


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a saint, likely St. Charles, seated on a throne and holding a book. The figure is surrounded by various heraldic symbols, including a crown, a shield, and a lion. The Latin motto "CETERA OMBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MICORRIZAS Y SU EFECTO EN DOS
ESPECIES DE PINO (*Pinus oocarpa* Schiede y *P. maximinoi* Farjon & Frankis), POR
CUATRO ESPECIES DE HONGOS ECTOMICORRÍCICOS, EN CONTENEDOR.**

ARIEL ELISEO TURCIOS PANTALEÓN
GUATEMALA, MARZO DE 2009

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Micorrizas.....	3
2.2 Historia	4
2.3 Clasificación de las micorrizas	5
2.4 Principales beneficios de las micorrizas	9
2.5 Aislamiento de hongos ectomicorrícicos.....	12
2.5.1 Crecimiento en cultivo puro	13
2.5.2 Medios de cultivo semisintéticos.....	19
2.6 Elaboración de medios para el cultivo de hongos ectomicorrícicos.....	20
2.7 Importancia y selección de los hongos para inóculo	20
2.8 Fuentes de inóculo y técnicas de inoculación.....	20
2.8.1 Inoculación con suelo	21
2.8.2 Inoculación con esporas.....	21
2.8.3 Inoculación con micelio.....	22
2.9 Selección de hongos y variación ecotípica	23
2.10 Evaluando el éxito de la inoculación.....	24
2.11 Factores que afectan el desarrollo micorrícico	24
2.11.1 Desarrollo de raíces	24
2.11.2 Fertilización	25
2.11.3 Riego.....	26
2.11.4 Sustrato	27
2.11.5 Temperatura.....	28
2.11.6 Plaguicidas.....	28

3. MARCO REFERENCIAL	29
3.1 Antecedentes.....	29
3.2 Ubicación geográfica de la investigación.....	30
3.3 Condiciones agroecológicas y recursos naturales de la zona	32
3.3.1 Zona de vida	32
3.3.2 Altitud.....	32
3.3.3 Temperatura.....	32
3.3.4 Precipitación pluvial	32
3.3.5 Suelos.....	32
3.3.6 Pendiente	33
3.3.7 Fisiografía.....	33
3.3.8 Textura del suelo	33
3.3.9 Agua.....	34
3.4 DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL.....	34
3.4.1 <i>Pinus oocarpa</i> Schiede ex Schltdl.	34
3.4.2 <i>Pinus maximinoi</i> Farjon & Frankis (1998).....	34
3.4.3 <i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers.) Coker & Couch	35
3.4.4 <i>Scleroderma geaster</i> Fr.	37
3.4.5 <i>Lactarius indigo</i> (Schw.) Fries	38
3.4.6 <i>Thelephora terrestris</i> Ehrenb.....	39
4. HIPÓTESIS	40
5. OBJETIVOS.....	41
6. METODOLOGÍA.....	42
6.1 Desinfección y germinación de semillas	42
6.2 Producción de inóculo miceliar	42
6.3 Obtención de esporas.....	42
6.4 Obtención de micorrizas.....	43
6.5 Dosificación del inóculo.....	43
6.6 Factores evaluados.....	43
6.7 Diseño experimental.....	43
6.8 Tratamientos	44

6.9 Unidad experimental.....	46
6.10 Unidad de muestreo	46
6.11 Modelo estadístico	46
6.12 Variables de respuesta	47
6.13 Manejo del experimento	47
6.14 Análisis de los datos	47
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	48
7.1 Porcentaje de micorrización	48
7.2 Altura de las plantas	52
7.3 Longitud de raíz.....	54
7.4 Diámetro de tallo	55
7.5 Peso fresco de raíz	58
7.6 Peso fresco de tallo	60
7.7 Peso seco de raíz.....	62
7.8 Peso seco de tallo.....	64
8. CONCLUSIONES.....	67
9. RECOMENDACIONES	68
10. BIBLIOGRAFIA	69
APÉNDICES	73

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Micorrizas formadas en la raíz de pino.	9
Figura 2. Mapa de ubicación de la Finca Bárcena, Villa Nueva.	31
Figura 3. Porcentaje de micorrización a los diez meses después del trasplante	50
Figura 4. Velocidad de crecimiento en medios semisintéticos	51
Figura 5. Altura de las plantas a los diez meses DDT	54
Figura 6. Diámetro de tallo a los diez meses después del trasplante	58

Figura 7. Peso seco de la raíz a los diez meses después del trasplante	63
Figura 8. Peso seco de la parte aérea a los diez meses después del trasplante	66
Figura 9A. Cuerpo fructífero de <i>Pisolithus tinctorius</i> bajo <i>P. oocarpa</i>	73
Figura 11A. Cuerpo fructífero de <i>Scleroderma geaster</i> bajo <i>P. oocarpa</i>	73
Figura 10A. Micorrizas de <i>Pisolithus tinctorius</i> con <i>P. maximinoi</i>	73
Figura 12A. Micorrizas <i>Scleroderma geaster</i> con <i>P. maximinoi</i>	73
Figura 13A. Cuerpo fructífero de <i>Thelephora terrestris</i> con <i>P. maximinoi</i>	74
Figura 15A. Cuerpo fructífero de <i>Lactarius indigo</i>	74
Figura 14A. Micorrizas <i>Thelephora terrestris</i> con <i>P. maximinoi</i>	74
Figura 16A. Micorrizas <i>Lactarius indigo</i> con <i>P. oocarpa</i>	74
Figura 17A. Desarrollo de raíces.....	75

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Tipos de micorrizas formadas por los principales géneros de especies forestales producidas en viveros de clima templado frío.....	4
Cuadro 2. Comparación de algunos hongos que forman los tres diferentes tipos de micorrizas y algunos géneros de especies forestales relacionados.....	7
Cuadro 3. Descripción de la combinación de los dos factores evaluados	44
Cuadro 4. Distribución de las unidades experimentales	45
Cuadro 5. ANDEVA para porcentaje de micorrización	48
Cuadro 6. Prueba múltiple de medias Tukey para porcentaje de micorrización	49
Cuadro 7. Velocidad de crecimiento en medios semisintéticos	51
Cuadro 8. ANDEVA para altura de las plantas.....	52
Cuadro 9. Prueba múltiple de medias Tukey para altura de las plantas.....	53
Cuadro 10. ANDEVA para la longitud de raíz.....	54
Cuadro 11. ANDEVA para diámetro de tallo.....	55
Cuadro 12. Prueba múltiple de medias Tukey para diámetro de tallo	56

Cuadro 13. Prueba múltiple de medias usando el comparador de Duncan para diámetro de tallo	57
Cuadro 14. ANDEVA para peso fresco de la raíz	59
Cuadro 15. Prueba múltiple de medias Tukey para peso fresco de la raíz	59
Cuadro 16. Prueba múltiple de medias Duncan para peso fresco de la raíz.....	60
Cuadro 17. ANDEVA para peso fresco de la parte aérea	61
Cuadro 18. Prueba múltiple de medias Tukey para peso fresco del tallo	61
Cuadro 19. ANDEVA para peso seco de la raíz.....	62
Cuadro 20. Prueba múltiple de medias Tukey para peso seco de la raíz	62
Cuadro 21. ANDEVA para peso seco de la parte aérea.....	64
Cuadro 22. Prueba múltiple de medias Tukey para peso seco del tallo.....	64
Cuadro 23. Prueba múltiple de medias Duncan para peso seco del tallo.....	65
Cuadro 24A. Medio MMN (Melin Norkrans modificado).....	76
Cuadro 25A. Composición del medio BAF.....	77

RESUMEN

La investigación se llevó a cabo en el vivero forestal de la Escuela Nacional Central de Agricultura (ENCA), Bárcena, Villa Nueva, durante el tiempo comprendido entre febrero a noviembre del año 2008.

Para *Lactarius indigo* y *Pisolithus tinctorius* la forma de inóculo utilizada fue micelio cultivado *in vitro*, para *Scleroderma geaster* se usó una solución de esporas y en el caso de *Thelephora terrestris* se emplearon raíces vivas micorrizadas con esta especie, las cuales se obtuvieron de plántulas del vivero forestal de la ENCA, el resto de hongos ectomicorrícicos se recolectaron en Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa.

Los factores evaluados fueron dos, a) especies de hongos micorrícicos (*Scleroderma geaster*, *Lactarius indigo*, *Pisolithus tinctorius* y *Thelephora terrestris*) y b) especies de pino (*Pinus oocarpa*, *P. maximinoi*). El diseño experimental utilizado fue el de completamente al azar con arreglo bifactorial combinatorio, con un total de 50 unidades experimentales, con un número de seis plantas por unidad experimental.

Las variables de respuesta fueron las siguientes: porcentaje de micorrización, altura de las plantas, diámetro de tallo, longitud de raíces, peso fresco y peso seco de la parte aérea, peso fresco y peso seco de la raíz. Los datos se obtuvieron cinco meses después de haberse inoculado las plántulas. A las variables de respuesta se les aplicó un análisis de varianza auxiliándose del programa de computación SPSS, determinándose así la existencia o no existencia de diferencia significativa entre las cepas de hongos y especies de pino. Posteriormente se realizó una prueba múltiple de medias TUKEY al 5% de significancia.

La especie de hongo ectomicorrícico con la que se obtuvieron los mejores resultados en todas las variables de respuesta, independientemente de la especie de pino fue *Pisolithus tinctorius*, seguido por *Scleroderma geaster*. Respecto al porcentaje de micorrización, *Pisolithus tinctorius* reportó un valor promedio de 72.9490%, siguiendo *Scleroderma*

geaster con 42.2980%, y *Thelephora terrestris* con 26.23%. Los valores más bajos se produjeron con *Lactarius indigo* y el testigo sin diferencia significativa entre ambos.

En cuanto a la altura de las plantas, a nivel estadístico no hubo diferencia significativa, aunque la mayor longitud se obtuvo en las plantas inoculadas con *Pisolithus tinctorius*. Según los análisis de varianza realizados se encontró diferencia significativa de las variables peso seco y peso fresco de raíz, peso seco de la parte aérea y diámetro de tallo. Por último, y muy importante, fue que el 8% de las plantas fueron contaminadas por *Thelephora terrestris* (esta especie se caracteriza por producir abundantes esporas con gran capacidad micorrícica en plantas jóvenes de vivero). Sin embargo, el efecto positivo de *P. tinctorius* y de las otras especies es alta sobre los producidos por *Thelephora terrestris*.

1. INTRODUCCIÓN

Guatemala es un territorio donde el 75% de su suelo es de vocación forestal (INAB, 1999), pero actualmente sólo el 34.4% (3,750,000 hectáreas) se encuentra cubierto de bosque. Sin embargo, día con día este valor disminuye, perdiéndose aproximadamente unas 90,000 hectáreas de bosque por año debido al avance de la frontera agrícola, la excesiva deforestación y el mal aprovechamiento del recurso bosque.

En la actualidad se han desarrollado programas de incentivos forestales, dentro de los cuales destaca el PINFOR. Este programa ha aumentado considerablemente la cantidad de área reforestada en el país, utilizando principalmente *Pinus oocarpa* y otras especies de pino. Aquí juegan un papel fundamental los viveros forestales para la producción de plántulas.

Para acelerar el proceso de crecimiento y adaptación de las plantas al sitio definitivo de plantación, es necesario que las plántulas estén micorrizadas o que el suelo posea suficiente inoculo natural y del tipo adecuado. En Guatemala el manejo científico del tema es relativamente nuevo, ya que la utilización de hongos micorrícicos se ha realizado en forma empírica, generalmente mediante aplicación de broza de bosques.

Los hongos micorrícicos funcionan como una extensión del sistema radicular de las plantas, aumentando la eficiencia en la absorción de los nutrimentos. Existen muchas especies de hongos micorrícicos, los cuales varían en su capacidad de asociación dependiendo de la especie y edad del hospedero, así como de las condiciones ambientales del lugar.

Para un buen desarrollo de plántulas de pino a nivel de vivero es fundamental estimular la simbiosis micorrícica (raíz-hongo), puesto que de ella dependerá en buena medida la supervivencia al trasplante en campo definitivo. En el país generalmente se usa broza como inóculo, que aunque puede ser efectiva para producir micorrizas, también puede implicar infección por patógenos del bosque y suelo así como deterioro biológico y erosión del área de recolecta. Con esta técnica no se hace selección de las especies fúngicas idóneas para su aplicación en plántulas de vivero.

La Escuela Nacional Central de Agricultura (ENCA), cuenta con un vivero forestal de un área aproximada de una hectárea, donde se produce pino de distintas especies. A partir del 2008 se produjo *Pinus oocarpa* y *Pinus maximinoi*, por su alta demanda en el país. Para micorrizar estas plántulas, los trabajadores recolectan broza en plantaciones de pino, con el supuesto que existe inóculo de hongos micorrícicos y el cual se aplica en suspensión, con regaderas, aproximadamente a los dos meses después del trasplante.

Hoy es fundamental dedicar mayor atención a la utilización de hongos micorrícicos selectos en campo y particularmente su cultivo a nivel de laboratorio para evitar el uso indiscriminado de broza. La eficiencia micorrícica de cada especie varía, siendo necesario identificar la que produzca un mayor porcentaje de micorrización en determinada especie de pino.

Por otro lado, los bosques pueden dar un valor agregado mediante producción de hongos micorrícicos comestibles, ya sea porque existen naturalmente *in situ* o aplicándolos a partir del vivero, o incluso aplicando inóculo en el bosque mismo. Esta es una fuente que puede ser aprovechada por la gente del área rural para mejorar su nivel económico y nutricional y hacer del bosque un cultivo mucho más atractivo que otros cultivos agrícolas.

La presente investigación consistió en evaluar la capacidad formadora de micorrizas (porcentaje de micorrización) y su efecto (altura, diámetro de las plantas inoculadas, longitud de raíz, peso fresco y peso seco de la parte aérea, peso fresco y peso seco de raíces) con cuatro especies de hongos micorrícicos (*Scleroderma geaster*, *Lactarius indigo*, *Pisolithus tinctorius* y *Thelephora terrestris*) en dos especies de pino (*Pinus oocarpa* y *Pinus maximinoi*). El trabajo se desarrolló en la Escuela Nacional Central de Agricultura (ENCA), Bárcena, Villa Nueva, utilizando como sustrato turba esterilizada (75%) e illita (25%), en contenedores plásticos de 160cc por cavidad.

Se utilizaron tres formas de inóculo: solución acuosa de esporas de *Scleroderma geaster*, micelio cultivado *in vitro* de *Lactarius indigo* y *Pisolithus tinctorius* y utilización de micorrizas vivas infectadas con *Thelephora terrestris*.

2. MARCO TEÓRICO

Para desarrollar criterios de evaluación de la calidad de las raíces, debemos incorporar conocimientos sobre la dinámica de la raíz de las plantas. Este conocimiento es de suma importancia, dado que una vez que las plantas son establecidas en el campo definitivo, el sistema radicular deberá funcionar acorde a las condiciones del suelo. Estas condiciones diferirán drásticamente entre sustratos bien irrigados y bien fertilizados de suelos pobres (Akira, 1994).

En los suelos naturales todas las especies forestales forman asociaciones simbióticas y mutuamente benéficas entre sus raíces y hongos especializados. Esta formación raíz-hongo es llamada micorriza. Las micorrizas proporcionan muchos beneficios a las plántulas y árboles adultos, especialmente en la obtención del agua y nutrientes. Las plantas dependen de las micorrizas para crecer y sobrevivir, lo que es evidenciado por la baja supervivencia de plantas no micorrizadas cuando son plantadas en suelos con carencia de hongos micorrícicos. Por lo tanto, la presencia y abundancia de micorrizas debe ser una importante consideración a la hora de evaluar la salud y calidad del sistema radicular y en la predicción del comportamiento en campo (Akira, 1994, Cruz, 1990).

Actualmente existen numerosas investigaciones sobre el rol de las micorrizas en la nutrición de las plantas y usos prácticos en silvicultura. También hay gran cantidad de información y conceptos disponibles para que puedan ser utilizados en forma inmediata en los viveros forestales que producen planta en contenedor (Flores, 2008).

2.1 Micorrizas

Literalmente la palabra micorriza significa “*hongos de las raíces*” y define la íntima asociación entre el sistema radicular de las plantas y un hongo especializado del suelo, el hongo micorrícico. Casi todas las principales plantas terrestres del planeta forman algún tipo de micorriza y, salvo pocas excepciones, todas las especies forestales las forman. Prevalen dos principales tipos: las ectomicorrizas (ECM), las cuales son formadas con el importante grupo de especies de coníferas de la familia *Pinaceae*, y latifoliadas de las

familias *Fagaceae* y *Betulaceae*; y las micorrizas vesiculares-arbusculares (VA), las cuales son comunes en otras latifoliadas particularmente en los géneros *Acer*, *Thuja*, *Liquidambar* y *Sequoia*. Aunque ambos tipos proporcionan funciones y beneficios muy similares hacia su hospedante, difieren fuertemente debido al tipo de hongo involucrado, su morfología y sus aplicaciones potenciales en los viveros forestales (Newsham, 1994). En el cuadro 1 se puede observar un breve listado de especies vegetales y los tipos de micorrizas que forman (Landis, 1993).

Cuadro 1. Tipos de micorrizas formadas por los principales géneros de especies forestales producidas en viveros de clima templado frío

Ectomicorrizas	Ectomicorrizas y micorrizas vesiculares-arbusculares	Micorrizas vesiculares-arbusculares
<i>Betula</i> (Abedul)	<i>Eucalyptus</i> (Eucalipto)	<i>Fraxinus</i> (Fresno)
<i>Pseudotsuga</i> (Abeto Douglas)	<i>Juniperus</i> (Enebro)	<i>Prunus</i> (Capulín)
<i>Abies</i> (Oyamel)	<i>Populus</i> (Álamo)	<i>Hacer</i> (Maple)
<i>Tsuga</i> (Abeto)	<i>Juglans</i> (Nogal)	<i>Sequoia</i> (Sequoia)
<i>Larix</i> (Alerce)		<i>Liquidambar</i> (Liquidámbar)
<i>Quercus</i> (Encino)		<i>Platanus</i> (Sicomoro)
<i>Pinus</i> (Pino)		<i>Thuja</i> (Thuja)
<i>Picea</i> (Abeto)		<i>Liriodendron</i> (Tulipán)

Fuente: Landis, T *et al.* (1993).

2.2 Historia

Probablemente las plantas superiores se originaron por una simbiosis entre hongos marinos y algas fotosintéticas, si eso es cierto, es lógico que las plantas requieran de los hongos micorrícicos para sobrevivir o para un crecimiento óptimo (Trappe, 1977).

Durante la segunda mitad del siglo XIX, varias personas notaron la presencia de hongos en las raíces de las plantas sin alguna enfermedad aparente. Reissek (1847) y Kamienski (1881), describieron una capa fúngica presente en raíces de algunas plantas. Frank (1885) denominó a estas asociaciones como “micorrizas”, y más tarde, distinguió entre aquellas

que crecían fuera de la raíz a las que llamó ectomicorrizas, y aquellas que se desarrollaban dentro de la raíz denominándolas endomicorrizas (Akira, 1994, Cruz, 1990).

