



AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL HONGO
 ECTOMICORRÍZICO *Helvella lacunosa* EN DIFERENTES MEDIOS DE
 CULTIVO

[ISOLATION AND PURIFICATION OF ECTOMYCORRHIZAL
 FUNGUS *Helvella lacunosa* IN DIFFERENT CULTURE MEDIA]

D. Domínguez Romero*¹, H. Vázquez Rivera², B.G. Reyes Reyes¹,
 J.I. Arzaluz Reyes¹ and A. R. Martínez Campos¹

¹. Universidad Autónoma del Estado de México. Instituto de Ciencias
 Agropecuarias y Rurales. Km. 14.5 Autopista Toluca-Atlacomulco. San
 Cayetano de Morelos. Toluca, Estado de México. CP 50295.

Email: ddrmec@gmail.com; phone number; (01) 722 2832527

² Canada's University, University of Ottawa,
 115 Séraphin Marion St. Ottawa, Ontario Canada K1N 6N5

*Corresponding author

SUMMARY

Helvella lacunosa, besides its mycorrhizal importance for plant forest species, has a high commercial value. The commercial production of *H. lacunosa* represents two main advantages: Economical benefits for the communities able to produce it; and conservation of biodiversity in the forests by preventing the species overexploitation and maintaining the mushroom-plants mycorrhizal relationship. Carrying out this perspective requires, in principle, to isolate the species mycelium, and then to develop the mycorrhizing technique that allows the production of the mushroom. Isolating the mycelium by the first time, however, involves testing several culture media in order to identify the potential requirements for inducing the mycelium's growth. In the present work we tested, in laboratory, five different agar-based culture media to isolate *H. lacunosa*'s mycelium, and to evaluate its growing rate, analysis of covariance showed that there is a simple linear relationship between incubation time and the diameter. Indicating that the cumulative growth rate of the mycelium, was different between the culture media ($F_{4, 240} = 17,008$, $p < 0.001$). The APD medium had the highest growth rate followed by AEA. In both growing media, the diameter of the mycelium converges the fifth day. The lowest growth rate was presented in the media AEM and AEP.

Key words: *Helvella lacunosa*; mycorrhiza; isolation; culture media; mycelium; pure culture.

RESUMEN

Helvella lacunosa (*H. lacunosa*) adicionalmente a su importancia micorrízica tiene un alto valor comercial. La producción comercial de *H. lacunosa* tiene dos ventajas: Beneficio económico para las comunidades que sean capaces de producirlo y; conservación de la biodiversidad en el bosque al prevenir la sobre explotación de la especie y mantener la relación micorrízica hongo:planta. Es necesario, en principio, obtener el micelio puro (aislamiento), y a partir de éste buscar la técnica de micorrización más adecuada para su producción. El aislamiento de cepas, requiere de pruebas selectivas de diversos medios de cultivo lo que permite identificar los requerimientos potenciales para inducir el desarrollo del micelio. Se realizaron pruebas de crecimiento en cinco medios de cultivo con el objetivo de obtener cepas puras del hongo ectomicorrízico *H. lacunosa*. Mediante un Análisis de Covarianza se demostró que existe una relación lineal entre el tiempo de incubación y el diámetro, lo que indica que la velocidad de crecimiento acumulado del micelio, fue diferente entre los medios de cultivo ($F_{4, 240} = 17.008$; $p < 0.001$). En el medio APD se observó la mayor velocidad de crecimiento seguido del medio AEA. En ambos, el diámetro del micelio converge al quinto día. La menor velocidad de crecimiento se presentó en los medios AEP y AEM.

Palabras clave: *Helvella lacunosa*; Micorriza; aislamiento; Velocidad de crecimiento; Micelio; cepa pura.

INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos valiosos que juegan un papel importante en la naturaleza al participar en procesos de reciclaje de materia orgánica, en la formación y conservación del suelo, y en el equilibrio de los ecosistemas naturales, a través de sus relaciones con otros organismos (Hawksworth, 1997; Deacon, 1993). Las micorrizas son asociaciones anatómicas íntimas entre las raíces de las plantas y algunos hongos del suelo, denominados hongos micorrízicos (HM). Estas asociaciones se encuentran distribuidas en todos los ecosistemas terrestres; En ellos estas simbiosis juegan un importante papel en su funcionamiento y mantenimiento, tanto en las regiones templadas como en las tropicales (Pérez y Ferrera, 1997).

