos de transporte de agua y nutrientes y aumentan la superficie de contacto con el suelo a través de largas distancias.

Rizoplano. Área constituida por la superficie de las raíces de las plantas.

Rizosfera. Área circundante al sistema radicular de las plantas.

Saprótrofo o saprobio. Organismo que se alimenta de materia orgánica inerte.

Septo. Tabique o pared transversal que separa a las células formadoras de las hifas.

Setas. Nombre comercial de los hongos cultivados del género *Pleurotus* en México. Es una variación del término utilizado en España para designar a las especies comestibles.

Simbiosis. Interacción entre dos especies (plantas, animales, hongos), que proporcionan beneficios mutuos. Simbionte. Organismo que establece una simbiosis con otros organismos.

Sublimación. Cambio de la materia de estado sólido a gaseoso, sin pasar por estado líquido.

Suelo rizosférico. Es la parte del suelo inmediata a las raíces vivas y que está bajo la directa influencia de éstas.

Sustancias fungitásticas. Compuestos que impiden o inhiben la actividad vital de un hongo.

Tasa de crecimiento. Es un índice que expresa el incremento del micelio en relación con una unidad de tiempo. También llamada velocidad de crecimiento, es un parámetro que puede variar dependiendo de los factores bióticos y abióticos en que crece un hongo.

Tasa de evaporación. Cantidad de agua que se evapora en una superficie dada en un tiempo determinado. Depende de múltiples factores físicos de la materia y el ambiente.

Tasa de respiración. Relación entre el consumo de oxígeno o la producción de dióxido de carbono ocurridas durante las reacciones de respiración celular; a partir de la descomposición de las moléculas de los nutrientes para generar energía en forma de adenosín trifosfato (ATP).

Transaminación. Reacción química que permite el reacomodo de grupos amino entre aminoácidos.

Tween. Aditivo alimentario con numerosas aplicaciones. Compuesto tensoactivo no iónico que puede emulsionar y disolver grasas, utilizado como suplemento en la preparación de medios de cultivos.

Vermiculita. Mineral de la familia de la mica compuesto básicamente por silicatos de aluminio, magnesio y de hierro. Su forma natural es la de una mica de color pardo y estructura laminar, conteniendo agua ínter laminada. Se utiliza como sustrato para cultivos.

Vesículas. Abultamientos hifales intercalares (-o-) o terminales (-o) formadas en hifas internas dentro de la corteza de la raíz. Pueden formarse dentro o entre las células. Las vesículas acumulan lípidos y pueden desarrollar capas de paredes gruesas en las raíces más antiguas. La producción y estructura de las vesículas varía entre los diferentes géneros de hongos Glomeromycota. Son órganos de almacenamiento que también pueden funcionar como propágulos.

LECTURAS RECOMENDADAS

CAPÍTULO 1

Deacon, J.W., 2006. Fungal biology, 4th ed. Blackwell Po. Oxford.

Hawksworth, D.L., R. Lücking, 2017 Fungal diversity revised: 2.2 to 3.8 million species. In: Heitman, J., B.J. Howlett, P.W. Crous, E.H. Stukenbrock, T.Y. James, N.A.R. Gow (eds.), The fungal kingdom. American Society for Microbiology Press, Washington. Pp. 79-95.

Herrera, T., M. Ulloa, 1998. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada, 2ª. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Jenkins, D.H., 2007. The physiology of fungal nutrition. Cambridge University Press, Cambridge.

Ulloa, M., R.T. Hanlin, 2006. Nuevo diccionario ilustrado de micología. The American Phytopathological Society, St. Paul.

CAPÍTULO 2

Callac, P., 2007. El género *Agaricus*. In: Sánchez, J.E., D.J. Royle, H. Leal Lara (eds.), Cultivo, mercado-tecnia e inocuidad alimentaria de *Agaricus bisporus*. El Colegio de la Frontera Sur-Universidad Nacional Autónoma de México-Pennsylvania State University. Pp. 19-36.

Cepero de García, M.C., S. Restrepo Restrepo, A.E. Franco-Molano, M. Cárdena Toquica, N. Vargas Estupiñán, 2012. Biología de hongos. Universidad de Los Andes, Bogotá.

Chang, S.T., P.A. Miles, 1989. Edible mushroom and their cultivation. CRC Press, Boca Raton.

Chang, S.T., J.A. Buswell, P.A. Miles (eds.), 1993. Genetics and breeding of edible mushrooms. Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.

Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto, L. Guzmán Dávalos, 2013. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

Herrera, T., M. Ulloa, 1990. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México - Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Souza Dias, E., M. Rocha de Brito, 2017. Mushrooms: Biology and life cycle. In: Cunha Zied, D., A. Pardo-Giménez (eds.), Edible and medicinal mushrooms. Technology and applications. Willey Blackwell, Oxford. Pp. 15-33.

Stamets, P., J.S. Chilton, 1983. The mushroom cultivator. A practical guide to growing mushrooms at home. Agarikon Press, Olympia.

CAPÍTULO 3

Carreño Ruíz, S.D., S. Cappello García, R. Gaitán-Hernández, J. Cifuentes Blanco, E. Rosique Gil, 2014. Crecimiento de tres hongos comestibles tropicales en medio de cultivo y residuos agrícolas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 5: 1447-1458.

Gaitán-Hernández, R., I. Báez Rodríguez, 2008. Crecimiento micelial de cepas silvestres nativas de *Lepista nuda*, en medios de cultivo con diferentes suplementos orgánicos. Revista Mexicana de Micología 26: 41-49.

Gaitán-Hernández, R., D. Salmones, 2015. Uso de residuos lignocelulósicos para optimizar la producción de inóculo y la formación de carpóforos del hongo comestible *Lentinula boryana*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 6: 1639-1652.

Küppers, H. 1996. Atlas de los colores. Editorial Blume, Barcelona.

Mier, T., C. Toriello, M. Ulloa, 2002. Hongos microscópicos sapróbios y parásitos: Métodos de laboratorio. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.

CAPÍTULO 4

Chang, S.T., P.A. Miles, 1989. Edible mushroom and their cultivation. CRC Press, Boca Raton.

Chang, S.T., J.A. Buswell, P.A. Miles (eds.), 1993. Genetics and breeding of edible mushrooms. Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.

Guzmán, G., G. Mata, D. Salmones, C. Soto, L. Guzmán Dávalos, 2013. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

Mata, G., R. Pérez-Merlo, 2003. Spawn viability in edible mushrooms after freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. Cryobiology 47: 14-20.

Mata, G., R. Pérez Merlo, J.M. Savoie, D. Salmones, 2014. Spawn cryopreservation of *Agaricus bisporus* and *A. subrufescens* strains. Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. New Delhi, WSMBMP-ICAR, Solan. Pp. 108-112.

Mata, G., R. Pérez Merlo, J.M. Savoie, 2016. Spawn cryopreservation of *Pleurotus pulmonarius* and *Lentinula edodes* strains. In: Sonnenberg A.S.M., J.J.P. Baars (eds.), Proceedings of the 19th Congress of the International Society for Mushroom Science, International Society for Mushroom Science, Amsterdam. Pp. 379-383.

Mata, G., D. Salmones, 2005. Preservation of shiitake spawn stocks by cryogenic storage. In: Shiitake cultivation. Mushroom growers' handbook 2. MushWorld, Seoul. Pp. 51-55.

Mata, G., D. Salmones, R. Gaitán, 2004. Spawn viability and mushroom production in *Pleurotus* strains frozen for eight years in liquid nitrogen. In: Romaine, P., P. Keil, D.L. Rinker, D.J. Royse (eds.), Science and cultivation of edible and medicinal fungi. Penn State University, University Park. Pp. 185-191.

Mata, G., J.M. Savoie, 2013. Preservation of *Agaricus subrufescens* strains at low temperature by using cultures on sorghum grains. Revista Iberoamericana de Micología 30: 96-102.

Salmones, D., G. Mata, 2011. El Cepario de Hongos del Instituto de Ecología A.C. In: Gamboa Angulo, M., R. Rojas Herrera (eds.), Recursos genéticos microbianos en la zona Golfo-Sureste de México. Volumen I. Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos, SAGARPA, Morelia. Pp. 110-123.

Salmones, D., G. Mata, 2012. Ceparios de hongos en México. In: Sánchez Vázquez, J.E., G. Mata (eds.), 2012. Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural. El Colegio de la Frontera Sur - Instituto de Ecología, A.C., Tapachula. Pp. 69-77.

Smith, D., A.H.S. Onions, 1983. The preservation and maintenance of living fungi. CAB Mycological Institute, Kew.

CAPÍTULO 5

Castañeda-Ruiz, R.F., G. Heredia, L.F.P. Gusmao, D.-W. Li, 2016. Fungal diversity of Central and South America. In: Li, D.-W. (ed.), Biology of microfungi. Springer International Publishing, Cham. Pp. 197-217.