A principios de 1900 hubo numerosos reportes sobre la clase de hongos que existían en las micorrizas de las plantas, notando que los Ascomicetos, Basidiomicetos y Zygomycetos estaban involucrados en ellas. De 1925 a 1950, la mayoría de estudios se refirieron a las ectomicorrizas. De 1950 a 1960 el beneficio aportado por las endomicorrizas, en especial las de tipo vesicular, cobró importancia. Así, los estudios sobre micorrizas aumentaron en las décadas de los 60 y 70.

Pero, ¿por qué este resurgimiento del interés de las micorrizas cuya presencia ya se conocía por más de 100 años y cuya existencia era evidente en grabaciones de fósiles de algunas de las más antiguas plantas terrestres? (Aguilar, Beltran, 1997)

Probablemente varios factores fueron responsables para este nuevo interés. Pero quizá el más importante es haber demostrado que en la naturaleza la existencia de micorrizas en las plantas es más la regla que la excepción (Beltran, 1997, Harley, 1983).

2.3 Clasificación de las micorrizas

Al principio, las micorrizas se clasificaron como ectotróficas y endotróficas, basándose en el tipo de estructuras que formaba el hongo con la raíz. Posteriormente se agruparon en endomicorrizas, ectomicorrizas y ectendomicorrizas con base en la penetración de las hifas en las células de la raíz. Actualmente, se acepta la clasificación de Harley y Smith, que describe siete tipos de micorrizas: vesiculares, ectomicorrizas, ectendomicorrizas, arbutoides, monotropoides, ericoides y orcooides (Beltran, 1997, Congreso Nacional de la República de Guatemala, 1996).

2.3.1 Ectomicorrizas

Las ectomicorrizas se desarrollan en las raíces cortas y activas en vez de las raíces laterales estructurales, largas y de consistencia leñosa. Las ectomicorrizas pueden ser fácilmente reconocidas por su característica cubierta fúngica o manto que envuelve a las raíces activas; a menudo el micelio fúngico, o crecimiento de moho en forma de fibras,

puede ser visto emergiendo directamente del manto y colonizando el suelo o el sustrato de enraizamiento (Landis, 1993).

Cuando una ectomicorriza es seccionada y su anatomía interna es examinada bajo el microscopio, es posible ver la segunda característica principal de las ectomicorrizas: el crecimiento intercelular del hongo entre las células epidérmicas y corticales, que forma la red de Hartig. En el interior de esta extensiva zona de contacto entre hongo y células radiculares, es donde se realiza el intercambio de los nutrientes y el agua entre el hongo y el hospedante; el hongo capta y libera los nutrientes y el agua hacia su hospedante, recibiendo a cambio azúcares y otros productos de la fotosíntesis generados por la planta (Landis, 1993).

Los hongos que forman las ectomicorrizas son principalmente los Basidiomicetes y los Ascomicetes, incluyendo muchos de los hongos macromicetos forestales (hongos con “pie”), y los *Sclerodermatales* (hongos sin “pie”), así como el hongo hipógeo que fructifica bajo tierra, conocido como trufa. Géneros de hongos bien conocidos que forman ectomicorrizas son *Amanita*, *Boletus*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Scleroderma*, *Suillus* y *Tricholoma* (todos Basidiomicetes), *Cenococcum* y *Tuber* (Ascomicetes). Otro género de hongo muy común en las plantas producidas en vivero es *Thelephora terrestris*, cuyos cuerpos reproductivos (o esporocarpos) comúnmente se presentan como estructuras erectas y duras de color café sobre la base del tallo de las plantas, o alrededor de los orificios de drenaje en los contenedores individuales, o en la base de los bloques de poliestireno expandido (Landis, 1993). Este hongo llega a convertirse en un problema cuando se trabaja en la micorrización con especies seleccionadas, porque resulta altamente competitivo y puede desplazar al hongo inoculado. En el cuadro 2 se puede observar un listado de géneros fúngicos y vegetales plenamente determinados por su asociación micorrícica (Landis, 1993).

Cuadro 2. Comparación de algunos hongos que forman los tres diferentes tipos de micorrizas y algunos géneros de especies forestales relacionados

Tipos de micorriza	Hongo involucrado		Especies forestales normalmente asociadas
	Clase	Género representativo	
Ectomicorrizas	Basidiomicetes	<i>Boletus, Suillus, Leccinum, Cortinarius, Tricholoma, Russula, Rhizopogon, Amanita, Hymenogaster, Gautieria, Hysterangium, Lactarius, Paxillus, Gastroboletus, Martella y Scleroderma</i>	<i>Fagus sp., Betulia sp., Pseudotsuga menziesii, Eucalyptus spp., Corylus spp., Tsuga spp., Larix spp., Quercus spp., Pinus spp., Populus spp., Picea spp. y Salix spp.</i>
	Ascomycetes	<i>Tuber, Genea, Elephomyces, Hydnotrya, Geopora, Balsamia, Sphaerosporella y Cenococcum</i>	<i>Fagus sp., Betula sp., Pseudotsuga menziessi, Eucalyptus spp., Corylus spp., Tsuga spp., Larix spp., Quercus spp., Pinus spp., Populus spp., Picea spp., y Salix spp.</i>
	Zygomycetes	<i>Endogone</i>	<i>Pseudotsuga menziesii</i>
Ectendomicorrizas	Ascomycetes	<i>Phialophora y Chloridium, Cepa-E</i>	<i>Betula sp., Pinus spp. y Picea spp.</i>
Vesiculares-arbusculares (Endomicorrizas)	Zygomycetes	<i>Acaulospora, Endogone, Entrophospora, Gigaspora, Glomus, Sclerocystis y Scuteliospora</i>	<i>Fraxinus spp., Taxodium distichum, Tilia sp., Chamaecyparis sp., Libocedrus sp., Thuja sp., Eucalyptus sp., Sequoiadendron giganteum, Acer spp., Sequoia sempervirens, Liquidambar spp., Platanus spp. y Liriodendron tulipifera.</i>

Fuente: Landis, T *et al.* (1993).

Dado que la mayoría de los viveros que producen especies forestales en contenedor utilizan sustrato artificial, con carencia de micorrizas, es importante entender cómo las plantas pueden ser micorrizadas, ya sea en forma natural o mediante métodos controlados. Muchos de los hongos ectomicorrícicos producen esporas que son dispersadas a grandes distancias por el viento, desde las zonas forestales hasta los viveros, donde se asocian a las plántulas. Sin embargo, en la medida en que un vivero se

halla más lejos de extensiones forestales o de grupos de árboles con ectomicorrizas, menor será la probabilidad de que reciba esporas inoculantes dispersadas por el viento. Dentro del vivero, los cuerpos fructíferos producidos en plantas micorrizadas ofrecen una fuente confiable de esporas para la inoculación de las plantas vecinas y para los futuros cultivos (Landis, 1993).

La apariencia estructural de las ectomicorrizas está en función tanto de los mismos hongos como de la planta hospedante. Miles de hongos diferentes forman ectomicorrizas, y muchos con más de una planta hospedante, por lo que la apariencia general de las diferentes combinaciones hongo hospedante puede variar considerablemente. La morfología de las ectomicorrizas es con frecuencia caracterizada por el género hospedante. Por ejemplo, los puntos radicales de las ectomicorrizas en los pinos comúnmente se ramifican dicotómicamente en complejas estructuras. Otras formaciones de ectomicorrizas varían desde simples cilindros hasta formaciones complejas pinnadas, coraloides e incluso formas de tubérculos compactos. La cantidad de micelio emanado de una ectomicorriza es otra característica importante. El micelio externo (o hifa) puede variar desde filamentos escasos y casi invisibles, hasta prolíficas marañas y filamentos en forma de raíz de hifas (rizomorfos) que transportan el agua y nutrientes (Landis, 1993).

Las siguientes características podrán guiar su reconocimiento:

1. Las ectomicorrizas son típicamente estructuras gruesas (hinchadas) y carecen de pelos absorbentes o radiculares.
2. El manto del hongo o cubierta es usualmente de un color diferente al de los pelos absorbentes; algunos mantos son de colores vivos o blanco puro.
3. El micelio del hongo o la ramificación de las hifas comúnmente se desarrollan fuera del tejido que compone al manto, dando una apariencia algodonosa.

4. Las ectomicorrizas maduras comúnmente ramifican varias veces en patrones regulares e irregulares.

5. Las raíces alimentadoras no micorrizadas, son más delgadas, usualmente cubiertas de pelos absorbentes, y para muchas de las especies de coníferas, se presentan sin ramificaciones (Landis, 1993).

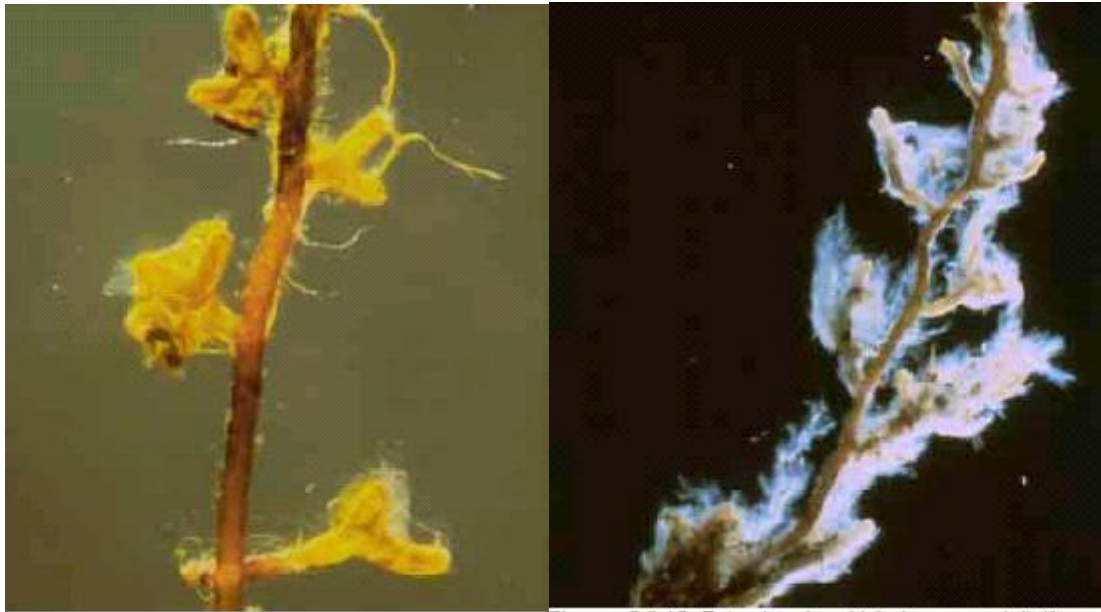


Figura 1. Micorrizas formadas en la raíz de pino.

Fuente: Landis, T *et al.* (1993).

2.4 Principales beneficios de las micorrizas

Las micorrizas benefician la nutrición, el crecimiento y la supervivencia de las plantas de muchas formas. El beneficio más conocido es el incremento en la absorción del agua y los nutrientes minerales, especialmente el fósforo y nitrógeno. Estos beneficios son debidos en parte a la exploración de las hifas en el suelo en la búsqueda de nutrientes y agua, lo cual amplía con mucho las capacidades de las raíces por sí solas. Los hongos ectomicorrícicos también producen reguladores de crecimiento y estimulan la ramificación y elongación de las raíces alimenticias, por lo cual se incrementa el número total de raíces absorbentes producidas. Este tipo de ramificaciones de las raíces también beneficia la

absorción de nutrientes mediante el incremento de la superficie radical. Algunos hongos ectomicorrícicos producen densos mantos de micelio en el suelo, para la absorción de nutrientes, mientras que otros además producen rizomorfos (largos filamentos de hifas paralelas), que actúan como conductores del flujo de nutrientes hacia y desde las ectomicorrizas. Este tipo de micorrizas también reduce la respiración de las raíces, lo que favorece su longevidad. Aunque los hongos micorrícicos VA no alteran la morfología de la raíz, también exploran grandes volúmenes de suelo con sus micelios externos, y en consecuencia proporcionan agua y nutrientes del suelo más allá de los límites de los pelos absorbentes de las raíces (Fregoso, 1997, Li, 1995, Schenck, 1982).

Las plantas micorrizadas también han demostrado tener gran tolerancia a metales pesados tóxicos, a la sequía, a temperaturas altas del suelo, salinidad, al pH adverso del suelo, a shocks de trasplante y a patógenos de raíces. Debido a estos atributos, las micorrizas son ahora considerados determinantes para el establecimiento de plantas en sitios inhóspitos o lugares altamente erosionados. Además en la agricultura sirven para reducir el uso de fertilizantes y para aumentar la producción de comida y fibra (Fregoso, 1997, Li, 1995, Schenck, 1982).

Los hongos micorrícicos pueden proteger a las raíces contra los patógenos de varias formas. El manto del hongo de las ectomicorrizas proporciona una barrera directa contra la penetración de aquellos. Más aún, muchos hongos de este tipo producen antibióticos antagónicos a algunos patógenos de la raíz (Fregoso, 1997, Li, 1995, Schenck, 1982).

Los viveristas deberán estar conscientes de la interacción de las micorrizas con las enfermedades como otro aspecto de importancia: Las micorrizas protegen indirectamente a las plantas contra muchos tipos de patógenos debido al beneficio en crecimiento. Las plantas saludables, con una nutrición bien balanceada, resisten de mejor forma las enfermedades, que aquéllas con una baja nutrición. Las micorrizas contribuyen de manera vital a la adecuada nutrición de las plantas, y de este modo incrementan de manera indirecta la resistencia a las enfermedades. Dado que el tiempo puede ser crítico para la resistencia, mientras más pronto el hongo micorrícico esté en el sustrato, incrementará el

potencial de control del patógeno. Para asegurarse que las micorrizas se desarrollan en las plantas, los viveristas además deberán proporcionar algún tipo de protección contra los patógenos (Fregoso, 1997, Li, 1995, Schenck, 1982).

En Guatemala los hongos ectomicorrícicos se encuentran distribuidos en la mayor parte de sus zonas de vida, asociadas a pinos, encinos, pinabete y otros. Sin embargo, debido al aumento de la deforestación, se ha creado una nueva ley forestal que busca maximizar la producción sostenible de bienes y servicios del bosque, lo cual no se cumple en la actualidad (Flores, R; Bran, MC. 1998).

Es tal la importancia de los hongos ectomicorrícicos que en países desarrollados ya se utilizan técnicas moleculares para caracterizar sus ácidos nucleicos y obtener una mejor identificación de las especies. Por ejemplo, técnicas basadas en PCR han sido de ayuda para la clasificación de los hongos en aquellos casos en los cuales los caracteres morfológicos son conflictivos, ambiguos o desconocidos (Longato, 1997).

2.4.1 Beneficios en el vivero

Las plantas que no están micorrizadas comúnmente crecen bien en sustratos artificiales, siempre y cuando sea suministrada agua y nutrientes solubles. Los pelos absorbentes de las raíces de este tipo de plantas, no podrán obtener el agua y los nutrientes de manera adecuada del suelo, una vez plantadas en campo, hasta que formen asociaciones micorrícicas (Landis, 1993).

En países en vías de desarrollo sigue vigente el viejo paradigma de que “cualquier ectomicorriza en una planta es mejor que ninguna”, pero está ya confirmado que algunos hongos ectomicorrícicos son mejores que otros, dependiendo de las aplicaciones. Se ha observado que las plantas no micorrizadas presentan retraso en el crecimiento y disminución de su supervivencia, al igual que aquellas que fueron inoculadas con hongos ectomicorrícicos “adaptados al vivero”, una vez plantadas en localidades que requieren de un rápido establecimiento para poder sobrevivir. El tiempo requerido por el sistema

radicular de las plantas para reemplazar el hongo adaptado al vivero por un hongo mejor adaptado a las condiciones del suelo, conduce al incremento de la mortalidad y a la reducción del crecimiento inicial de las plantas (Landis, 1993).

Un programa efectivo de inoculación requiere de hongos micorrícicos que funcionen correctamente en el ambiente de crecimiento de las plantas, tanto en el vivero como en el campo. El programa de inoculación del vivero deberá tener objetivos claros:

1. Reducción del porcentaje de pérdida del vivero.
2. Incremento del cuello de la raíz o del crecimiento apical en el vivero y en terreno.
3. Protección contra agentes patógenos.
4. Rápida colonización micorrícica para evitar achaparramientos.
5. Incremento de la supervivencia en campo (Landis, 1993).

Los viveristas y dasónomos pueden utilizar la inoculación micorrícica como una herramienta en sus trabajos de producción de planta en vivero y de reforestación. Sin embargo la efectividad de las técnicas de inoculación varía tanto por el hospedante como por las especies de hongo, de forma tal que la flexibilidad es vital para su éxito. Un hongo (o un ecotipo aislado) puede satisfacer uno o varios objetivos, para una o varias especies hospedantes (Landis, 1993).

Un programa flexible de inoculación deberá ser capaz de satisfacer algunos objetivos para una parte de la producción, y otros objetivos para la otra parte. Ninguna especie de hongo, cepa o ecotipo, será capaz de satisfacer los diferentes objetivos de todos los viveros (Landis, 1993).

2.5 Aislamiento de hongos ectomicorrícicos

Los hongos ectomicorrícicos se aíslan mejor del esporocarpo, pero también se pueden aislar de micorrizas, esclerocios, rizomorfos y de esporas. Se prefiere el aislamiento de esporocarpos porque requiere poco pretratamiento del material fúngico y porque los hongos se diferencian bien por medio de los esporocarpos y el crecimiento en cultivo *in vitro*. La mayoría de especies de *Suillus* y *Rhizopogon* se aíslan fácilmente y crecen bien

en el cultivo. En el género *Amanita*, especies del subgénero *Amanita* son más fáciles de aislar y crecer en el cultivo que especies del subgénero *Amanitopsis*. Se han aislado pocas especies de *Russula*. El género *Gomphidius* se ha intentado aislar pero sin éxito (Molina, 1982).

Varias especies de géneros importantes se aíslan rutinariamente de esporocarpos: *Alpova*, *Amanita*, *Boletus*, *Cortinarius*, *Hymenogaster*, *Hysterangium*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Melanogaster*, *Paxillus*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Scleroderma*, *Suillus*, y *Tricholoma*. Sin embargo, el aislamiento siempre es difícil debido a contaminación del medio, simbiosis con bacterias u otros microorganismos y poco o ningún crecimiento en varios intentos (Molina, 1982).

2.5.1 Crecimiento en cultivo puro

La manipulación experimental de cultivos de hongos ectomicorrícicos ha sido crítica en el desarrollo de todas las fases de investigación. Los estudios de cultivo *in vitro* proveen conocimientos sobre los procesos simbióticos de estos hongos, por ejemplo: las respuestas de crecimiento frente al pH, temperatura, regímenes de humedad, interacción con otros microorganismos, fisiología de los carbohidratos, minerales y producción de enzimas y hormonas. Los estudios comparativos de especies iguales o diferentes proveen una base para seleccionar los aislamientos adecuados para futuros inóculos artificiales (Molina, 1982).