La asociación generalmente se ve traducida en un beneficio nutricional para las plantas y los HM. En la asociación mutualista que se establece con la micorriza, el hongo coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, sin causar daño a la planta, llegando a ser, fisiológica y morfológicamente, parte integrante de dicho órgano (Alarcón y Ferrera, 1999). Los hongos ectomicorrízicos son los responsables de suministrar a las planta una mayor cantidad de nutrimentos minerales. Las hifas de los hongos se extienden mas que los pelos radicales dentro del suelo, por lo que se incrementa la superficie de absorción de las raíces y en consecuencia pueden explorar un mayor volumen de suelo (O' Dell *et al.*, 1992). Otro efecto de las ectomicorrizas en el crecimiento de las plantas se debe a la protección que brindan a la raíz contra patógenos del suelo. También se ha observado que algunos mantos de ectomicorrizas formados por hongos que no producen antibióticos constituyen excelentes barreras físicas que protegen a la raíz de la invasión de hongos fitopatógenos como *Phytophthora* y *Fusarium* (Munyanziza *et al.*, 1997) El uso de micorrizas en plántulas que van a ser enraizadas en tierra, es de particular interés para incrementar la sobrevivencia y el crecimiento de las plántulas (Xoconostle, 2002). La adecuada selección de hongos y su posterior manipulación biotecnológica de las micorrizas permite obtener un notable incremento de la productividad de la biomasa vegetal, por lo que las plantas sometidas a micorrización controlada aumentan sustancialmente su viabilidad (Díaz y Honrubia, 1999). En los Programas Nacionales de Reforestación (PRONARE), como una medida de prevención y control del deterioro ambiental, han incorporado el uso de plantas ectomicorrizadas para reducir los tiempos de desarrollo de las plantas y así optimizar la reforestación de bosques.

Para inducir la micorrización en especies de importancia forestal, se han utilizado principalmente tres fuentes de inóculo: tierra de monte (sustrato proveniente de bosques donde la especie de interés es observada), esporas de hongos y micelio (Jenninngs y Lysek, 1999; Mikola, 1970). El micelio es una de las fuentes de inóculo que ha recibido mayor atención en las últimas décadas; Es producido en condiciones de cultivo estériles (de laboratorio) y puede ser usado directamente como inóculo o puede mezclarse con diversos acarreadores inertes (Brundett *et al.*, 1996). La principal limitación de esta técnica es lograr el aislamiento de los hongos ectomicorrízicos, seguida del alto costo de los medios sintéticos utilizados para el aislamiento. La ventaja de estos procedimientos es que podría disponerse de inóculo en cualquier época del año, lo cual facilita su manejo y aplicación práctica (Pérez, 2002).

Para el cultivo y crecimiento de los hongos comestibles en el laboratorio, es decir el desarrollo del micelio en cajas de Petri, se deben utilizar determinados medios de cultivo, los cuales deben proporcionar al hongo los nutrimentos requeridos para su crecimiento y desarrollo. Por lo regular se emplean medios de cultivo sólidos con agar, los cuales actúan a manera de sustrato al solidificarse como una gelatina. El medio de cultivo que se utilizará dependerá de la especie de hongo que se quiere cultivar, ya que cada especie tiene sus propios requerimientos nutricionales (Guzmán, *et al.* 1993).

Con la finalidad de conocer el medio de cultivo sólido más adecuado para el desarrollo óptimo, preservación y manejo de cepas de *H. lacunosa*, se procedió al estudio de tres medios de cultivo complejos Agar Extracto de Pino (AEP), Agar Extracto de Oyamel (AEO) y Agar Extracto de Alfalfa (AEA). Los dos primeros se diseñaron debido a que el hongo al que se refiere este estudio, se localiza en bosques de pino y oyamel (Gerhard *et al*, 2000; Lincoff, 2002). Mientras que el caso de AEA, es un medio diseñado a partir de una especie forrajera que proporciona elevados niveles de proteínas, minerales y vitaminas, utilizada en el aislamiento de hongos micorrízicos arbusculares. Estos medios se diseñaron y utilizaron con el fin de encontrar un elicitor que nos permitiera la obtención de cepas de *H. lacunosa*. Ya que no existen registros en la literatura sobre aislamiento de hongos ectomicorrízicos en estos tres medios de cultivo propuestos.

El objetivo del presente trabajo fue aislar y purificar el hongo silvestre *H. lacunosa*, para lo cual se realizaron ensayos de aislamiento en 5 formulaciones diferentes de medios de cultivo, como primera parte del trabajo se realizó una caracterización taxonómica, que incluyo la identificación macro y microscópica de

los aislados presuntivos y una vez identificados cultivos correspondientes a *H. lacunosa*; se utilizó el método de crecimientos sucesivos para la obtención de la cepa pura, finalmente se procedió a realizar pruebas de selección secundaria consistentes en evaluar la capacidad de crecimiento de las cepas puras en los cinco medios de cultivo propuestos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la cepa pura de *H. lacunosa*