Crouss, P., G.J.M. Verkley, J.Z. Groenewald, R.A. Samsom, 2009. Fungal biodiversity. CBS Laboratory Manual Series. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, Uppsala.

Frankland, J., 1990. Ecological methods of observing and quantifying soil fungi. Transactions of the Mycological Society of Japan 31: 89-101.

Mier, T., C. Toriello, M. Ulloa, 2002. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio. Instituto de Biología, UNAM, México, D.F.

Mueller, G.M., G. Bills, M.S. Foster, 2004. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Elsevier, Academic Press, Amsterdam.

Parkinson, D., T.R.G. Gray, S.T. Williams, 1971. Methods for studying the ecology of soil micro-organisms. IBP Handbook No. 19. Blackwell Scientific, Oxford.

CAPÍTULO 6

Butt, T.M., 2002. Use of entomogenous fungi for the control of insect pests. In: Kempken, F. (ed.), The mycota. A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research. Vol. XI: Agricultural Applications. Springer, Berlin. Pp. 111-134.

Davies K., Y. Spiegel (eds.), 2011. Biological control of plant-parasitic nematodes: Building coherence between microbial ecology and molecular mechanisms. Springer, New York.

Johnston A., C. Booth (eds.), 1983. Plant pathologist's pocketbook. 2nd ed. Commonwealth Mycological Institute. Farnham Royal.

Kapteyn, J.C., R.C. Montijn, E. Vink, J. de la Cruz, A. Llobell, J.E. Douwes, H. Shimoi, P.N. Lipke, F.M. Klis, 1996. Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked -1,3/-1,6 glucan heteropolymer. *Glycobiology* 3: 337-345.

Samson, R.A., H.C. Evans, J-P. Latgé, 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer, Berlin.

Singleton, L.L., J.D. Mihail, C.M. Rush, 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi, American Phytopathological Society Press, Saint Paul.

Soares, F.E.F., B.L. Sufiate, J.H. Queiroz, 2018. Nematophagous fungi: Beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. *Agriculture and Natural Resources*. 52: 1-8.

Ulloa, M., 1991. Diccionario ilustrado de micología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Ulloa M., R.T. Hanlin, 2012. Illustrated dictionary of mycology. 2nd ed. The American Phytopathological Society Press, Saint Paul.

van Bezooijen, J., 2006. Methods and techniques for nematology. Wageningen University, Wageningen.

Wezel, A., M. Casagrande, F. Celette, J.-F. Vian, A. Ferrer, J. Peigné, 2014. Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 34: 1-20.

Whips, J.M., 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 482-511.

CAPÍTULO 7

Brundrett, M., N. Bougher, B. Dell, T. Grove, N. Malajczuk, 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.

Hernández-Santiago, F., J. Pérez-Moreno, 2020. Métodos de identificación macro y micromorfológica de macromicetos comestibles y tóxicos. In: Delgadillo-Martínez J., R. Ferrera, J. Alvarado, A. Alarcón, J. Pérez-Moreno, J.J. Almaraz (eds.), *Microbiología aplicada a la agricultura y agroecosistemas*. Biblioteca Básica de Agricultura, Texcoco, Pp. 585-622.

Kumar, S., T. Satyanarayana, 2002. Isolation of ectomycorrhizal fungi: Methods and techniques. In: Mukerji, K.G., C. Manoharachary, B.P. Chamola (eds.), *Techniques in mycorrhizal studies*. Springer, Dordrecht. Pp. 133-142.

Pérez-Moreno, J., M. Martínez-Reyes, F. Hernández-Santiago, I. Ortiz-López, 2020. Climate change, biotechnology, and Mexican neotropical edible ectomycorrhizal mushrooms. In: Pérez-Moreno, J., A. Guerin-Laguette, R. Flores-Arzú, Y. Fu-Qiang (eds.), *Mushrooms, humans and nature in a changing world: Perspectives from ecological, agricultural and social sciences*. Springer Nature, Cham. Pp. 61-99.

Pérez-Moreno, J., A. Lorenzana-Fernández, R. Medel-Ortiz, R. Ferrera-Cerrato, G. Mata, 2019. Los hongos ectomicorrízicos de México: Una perspectiva global. In: Álvarez-Sánchez, F.J., P. Rodríguez-Guzmán, A. Alarcón (eds.), *Biodiversidad de microorganismos de México. Importancia, aplicación y conservación*. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México. Pp. 102-126.