Nutrientes

La mayor dificultad para aislar especies de hongos ectomicorrícicos se debe a la ignorancia sobre los requerimientos nutricionales exactos que derivan del hospedero.

- a) **Fuentes de Carbono.** La D-glucosa, es utilizada por casi todos los hongos ectomicorrícicos. Por esta razón se incluye como la única o principal fuente de carbono en medios sintéticos y como la fuente principal o suplementaria en los substratos semisintéticos. Las concentraciones más usadas son 5, 20 y 30 g/l. Un buen número de hongos no utiliza otros compuestos de 6 carbonos. Los azúcares

con 3, 4 y 5 carbonos no se usan ya que el crecimiento es pobre. Entre los disacáridos, la celobiosa, maltosa, trealosa, y sucrosa son satisfactorios para varios aislamientos. Sin embargo, a altas temperaturas la sucrosa puede disociarse a glucosa y fructosa y podría bajar la acidez (Molina, 1982, Oort, 1981).

Pocos aislados crecen bien sobre trisacáridos o alcoholes de 3 a 6 carbonos. Los polisacáridos solubles se utilizan más que los insolubles y sus derivados. Algunos ácidos orgánicos o sus sales, como el cítrico, fumárico, málico, propiónico y succínico, permiten el crecimiento de algunos aislamientos. Los iones fosfato en concentraciones por encima de aquellas usadas comúnmente pueden reducir el crecimiento actuando sobre algunos grupos de carbohidratos. Los acetatos generalmente son inhibidores (Lei, 1995). Algunos lípidos se utilizan como fuente de carbono. Por ejemplo, se ha investigado la triolina aunque con resultados poco satisfactorios (Oort, 1981).

- b) **Fuentes de Nitrógeno.** El cloruro de amonio (0.5 g/l) y el nitrato de amonio (1.0 g/l) se usan comúnmente como fuentes suplementarias de nitrógeno en soluciones nutrientes semisintéticas. En formulas sintéticas, el tartrato de amonio (0.5, 1, y 5 g/l) se usa más. Otras sales de amonio en 0.25-1.0 g/l y la asparagina en 1.0-1.3 g/l son satisfactorios (Molina, 1982, Oort, 1981).

Puesto que los nitratos casi no se utilizan, el nitrato de amonio es probablemente una buena elección para intentos iniciales de aislamientos de nuevas especies. Con el uso de compuestos inorgánicos se puede esperar en ocasiones un aumento o caída rápida de pH si la solución no está buferada. El tartrato de amonio es un buffer, así como el fosfato dibásico o monobásico de potasio, quizás por eso explican su uso preferencial como fuentes de nitrógeno. Sin embargo en procedimientos que se necesita la exclusión de algún carbono adicional y posiblemente utilizable, usualmente excluyen el uso de tartrato de amonio, sales de amonio, y otros ácidos orgánicos, asparagina y otros componentes proteicos. Además, varias de estas sustancias son reguladores de crecimiento, lo que los

convierte en algo indeseable para estudios de regulación del crecimiento (Molina, 1982).

Otras fuentes de nitrógeno importantes son la peptona (2, 4 o 6 g/l), caseína (2 g/l) y mezclas de aminoácidos. Por otro lado, se ha demostrado que los aminoácidos promueven el crecimiento cuando se agregan en familias o solos como el ácido glutámico, pero la preferencia de estos compuestos varía con cada especie (Molina, 1982).

- c) **Minerales.** La experiencia indica que el fósforo, potasio, azufre y magnesio deben estar presentes en cantidades relativamente grandes y que el cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc en pequeñas cantidades para el crecimiento de casi todos los hongos. El potasio y el fósforo se agregan como fosfato di-hidrogeno de potasio en 0.5 g/l o 1.0 g/l. El magnesio y el azufre se agregan usualmente como sulfato de magnesio en 0.5 g/l (Molina, 1982, Oort, 1981).

En la mayoría de soluciones semisintéticas y en varias de las sintéticas, se agrega por lo menos un micronutriente, más como un simple químico que como una solución compuesta. El hierro en la forma de cloruro férrico alrededor de 0.005 g/l es común aunque 1.0-3.0 ppm se consideran como la cantidad esencial. Desafortunadamente, el cloruro férrico se difunde en la mayoría de tipos de vidrio, lo que hace que se guarde en una solución stock a baja temperatura. Por eso, el nitrato férrico, el sulfato férrico, o el citrato férrico a menudo se sustituyen en un macronutriente (Molina, 1982).

Las sales inorgánicas de hierro precipitan en grandes cantidades cuando el pH sube arriba de 4.0. Las sales férricas orgánicas o inorgánicas acompañadas por un ácido orgánico permanecerán en solución. Ahora se ha incorporado un producto de hierro quelatante, Sequestrene, de Geigy (penta-acetato dietilenti-amino férrico de sodio) en los medios sintéticos en cantidad de 0.02 g/l con buenos resultados (Molina, 1982).

El zinc se agrega a casi todas las fórmulas sintéticas y semisintéticas como sulfato de zinc en niveles de 1 a 5 mg/l. Concentraciones, inclusiones de cobre y manganeso, los cuales probablemente son esenciales, por lo menos en algunos aislados, no son frecuentes (Molina, 1982).

El calcio, como cloruro de calcio, se agrega más a menudo que el manganeso. Las cantidades varían entre 50 y 200 mg/l con 55.5 mg/l (5 ml de una solución 0.1 M) como la más usada. Cationes como el calcio, hierro y zinc se vuelven no disponibles a pH cerca de 7.4, pero un pH elevado no es frecuente con estos acidófilos (Molina, 1982, Oort, 1981).

- d) **Microelementos, vitaminas y reguladores del crecimiento.** Algunos suplementos como sales de ácido húmico, elementos traza y soluciones nutritivas complejas se han usado en el crecimiento de hongos ectomicorrícicos como *Boletus sp*, *B. edulis*, *Suillus grevillei*, *S. luteus*, *Gomphidius viscidus*, *Xerocomus chrysenteron* y *Cortinarius sp*. Estos suplementos generalmente han tenido un efecto beneficioso sobre *Boletus* estimulando la producción de hifas en cultivo líquido. También estimulan la formación de raíces ectomicorrícicas y el crecimiento de semillas asociadas a *Pinus elliotii* y *P. tabulaeformis* (Lei, 1995).

En cuanto a las vitaminas, la dependencia de los hongos a la tiamina está bien establecida, mientras que la biotina, ácido fólico e inositol también se consideran como factores que promueven el crecimiento. Unos pocos hongos no necesitan obligatoriamente la biotina. Ninguna vitamina se agrega regularmente a los medios semisintéticos. La tiamina se agrega a la mayor parte de las soluciones sintéticas usualmente en 50 µg/l pero varía entre 1 y 100 µg/l. La biotina se agrega también a algunas soluciones antes de la esterilización. La tasa usual es de 6 µg/l o 10 µg/l. Ambas se deberían agregar si el hongo no ha sido previamente aislado (Molina, 1982, Oort, 1981).

La estimulación de crecimiento por otros reguladores del crecimiento es frecuente; la supresión de crecimiento no es probable en las concentraciones usadas, por ejemplo menos de 1.0 g/l. La inoculación de compuestos simples y mezclas naturales, por ejemplo hidrolizado de caseína, frecuentemente aumentan el crecimiento pero raramente a un nivel significativo. La fórmula duplicada de aminoácidos reportada para estimular al hidrolizado de caseína y los complejos de vitaminas o ambos en 1.0 mg/l, podrían ayudar a iniciar o aumentar el crecimiento del cultivo (Molina, 1982).

Compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoides (quercetina y naringina), tienen efectos de inhibición y promoción del crecimiento en relación directa con su concentración.

Aparentemente la oxidación de estas sustancias por acción enzimática genera promotores de crecimiento, como el peróxido de hidrógeno, al que se le atribuyen varias funciones, como la de sustancia oxidante de los componentes del sustrato, permitiendo degradar más fácilmente la celulosa y otros polímeros (Duran, 1997, Schenck, 1982).

2.5.1.1 Condiciones ambientales para cultivos puros

En cultivo puro, las respuestas son específicas para cada aislamiento, pero la mayoría de hongos son acidófilos (pH óptimo 4.5-5.0, rangos 3.5-6.0), aerobios (requieren oxígeno gaseoso), mesófilos (óptimo entre 18°C 26 °C) y fotoinactivos (no hay inducción de zonación o pigmentación). La estabilización del pH con buffers es posible pero complicara algunos procedimientos experimentales especialmente si están involucrados los fosfatos, ácidos orgánicos o sus sales (Akira, 1994, Molina, 1982, Yoshie, 1994)

Se han estudiado condiciones de cultivo para el crecimiento de cepas de *Pisolithus tinctorius* asociados con pino Masson (*Pinus massoniana*) utilizando diferentes temperaturas y composiciones de medios. Estudios mostraron que en cultivo puro, el crecimiento óptimo fue de 25 °C, el pH de la solución de cultivo fue de 5.5, y las fuentes de carbono y nitrógeno más efectivas fueron glucosa y amonio inorgánico (Molina, 1982).

2.5.1.2 Mantenimiento de hongos ectomicorrícicos en cultivo puro

Cuando los cultivos de hongos ectomicorrícicos se necesitan por varios años, los cultivos de semilla primaria se deben mantener separados de los cultivos de trabajo. Los cultivos madre comúnmente se guardan sobre un agar nutritivo bajo refrigeración (3-5 °C), en agar MMN, BAF, Modess o PDA. Cada aislado se transfiere cada 3 o 4 meses (Molina, 1982, Oort, 1981).

Los cultivos transferidos se incuban a 20-23°C hasta que el micelio esté firmemente establecido sobre el agar y luego se refrigeran hasta el próximo período de transferencia. Con este régimen, los cultivos crecen lentamente durante la mayor parte de su vida de almacenamiento y tienen menos oportunidad de modificar su fisiología (Molina, 1982).

No todos los hongos ectomicorrícicos se almacenan bien bajo tales condiciones; algunos prefieren temperaturas de incubación más alta o transferencias más frecuentes. Varios de ellos cambian su hábitat de crecimiento y pueden perder su habilidad para formar ectomicorrizas después de largos periodos de almacenamiento. Sin embargo, otros podrían conservarse por 3 años o más en agua fría estéril a 5 °C en obscuridad (Molina, 1982).

Esta técnica no se trabaja con todos los hongos, por lo que debe examinarse cada aislamiento para conocer la recuperabilidad de este sistema antes de llevar los cultivos de semilla primaria para almacenamiento. Se deben tener descripciones completas de cada aislado. Si los aislados se usan en inóculos experimentales y luego son reaislados, los nuevos aislados deben tener un número diferente de identificación y las condiciones experimentales deberían anotarse (Molina, 1982).

2.5.2 Medios de cultivo semisintéticos

Las formulaciones semisintéticas son las más usadas para la propagación, preparación del inóculo, almacenaje en agar, fructificación y otros procedimientos experimentales entre ellas de Hagem, modificado por Modess en 1941 y la solución MMN (Modified Melin Norkrans) ver cuadro 24A., la cual representa un enriquecimiento de la fórmula ideada por Marx a partir de una fórmula de Melin Norkrans. La solución original era una fórmula sintética (sin extracto de malta) con sólo 25 µg de tiamina y 2.5 g de glucosa. La fórmula usada en el este de Europa a menudo repone o aumenta al extracto de malta con caseína, hidrolizado de levadura o ambos. Otros usan el agar papa dextrosa (PDA) y en Rusia han usado la col dextrosa (CD) agregando una solución al 0.5% de tiamina con una tasa de 1.0 ml/10 l de solución nutritiva (Newsham, 1994).

El medio GPY (20 g de glucosa, 5 g de polipeptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.2 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ en 1 litro de agua destilada con 1.5% de agar) también se ha usado como medio semisintético. El agar Glucosa-Extracto de Levadura se ha usado para examinar contaminación por microorganismos (Akira, 1994, Yoshie, 1994).

Existen algunas investigaciones sobre la eficacia de los medios de cultivo. Un estudio realizado en Holanda para investigar los requerimientos nutricionales de especies de *Lactarius* y sus características de cultivo, utilizaron el medio BAF (Moser, 1960) y Modess (1941) para aislamiento y propagación, ver cuadro 25A. Ambos medios han sido utilizados en Europa para el cultivo de basidiomicetos micorrícicos y probaron ser los más satisfactorios entre varios (Oort, 1981).

2.6 Elaboración de medios para el cultivo de hongos ectomicorrícicos

Los medios de cultivo para hongos deben realizarse de modo ajustado, para que los resultados de los experimentos puedan ser replicados posteriormente. El medio adecuado dependerá del hongo que deseemos aislar y en algunos casos de la fuente de inóculo. Dos de los medios más empleados y que ofrecen buenos resultados son MMN y PDA (véase cuadros 24A y 25A).

2.7 Importancia y selección de los hongos para inóculo

Todos los hongos ectomicorrícicos son importantes para el hospedero con el que interactúan; sin embargo para procesos de micorrización hechos por el hombre, se debe dar prioridad a ciertas especies por su capacidad de infección, rápida micorrización, protección contra fitopatógenos, afinidad de hospedero y producción de cuerpos fructíferos comestibles. Algunas de las especies que crecen en Guatemala son: *Pisolithus tinctorius*, *Laccaria amethystina*, *Laccaria bicolor*, *Suillus granulatus*, *Scleroderma spp*, *Boletus edulis*, *Cantharellus cibarius*, *Amanita rubescens*, *Lactarius spp*, *Alpova spp*, *Tylopilus spp* y *Russula delica*, hongos de los cuales se ha demostrado en otros países, con cepas nativas del lugar, que tienen las características antes mencionadas (Flores, 1998).

2.8 Fuentes de inóculo y técnicas de inoculación

Las tres principales fuentes para la micorrización e inoculación con micorrizas en los viveros que producen en contenedor son el suelo, las esporas y los micelios vegetativos. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas, dependiendo de los objetivos y del costo del programa de inoculación (Landis, 1993).

2.8.1 Inoculación con suelo

Históricamente, el inóculo de suelo obtenido debajo de árboles hospedantes ha sido utilizado de manera extensiva, particularmente en los países en desarrollo. En los viveros a raíz desnuda, hasta 10% en volumen de suelo inoculado es incorporado a la cama de crecimiento (aproximadamente los 10 cm de la capa superior de la cama) antes de realizar la siembra. Este método requiere grandes cantidades de suelo cada año. Una de las más serias desventajas de este tipo de inóculo, es que las semillas, rizomas de malezas y patógenos potenciales, pueden ser transportados de forma accidental hacia el vivero a través del suelo. Otra desventaja es la inconsistencia en la calidad del inóculo, debido a los diferentes momentos y fuentes de abastecimiento de suelo. No se recomienda este método a menos que no existan otras formas de inoculación (Landis, 1993).

2.8.2 Inoculación con esporas

Las esporas o cuerpos de fructificación macerados de algunos hongos macromicetes, *Sclerodermatales* y trufas (y falsas trufas) ectomicorrícicas, proporcionan buen inóculo. Las trufas (ascomicetos) y las falsas trufas (basidiomicetos), referidas ambas como trufas de ahora en adelante, resultan excelentes para esto, dados que sus cuerpos reproductores principalmente del tejido que sostiene esporas y sus cuerpos de fructificación pueden ser bastante grandes (Landis, 1993).

Para preparar la inoculación por esporas, los cuerpos reproductores recién recolectados son enjuagados con agua corriente para remover el suelo adherido o la materia orgánica, posteriormente se cortan en pequeños trozos (de 1 a 3 cc) y finalmente se agrega agua potable a presión por un espacio de 2 a 3 minutos, hasta que las partes queden completamente licuadas. Se ha encontrado que no es necesario purificar la suspensión. Li y Castellano (1987) y Li (1987), encontraron microorganismos benéficos tanto dentro como en el exterior de los cuerpos reproductores maduros de varios hongos ectomicorrícicos (Landis, 1993).

Las concentraciones de esporas dentro de la suspensión resultante son determinadas mediante un hemacitómetro (contador de células sanguíneas) y es almacenada bajo refrigeración en completa oscuridad (5° C) hasta que vaya a ser usada. Se recomienda utilizar esporas frescas siempre que sea posible, aunque se ha almacenado suspensión de esporas, de diferentes especies del género *Rhizopogon* hasta por tres años, sin una reducción significativa en la efectividad de la inoculación (Landis, 1993).

Las esporas son aplicadas de seis a doce semanas luego de la siembra, ya sea mediante una regadera común o a través del sistema de riego. La mayoría de las esporas de trufas tienen un diámetro menor a 50 µm y puede pasar libremente a través de la mayoría de los filtros y boquillas de riego. La cantidad deseada de esporas es mezclada dentro de una regadera que contiene suficiente agua para cubrir un determinado número o superficie de plantas. La aplicación de esporas dos veces, con una separación de dos o tres semanas, funciona mejor para asegurar una distribución uniforme, especialmente cuando se usa el sistema de riego, en lugar de regaderas manuales (Landis, 1993).

Como sucede con la inoculación vegetativa, no todos los hongos pueden ser inoculados de manera efectiva con este método. El inóculo no está libre de otros organismos, pero en siete años de experiencia con este tipo de inóculo, no se ha encontrado ningún efecto dañino en las plantas que han sido tratadas. Los cuerpos reproductores usados para la preparación de la suspensión sólo están disponibles en ciertas épocas del año, y a diferencia de la inoculación vegetativa, la constitución genética de las esporas variará año con año y de lugar a lugar (Landis, 1993).

2.8.3 Inoculación con micelio

Muchos investigadores se han concentrado en la producción y utilización de cultivos puros de inóculo de hongos micorrícicos selectos. Molina y Palmer (1982) detallan el aislamiento y mantenimiento de cultivos ectomicorrícicos. Marx y Kenney (1982) trabajaron en la producción de inóculo ectomicorrícico. Básicamente, un cultivo puro de un hongo en particular es obtenido mediante el aislamiento de material fúngico (germinación de esporas

o explantes de tejido vegetativo) en un sustrato especial, para después ser cultivado bajo condiciones asépticas para la producción del inóculo. El inóculo así obtenido, usualmente producido en un sustrato de turba de musgo, y humedecido con una solución nutritiva, se mezcla con el sustrato de los contenedores antes de que éstos sean llenados y sembrados (Landis, 1993).

La inoculación vegetativa tiene un costo inicial alto y demanda más trabajo que el método de inoculación por esporas. De la misma forma que en la inoculación por esporas, las diferentes especies de hongos también varían en su efectividad en la inoculación vegetativa. Por ejemplo, *Rhizopogon vinicolor* se desarrolla bien en un sustrato artificial, pero no es efectivo en la colonización de raíces activas, cuando es usado como inóculo vegetativo (Landis, 1993).

2.9 Selección de hongos y variación ecotípica

Los hongos micorrícicos compiten entre sí o con microorganismos constantemente por espacio de crecimiento en la rizósfera de la planta. De la misma forma en que los hongos micorrícicos pueden ser antagónicos con ciertos patógenos, existe también antagonismo con otros hongos micorrícicos. En cultivos puros, algunas especies del género *Rhizopogon* producen sustancias químicas que inhiben a hongos como *Cenococcum geophilum*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius* y *Thelephora terrestris*. La comprensión de las interacciones competitivas entre los hongos micorrícicos, permitirá seleccionar las especies de hongos, por su capacidad para dominar el sistema radicular luego de la inoculación, y para continuar proporcionando beneficios selectos en las plantas cuando han sido establecidas en campo (Landis, 1993).