Se realizaron aislamientos a partir del carpóforo fresco de *H. lacunosa* colectados en Octubre de 2007 en bosques de oyamel, encino y pino, a una altura promedio de 3000 msnm y situados entre los 99° 25' y 99° 23' de Longitud Oeste y 19°14' y 19° 16' de Latitud Norte, en el municipio de Ocoyoacac, Estado de México. Los hongos presuntivos de *H. lacunosa* se identificaron taxonómicamente con la ayuda de guías especializadas, tomando en cuenta características macro y microscópicas. Dentro de las características macroscópicas se utilizó una lupa binocular Olympus SZH, donde se describieron cada una de las partes del carpóforo como son: Píleo, tamaño, forma, color, textura, consistencia y ornamentación. Mientras que las características microscópicas que se midieron y observaron fueron estructuras como ascas, hifas y esporas, con ayuda de un microscopio óptico acoplado al programa Motic Image Plus 2.0 (Gerhard *et al*, 2000; Lincoff, 2002).

El aislamiento del hongo micorrízico *H. lacunosa* se realizó evaluando 5 formulaciones diferentes de medios de cultivo: Agar Extracto de Malta (AEM); Agar Papa Dextrosa (APD), frecuentemente utilizados para la obtención de micelio (Carrillo, 2003; Gaitán, *et al*, 2006; Malvárez, *et al*, 2001) y tres medios complejos AEP (1000 ml agua, 50 ml de Extracto de Pino, 5 g de glucosa, 25 g de agar agar y 7 g de caldo nutritivo); AEO (1000 ml agua, 50 ml de Extracto de Oyamel, 5 g de glucosa, 25 g de agar agar y 7 g de caldo nutritivo); AEA (1000 ml agua, 50 ml de Extracto de Alfalfa, 5 g de glucosa, 25 g de agar agar y 7 g de caldo nutritivo). Los aislamientos y purificación del hongo fueron realizados mediante el método de crecimiento sucesivo.

Aislamiento del micelio de *H. lacunosa*

Crecimiento sucesivo: Se realizó a partir de tejido del contexto del hongo, tomando un fragmento de la zona del píleo con pinzas estériles dentro de una campana de flujo laminar. El implante se sumergió en una solución acuosa de hipoclorito de sodio y posteriormente se colocó en cajas de Petri con los 5 medios de cultivo mencionados, estableciendo diez repeticiones por medio de cultivo (n=50). Las cajas

etiquetadas para cada medio, se dejaron en una incubadora (LINDBERG/BLUEM) a 20°C., durante 30 días. Las placas con crecimientos presuntivos colonias con micelio color blanco sin contaminación, fueron seleccionadas para resiembra sucesiva.

Proceso de purificación

La purificación de la cepa de *Helvella lacunosa*, se realizó de inóculos provenientes del aislado de la etapa anterior mediante la técnica de resiembra sucesivas en el medio de cultivo AEA. Las cajas Petri fueron colocadas en incubación a 20°C., durante 5 días.

Caracterización de la cepa

Una vez que se obtuvo el micelio puro se realizó la caracterización macro y microscópica de la cepa *in vitro* (Sánchez *et al.*, 2001). Para la caracterización macroscópica se utilizó una lupa binocular Olympus SZH. Dentro de las características macroscópicas se debe observar color de la cepa, mismo que fue comparado con la tabla de colores para hongos del Royal Botanic Garden Edimburg (Hendersen *et al.*, 1969); este incluye forma, tipo de margen, textura, tipo de crecimiento y superficie; Para las características microscópicas se utilizó un microscopio óptico acoplado al programa Motic Image Plus 2.0, donde se observa el tipo de hifas, su estructura y grosor promedio de las hifas.

Conservación de la cepa

Para mantener la viabilidad y la pérdida de las características propias de las cepas, es necesario preservarlas adecuadamente. El micelio de *H. lacunosa* fue propagado en tubos de ensayo los cuales contenían AEA, medio en el que se aisló el micelio; El micelio fue crecido por 72 horas a 25°C en oscuridad y posteriormente se colocó en refrigeración (5°C) hasta su uso, cada 4 meses se procedió a su resiembra.

Control del efecto de adaptación al medio de prueba

Una vez conservada la cepa se procedió al re-aislamiento del micelio en los cinco medios de cultivo en tubos de ensayo, previo a las pruebas de crecimiento, con el fin de controlar el posible efecto por adaptación inducido, al crecer el micelio en un medio diferente al medio que se evalúa. De esta manera, las pruebas de crecimiento se realizaron en el mismo tipo de sustrato en el cual el micelio había crecido anteriormente.

Pruebas de crecimiento

Para evaluar el crecimiento del micelio en los cinco medios de cultivo. Primeramente se tomó una muestra del micelio puro de *H. lacunosa* de los tubos de ensayo, posteriormente se propagó en cajas de Petri de 9.5 cm de diámetro. El crecimiento fue medido en términos del diámetro del micelio por día. Las medidas fueron tomadas hasta el quinto día, intervalo de tiempo en el que el micelio alcanzó la pared de la caja de Petri. El diámetro fue medido con un vernier digital MOD. CD-6 Mitutoyo, manteniendo siempre en la misma dirección, la cual fue establecida al azar. Finalmente, se realizó un estudio macro y microscópico de las cepas, determinando caracteres como textura, tipo de micelio, color, tipos de hifas y estructuras anamórficas, que complementarían su identificación taxonómica.