Repáč, I., 2011. Ectomycorrhizal inoculum and inoculation techniques. In: Rai, M., A. Varma (eds.), *Diversity and biotechnology of ectomycorrhizae*. *Soil Biology*, vol 25. Springer, Berlin. Pp. 43-63.

CAPÍTULO 8

Carreón-Abud, Y., E. Jerónimo-Treviño, M.D.L.Á. Beltrán-Nambo, M. Martínez-Trujillo, D. Trejo Aguilar, M.E. Gavito, 2013. Aislamiento y propagación de cultivos puros de hongos micorrízicos arbusculares provenientes de huertas de aguacate con diferente manejo agrícola por la técnica de minirizotrófon. *Revista Mexicana de Micología* 37: 29-39.

- Brundrett, M.C., 2008. Mycorrhizal Associations: Mycorrhizal association: The web resource. <https://mycorrhizas.info>.
- Dalpé, Y., M. Monreal, 2004. Arbuscular mycorrhiza inoculum to support sustainable cropping systems. *Crop management* 3: 1-11.
- Declerck, S., S. Séguin, Y. Dalpé, 2005. The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for germplasm collections. In: Declerck, S., D.G. Strullu, J.A. Fortin (eds.), *In vitro culture of mycorrhizas*. Springer, Berlin. Pp. 17-30.
- Diagne, N., M. Ngom, P.I. Djighaly, D. Fall, V. Hocher, S. Svistoonoff, 2020. Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and performance: Importance in biotic and abiotic stressed regulation. *Diversity* 12(10): 370.
- Gerdemann, J.W., T.H. Nicolson, 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244.
- Huck, M.G., H.M. Taylor, 1982. The rhizotron as a tool for root research. In: Brady, N.C. (ed.), *Advances in agronomy* Vol. 35. Elsevier, New York. Pp. 1-35.
- Ohel, F., I. Sánchez-Castro, D.K.A. da Silva, V.M. Santos, J. Palenzuela, G.A. da Silva, 2019. *Septoglomus nigrum*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from France, Germany and Switzerland. *Nova Hedwigia* 109: 121-134.
- Ohel, F., E. Sieverding, K. Ineichen, P. Mäder, T. Boller, A. Wiemken, 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 2816-2824.
- Phillips, J.M., D.S. Hayman, 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- Schenck, N.C., Y. Perez, 1990. *Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi*. Synergistic Publications, Gainesville.
- Selvakumar, G., K. Kim, D. Walitang, M. Chanratana, Y. Kang, B. Chung, T. Sa, 2016. Trap culture technique for propagation of arbuscular mycorrhizal fungi using different host plants. *Korean Society of Soil Science and Fertilizer* 49: 608-613.
- Selvakumar, G., C.C. Shagol, Y. Kang, B.N. Chung, S.G. Han, T.M. Sa, 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi spore propagation using single spore as starter inoculum and a plant host. *Journal of Applied Microbiology* 124: 1556-1565.

- Sieverding, E., 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Sonderpublikation der GTZ, Bremer.
- Stürmer, S.L., J.D. Bever, P.A. Schultz, S.P. Bentivenga, 2021. Celebrating INVAM: 35 years of the largest living culture collection of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 31: 117-126.
- Trejo-Aguilar, D., J. Banuelos, 2020. Isolation and culture of arbuscular mycorrhizal fungi from field samples. In: Ferrol, N., L. Lanfranco (eds.), *Arbuscular mycorrhizal fungi. Methods and protocols*. Humana Press, Totowa.
- Trejo-Aguilar, D., L. Lara-Capistrán, I.E. Maldonado-Mendoza, R. Zulueta-Rodríguez, W. Sangabriel-Conde, M.E. Mancera-López, I. Barois, 2013. Loss of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in trap cultures during long-term subculturing. *IMA fungus* 4: 161-167.