La influencia de la composición genética de distintas especies de hongos, en su capacidad para formar micorrizas con hospedantes de diferentes fuentes de semilla, no ha sido estudiada.

Aún dentro de la misma especie, los hongos aislados procedentes de diferentes hábitat tienen características morfológicas diferentes. La aplicabilidad de la inoculación de especies hospedantes procedentes de una fuente específica, con un ecotipo de hongo en particular, tiene el potencial de acoplamiento entre el hongo y el hospedante para determinado hábitat (Landis, 1993).

2.10 Evaluando el éxito de la inoculación

Debido a la diversidad de las especies, condiciones de crecimiento y técnicas de manejo en los viveros que producen en contenedor, las inoculaciones micorrícicas que producen buenos resultados en un vivero, pueden no funcionar en otros. Se recomienda que en cada vivero se realicen pruebas a pequeña escala sobre el manejo de las micorrizas, antes de realizar el proceso de inoculación en todo el vivero (Landis, 1993).

Algunos miles de plantas son más que suficientes para realizar las primeras pruebas. En los programas de inoculación hay que asegurarse de incluir pruebas con alguna variación con respecto a los procedimientos normales, por ejemplo, variar el tipo de esporas, el tiempo de aplicación, los niveles de fertilización y los tipos de fertilizantes, de forma tal que se pueda aprender cómo las prácticas de manejo interactúan con el éxito en la inoculación. Adicionalmente, es recomendable apoyarse de un estadístico o investigador, quien pueda auxiliar en el desarrollo de un diseño experimental simple, para facilitar el análisis de resultados (Landis, 1993).

2.11 Factores que afectan el desarrollo micorrícico

2.11.1 Desarrollo de raíces

Las raíces laterales primarias de las coníferas que son producidas en contenedor, comúnmente crecen hacia las paredes del contenedor para posteriormente descender 10 a 15 cm de forma paralela a éstas. Este crecimiento inhibe la formación de las raíces laterales secundarias; muchas de las raíces continúan esta tendencia de crecimiento después de que han sido plantadas en campo. En el terreno de plantación, la parte superior del perfil del suelo (10-15 cm) usualmente tiene grandes cantidades de oxígeno,

humedad y disponibilidad de nutrientes, lo cual es propicio para una gran actividad microbiana. Para asegurar el establecimiento de las plantas una vez plantadas, es deseable que las raíces absorbentes y las micorrizas puedan explorar las capas superficiales del suelo (Landis, 1993).

Las técnicas de vivero para manejar el sistema radical de las plantas producidas en contenedor y promover el crecimiento potencial de las raíces una vez plantadas, son relativamente nuevas. Una se logra mediante el impregnado de las paredes internas de los contenedores con pintura de látex, que contenga un químico que promueva la auto-poda de las raíces. Después de que la pintura ha secado, los contenedores son llenados con sustrato, realizando la siembra de manera normal (Romero *et al.*, 1986).

2.11.2 Fertilización

Las micorrizas y los hongos micorrícicos son extensiones del sistema radicular de las plantas; extraen los nutrientes y agua del suelo y los transportan hacia su hospedante. Las plantas responden a la formación de micorrizas más fuertemente en suelos de baja fertilidad. La mayoría de los hongos micorrícicos están adaptados a condiciones de baja fertilidad de suelos forestales. Muchos hongos micorrícicos no crecen bien en sustratos artificiales, que continuamente son saturados con altas cantidades de fertilizantes solubles o mejorados con fertilizantes de lenta liberación. La inhibición micorrícica debido a los altos niveles de fertilización, más la carencia de propágulos de hongos micorrícicos en los sustratos artificiales, representan el mayor reto para los programas de manejo de micorrizas (Landis, 1993).

Debido a que las diferentes especies de hongos micorrícicos responden de manera distinta a la fertilización, se pueden utilizar hongos adaptados a las condiciones de fertilidad en el vivero, o la aplicación de fertilizantes puede ser modificada para promover la colonización de hongos deseables pero sensibles a la fertilización. Por ejemplo, altos niveles de fertilización soluble con NPK reducen la formación micorrícica de *Pisolithus tinctorius*. La reducción de los niveles de fertilización a un 50%, puede duplicar la colonización micorrícica para algunos hospedantes (Marx *et al.*, 1982). Por otra parte,

algunos hongos como *Laccaria laccata* y *Rhizopogon vinicolor* son mínimamente afectados por los altos niveles de fertilización soluble. La inoculación con estos hongos en viveros comerciales ha sido exitosa sin alterar los regímenes rutinarios de fertilización (Landis, 1993).

2.11.3 Riego

Tanto el exceso como la escasez de agua reducen la formación de las raíces absorbentes. Muchos viveros riegan sus plantas diariamente a punto de saturación todos los días. Un síntoma de riego excesivo es la formación de “raíces de agua”, las cuales son gruesas, carnosas, y de color opaco, carentes de micorrizas y de pelos absorbentes. Este tipo de raíces en el vivero actúan como grandes esponjas que rápidamente absorben el agua y los nutrientes solubles. Éstas carecen de las raíces activas que son necesarias para la formación micorrícica, y esencialmente no son funcionales para la absorción de agua y nutrientes en el campo definitivo. Se ha observado que las “raíces de agua” mueren y se descomponen rápidamente una vez que la planta ha sido plantada en campo; además estas raíces se han observado en situaciones extremas algunas veces, comúnmente en sustratos compactados. Cuando existen sustratos con una buena porosidad, el riego excesivo no causa ningún problema. La calidad de la turba es crítica: turba de baja calidad, con un gran porcentaje de partículas finas provocará que el sustrato tenga mal drenaje. Adicionalmente, anillamientos del xilema provocados por algunos insectos, pueden favorecer la formación de “raíces de agua”, debido a la restricción del flujo del agua hacia la parte aérea. De nuestra experiencia, algunas pruebas de inoculación han fallado debido a que los hongos no pueden formar ectomicorrizas, por la excesiva formación de “raíces de agua”. El peso seco de las raíces no es un buen indicador de la calidad del sistema radical; un sistema con gran cantidad de “raíces de agua”, puede tener la misma biomasa seca que otro que cuente con muchas raíces absorbentes (Landis, 1993).

Las plantas que han sido de alguna manera sobreirrigadas (aunque sin llegar al punto de contar con excesivas raíces hinchadas), desarrollan muchas raíces con pocas o nulas ramificaciones laterales cercanas a las paredes o en la base del contenedor. En estas plantas, el desarrollo óptimo de las raíces absorbentes, y por lo tanto de las micorrizas,

ocurre solamente en la parte interna y cercana a la parte superior del cepellón, donde la aireación es mejor. Estas plantas presentan un potencial de regeneración del sistema radicular extremadamente pobre, una vez que son plantadas en campo (Landis, 1993).

Para evitar la formación de “raíces de agua”, y por lo tanto favorecer el buen desarrollo de las raíces absorbentes y la formación de ectomicorrizas, los viveristas deberán examinar de manera regular los sistemas radiculares, y modificar de forma apropiada los regímenes de riego. Tal como se enfatizó anteriormente, esta deberá ser una práctica regular cuando se evalúan las raíces y la calidad de las plantas en general, durante la estación de crecimiento (Landis, 1993).

2.11.4 Sustrato

Las características físicas y químicas del sustrato influirán en el éxito de los programas de inoculación micorrícica. El tamaño de los poros, su distribución y su pH (niveles óptimos y tolerancia), afectarán en forma directa no sólo la formación de raíces absorbentes y su distribución, también el desarrollo micorrícico. Un sustrato compactado no sólo inhibirá la formación de raíces absorbentes, sino que también inhibirá la extensión de raíces laterales y activas. El alto porcentaje de musgo (turboso) en la mayoría de los medios de crecimiento, afecta sus propiedades físicas y químicas, esto es su pH. De observaciones en campo se infiere que algunos hongos micorrícicos prefieren suelos con alto contenido de materia orgánica (por ejemplo, residuos de madera en descomposición con pH=4), mientras que otros crecen mejor en suelos minerales con poca materia orgánica (por ejemplo, áreas recientemente incendiadas, con pH=7). Los hongos ectomicorrícicos tienen diferentes niveles óptimos de pH para crecer en cultivos (Hung y Trappe, 1983). Algunos de ellos crecen de igual forma sobre un intervalo de pH relativamente amplio, mientras que otros son menos tolerantes. Por ejemplo, *Pisolithus tinctorius* forma más ectomicorrizas con valores de pH que van desde 5.5 a 6.5, cuando son inoculados en plantas de *Cayia illinoensis*.

La compactación del sustrato no parece eliminar el crecimiento del hongo, pero reduce marcadamente la formación de raíces absorbentes, las cuales son necesarias para la colonización ectomicorrícica. El sustrato en el contenedor deberá proporcionar una

adecuada porosidad para el intercambio de oxígeno, el cual promoverá un crecimiento vigoroso tanto de las raíces, como del hongo. Se recomienda seleccionar aquellos hongos que crecen mejor sobre un amplio intervalo de pH del sustrato, para la inoculación en vivero (Landis, 1993).

2.11.5 Temperatura

Así como con el pH, los hongos ectomicorrícicos tienen intervalos de tolerancia a temperaturas. Las temperaturas del sustrato en los contenedores pueden variar ampliamente, desde los 0°C durante el invierno o en el almacenamiento antes de la plantación, hasta los 38 °C durante el verano. Algunos hongos micorrícicos pueden tolerar esta amplia fluctuación de temperaturas durante el período de producción, pero otros no (Landis, 1993).

2.11.6 Plaguicidas

Los plaguicidas provocan una multitud de reacciones complejas sobre organismos objetivo y no objetivo. Las generalizaciones sobre las reacciones a los plaguicidas deben abordarse con precaución. Por ejemplo, los plaguicidas que afectan a los hongos micorrícicos o su desarrollo, pueden influir de manera positiva o negativa el crecimiento de las plantas (Landis, 1993).

Una de las conclusiones de Carrillo Sánchez (2000) fue “El uso de fungicidas en vivero, necesario para el cultivo de pino carrasco, dada su sensibilidad a los hongos patógenos, en esta fase del desarrollo, no afecta negativamente el proceso de micorrización controlada”.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 Antecedentes

En Guatemala se han realizado ya varios estudios sobre hongos micorrícicos y procesos de micorrización con plantas y hongos nativos.

Culajay (1999) concluyó:

- *Pisolithus tinctorius* EV-1.98, *Pisolithus tinctorius* Pop-1.98 son las cepas que mas rápido iniciaron su crecimiento respecto a otras cepas
- El medio BAF es el medio que mas favorece el crecimiento para: *Amanita rubescens* PC-1.97, *Boletus aff aestivalis* Flo-1.98, *Laccaria bicolor* España, *Lactarius indigo* Ard-1.98, *Pisolithus tinctorius* EV-1.98, *Pisolithus tinctorius* Pop-1.98 y *Tylopilus sp* Flo-1.98. respecto a MMN y PDA.
- El medio Papa Dextrosa PDA es el medio que mas favorece el crecimiento para *Alpova sp* Chi-1.98, *Laccaria bicolor* Chi-1.97 y *Suillus sp* Chi-1.97.
- *Pisolithus tinctorius* EV-1.98 y *Pisolithus tinctorius* Pop-1.98 son las cepas que produjeron mayor cantidad de biomasa.

Una de las conclusiones más importantes de Berduo (2000) es:

- El inóculo de *Laccaria aff bicolor*, produjo su mejor infectividad a una dosis de 1:8; sin embargo, la dosis 1:16 es estadísticamente similar en la formación de micorrizas y beneficio a la anterior. La utilización de la dosis 1:16 permite un ahorro significativo en cuanto a insumos para la producción de inóculo vegetativo.

Las conclusiones relevantes de Mendez (2002) son:

- La utilización del sustrato *Luffa cylíndrica* más broza con esporas es el más económico del experimento, y su respuesta comparado con peat moss (turba) más vermiculita. Los parámetros de crecimiento y desarrollo se consideran buenos indicadores de su respuesta.
- La utilización de inóculos miceliares de *Laccaria bicolor*, produjo mayor altura, peso fresco de la parte aérea, radical y porcentaje de micorrización.

Urizar (1999) concluyó:

- La utilización de contenedores y sustrato de turba mas vermiculita es efectiva para la producción de planta micorrizada, ya que facilita la extracción y manejo de plantas para estudios de observación.

Madrid Rosales (2003) concluyó:

- La concentración de 3×10^5 esporas/ml de solución es la que mejores resultados aportó para la variable de altura de las plántulas
- La concentración de 2×10^5 esporas/ml de solución es la que mejores resultados apporto en cuanto a diámetro de las plántulas, peso fresco, peso seco, y porcentaje de plántulas sanas.

3.2 Ubicación geográfica de la investigación

La Escuela Nacional Central de Agricultura ENCA, se encuentra ubicada en la finca Bárcena, del municipio de Villa Nueva, departamento de Guatemala., con una altitud de 1440 metros en promedio sobre el nivel del mar, con latitudes y longitudes de $14^{\circ} 31' 15''$ L N. a $90^{\circ} 38' 18''$ L W. y $14^{\circ} 32' 30''$ L N. a $90^{\circ} 38' 35''$ LW. (IGN, 1976).

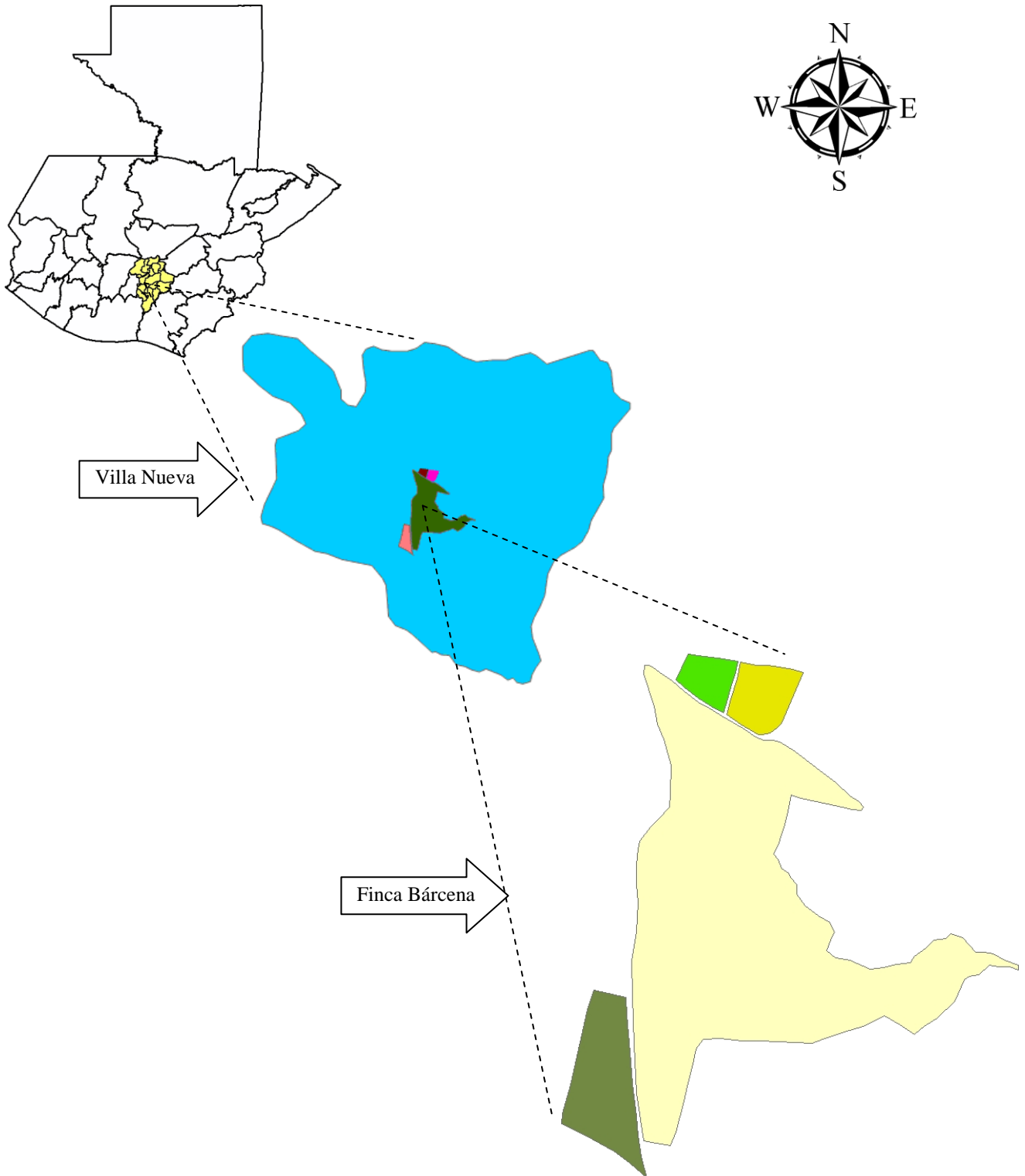


Figura 2. Mapa de ubicación de la Finca Bárcena, Villa Nueva, Guatemala.

Se encuentra situada a 3 kilómetros de la cabecera municipal de Villa Nueva y a 17 kilómetros de la Ciudad Capital.

3.3 Condiciones agroecológicas y recursos naturales de la zona

3.3.1 Zona de vida

La zona de vida en la que se encuentra la ENCA pertenece, según las zonas de vida de Holdrige, al bosque subtropical templado, variando ligeramente a cálido, debido a los cambios climáticos que se han generado por la falta de cobertura de cuerpos de agua, cambios en el uso de la tierra producto del avance de la frontera agrícola y el aprovisionamiento de materias primas para la elaboración de blocks (Herrera, 2009)

3.3.2 Altitud

La finca Bárcena posee altitudes variables: 1,406 msnm al final del río platanitos hasta 1,485 msnm en el consulado oeste, mientras que en las instalaciones administrativas se encuentran a una altura sobre el nivel del mar de 1,445 m. (Corado *et al*, 2000).

3.3.3 Temperatura

La temperatura media anual en la finca Bárcena en el año 2008 fue aproximadamente de 22 ° C. (Corado *et al*, 2000).

3.3.4 Precipitación pluvial

La precipitación pluvial media por año es de 945 mm/año (Corado, *et al*, 2000).

3.3.5 Suelos

Según el mapa geológico los suelos de la ENCA se desarrollaron a partir de la era Cuaternaria y pertenecen a los rellenos y cubiertas gruesas de cenizas pómez de origen diverso (Corado *et al*, 2000).

Morfogénesis

El suelo de la ENCA tiene forma de abanico, el origen de este abanico se debe al aporte de material volcánico de la parte Norte efectuado por los ríos Villalobos, Pinula, Molino y Platanitos (Corado *et al*, 2000).

3.3.6 Pendiente

De acuerdo a Corado *et al* (2000), la ENCA se encuentra dentro de suelos que oscilan entre planos de pendientes inferiores al 4% a fuertemente inclinados, reportando pendientes mayores a 55%.