Análisis estadístico

Para determinar si la velocidad de crecimiento del micelio por día difería entre medios, se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA) siendo el diámetro del micelio la variable dependiente, el día la variable independiente (covariante) y medio de cultivo otra variable independiente (categórica). Se analizó si las pendientes obtenidas entre el diámetro del micelio y día difería entre los diferentes medios.

Análisis de regresión

Debido a que se detectaron diferencias significativas entre las pendientes, para conocer el valor de esta se realizaron análisis de regresión para cada tipo de medio de cultivo. Se realizaron pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene para identificar desviaciones con respecto a la normalidad y homoscedasticidad de los datos. Los datos no mostraron desviaciones en ninguno de los casos ($p > 0.05$).

Análisis de varianza

Se aplicaron análisis de varianza para determinar si los medios de cultivo tenían algún efecto en el crecimiento medio del micelio de *H. lacunosa*. Debido a que los datos representan medidas repetidas, se corrieron análisis de varianza de dos vías para medidas repetidas (ANOVA-2V-MR), donde el medio de cultivo corresponde al factor categórico con 5 niveles (medios de cultivo) y día al factor repetido con 5 niveles (días). Se aplicaron dos ANOVA-2V-RM, uno sobre el diámetro diario del micelio (crecimiento acumulado), y otro sobre el crecimiento real diario del micelio (crecimiento del micelio en 24 horas).

Pruebas de esfericidad

Se corrieron pruebas de esfericidad para identificar desviaciones en la homogeneidad de las varianzas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Identificación de la especie

Características macroscópicas: La figura 1 muestra una imagen fotográfica del hongo silvestre utilizado para el aislamiento y purificación del hongo ectomicorrízico objeto de estudio en este trabajo. La imagen fue tomada con un zoom óptico de 3x, en ella se puede apreciar la división entre el estípite y el píleo, con una altura total de 3 a 18 cm, himenio dirigido hacia fuera, negruzco gris, con surcos longitudinales y consistencia frágil; su píleo tiene forma de silla de montar, con cámaras dentro del pie, características que corresponden a las descritas para *H. lacunosa* en guías especializadas para identificación de hongos de Gerhard *et al*, 2000 y Lincoff, 2002.



Figura 1. Características macroscópicas de *Helvella lacunosa*.

Características microscópicas:

En la figura 2 se pueden observar las características microscópicas del tejido de *H. lacunosa*. Donde se pueden observar hifas hialinas, dicotómicas con septos lisos y ramificados, elipsoidales lisas, con una gran gútula lipídica, de 15-18 (20) x 10.5-12(13) μm , ascas cilíndricas de 250-320 x 14-17 μm . Paráfisis filiformes, con el ápice dilatado, ligeramente claviforme. Estas observaciones son características de los ascomicetes, cuyas ascas generalmente presentan 8 ascosporas (Herrera y Ulloa, 1998).

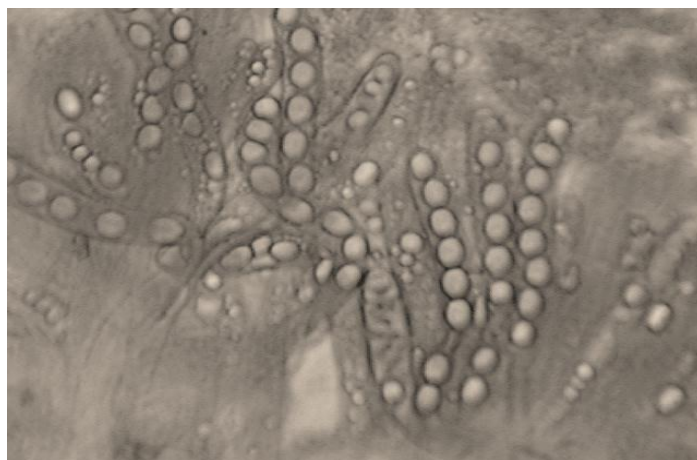


Figura 2. Características macroscópicas de *Helvella lacunosa*

Obtención de cepas.

Después de aplicar la técnica de crecimientos sucesivos, aplicada a los cinco medios de cultivo, se obtuvo la cepa pura de *H. lacunosa*, sólo en el medio de cultivo AEA, mientras que en el resto de los medios de cultivo no se observó ningún tipo de crecimiento y se observaron contaminaciones de bacterias no identificadas, y de *Rhizopus* y *Aspergillus*.