CAPÍTULO 9

- Fisher, P.J., O. Petrini, 1987. Location of fungal endophytes in tissue of *Suaeda fruticosa*: a preliminary study. *Transactions of the British Mycological Society* 89: 246-249.
- Geisen, S., O. Kostenko, M.C. Cossen, F.C. ten Hooven, B. Vreš, W.H. van der Putten, 2017. Seed and root endophytic fungi in a range expanding and a related plant species. *Frontiers in Microbiology* 8: 1645.
- Khan, A.L., A. Al-harrasi, A. Al-rawahi, Z. Alzfarsi, A. Al, M. Waqas, J. Shin, 2016. Endophytic fungi from frankincense tree improves host growth and produces extracellular enzymes and Indole Acetic Acid. *PLoS ONE* 11: 58207.
- Liu, K., X. Ding, B. Deng, W. Chen, 2009. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology* 36(9): 1171.
- Petrini, O., P.J. Fisher, 1990. Occurrence of fungal endophytes in twigs of *Salix fragilis* and *Quercus robur*. *Mycological Research* 94: 1077-1080.
- Potshangbam, M., S.I. Devi, D. Sahoo, G.A. Strobel, 2017. Functional characterization of endophytic fungal community associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L. *Frontiers in Microbiology* 8: 325.
- Qin, S., J. Li, H.H. Chen, G.Z. Zhao, W.Y. Zhu, C.L. Jiang, 2009. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6176-6186.

Shah, S., R. Shrestha, S. Maharjan, M.A. Selosse, B. Pant, 2019. Isolation and characterization of plant growth-promoting endophytic fungi from the roots of *Dendrobium moniliforme*. *Plants* 8(1): 5.

Sarangthem, I.D., P. Momota, 2012. Isolation and characterization of Endophytic microbiome from indigenous maize (*Zea mays*) variety of Manipur and its impact on biological control. *International Journal of Human Genetics Medical Biotechnology and Microbiological Studies* 1: 11-17.

Unterseher, M, M. Schnittler, 2009. Dilution to extinction cultivation of leaf inhabiting endophytic fungi in beech (*Fagus sylvatica* L.) different cultivation techniques influence fungal biodiversity assessment. *Mycological Research* 113: 645-654.

CAPÍTULO 10

Crous, P.W., G.J.M. Verkley, J.Z. Groenewald, J. Houbraken, 2019. *Fungal biodiversity*, 2nd ed. American Phytopathological Society Press. St. Paul.

Hawksworth, D.L., R. Lücking, 2017. Fungal diversity revised: 2.2 to 3.8 million species. In: Heitman, J., B.J. Howlett, P.W. Crous, E.H. Stukenbrock, T.Y. James, N.A.R. Gow (eds.), *The fungal kingdom*. American Society for Microbiology Press, Washington. Pp. 79-95.

Ma, J., H. Sugawara, D. Philippe, 2014. *World directory of culture collections*, 6th. ed. WFCC-MIRCEN World Data Center for Microorganisms (WDCM). www.wfcc.info/ccinfo/index.php/home/content.

Salmones, D., G. Mata, 2012. Ceparios de hongos en México. In: Sánchez Vázquez, J.E., G. Mata (eds.), 2012. *Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: investigación y desarrollo en un entorno multicultural*. El Colegio de la Frontera Sur - Instituto de Ecología, A.C., Tapachula. Pp. 69-77.

Smith, D., A.H.S. Onions, 1983. *The preservation and maintenance of living fungi*. CAB Mycological Institute, Kew.

CRÉDITOS DE LAS FIGURAS

David Alarcón: 5A, 7, 64

Alejandra Almaraz Llamas: 47f

Melanie Brewster Salmones: 1A-B, 8, 9, 12, 18, 59, 60, 61

Liliana Cadavid Florez: 38

Gloria Carrión: 2B, 43, 44, portada del capítulo 6

Jie Cheng: 3A, 65B, 65D

Zelene Durán Barradas: 10, 39, 40, 41

Manuel Escamilla: 36

Rigoberto Gaitán Hernández: 2A, 21, 22A-B, 23, 24, portada del capítulo 3

Gabriela Heredia Abarca: 3B, 32, 33, 34, 35, 37, portada del capítulo 5, figura 1 del prólogo

Juan Lara: 63

Daniel López Lima: 45

Magdalena Martínez Reyes: 46a-e, 47a-e

Gerardo Mata: 2C, 5B, 6A-C, 11, 13, 14A-D, 15, 16, 17A-C, 19, 20A-B, 25A-B, 26A-B, 27A-B, 28A-B, 29A-C, 30A-E, 31, 65A, 65D, portadas de los capítulos 1, 2, 4, 10 y portada del capítulo protocolos de preparación de medios de cultivo, figura 2 del prólogo

Rosario Medel Ortiz: portada del capítulo 9

Jesús Pérez Moreno: 48, 49, 50, portada del capítulo 8

Uzziel Ríos García: 46f

Dulce Salmones: 62A-B

Dora Trejo Aguilar: 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, portada del capítulo 7

Luc Villain: 42