3.3.7 Fisiografía

De acuerdo a la clasificación fisiográfica – geomorfología, la ENCA se encuentra dentro de la provincia fisiográfica Tierras Altas Volcánicas e influenciado en el gran paisaje del complejo montañoso de la montaña de Carmona, en las cuales se ubican las áreas de la ENCA en el pie de monte, terrazas antiguas, terrazas aluviales y talud cauce del río platanitos (Corado *et al*, 2000).

La ENCA se encuentra ubicada en la región fisiográfica de Tierras Altas Volcánicas la cual se encuentra delimitada por la pendiente volcánica reciente y las tierras altas cristalinas, esta región fisiográfica se caracteriza por tener las montañas y volcanes más altos de la república y los dos volcanes más altos de Centroamérica, está formado por rocas ígneas intrusivas y extrusivas en la cual la actividad volcánica empezó desde el Paleozoico intensificado durante el terciario. En esta región las erupciones de tipo grieta lanzaron cantidades de material principalmente basalto y riodacita que cubrieron las formaciones de tierra preexistente desarrollados sobre el basamento cristalino y sedimentario que se encuentra hacia el norte (Corado *et al*, 2000).

La región natural de tierras altas volcánicas pertenecen las regiones que comúnmente se le conoce como altiplano en el cual toma en cuenta la porción oriente, occidente y central (Corado *et al*, 2000).

En esta región el uso actual está enfocado a bosques, hortalizas (tradicionales y de exportación) y frutales deciduos (Herrera, 2009)

3.3.8 Textura del suelo

Las texturas presentes en toda el área de la Finca Bárcena son: Arena franca, arenoso, franco arenoso y franco arcillo-arenoso (Corado *et al*, 2000).

3.3.9 Agua

El agua que abastece todas las instalaciones de la ENCA proviene de pozos propios de la institución y sirve para todos los servicios internos en ella (Herrera, 2009).

3.4 DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL

3.4.1 *Pinus oocarpa* Schiede ex Schlechtendal.

Árbol, de tamaño mediano a alto de 10-15 o 30-35 metros (dependiendo de la variedad y de las condiciones de sitio). Fuste recto, redondo, usualmente con ramificaciones. Esta especie tiene el mayor rango de distribución en nuestra región y es especialmente abundante en Mesoamérica, parece que fue la especie progenitora que sirvió de ancestro para algunas de las especies de pinos de México y Centro América. Su distribución natural va desde los 29° a los 14° latitud norte. Necesita de 15 a 24° C para un buen desarrollo. Se encuentra en un rango de altura de 500-2300 m, con precipitaciones de 700-3000 mm anuales. Estas variaciones de clima son las más fantásticas en Mesoamérica y son menos pronunciadas particularmente en la parte NW. Se extiende desde el estado de Chihuahua, México, y Guatemala a las más altas elevaciones de Honduras, El Salvador y noroeste de Nicaragua. En El Salvador, Honduras y Nicaragua crece arriba de los 1100 metros. La variedad *P. oocarpa* var. *trifoliata* crece entre los 2000 y 2400 m sobre el nivel del mar (Farjon & Styles, 1997).

Ha sido introducido para producción comercial de madera para la industria papelera: en Ecuador, Kenya, Zambia, Colombia, Bolivia, Queensland (Australia), Brasil y Sudáfrica (Farjon & Styles, 1997, Perry, 1991).

3.4.2 *Pinus maximinoi* Farjon & Frankis (1998)

Sinónimos: *Pinus tenuifolia* Bentham, *P. douglasiana* Martinez, *P. escandoniana* Roezl, *P. hoseriana* Roezl, *P. tzompoliana* Roezl. Para evitar un cambio de nombre y sin sentido, Farjon y Frankis (1998) propusieron conservar el nombre de *P. maximinoi*.

Árbol, de tamaño medio a alto de 20-40 metros, tronco recto, redondo y usualmente sin ramificarse, ramas horizontales, con desarrollo piramidal en la madurez, una gruesa y redondeada corona abierta, las acículas persisten de 2 a 2.5 años (Farjon & Styles, 1997, Perry, 1991).

Perry notó que esta especie es muy común y fácil de ver a lo largo de autopistas importantes. Observó árboles de esta especie en la autopista 15 México de Toluca a Morelia, Patzcuaro y Uruapan, y árboles a lo largo de la 190 México, cerca de San Cristóbal de las Casas en Chiapas; en Guatemala en la pista CA-1 cerca de la ciudad capital. En Honduras a unos pocos kilómetros al este de Tegucigalpa en la pista 4, y en El Salvador cerca del pueblo de la Palma y Chalatenango, cerca de la frontera de Honduras (López, 2007).

3.4.3 *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch

Pisolithus tinctorius es un hongo ectomicorrícico, comestible en estadios juveniles, de enorme importancia en la inoculación de plantas de interés forestal. En el medio sólido, los mayores crecimientos en diámetro e incremento en biomasa se observan en los medios papa dextrosa agar y MNM, en comparación con extracto de malta.

Este hongo ha sido estudiado ampliamente en el extranjero y se ha encontrado que posee una gran tolerancia a las altas temperaturas del suelo. Su capacidad para formar micorrizas es una de las mejores respecto a muchos hongos, además permite un buen manejo en el laboratorio para la elaboración de inóculo tanto en esporas como micelio. (Flores, 1998).

Se puede encontrar desde julio hasta septiembre en suelos estériles, secos y arenosos, en las partes abiertas del bosque, al borde de los caminos. Puede crecer en la proximidad de coníferas (Flores, 1998).

El hongo forma cuerpos fructíferos que están adheridos al suelo por un pie corto y fibroso, parecidos a cordones. Varían en su forma desde redondeados u ovalados y algo aplanados hasta con forma de pera invertida; su tamaño varía desde 5 - 20 cm de alto a 4-10 cm de ancho. La cubierta externa del cuerpo fructífero es delgada, lisa y de color ocre cuando es joven y se vuelve de color pardo oscuro al alcanzar su madurez. Los ejemplares muy jóvenes son blanquecinos por dentro pero se vuelven oscuros cuando se empiezan a desarrollar unas estructuras con forma de arvejas donde se forman las

esporas. Cuando las esporas están maduras, el tejido que las rodea se desintegra y entonces, todo el interior del cuerpo fructífero maduro se llena de una masa pulverulenta de esporas mezclada con algunas hebras. Las esporas quedan libres cuando la delgada cubierta externa del cuerpo fructífero se rompe en fragmentos que se caen. Las esporas expuestas se dispersan por medio de las corrientes de aire, gotas de lluvia y por insectos (Red de la naturaleza, 2008). Ver figura 9A.

Las micorrizas simples miden 0.5-2.0 mm de longitud y 0.5 mm de diámetro, con pedicelos. Las bifurcadas simples van de 2 a 2.5 mm de alto por 1.5 mm de ancho y 1.5 mm de diámetro. Las bifurcadas dobles miden 3-3.5 mm de alto por 2-3 mm de diámetro, con brazos de 0.5 mm de diámetro, pedicelos cortos de 0.5 a 1.0 mm de alto. Las micorrizas coraloides miden 7-8 mm de diámetro por 4 mm de alto con un diámetro de brazos de 0.5 mm.

Micorrizas inicialmente cerosas y con micelio tomentoso amarillento que finalmente las cubre por completo y con una tonalidad beige amarillento, puede presentar exudados de color café-rojizo sobre el micelio externo, particularmente en las axilas de las bifurcaciones. En las maduras el micelio es abundante, apretado, produciendo rizomorfos particularmente desde los ápices y/o de la parte media. Al secarse disminuye el número de hifas externas y adquiere un aspecto compacto-granuloso de color café-rojizo a casi negruzco. Presenta abundantes rizomorfos y cordones miceliares de color blanquecino en las más jóvenes, luego beige dorado y finalmente café a negruzco, al secarse quedan gránulos de secreción negruzco en la superficie (figura 10A).

a) Características comestibles

Esta especie es adecuada para ser empleada con una finalidad bastante singular. Efectivamente, sirve para aromatizar platos y sopas con características similares a las de las trufas. Después de haberla pelado, se corta en rodajas delgadas que se secan. Estas, después, son usadas en salsas o en sopas a las cuales dan un buen sabor que, sin embargo, no es apreciado por todo el mundo. Además, tiñen todo de amarillo. Podría llamarse la trufa de los pobres (Red de la naturaleza, 2008).

b) Guía para su determinación

Se trata de una extraña especie que forma parte de la familia de los gasteromicetos; generalmente tienen forma de balón, pudiendo o no abrirse como en el caso de las bejines. Se caracteriza por la peculiar forma de la gleba, o carne interior, que al corte se presenta extrañamente dibujada, con aspecto de mosaico, como formada por celdillas poligonales o casi esféricas, que contienen cuerpos del tamaño de un guisante o más pequeños, llamados peridiolos, donde están situadas las esporas. En conjunto, es de forma globoidal; a veces, terminando alargada en una especie de pie. Es de color inicialmente amarillo-ocre, luego más oscuro, marrón. Dentro de la película exterior, muy sutil, se encuentra la carne con el aspecto descrito que, sin embargo, se disuelve al madurar en una masa pulverulenta marrón. Los individuos están generalmente fijos al suelo en el cual crecen, y en la parte inferior tienen filamentos de micelio. La carne tiene sabor aromático (Red de la naturaleza, 2008)

3.4.4 *Scleroderma geaster* Fr.

Es un hongo globoso que forma una masa polvorienta cuando madura. No es gelatinoso. Comúnmente se le llama “bola de tierra”. Tiene color amarillo o anaranjado. Es un gasteromiceto y asemeja a *Pisolithus tinctorius*. Es considerado como no comestible. Tiene un grueso y carnoso peridio no sutil y frágil (Flores, 2007).

Cuerpo fructífero de 5 a 10 cm de ancho, subgloboso, aplanado en la parte superior, tallo con una masa micelial bastante extensa. Cutícula gruesa con coloración café, áspera, granular, con segmentos estrellados irregulares. Masa de esporas de color púrpura a café, muy finas. Esporas globosas de 5-10 μm . Inicialmente habita en el interior del suelo emergiendo posteriormente (Flores, 2007). véase figura 11A

Las micorrizas simples miden de 1.0 a 2.0 mm de longitud, 0.3-0.5 mm de diámetro, de color amarillento-anaranjado cubiertas inicialmente de micelio blanco algodonoso un poco laxo y finalmente cubiertas con micelio denso-compacto en las adultas. Micorrizas poco frecuentes y que tienden a crecer en grupos cercanos y más frecuentes en el exterior. Las micorrizas bifurcadas miden de 1.0 a 1.5 mm de longitud, 1.0-2.0 mm de ancho. Las

micorrizas compuestas miden 2 mm de alto por 3.0 mm de ancho y 0.3-0.5 mm de diámetro de brazos, con pedicelos de 1-2 mm de longitud. Rizomorfos blancos que cambian a color beige al envejecer (figura 12A).

3.4.5 *Lactarius indigo* (Schw.) Fries

El lactario de leche azul o índigo es uno de los hongos más fáciles de identificar debido a su color poco común. Todo el hongo, incluyendo el sombrero, el pie y las láminas son de color azul oscuro. Además, si las láminas de un ejemplar fresco se cortan o dañan exudan gotas de "leche" o látex de color azul-índigo profundo. Dicho látex tiñe todas las cosas que se encuentran en contacto con él pero se desmancha fácilmente al lavarse. En los ejemplares viejos, el color del sombrero y del pie, pueden adquirir un color de grisáceo a azul plateado. En los ejemplares jóvenes, el sombrero es convexo con los márgenes incurvados, pero conforme se expande, adquiere una forma de embudo con una depresión central. El sombrero maduro mide de 5 - 15 cm de ancho que se encuentra sobre un pie grueso que mide hasta 8 cm de alto. La superficie del sombrero es lisa y cuando está húmeda es viscosa. Visto desde arriba se pueden ver una serie de anillos concéntricos estrechos y oscuros, especialmente cerca del margen. Las láminas están cerca una de otra y se extienden una distancia corta hacia abajo sobre el pie y dichas láminas siempre son de un color más oscuro que el sombrero o el pie (Díaz, G; Flores, R; Honrubia, M. 2007). véase figura 15A

L. indigo se encuentra en suelos de bosques mixtos, especialmente cerca de los encinos, es ectomicorrícico y comestible. Se pueden encontrar solitarios o en grupos. El color azul es raro entre los hongos y cuando se encuentra un grupo de lactarios azules es un placer visual verdadero (Díaz, G; Flores, R; Honrubia, M. 2007).

Micorrizas algunas veces coraloides, de color amarillento a anaranjado, de hasta 9.0 mm de longitud, ejes principales de hasta 2.1 mm de longitud. Ápices de ramificaciones algunas veces engrosadas de hasta 3.4 mm de longitud y 0.3-0.4 mm de diámetro; rizomorfos raramente presentes, de hasta 78 μm de diámetro (Flores, 2007). Ver figura 16A.

3.4.6 *Thelephora terrestris* Ehrenb

Hongo ectomicorrícico no comestible, se encuentra en la mayoría de viveros de pino, beneficiando a las plantas de pino en sus fases tempranas, incrementando la absorción de agua y nutrimentos. No es la mejor especie micorrícica pero a cambio de nada es muy buena. El color del micelio es blanquecino con longitudes muy largas y variables, recubriendo rápidamente el pilón de la plántula de pino (Trappe, 1977). Véase figura 13A.

Micorrizas simples a bifurcadas simples a algunas veces casi coraloides. Las micorrizas simples miden de 0.5-1.0 mm de alto por 0.5-0.8 mm de diámetro, las bifurcadas simples 1.0 mm de alto, 2.0 mm de diámetro, con diámetro de brazos de 0.5 mm.

Superficie inicialmente cerosa-granulosa con micelio externo laxo a un poco denso de color blanquecino a beige. En micorrizas maduras la apariencia cerosa aumenta. Presenta abundantes rizomorfos de hasta 0.3 mm de diámetro y cordones miceliares inicialmente blanquecinos, luego beige y finalmente café. Los rizomorfos con abundantes proyecciones laterales.

Todas las micorrizas poseen un pedicelo simple o bifurcado claramente diferenciable por el tejido cortical, de hasta 4 mm de longitud. Las micorrizas son más frecuentes en el lado exterior y en los canales del contenedor (véase figura 14A).

4. HIPÓTESIS

La inoculación artificial con hongos ectomicorrícicos produce un alto porcentaje de micorrización, incrementando la altura, biomasa y diámetro de plántulas de pino, respecto a plantas no inoculadas.

5. OBJETIVOS

General:

- Evaluar la producción de micorrizas y su efecto en dos especies de pino (*Pinus oocarpa* y *Pinus maximinoi*), por cuatro especies de hongos ectomicorrícicos, en contenedor.

Específicos:

- Determinar qué especie de hongo micorrícico es más eficiente en la formación de ectomicorrizas (*Lactarius indigo*, *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma geaster* y *Thelephora terrestris*)
- Determinar cuál de las especies de hongos micorrícicos utilizadas produce mayor crecimiento, biomasa y diámetro de las plantas de pino
- Analizar el efecto del uso de inóculo de esporas, de micelio y de micorrizas vivas en la formación de micorrizas en las 2 especies de pino.
- Ensayar este proceso utilizando como sustrato turba (75%) con 25% de illita.

6. METODOLOGÍA

6.1 Desinfección y germinación de semillas

Las semillas se compraron en el banco de semillas del INAB, se limpiaron superficialmente con agua destilada; se eliminaron las semillas vanas por flotación, procediendo a la siembra en arena estéril. A los 60 días después de la siembra, se realizó el trasplante a bandejas o contenedores, con cavidades de un volumen de 160 cc, conteniendo una mezcla de turba (75%) e illita (25%) previamente esterilizada en la autoclave, con un tiempo total de 40 minutos a 120 °C con una presión de 15 libras por pulgada cuadrada.

6.2 Producción de inóculo miceliar

La producción de inóculo miceliar se realizó en el laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y en el laboratorio de la Escuela Nacional Central de Agricultura, según la técnica descrita por Molina y Braine utilizada por Pera con algunas modificaciones. A partir de fragmentos de cuerpos fructíferos de *Lactarius indigo* y *Pisolithus tinctorius* se obtuvo un cultivo puro en medio sólido BAF y Melin Norkans Modificado (MMN) respectivamente, incubado a 26°C durante 25 días. Se tomaron 5 fragmentos de micelio de un centímetro cuadrado incorporándose en frascos de tapón conteniendo 100 ml de medio semilíquido estéril (120°C, 15 minutos), usando el medio BAF para *Lactarius indigo* y MMN para *Pisolithus tinctorius*. Los cultivos semilíquidos se incubaron a 26°C durante 30 días y se agitaron cada 5 días para fragmentar el micelio y conseguir un crecimiento disperso y uniforme.

6.3 Obtención de esporas

Las esporas de *Scleroderma geaster* se obtuvieron a partir de cuerpos fructíferos maduros los cuales se recolectaron en el campo en la época en que empezó la lluvia, siendo en el mes de mayo. Para la aplicación se hizo una solución de esporas en agua destilada. El conteo de esporas se hizo con una cámara de Neuvahuer.

6.4 Obtención de micorrizas

El micelio y micorrizas de *Telephora terrestris* se extrajeron de pilones de plantas de pino existentes en el vivero de la ENCA, para aplicarse de forma directa en la inoculación de las plántulas.

6.5 Dosificación del inóculo

Para evaluar *Lactarius indigo* y *Pisolithus tinctorius* se empleó una dosis general de 1:16 (inóculo:peat-moss), siendo una parte del inóculo que se encontraba en medio semilíquido y dieciséis partes de sustrato que formó parte del pilón de la planta. Para la aplicación de esporas se utilizó una dosis de 2×10^5 esporas/ml, aplicando 10 ml. por planta. En el caso de *Telephora terrestris*, se utilizó una dosis de 1:16 (micelio+micorrizas : sustrato de la planta)

6.6 Factores evaluados

- “A” Cuatro especies micorrícicas (*Scleroderma geaster*, *Lactarius indigo*, *Pisolithus tinctorius* y *Thelephora terrestris*).
- “B” Dos especies de pino (*Pinus oocarpa*, *P. maximinoi*)

6.7 Diseño experimental

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo bifactorial combinatorio, debido a que no existió ninguna gradiente de variación por estar la investigación bajo sárán, estando las plantas en contenedores con iguales condiciones de suelo y clima.