Proceso de purificación

Una vez obtenida la cepa de *H. lacunosa*, se procedió a su purificación mediante la técnica de resiembra sucesivas en el medio de cultivo AEA. Esta técnica fue utilizada hasta que se logró purificar la cepa.

Descripción colonial y del micelio

El crecimiento del micelio puro presentó las siguientes características macroscópicas: color blanquecino, de forma circular, margen fimbriado, crecimiento rastroso postrado de textura algodonosa y superficie circular (Figura 3). Mientras que las características microscópicas fueron: Presencia de hifas lisas, septadas, ramificadas y dicotómicas con un grosor de 19.01 μ m. Lo cual concuerda con las características descritas por Herrera y Ulloa (1998), para micelio de *H. lacunosa*.

Pruebas de crecimiento

Se evaluó el crecimiento de la cepa pura de *H. lacunosa* en 50 cajas Petri que contenían los cinco medios de cultivo antes propuestos, a partir del

micelio obtenido mediante la técnica de Crecimientos Sucesivos en el medio AEA. Con la finalidad de determinar que medio es el que presenta las mejores condiciones de crecimiento.

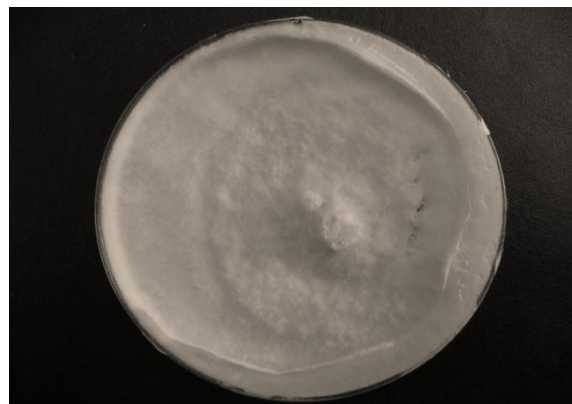


Figura 3. Cepa pura de *Helvella lacunosa* en Agar Extracto de Alfalfa

Velocidad de crecimiento de la cepa de *H. Lacunosa*

El análisis de covarianza (ANCOVA) mostró que la velocidad de crecimiento del micelio de *Helvella lacunosa*, medida a través de la pendiente entre diámetro del micelio y día, i.e. crecimiento acumulado (Figura 4), fue diferente entre los medios de cultivo ($F_{4, 240} = 17.008$; $p < 0.001$). Análisis de regresión independientes por medio de cultivo indicaron que en el medio APD se observó la mayor pendiente (Figura 4), i.e. la mayor velocidad de

crecimiento. En el medio de cultivo AEA se presentó la segunda mayor velocidad de crecimiento del micelio, aunque el crecimiento inicial del micelio en este medio fue superior al del micelio crecido en APD. En ambos medios, el diámetro del micelio converge al quinto día (Figura 4). La menor velocidad de crecimiento se presentó en los medios AEP y AEM.

El ANOVA de dos vías para medidas repetidas, mostró que la media del crecimiento del micelio, medido en cinco días, fue diferente entre medios ($F_{4, 45} = 29.13252$; $p < 0.001$). Comparaciones múltiples (Figura 5) mediante la prueba de Scheffé detectaron que no hubo diferencias significativas ($p > 0.1$) entre

los medios AEA, APD y AEO, ni entre los medios AEM y AEP. Entre las demás combinaciones si hubo diferencias significativas ($p < 0.001$).

Finalmente el ANOVA de dos vías para medidas repetidas sobre los valores de crecimiento diario del micelio (i.e. el crecimiento real por día), indicaron que el micelio de *H. lacunosa* es distinto entre medios ($F_{4, 45} = 33.551$; $p < 0.0001$). Comparaciones múltiples (Figura 6) mediante la prueba de Scheffé detectaron que no hubo diferencias significativas ($p > 0.1$) entre los medios AEA y APD, ni entre los medios AEO, AEM y AEP. Entre las demás combinaciones si hubo diferencias significativas ($p < 0.0001$)