6.8 Tratamientos

Se combinaron los niveles del factor A (4 especies micorrícicas+testigo) con los niveles del factor B (2 especies de pino)

Número de tratamientos= $5 \times 2 = 10$

Número de repeticiones= 5

Número de unidades experimentales= 50

Cuadro 3. Descripción de la combinación de los dos factores evaluados

Descripción tratamiento	Abreviación tratamiento
<i>Lactarius indigo</i> x <i>Pinus oocarpa</i>	T1
<i>Lactarius indigo</i> x <i>Pinus maximinoi</i>	T2
<i>Scleroderma geaster</i> x <i>Pinus oocarpa</i>	T3
<i>Scleroderma geaster</i> x <i>Pinus maximinoi</i>	T4
<i>Pisolithus tinctorius</i> x <i>Pinus oocarpa</i>	T5
<i>Pisolithus tinctorius</i> X <i>Pinus maximinoi</i>	T6
<i>Thelephora</i> sp. x <i>Pinus oocarpa</i>	T7
<i>Thelephora</i> sp. x <i>Pinus maximinoi</i>	T8
Testigo x <i>Pinus oocarpa</i>	T9
Testigo x <i>Pinus maximinoi</i>	T10

Cuadro 4. Distribución de las unidades experimentales

$T_{10}R_4$		T_3R_5	
T_7R_2	$T_{10}R_5$	T_2R_4	T_5R_5
T_4R_5	T_5R_3	T_7R_3	T_8R_5
T_5R_2	T_3R_2	T_8R_3	T_1R_2
T_6R_2	T_2R_1	T_9R_5	T_6R_1
$T_{10}R_3$	T_1R_1	T_8R_1	T_2R_3
T_3R_4	T_4R_2	T_9R_2	T_5R_1
T_1R_3	T_7R_5	$T_{10}R_1$	T_4R_3
T_6R_4	T_3R_3	T_8R_4	T_9R_3
T_9R_1	T_5R_4	$T_{10}R_2$	T_2R_5
T_6R_5	T_7R_4	T_3R_1	T_1R_5
T_9R_4	T_8R_2	T_2R_2	T_4R_4
T_6R_3	T_1R_4	T_4R_1	T_7R_1

6.9 Unidad experimental

Consistió de seis cavidades de 160 cc, conteniendo una planta por cavidad, haciendo un total de seis plantas por unidad experimental, con una sumatoria de 50 unidades experimentales.

6.10 Unidad de muestreo

Debido a que la planta se desechó por destrucción del pilón en el momento de tomar el dato de porcentaje de micorrización, se tomaron únicamente dos plantas por unidad experimental, siendo éstas las que estaban ubicadas en el centro de cada unidad para evitar el efecto de borde.

6.11 Modelo estadístico

$$Y_{ijk} = U + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta observada en la ijk -ésima unidad experimental

U = Efecto de la media general

A_i = Efecto del i -ésimo nivel del factor "A"

B_j = Efecto del j -ésimo nivel del factor "B"

AB_{ij} = Efecto de la interacción entre la i -ésima especie micorrizica y la j -ésima especie de pino

E_{ijk} = Error experimental en la ijk -ésima unidad experimental

6.12 Variables de respuesta

Después de transcurridos cinco meses a partir de la inoculación se determinó el porcentaje de micorrización, altura de las plantas, diámetro, longitud de raíces, peso fresco de la parte aérea, peso fresco de la raíz, peso seco de la parte aérea y peso seco de la raíz.

6.13 Manejo del experimento

El manejo que se le dio al experimento fue igual al manejo general del vivero para que los resultados obtenidos se apliquen a la realidad del vivero, variando únicamente en la disminución de la fertilización, con un total de tres aplicaciones, con una dosis de 2 gramos/litro de Hakaphos® violeta (13-40-13) en la primera aplicación, y la misma dosis en la segunda y tercera fertilización con Hakaphos® azul (20-5-5).

6.14 Análisis de los datos

A las variables de respuesta se les efectuó un análisis de varianza auxiliándose del programa de computación SPSS, determinándose así la existencia o no existencia de diferencia significativa entre las especies de hongos y especies de pino, posteriormente se realizó una prueba múltiple de medias usando el comparador de TUKEY al 5% de significancia.

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Porcentaje de micorrización

En el cuadro 5 se muestran los resultados del Análisis de Varianza (ANDEVA) obtenidos al utilizar el programa SPSS para la variable de respuesta porcentaje de micorrización, con un nivel de confianza de 0.95

Cuadro 5. ANDEVA para porcentaje de micorrización

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: micorrizacion

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	29896,537 ^a	9	3321,837	71,283	,000
Intersección	49520,563	1	49520,563	1062,661	,000
f actorA	29730,408	4	7432,602	159,496	,000
f actorB	105,473	1	105,473	2,263	,140
f actorA * f actorB	60,655	4	15,164	,325	,859
Error	1864,021	40	46,601		
Total	81281,121	50			
Total corregida	31760,558	49			

a. R cuadrado = ,941 (R cuadrado corregida = ,928)

Alta significancia estadística: valor de 0

Significancia estadística: valor entre 0.01 a 0.05

En el factor A, el cual se refiere a especies de hongos micorrícicos, existe alta significancia estadística, habiendo diferencias entre dichas especies. En el factor B, el cual se refiere a especies de pino, no existe diferencia significativa, con un porcentaje de micorrización muy similar en ambas especies de pino (*Pinus oocarpa* y *Pinus maximinoi*). En la fuente factor A * factor B, indica la interacción entre ambos factores, en este caso no existe diferencia significativa entre las especies de hongos respecto a las especies de pino.

La raíz de pino independientemente de la especie es bastante similar, tanto en su morfología así como en su fisiología, con una formación muy similar de micorrizas en las distintas especies de pino.

Cuadro 6. Prueba múltiple de medias Tukey para porcentaje de micorrización

micorrizacion

DHS de Tukey^{a,b}

factorA	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
1,00	10	7,5100			
5,00	10	8,3670			
4,00	10		26,2300		
2,00	10			42,2980	
3,00	10				72,9490
Significación		,999	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo II

El término error es la Media cuadrática (Error) = 46,601.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000

b. Alfa = ,05.

Niveles del factor A:

1: *Lactarius indigo*

2: *Scleroderma geaster*

3 *Pisolithus tinctorius*

4: *Telephora terrestris*

5: Testigo

La prueba múltiple de medias Tukey, indica que el mejor nivel del factor A es la especie *Pisolithus tinctorius*, con un valor promedio de 72.9490%, siguiendo *Scleroderma geaster* con un valor de 42.2980%, posteriormente está *Telephora terrestris* con un valor promedio de 26.23% y los valores más bajos los obtuvo *Lactarius indigo* y el testigo sin diferencia significativa entre ambos.

Lo más importante de éstos resultados es que se observa claramente que *Pisolithus tinctorius* produce el mayor porcentaje de micorrización en ambas especies, con una colonización acelerada, no permitiendo el ingreso de patógenos a la raíz por la secreción de sustancias antagónicas.

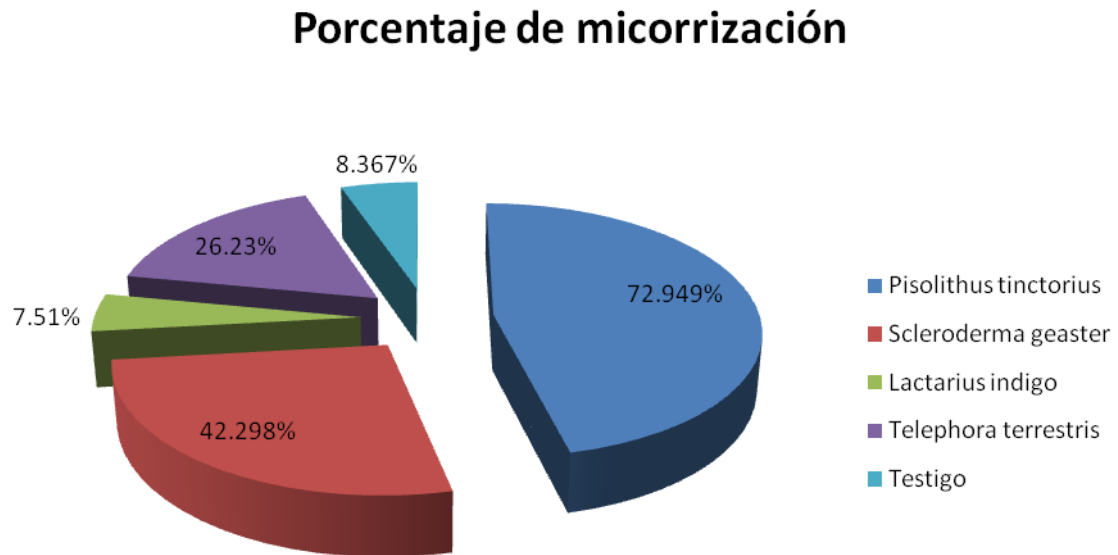


Figura 3. Porcentaje de micorrización a los diez meses después del trasplante

Pisolithus tinctorius, es un hongo con alta eficiencia de micorrización, superior al 72%, con una rápida adaptación y crecimiento en los medios semisintéticos, masificándose con una velocidad superior que *Lactarius indigo*.

Cuadro 7. Velocidad de crecimiento en medios semisintéticos

Especie	Diámetro en cm a los 15 días	Diámetro en cm a los 30 días
<i>Pisolithus tinctorius</i>	3.6	6.5
<i>Lactarius indigo</i>	1.1	3.1

Velocidad de crecimiento en medios semisintéticos

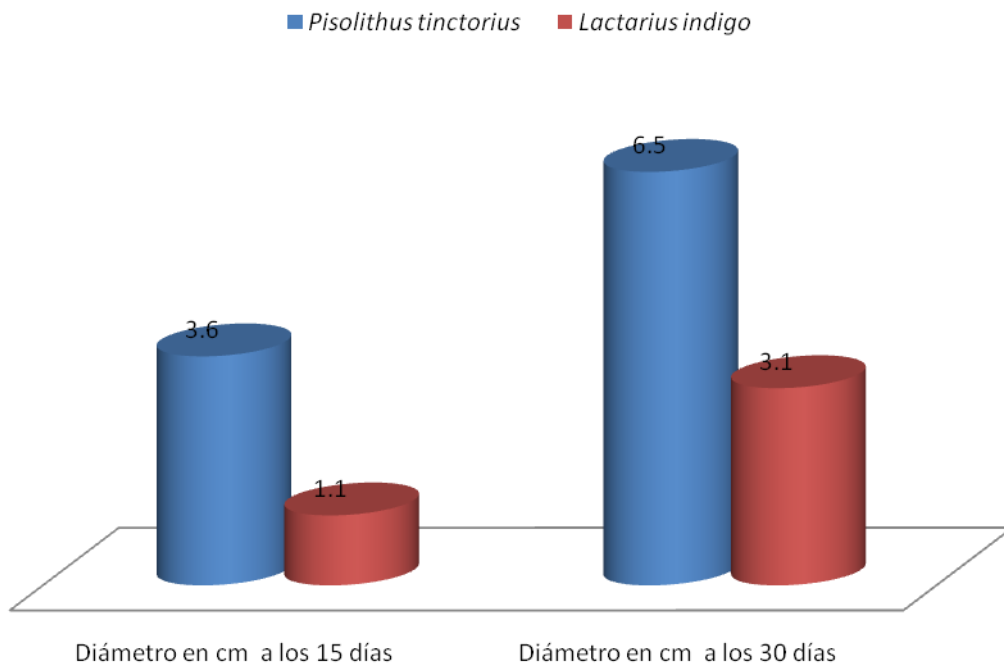


Figura 4. Velocidad de crecimiento en medios semisintéticos

La velocidad de crecimiento de *Pisolithus tinctorius* triplica a *Lactarius indigo* en un periodo de 15 días, teniéndose la ventaja de obtener mayor cantidad de inóculo a nivel de laboratorio en menor tiempo.

La rapidez de crecimiento de un hongo bajo condiciones controladas o de laboratorio se puede tomar como una medida del éxito o fracaso en los programas de inoculación. Si el hongo ectomicorrícico tiene un crecimiento acelerado en medios semisintéticos se puede predecir que el éxito en la inoculación es bastante alto, por ser agresivo con una alta tasa de masificación, antagonico a otras especies fitopatógenos.

7.2 Altura de las plantas

En el cuadro 8 se muestran los resultados del Análisis de Varianza para la variable de respuesta, altura de las plantas (véase figura 5 y 18A).

Cuadro 8. ANDEVA para altura de las plantas

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: altura

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	247,255 ^a	9	27,473	1,758	,108
Intersección	12833,942	1	12833,942	821,028	,000
f factorA	86,101	4	21,525	1,377	,259
f factorB	114,731	1	114,731	7,340	,010
f factorA * f factorB	46,423	4	11,606	,742	,569
Error	625,262	40	15,632		
Total	13706,459	50			
Total corregida	872,517	49			

a. R cuadrado = ,283 (R cuadrado corregida = ,122)

En la altura de las plantas no hubo diferencia significativa provocadas por el factor A (especies de hongos), pero sí por el factor B (especies de pino). La especie que presentó mayor crecimiento fue *Pinus oocarpa*, siendo una característica intrínseca de la especie.

Cuadro 9. Prueba múltiple de medias Tukey para altura de las plantas

altura

DHS de Tukey^{a,b}

factorA	N	Subconjunto
		1
4,00	10	14,4240
2,00	10	15,1640
5,00	10	15,7490
1,00	10	16,5090
3,00	10	18,2600
Significación		,212

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo II

El término error es la Media cuadrática (Error) = 15,632.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000
- b. Alfa = ,05.

Usando el programa SPSS se realizó una prueba múltiple de medias al factor A, aunque en este factor no hubo diferencia significativa, se hizo con el propósito de observar las medias, donde el nivel 3 del factor A, tiene la media superior de la altura de las plantas, de 18.26 centímetros, perteneciendo éste nivel al hongo *Pisolithus tinctorius* (véase figura 5). El programa no le realizó ésta prueba al factor B, donde sí existe diferencia significativa, debido a que en éste factor únicamente hay dos niveles, siendo el mejor el valor más alto, con 17.536 centímetros de altura para *Pinus oocarpa* y 14.5064 centímetros para *P. maximinoi*.

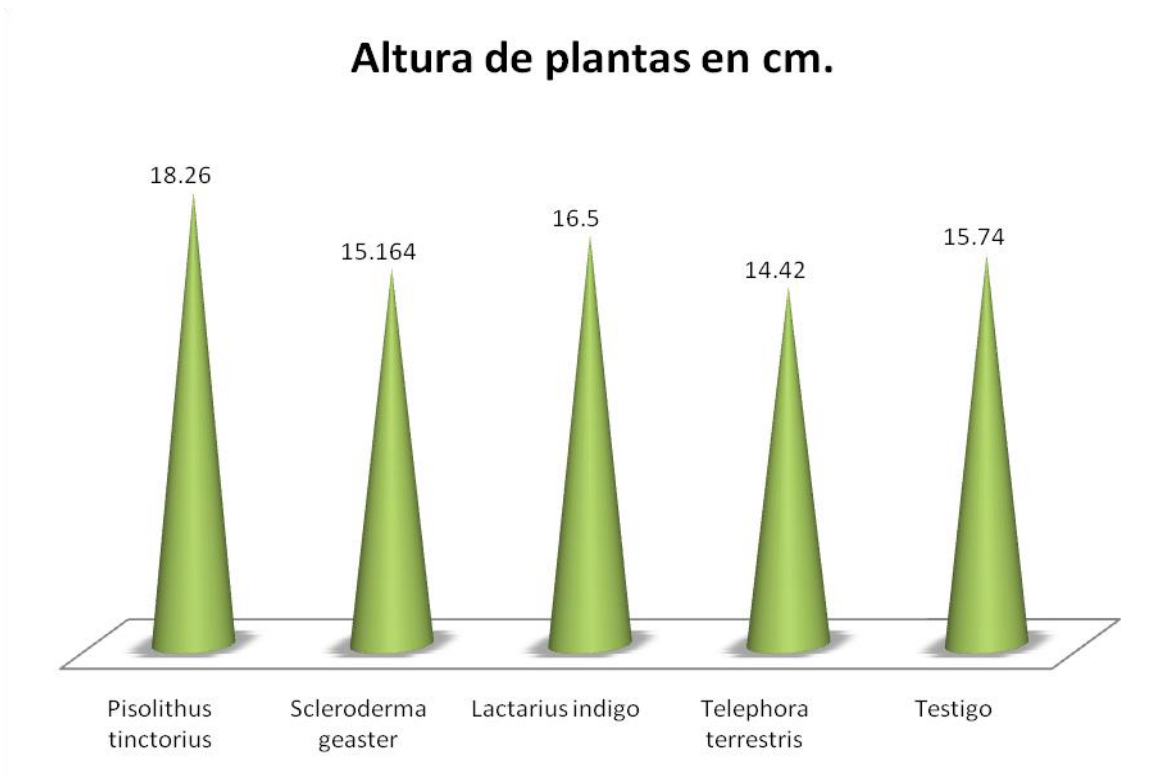


Figura 5. Altura de las plantas a los diez meses después del trasplante

7.3 Longitud de raíz

En el cuadro 10 se reportan los resultados del Análisis de Varianza para la variable de respuesta, longitud de raíz (véase figura 17A).

Cuadro 10. ANDEVA para la longitud de raíz

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: longitud de raíz

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	192,087 ^a	9	21,343	1,132	,363
Intersección	53342,925	1	53342,925	2830,346	,000
factorA	45,953	4	11,488	,610	,658
factorB	70,093	1	70,093	3,719	,061
factorA * factorB	76,042	4	19,011	1,009	,414
Error	753,871	40	18,847		
Total	54288,884	50			
Total corregida	945,959	49			

a. R cuadrado = ,203 (R cuadrado corregida = ,024)

Tanto en el factor A, así como en el factor B y en la interacción entre ambos factores, no existe diferencias significativa. Los hongos micorrícicos no tienen una influencia directa en el crecimiento radicular. Estos forman parte del sistema radicular, favoreciendo la absorción de agua y minerales, con un efecto indirecto en el desarrollo de raíces.

La raíz de la planta no se ve obligada a explorar mayor área en busca de minerales y agua debido a que ésta función es realizada por el micelio del hongo, en donde una raíz micorrizada tiene mayor área de exploración debido al micelio pero no necesariamente tiene una mayor longitud radicular.

7.4 Diámetro de tallo

En el cuadro 11 se muestran los resultados del Análisis de Varianza para la variable de respuesta, diámetro de tallo.

Cuadro 11. ANDEVA para diámetro de tallo

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: diámetro de tallo

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,258 ^a	9	,029	5,980	,000
Intersección	7,582	1	7,582	1581,811	,000
factorA	,068	4	,017	3,541	,014
factorB	,176	1	,176	36,807	,000
factorA * factorB	,014	4	,003	,712	,589
Error	,192	40	,005		
Total	8,031	50			
Total corregida	,450	49			

a. R cuadrado = ,574 (R cuadrado corregida = ,478)

En el factor A, existe diferencia significativa y en el factor B, alta diferencia significativa.

Cuadro 12. Prueba múltiple de medias Tukey para diámetro de tallo

Diámetro de talloDHS de Tukey^{a,b}

factorA	N	Subconjunto	
		1	2
4,00	10	,3360	
5,00	10	,3610	,3610
1,00	10	,4020	,4020
2,00	10	,4070	,4070
3,00	10		,4410
Significación		,168	,093

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo II

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,005.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000

b. Alfa = ,05.

En la prueba múltiple de medias Tukey, el mejor nivel del factor A, es *Pisolithus tinctorius*, con un diámetro de tallo de 0.4410 centímetros. En el factor B, en nivel de mayor diámetro es *Pinus oocarpa*, siendo una característica intrínseca de la especie, siendo ésta la que crece con mayor rapidez comparada con *Pinus maximinoi*. No existe interacción entre los factores, provocando *Pisolithus tinctorius* resultados similares en cuanto a la variable de respuesta, diámetro de tallo, en ambas especies de pino.

La altura de la planta tiene una relación directamente proporcional al diámetro del tallo, por lo que a mayor altura, mayor será el diámetro.

Cuadro 13. Prueba múltiple de medias usando el comparador de Duncan para diámetro de tallo

Diámetro de tallo

Duncan^{a,b}

factorA	N	Subconjunto		
		1	2	3
4,00	10	,3360		
5,00	10	,3610	,3610	
1,00	10		,4020	,4020
2,00	10		,4070	,4070
3,00	10			,4410
Significación		,424	,168	,242

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,005.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000

b. Alfa = ,05.

En ésta tabla están los resultados de la prueba múltiple de medias Duncan para la misma variable de respuesta anterior, diámetro de tallo. En algunas ocasiones se tiene la incertidumbre, que tipo de prueba múltiple usar, aunque en realidad depende de la naturaleza de los datos. Si al investigador le interesan diferencias mínimas, debe usar una prueba múltiple de medias menos exigente, como Duncan o SNK, si el interés es por altas diferencias entre los datos, se debe usar una prueba más exigente, como la de Tukey.

Es por esta razón que en el cuadro anterior hay tres subconjuntos, siendo menos exigente la prueba múltiple de medias Duncan. La diferencia en el diámetro de las plantas de pino en un tiempo de ocho meses no es muy marcada, pero ésta mínima diferencia se verá reflejada en una alta diferencia en un tiempo más prolongado, por lo que es conveniente realizar una prueba menos exigente.

El nivel 3 (*Pisolithus tinctorius*) del factor A (especies de hongos), tiene el mayor diámetro del subconjunto 3, con una media de 0.4410 centímetros. El nivel 2 (*Scleroderma geaster*), tiene el mayor diámetro del subconjunto 2 con un diámetro de 0.4070 centímetros, y los niveles 4 (*Lactarius indigo*) y 5 (testigo) tienen los valores más bajos (véase figura 6).

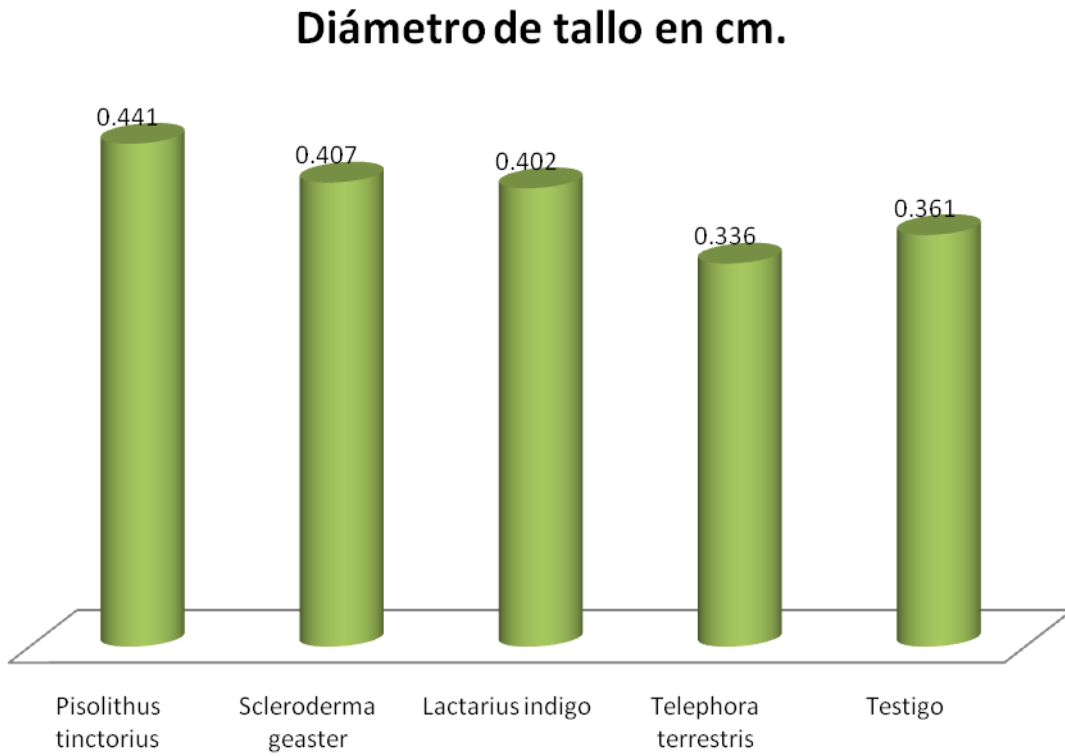


Figura 6. Diámetro de tallo a los diez meses después del trasplante

7.5 Peso fresco de raíz

En el cuadro 14 se observan los resultados del Análisis de Varianza para la variable de respuesta, peso fresco de raíz.

Cuadro 14. ANDEVA para peso fresco de la raíz

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: peso fresco de raíz

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	9,840 ^a	9	1,093	1,208	,317
Intersección	557,980	1	557,980	616,430	,000
factorA	7,154	4	1,789	1,976	,117
factorB	,056	1	,056	,062	,805
factorA * factorB	2,630	4	,657	,726	,579
Error	36,207	40	,905		
Total	604,027	50			
Total corregida	46,047	49			

a. R cuadrado = ,214 (R cuadrado corregida = ,037)

No existen diferencias significativas entre los valores de la variable de respuesta, peso fresco de la raíz.

Cuadro 15. Prueba múltiple de medias Tukey para peso fresco de la raíz

Peso fresco de raízDHS de Tukey^{a,b}

factorA	N	Subconjunto
		1
5,00	10	2,9130
1,00	10	3,0540
4,00	10	3,2150
2,00	10	3,5580
3,00	10	3,9630
Significación		,119

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo II

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,905.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000

b. Alfa = ,05.

La prueba múltiple de medias Tukey indica que no existe diferencia significativa entre ellas, perteneciendo todas al subconjunto único 1, aunque el mejor resultado pertenece al nivel 3 (*Pisolithus tinctorius*), con un peso de 3.9630 gramos.

Cuadro 16. Prueba múltiple de medias Duncan para peso fresco de la raíz

Peso fresco de raíz

Duncan^{a,b}

factorA	N	Subconjunto	
		1	2
5,00	10	2,9130	
1,00	10	3,0540	3,0540
4,00	10	3,2150	3,2150
2,00	10	3,5580	3,5580
3,00	10		3,9630
Significación		,175	,056

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,905.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000

b. Alfa = ,05.

La prueba múltiple de medias Duncan, sí muestra diferencias significativas, dividiendo los resultados de las medias en dos subconjuntos, siendo siempre el mejor nivel *Pisolithus tinctorius* del subconjunto que presenta los valores más altos, con un peso de 3.9630 gramos y el mejor nivel del subconjunto uno es *Scleroderma geaster*, con un peso de 3.5580 gramos. Al existir un mayor peso de raíces, hay una mayor extensión radicular, facilitándole a la planta la extracción de nutrimentos y agua del suelo, acelerando el crecimiento aéreo y una mejor adaptación de la planta al momento del trasplante al campo definitivo.

7.6 Peso fresco de tallo

En el cuadro 17 se reportan los resultados del Análisis de Varianza para la variable de respuesta, peso fresco de tallo.

Cuadro 17. ANDEVA para peso fresco de la parte aérea

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: peso fresco de la parte aérea

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	26,173 ^a	9	2,908	4,209	,001
Intersección	850,616	1	850,616	1231,148	,000
factorA	3,943	4	,986	1,427	,243
factorB	21,556	1	21,556	31,200	,000
factorA * factorB	,674	4	,168	,244	,912
Error	27,637	40	,691		
Total	904,425	50			
Total corregida	53,809	49			

a. R cuadrado = ,486 (R cuadrado corregida = ,371)

En el análisis estadístico realizado no existe diferencia significativa en el factor A y tampoco en la interacción de los dos factores, pero sí existe alta diferencias significativa en el factor B (especies de pino), con una mayor peso la especie *Pinus oocarpa*.

Cuadro 18. Prueba múltiple de medias Tukey para peso fresco del tallo

Peso fresco de la parte aérea

DHS de Tukey^{a,b}

factorA	N	Subconjunto
		1
4,00	10	3,7740
5,00	10	3,9390
2,00	10	4,0090
3,00	10	4,3760
1,00	10	4,5250
Significación		,275

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo II

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,691.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000

b. Alfa = ,05.

No existe diferencia significativa entre las medias de los niveles del factor A. En el peso fresco del tallo se incluye la masa existente de agua, pudiendo haber variación en la concentración de agua entre los distintos niveles.

7.7 Peso seco de raíz

En el cuadro 19 se muestran los resultados del Análisis de Varianza para la variable de respuesta, peso seco de raíz (véase figura 7 y 17A).

Cuadro 19. ANDEVA para peso seco de la raíz

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: peso seco de raíz

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,276 ^a	9	,142	5,123	,000
Intersección	25,676	1	25,676	927,761	,000
factorA	,315	4	,079	2,844	,036
factorB	,879	1	,879	31,767	,000
factorA * factorB	,082	4	,021	,742	,569
Error	1,107	40	,028		
Total	28,059	50			
Total corregida	2,383	49			

a. R cuadrado = ,535 (R cuadrado corregida = ,431)

Existe diferencia significativa en el factor A y alta diferencia significativa en el factor B, no hay diferencia significativa en la interacción de los factores.

Cuadro 20. Prueba múltiple de medias Tukey para peso seco de la raíz

Peso seco de raíz

DHS de Tukey^{a,b}

factorA	N	Subconjunto	
		1	2
5,00	10	,6360	
4,00	10	,6660	,6660
1,00	10	,6740	,6740
2,00	10	,7510	,7510
3,00	10		,8560
Significación		,540	,099

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo II

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,028.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000

b. Alfa = ,05.

En el peso seco, se excluye la cantidad de agua, la cual fue evaporada en el horno a una temperatura de 65°C durante 24 horas. La prueba múltiple de medias Tukey, divide las medias en dos subconjuntos, el mejor nivel del factor A, del subconjunto dos, es *Pisolithus tinctorius*, con un valor de 0.856 gramos y el mejor nivel del subconjunto uno es *Scleroderma geaster*, con un peso de 0.751 gramos. El mejor nivel del factor B es la especie *Pinus oocarpa*.

Al haber mayor biomasa radicular se establece una mayor área de contacto entre la raíz y el micelio del hongo, con mayor eficiencia en la absorción de nutrimentos los cuales son trasladados a la planta, reflejándose en un mayor crecimiento a través del tiempo. En la figura 7 se observa la diferencia de peso seco de raíz debido a las especies de hongos ectomicorrícicos.

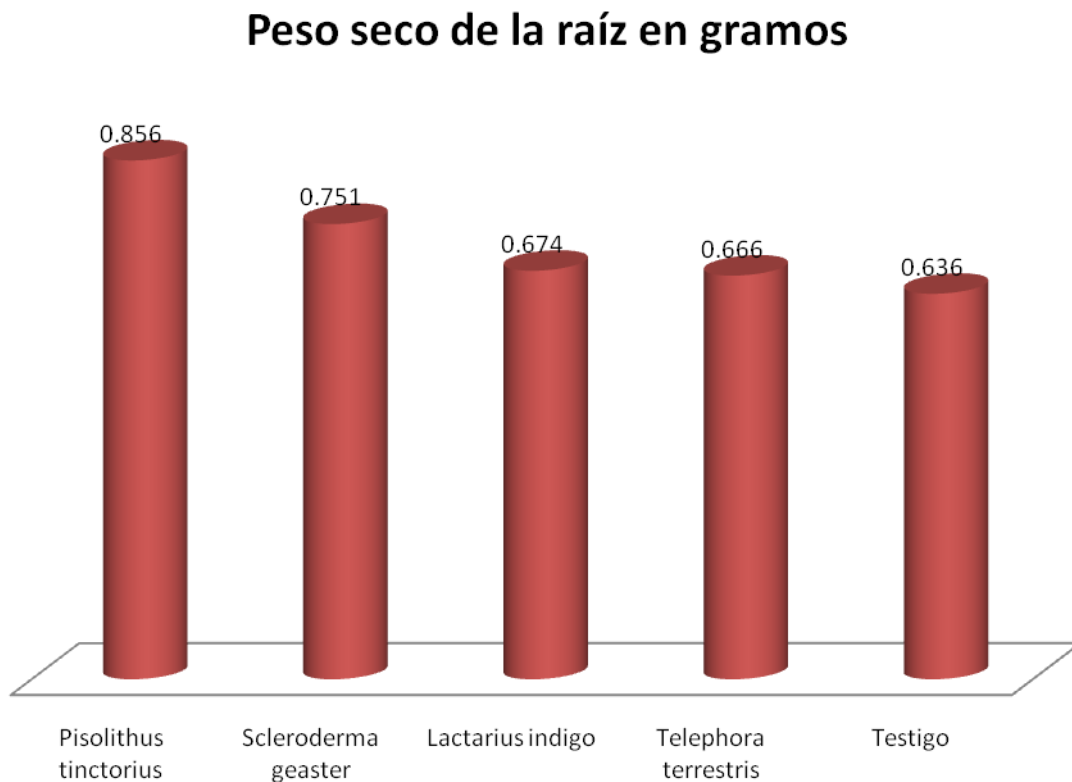


Figura 7. Peso seco de la raíz a los diez meses después del trasplante

7.8 Peso seco de tallo

En el cuadro 21 se reportan los resultados del análisis de varianza arrojados por el programa SPSS para la variable de respuesta, peso seco de tallo.

Cuadro 21. ANDEVA para peso seco de la parte aérea

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: peso seco de la parte aérea

Fuente	Suma de cuadrados tipo II	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	3,171 ^a	9	,352	5,015	,000
Intersección	87,331	1	87,331	1243,097	,000
factorA	,635	4	,159	2,260	,080
factorB	2,500	1	2,500	35,584	,000
factorA * factorB	,036	4	,009	,127	,972
Error	2,810	40	,070		
Total	93,312	50			
Total corregida	5,981	49			

a. R cuadrado = ,530 (R cuadrado corregida = ,424)

En el factor A y en la interacción entre ambos factores, A y B, no existe diferencia estadística, pero sí existe alta diferencia significativa en el factor B.

Cuadro 22. Prueba múltiple de medias Tukey para peso seco del tallo

Peso seco de la parte aérea

DHS de Tukey^{a,b}

factorA	N	Subconjunto
		1
4,00	10	1,1920
5,00	10	1,2170
2,00	10	1,2920
1,00	10	1,4460
3,00	10	1,4610
Significación		,176

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo II

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,070.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000

b. Alfa = ,05.

Tukey no declara diferencias significativas entre las medias de los niveles del factor A. El valor superior del único subconjunto es de 1.461 gramos, valor que pertenece a la especie de hongo *Pisolithus tinctorius*.

Hay que tomar en cuenta que las plantas obtienen más del 90% de su biomasa de la atmosfera, debido a que la composición de la pared celular es principalmente carbono, tomado del CO₂, entre otros. Los hongos ectomicorrícicos tienen una función muy importante en el 10% restante, aunque si no se desarrollan micorrizas es muy difícil que la planta de pino sobreviva por el poco crecimiento y baja eficiencia de absorción de la raíz comparada con la raíz de una especie arbórea más evolucionada.

Cuadro 23. Prueba múltiple de medias Duncan para peso seco del tallo

Peso seco de la parte aérea

Duncan ^{a,b}

factorA	N	Subconjunto	
		1	2
4,00	10	1,1920	
5,00	10	1,2170	1,2170
2,00	10	1,2920	1,2920
1,00	10	1,4460	1,4460
3,00	10		1,4610
Significación		,055	,066

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,070.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000

b. Alfa = ,05.

Duncan sí declara diferencia estadística entre las medias de los niveles del factor A, separando los valores en dos subconjuntos. En el subconjunto dos el valor más alto es de 1.461 gramos, que pertenece al nivel *Pisolithus tinctorius*; en el subconjunto uno, los valores más altos pertenecen a *Scleroderma geaster* y a *Lactarius indigo*, con valores de 1.292 y 1.446 gramos respectivamente.

Es muy importante recordar que si al investigador le interesa una diferencia muy pequeña entre tratamientos se debe optar por una prueba múltiple de medias menos exigente y por lo contrario, si el interés es por altas diferencias entre las medias de los tratamientos hay

que hacer uso de una prueba múltiple exigente como lo es Tukey. En el caso de esta investigación, aunque en algunas variables de respuesta no existe diferencia significativa, siempre interesa el valor más alto, ya que por mínima que sea la diferencia, tomando en cuenta que el pino es de crecimiento lento, a largo plazo podría repercutir en una diferencia muy apreciable para el productor.

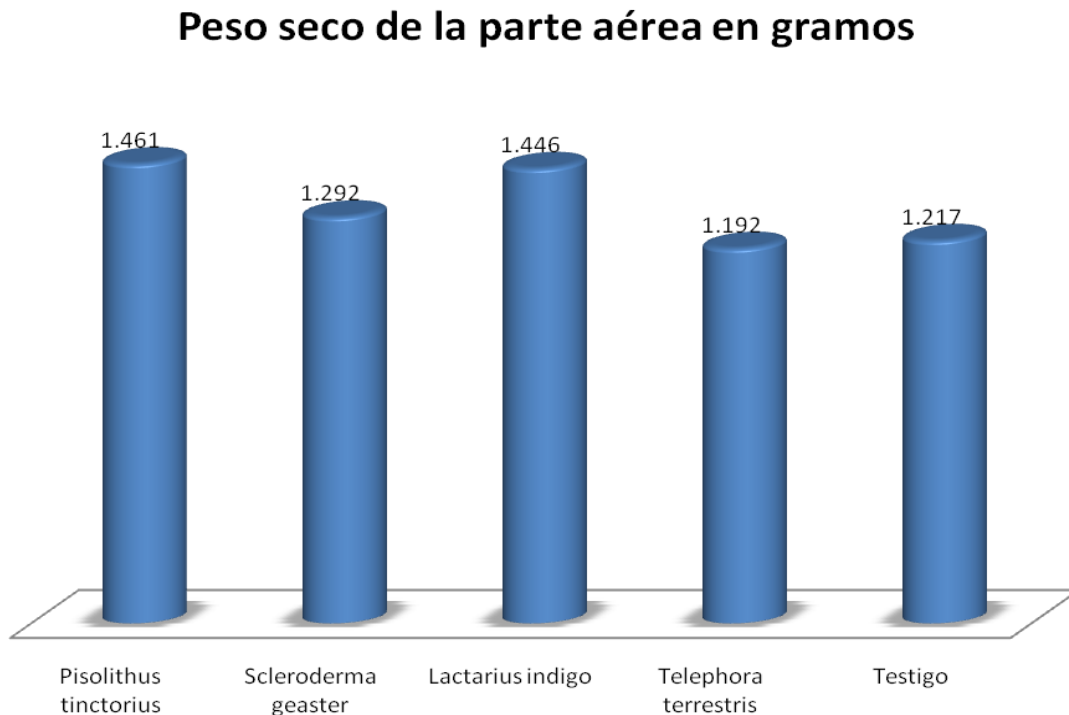


Figura 8. Peso seco de la parte aérea a los diez meses después del trasplante

En este grafico se observa la diferencia de peso seco de la parte aérea de las plantas debido a las distintas especies de hongos ectomicorrícicos, perteneciendo el valor más elevado a *Pisolithus tinctorius*, con un peso de 1.461 gramos.