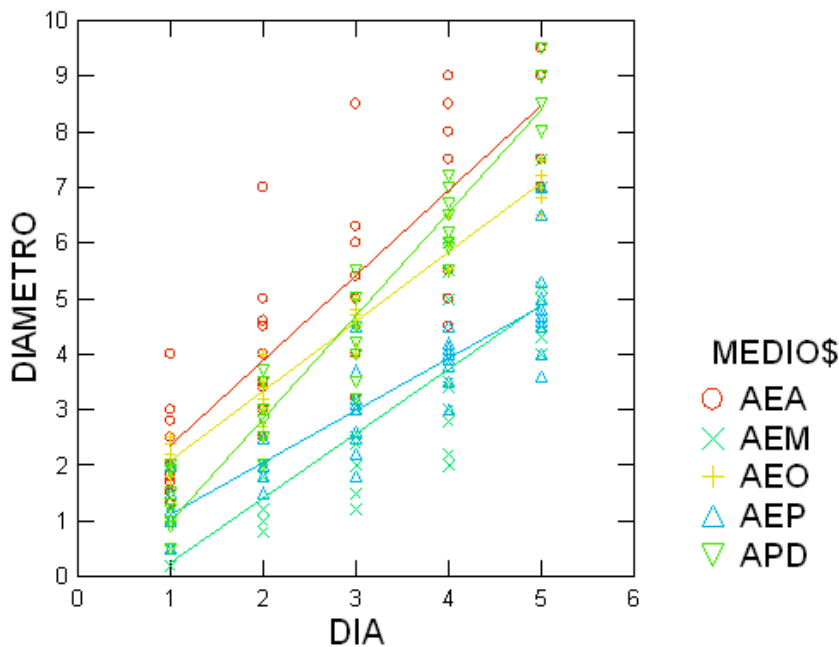


Figura 4. Velocidad de crecimiento acumulado

Tabla 1. Valores de la pendiente obtenida para cada medio de cultivo, entre el diámetro del micelio y día.

Medio de cultivo	N	Pendiente	t	p
APD	50	1.852	30.388	< 0.001
AEA	50	1.528	11.732	< 0.001
AEO	50	1.250	34.161	< 0.001
AEM	50	1.160	11.296	< 0.001
AEP	50	0.936	14.334	< 0.001

Los análisis corresponden a n (50) cajas distribuidas en los cinco medios.

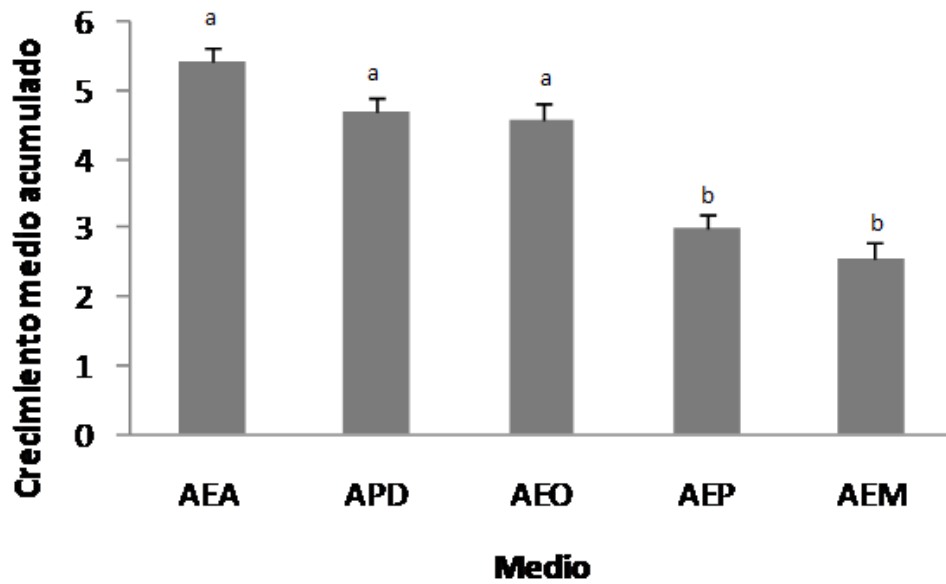


Figura 5. Comparaciones múltiples. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($\alpha \leq 0.001$)

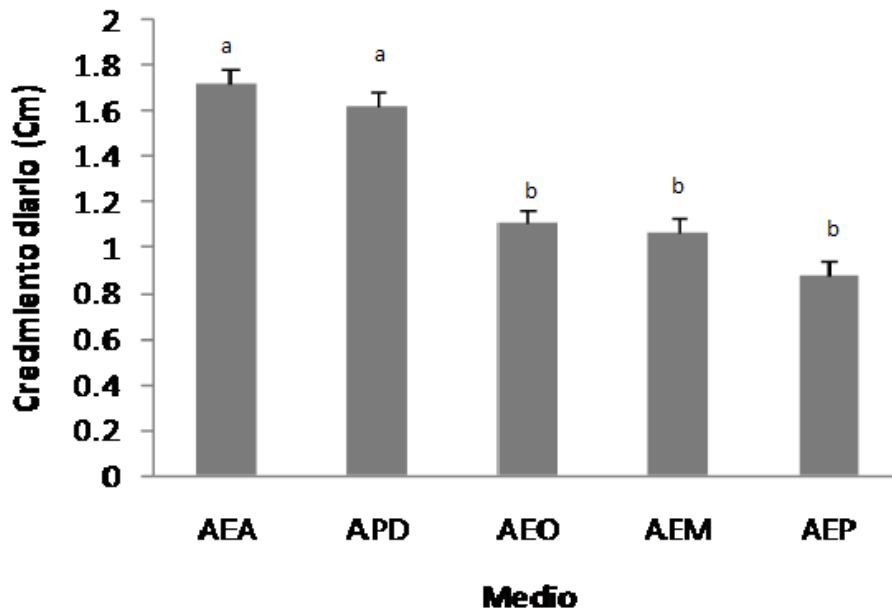


Figura 6 Crecimiento real por día de *Helvella lacunosa*. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($\alpha \leq 0.001$)

Los valores de Épsilon de Greenhouse-Geisser fueron de 0.62 y 0.83 para el diámetro del micelio y crecimiento real del micelio respectivamente, por lo que los resultados obtenidos con los ANOVA-2V-RM se consideran estadísticamente confiables.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio, AEA fue el único medio donde se aisló la cepa, Este medio resulto ser un excelente elicitor en la obtención de cepas de *H. lacunosa*, Contrastando con la literatura la cual indica que los medios de cultivo a base de Extracto de Alfalfa son exclusivos para el

aislamiento de hongos micorrízicos de tipo arbuscular. Existen nulos trabajos sobre el aislamiento de *H. lacunosa*, sin embargo. Chamizo et al., 2009; comprobó que la alfalfa es un excelente elicitor en la obtención de micelio de hongos ectomicorrízicos. En contraste los medios sintéticos EMA y APD utilizados frecuentemente para el aislamiento de hongos, no fueron efectivos para el aislamiento de *H. lacunosa*, resultado contrastante con los obtenidos por Güler y Arkan (1999), quienes lograron aislar en estos medios, cepas del *Morchella esculenta*, especie que también es de carácter ectomicorrízico y pertenece al mismo orden (Pezizales) que *H. lacunosa*. En contraste con los resultados de Malvárez et al. (2001), quienes aislaron cepas del hongo micorrízico *Monilinia spp.*, en medios de cultivo APD y EMA.

APD resultó ser el mejor medio para el crecimiento de cepas de *H. lacunosa*, ya que favoreció la mayor velocidad de crecimiento. En ambos medios el diámetro del micelio converge al quinto día

La importancia de esta investigación radica en que existe poca o nula información referente al aislamiento del hongo *H. lacunosa*. Y el aporte es la propuesta de tres medios de cultivo complejos como AEO, AEP y AEA, para la propagación y crecimiento de cepas *H. lacunosa*. La mayoría de los estudios están enfocados a la obtención de cepas de hongos micorrízicos arbusculares, los cuales tienen que ver con el incremento de biomasa en cultivos lo que indica un valor comercial. Mientras que los hongos ectomicorrízicos van dirigidos a la conservación de bosques.

CONCLUSIONES

Se obtuvo la cepa del hongo micorrízico *H. lacunosa*, mediante la aplicación de la técnica de crecimientos sucesivos. Se evaluaron cinco medios de cultivo de los cuales en el único medio donde se aisló la cepa de *H. lacunosa* fue el medio AEA. Mientras que en los cuatro medios de cultivo restantes no se obtuvo el micelio.

En esta fase de la investigación se obtuvo un medio complejo (AEA) el cual es un excelente elicitor en la obtención y crecimiento de cepas del hongo ectomicorrízico *H. lacunosa*. Y un medio complejo AEO que presenta características similares al AEA y APD para el crecimiento y propagación de la cepa de *H. lacunosa*.

De acuerdo al análisis estadístico se concluye que *H. lacunosa*, se desarrolla de mejor manera en el medio APD. Al presentarse diferencias significativas de crecimiento con respecto a los cuatro medios restantes. Sin embargo tanto APD como AEA,

convergen al quinto día *in vitro*. Por lo que respecta al crecimiento acumulado el resultado de las comparaciones múltiples mediante la prueba de Scheffé; se concluye que no hubo diferencias significativas ($p > 0.1$) entre los medios AEA, APD y AEO, ni entre los medios AEM y AEP. Mientras que en el crecimiento diario del micelio no hubo diferencias significativas ($p > 0.1$) entre los medios AEA y APD, ni entre los medios AEO, AEM y AEP.

Las perspectivas de este tipo de investigación son amplias: seguir incrementando el conocimiento de este grupo de hongos en México, contribuyendo con esto al conocimiento de la diversidad fúngica, especialmente en el Estado de México, al mismo tiempo seguir estudiando grupos de Ascomycetes de los cuales se tiene poco conocimiento en el país, en especial del orden Pezizales, cuyo representante aquí estudiado es un hongo de importancia económica y ecológica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo de la Universidad Autónoma del Estado de México, a este trabajo, en el proyecto con clave 2341/2006, el cual se desarrolla en el Instituto en Ciencias Agropecuarias y Rurales. Un especial agradecimiento a los pobladores del municipio de Ocoyoacac del Estado de México, quienes ayudaron en la ubicación y colecta de hongos.