7.9 Tipo de sustrato

Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los conseguidos por Urizar (1999) y Reyes (2004) quienes usaron como sustrato turba-vermiculita en proporción 1:1 v/v. Este es el primer estudio que se hace en Guatemala utilizando turba con piedra pómez (illita), que resulta más económico respecto al uso de vermiculita por ser ésta importada y con un alto costo.

8. CONCLUSIONES

- Las cuatro especies de hongos ectomicorrícicos utilizadas en este estudio (*Lactarius indigo*, *Pisolithus tinctorius*, *Scleroderma geaster* y *Thelephora terrestris*), formaron micorrizas en distintos porcentajes con las dos especies de pino (*P. oocarpa* y *P. maximinoi*), en contenedor.
- La especie de hongos micorrícico más eficiente en la formación de ectomicorrizas fue *Pisolithus tinctorius*, con una media de 72.949%
- *Pisolithus tinctorius* fue la especie de hongo ectomicorrícico que produjo mayor crecimiento aéreo, mayor biomasa y mayor diámetro de tallo en las plantas de estudio
- Las fuentes de inóculo (esporas, micelio producido en medios semisintéticos semilíquidos y micorrizas vivas), funcionan en forma efectiva para la formación de micorrizas de plantas en contenedor, variando de acuerdo a la especie de hongo ectomicorrícico empleado.
- La mezcla de turba (75%) con illita (25%) tiene efectos positivos en la formación de ectomicorrizas, puesto que éstas se desarrollaron perfectamente y con abundante micelio disperso en el sustrato. Esta es la primera prueba de micorrización con este tipo de sustrato que se documenta en Guatemala.

9. RECOMENDACIONES

- Utilizar el hongo ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius* para la inoculación de plantas de pino en contenedor, produciendo muy buenos resultados, con un mayor crecimiento aéreo y de raíces. Si se quieren producir plantas inoculadas con un hongo ectomicorrícico con el objetivo de producir setas comestibles en el campo definitivo para darle un valor agregado al recurso bosque, se recomienda trabajar con *Lactarius indigo*.
- Investigar dosis óptimas de fertilizantes a base de N-P-K con distintas especies de hongos ectomicorrícicos.
- Hacer ensayos sin usar fertilizante en combinación con varios sustratos variando las concentraciones y fuentes de materia orgánica.
- Llevar a cabo una investigación con distintos vehículos para la aplicación del inóculo con distintas especies de hongos formadores de ectomicorrizas.
- Variar concentraciones de esporas como fuente de inóculo desde 10,000 hasta 500,000 esporas/mililitro y proporciones de micelio:sustrato desde 1:4 hasta 1:20 para hacer más efectiva la micorrización. Estos rangos han sido los más comunes trabajados en las distintas investigaciones con hongos ectomicorrícicos.
- Evaluar otras variables como biomasa foliar, coloración, concentración de nitrógeno, fósforo y potasio en tejidos.
- Realizar cultivos de plantas inoculadas con hongos específicos lo más lejano posible de viveros forestales infestados con *Telephora terrestris*, por la contaminación que produce en plantas jóvenes de pino.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, MA. 1998. *Abies guatemalensis* Rehder, pinabete, especie arbórea digna de conservarse. Revista Agronomía 10(3):15-17.
2. Akira, O. 1994. Production of fruit-bodies of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*, in pure culture. Mycoscience 35(1):147-151.
3. Beltran, MJ; Samayoa, I. 1997. Efecto de compuestos fenolicos constituyentes de la lignina sobre el crecimiento miceliar de 5 basidiomicetos. In Congreso Nacional de Micología (6, 1997, MX); Jornadas Científicas (9, 1997, MX). Memorias. Tapachula, México, Jardín Botánico Nacional. p. 107.
4. Berduo, E. 2000. Evaluación de la eficiencia micorrícica de dos cepas de hongos. *Laccaria aff bicolor* y *Suillus aff brevipes*, aisladas en Guatemala, sobre plantas de *Pinus ayacahuite* Ehr, *Pinus rudis* Ende, y *Pinus hariwegii* Lindl. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 45 p.
5. Carrillo Sánchez, C. 2000. Técnicas de micorrización en vivero con hongos ectomicorrícicos, experiencias realizadas en el Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo". Guadalajara, España, Centros de Red Nacional. p. 1-17.
6. Chen Lian, Q; Pei, Z. 1995. Optimising growth conditions for *P. tinctorius* inoculum production. Canberra, Australia, Australian Centre for International Agricultural Research Proceedings. p. 52-56.
7. Congreso Nacional de la República de Guatemala, GT. 1996. Ley forestal. Diario de Centro América, Guatemala, Guatemala, dic, 4, 38:1129-1136. (tomo 255).
8. Corado, S; Domínguez, A; Estrada, C. 2000. Diagnostico de la fertilidad de los suelos de la Escuela Nacional Central de Agricultura, Barcena, Villa Nueva. Tesis MSc. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 53 p.
9. Cruz, BS. 1990. Cultivo *in vitro* y caracterización de micelio de basidiomicetos ectomicorrizogenos. Tesis PhD. México, Universidad Autónoma de México, Facultad de Ciencias. 123 p.
10. Culajay, F. 1999. Descripción de las características de cultivo *in vitro* de cepas de hongos ectomicorrizicos aislados en Guatemala. Tesis Lic. Quim. Biol. Guatemala, USAC, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 76 p.
11. Díaz, G; Flores, R; Honrubia, M. 2007. *Lactarius indigo* and *L. deliciosus* form mycorrhizae with eurasian or neotropical *Pinus* species. Sydowia 59(1):32-45.

12. Duran, Z; Romero, A. 1997. Comportamiento de *Entoloma compositarum* en diferentes medios de cultivo y temperaturas. *In* Congreso Nacional de Micología (6, 1997, MX); Jornadas Científicas (9, 1997, MX). Tapachula, México, COECYT. p. 118.
13. Farjon, A; Styles, B. 1997. Flora Neotrópica. US, The New York Botanical Garden. p.144-151.
14. Flores, R; Bran, MC. 1998. Identificación de hongos ectomicorrícicos, con potencial de inoculo, para proyectos de reforestación con pino y encino en diferentes áreas del país. Guatemala, CATIE / INAB. 23 p. (Doc. Tec. Informe Final de Consultoría).
15. Fregoso, LV. 1997. Avances en la taxonomía de los hongos micorrícicos arbusculares. *In* Congreso Nacional de Micología (6, 1997, MX); Jornadas Científicas (9, 1997, MX). Tapachula, México, COECYT. p. 50.
16. Harley, JL; Smith, SE. 1983. Mycorrhizal simbiosis. New York, US, Academic Press. 483 p.
17. Hernández, A. 2008. Sustancias y tecnologías naturales. *Agro-Nutrientes Especiales* 93:12-20.
18. Herrera, W. 2009. Evaluación del uso de aspersiones foliares de extractos de tés orgánicos (equinasa y vermicompost) en el rendimiento de lechuga (*Lactuca sativa*) y servicios desarrollados en la Escuela Nacional Central de Agricultura, ENCA, Bárcena, Villa Nueva, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 48 p.
19. Landis, T *et al.* 1993. Nursery pests and mycorrhizae. Washington, US, USDA, Forest Department. 5:171.
20. Lei, Z *et al.* 1995. The influence of nutritional supplements on the growth of ectomycorrhizal fungi in culture and associated tree seedlings in the nursery and field. Canberra, Australia, Australian Center for International Agricultural Research Proceedings. p. 57-61.
21. Li-Xiao, H; Fu, B; Yu-Jing, Y. 1995. Inoculation of *P. massoniana* with ectomycorrhizal fungi: growth responses and suppression of pathogenic fungi. Canberra, Australia, Australian Center for International Agricultural Research Proceedings. p. 72-76.
22. Longato, S; Bonfante, P. 1997. Molecular identification of mycorrhizal fungi by direct amplification of microsatellite regions. *Mycological Research* 101(4):425-432.
23. López, J; Donahue, J. 2007. *Pinus maximinoi*, species description in the tropical tree seed manual (en línea). US. Consultado 8 mayo 2008. Disponible en <http://www.rngr.net/Publications/ttsm/Folder.2003-07-11.4726>

24. Madrid Rosales, M. 2003. Evaluación de tres concentraciones y tres frecuencias de aplicación de esporas de la especie *Pisolithus tinctorius* de micorrizas en plántulas de la especie pino de Petén, (*Pinus caribaea* var. *hondurensis*) a nivel de vivero, en Machaquilá, Poptún, Petén. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 46 p.
25. Marx, DH; Kenney, DS. 1982. Production of ectomycorrhizal inoculum. *In* Schenck NC. Methods and principles of mycorrhizal research. US, The American Phytopathological Society. p. 129-131.
26. Méndez, L. 2002. Evaluación de tres sustratos orgánicos y dos especies de hongos micorrizicos, *Laccaria bicolor* e *Inocybe* sp. en la formación de ectomicorrizas en *Abies guatemalensis* Rehder y *Pinus ayacahuite* Ehr, en contenedor. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 63 p.
27. Molina, R; Palmer, JG. 1982. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. Schenck NC. Methods and principles of mycorrhizal research. US, The American Phytopathological Society. p. 115-126.
28. Newsham, KK; Fitter, AH; Watkinson, AR. 1994. Root pathogenic and arbuscular mycorrhizal fungi determine fecundity of asymptomatic plants in the field. *J. Ecol.* 82:805-814.
29. Oort, AJP. 1981. Nutritional requirements of *Lactarius* species, and cultural characters in relation to taxonomy. Amsterdam, Netherlands, North-Holland Publishing Company. 95 p.
30. Perry, J. 1991. The pines of México and Central América. México, Agriculture Science Program. 231 p.
31. Red de la naturaleza.com. 2008. *Pisolithus tinctorius* (en línea). US. Consultado 8 mayo 2008. Disponible en http://www.rednaturaleza.com/setas_doc.asp?p=2%20Pisolithus%20tinctorius%20
32. Reyes, M. 2004. Síntesis de micorrizas en *Pinus caribaea* con cepas nativas de *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma* sp. en contenedor. Tesis Lic. Biol. Guatemala, USAC, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. p. 32-47.
33. Rogers, F. 2008. Mycorrhizae (en línea). US. Consultado 8 mayo 2008. Disponible en <http://www.rogersmushrooms.com/gallery/DisplayBlock~bid~6769.asp>
34. Schenck, NC. 1982. Methods and principles of mycorrhizal research. US, The American Phytopathological Society. 244 p.

35. Trappe, J; Maser, C. 1977. Ectomycorrhizal fungi: interaction of mushrooms and truffles with beast and trees. *Dep. Agric.* 2:165-175.
36. Urizar, M. 1999. Eficiencia en la producción de micorrizas y aumento en biomasa en plántulas de pino candelillo (*Pinus maximinoi* H.E. Moore) con *Laccaria laccata*, *Pisolithus tinctorius* y *Scleroderma sp.* Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 49 p.
37. Wikipedia.com. 2008. *Pinus oocarpa* (en línea). España. Consultado 8 mayo 2008. Disponible en http://es.wikipedia.org/wiki/pinus_oocarpa
38. Yoshie, Y. 1994. Change in médium components and colony morphology due to mycelial growth of ectomycorrhizal fungus *Tricholoma bakamatsutake*. *Mycoscience* 35:153-159.

APÉNDICES



Figura 9A. Cuerpo fructífero de *Pisolithus tinctorius* bajo *P. oocarpa*



Figura 10A. Micorrizas de *Pisolithus tinctorius* con *P. maximinoi*



Figura 11A. Cuerpo fructífero de *Scleroderma geaster* bajo *P. oocarpa*

Fuente: Flores, R.

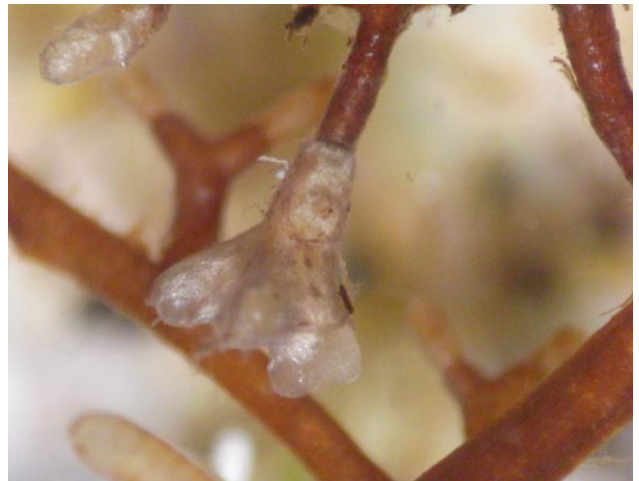


Figura 12A. Micorrizas *Scleroderma geaster* con *P. maximinoi*



Figura 13A. Cuerpo fructífero de *Thelephora terrestris* con *P. maximinoi*

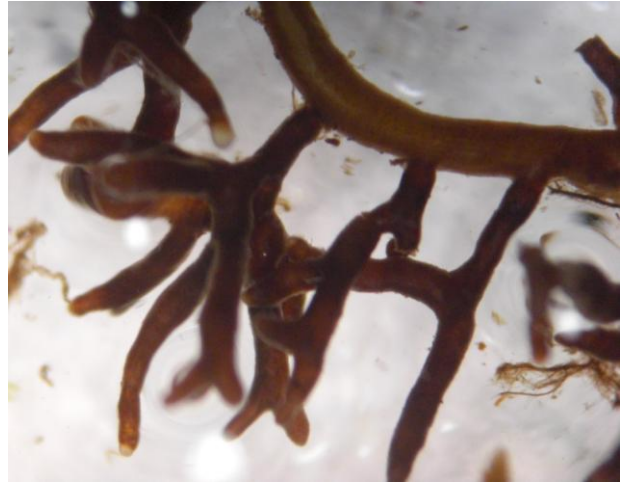


Figura 14A. Micorrizas *Thelephora terrestris* con *P. maximinoi*



Figura 15A. Cuerpo fructífero de *Lactarius indigo*
Fuente: Flores, R.

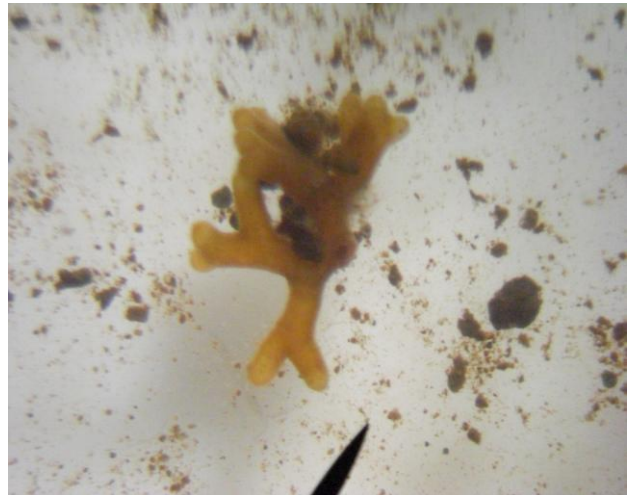


Figura 16A. Micorrizas *Lactarius indigo* con *P. oocarpa*

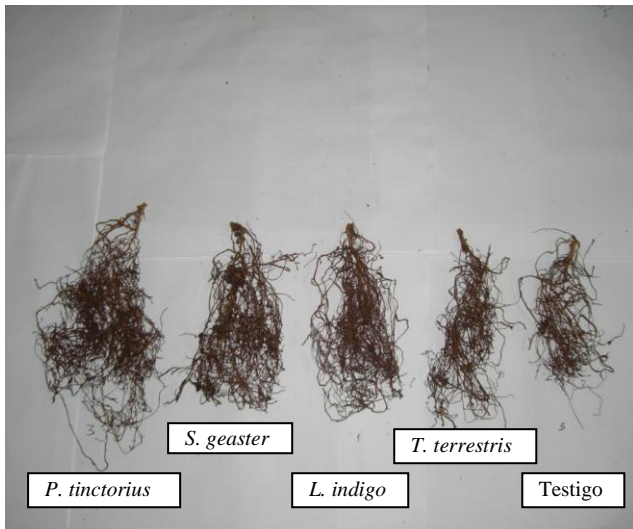


Figura 17A. Desarrollo de raíces

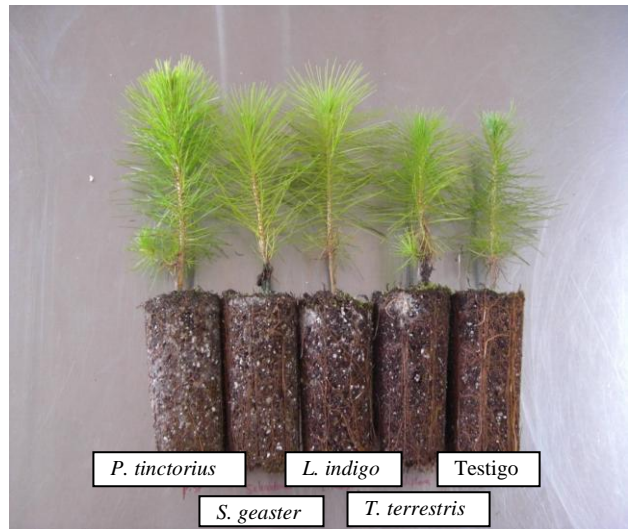


Figura 18A. Crecimiento de las plántulas

Niveles del factor A (especies de hongos micorrícicos) para el peso seco de raíces (figura 17A) y altura de plantas (figura 18A):

Fórmula nutritiva semisintética usada para propagación, preparación del inóculo, experimentación, y almacenaje de hongos ectomicorrícicos en cultivos axénicos.

Cuadro 24A. Medio MMN (Melin Norkrans modificado)

NUTRIENTES	Cantidad
Extracto de Malta	3.0 g
D-glucosa	10.0 g
(NH₄)₂HPO₄	0.25 g
KH₂PO₄	0.5 g
MgSO₄.7H₂O	0.15 g
CaCl₂	0.05 g
FeCl₃	1.2 ml solución al 1% o 0.02 g de Sequestrene
NaCl	0.025 g
Tiamina-HCl	100 µg
H₂O destilada	Llevar a 1,000 ml
pH después de autoclaveado	5.5-5.7

Fuente: Schenck (1982).

Cuadro 25A. Composición del medio BAF

Ingredientes	Cantidad (g/l)
Glucosa	30
Peptona Oxold L 37	2
Extracto de levadura	0.2
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
FeCl ₃ .6H ₂ O	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1
MnSO ₄	5
CaCl ₂	100
Microelementos	
Thiamina HCl	50
Biotina	1
Acido Folico	100
Contenido de N	170E11

Fuente: Moser (1960)