REFERENCIAS

- Alarcón, A. and Ferrera-Cerrato, R. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra*. 17, 179-191.
- Carrillo L., 2003. Hongos. *Microbiología Agrícola*, Capítulo 7. 14 pp.
- Chamizo, A., Cerrato, F., Ortiz, M.C., Santizo, J.A., Varela, L., Alarcón, A. 2009. Inoculación de Alfalfa con Hongos Micorrízicos Arbusculares y Rizobacterias en dos Tipos de Suelo. *Terra Latinoamericana*. 27, 197-205.
- Brundett, M., Buegher, N., Dell, B., Grove, T. and Malajazuk, N. 1996. Working with Mycorrhizas on Forestry and Agriculture. Peter Lynch. Australia. Monograph 32.
- Deacon, J.W. 1993. Introducción a la Micología Moderna. Editorial Limusa. 2ª ed. México, D. F. 13-19 pp.

- Díaz, G. and Honrubia, M. 1999. Crecimiento y nutrición de plántulas micorrizadas de *Pinus halepensis* bajo diferentes regímenes de fertilización. II Congreso Latinoamericano de Micología. Venezuela.
- Gaitán, H.R., Salmone, D., Pérez, M.R., Mata, G., 2006. Manual Práctico del Cultivo de Setas, Aislamiento, Siembra y Producción. Instituto de Ecología A.C.
- Gerhardt, E., Villa, J., Llimona, X. 2000. Hongos de España y Europa. Manual de identificación. Omega, España. 957 pp.
- Güler, Perihan y O. Arkan. 1999. Cultural Characteristics of *Morchella esculenta* Mycelium on Some Nutrients. Turkish Journal Biology 24, 783–794.
- Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto-Velazco, C., Guzmán-Dávalos, L. 1993. El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales Instituto Politécnico Nacional. México.
- Hawksworth, L.D. 1997. The critical role of fungi in the conservation of biodiversity. En: VI Congreso Nacional de Micología. IX Jornadas Científicas. UNACH- Sociedad Mexicana de Micología Tapachula, Chiapas. 5-6 pp.
- Hendersen, D.M., P.D. Orton, R. Watling, 1969. Flora of British Fungi: color identification chart. Her Majesty's Stationery Office, Edinburgh, U.K.
- Jennings, D.H. and Lysek, G. 1999. Fungal Biology. Bios Scientific Publishers. EEUU. 165 pp.
- Kolmogorov, A. 1933. Grundbegriffe der Wahrscheinlichkeitsrechnung. Berlín: Julius Springer.
- Kolmogorov, A. 1989. Publications of A.N. Kolmogorov. Annals of Probability. 17, 945-964.
- Levene, H. 1960. Robust tests for equality of variances. Stanford University Press. 278–292 pp.
- Lincoff, G. 2002. Field guide to Mushrooms. National Audubon Society North American Mushrooms. 926 pp.
- Malvárez G., Rodríguez A., Aguilar C., Silvera E., Mondino P., 2001. Identificación de especies de *Monilinia spp.* por PCR con PRIMERS Específicos. Agrociencia. 5, 48-53.
- Mikola, P. 1970. Mycorrhizal inoculation in afforestation. International Review of Forest Research. 114 pp.
- Munyanziza, E., Kehri, H., Bagyaraj, D., 1997. Agricultural Intensification, soil biodiversity and agro-ecosystem function in the tropic: the role of mycorrhiza in crops and trees Applied Soil Ecology. 6, 77-85.
- O'Dell I., Dirzo R., 1992. Forest as human-dominated ecosystem. Science. 277, 522-525.
- Perez, M., Ferrera C.R. 1997. Mycorrhizal Interactions with Plants and Soil Organisms in Sustainable Agroecosystems. In: Soil Ecology in sustainable Agricultural systems. L. Brussaard R. Ferrera- Cerrato (eds) CRC Press. USA.
- Pérez, M. 2002. Aspectos fisiológicos y ecológicos de la simbiosis ectomicorrízica y fuentes utilizadas en la producción de inoculantes forestales. IRENAT. Pp. 47-66.
- Ruiz, M.L. 1983. Métodos estadísticos de investigación. INIA 2ª ed., Madrid, España. 365 pp.
- Sánchez, F., Honrubia, M. and Torres, P. 2001. Effect of pH, water stress and temperature on in vitro cultures of ectomycorrhizal fungi from Mediterranean forests. Cryptogamie Mycology 22, 243-258.
- Xoconostle, C., 2002. Impacto de la biotecnología agrícola en cultivos: el caso de las micorrizas. Avances y perspectivas 21: 263-267.

Submitted January 18, 2011 – Accepted September 18, 2012
Revised received October 25, 2012