

Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos

ALFREDO VÁZQUEZ-GARCÍA*
GUADALUPE SANTIAGO-MARTÍNEZ*
ARTURO ESTRADA-TORRES*

Resumen. Se estudió el efecto del pH sobre el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos: *Amanita muscaria*, *Laccaria bicolor*, *Pisolithus arrhizus*, *Rhizopogon* sp., *Scleroderma polyrhizum*, *Suillus glandulosipes*, *S. tomentosus*, *Suillus* sp. y *Terfezia olbiensis*. Para la evaluación del desarrollo se midió: velocidad media de crecimiento, diámetro final de la colonia y peso seco. Las cepas de *Amanita muscaria* presentaron un crecimiento lento sin diferencias significativas en los pH de 4 a 7; *Laccaria bicolor* presentó su mayor crecimiento en los pH de 6 y 7; *Pisolithus arrhizus* tuvieron su mayor crecimiento en los pH de 4 a 6; *Rhizopogon* sp. 5.0 y 6.0; *Scleroderma polyrhizum* 6.0 y *Suillus* 4 a 6. *Terfezia olbiensis* fue la única cepa que se desarrolló mejor en pH 8.0; además, fue la de crecimiento más rápido, por lo que el experimento se finalizó a los 18 días.

Palabras clave: hongos ectomicorrizógenos, pH, *Amanita*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Suillus*, *Scleroderma*, *Terfezia*.

Abstract. The effect of pH on growth rate was studied in fifteen strains of ectomycorrhizal fungi, and belong to *Amanita muscaria*, *Laccaria bicolor*, *Pisolithus arrhizus*, *Rhizopogon* sp., *Scleroderma polyrhizum*, *Suillus glandulosipes*, *S. tomentosus*, *Suillus* sp. and *Terfezia olbiensis*. The tested pH values were 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0. The variables studied were average growth rate, final diameter and dry weight of the fungal colonies. *Amanita muscaria* strains had slow growth, without statistical significant differences at 4 to 7 pH; *Laccaria bicolor* had its larger growth at pH of 6 and 7; *Pisolithus arrhizus* at pH of 4 to 6; *Rhizopogon* sp. at 5 and 6; *Scleroderma polyrhizum* at 6 and *Suillus* at 4 to 6. In contrast, strain of *Terfezia olbiensis* was the only one that grew better at pH of 8.0, and its growth was so faster that the experiment was concluded at 18 days.

Key words: ectomycorrhizal fungi, pH, *Amanita*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Suillus*, *Scleroderma*, *Terfezia*.

Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos

ALFREDO VÁZQUEZ-GARCÍA*
GUADALUPE SANTIAGO-MARTÍNEZ*
ARTURO ESTRADA-TORRES*

Resumen. Se estudió el efecto del pH sobre el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrizógenos: *Amanita muscaria*, *Laccaria bicolor*, *Pisolithus arrhizus*, *Rhizopogon* sp., *Scleroderma polyrhizum*, *Suillus glandulosipes*, *S. tomentosus*, *Suillus* sp. y *Terfezia olbiensis*. Para la evaluación del desarrollo se midió: velocidad media de crecimiento, diámetro final de la colonia y peso seco. Las cepas de *Amanita muscaria* presentaron un crecimiento lento sin diferencias significativas en los pH de 4 a 7; *Laccaria bicolor* presentó su mayor crecimiento en los pH de 6 y 7; *Pisolithus arrhizus* tuvieron su mayor crecimiento en los pH de 4 a 6; *Rhizopogon* sp. 5.0 y 6.0; *Scleroderma polyrhizum* 6.0 y *Suillus* 4 a 6. *Terfezia olbiensis* fue la única cepa que se desarrolló mejor en pH 8.0; además, fue la de crecimiento más rápido, por lo que el experimento se finalizó a los 18 días.

Palabras clave: hongos ectomicorrizógenos, pH, *Amanita*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Suillus*, *Scleroderma*, *Terfezia*.

Abstract. The effect of pH on growth rate was studied in fifteen strains of ectomycorrhizal fungi, and belong to *Amanita muscaria*, *Laccaria bicolor*, *Pisolithus arrhizus*, *Rhizopogon* sp., *Scleroderma polyrhizum*, *Suillus glandulosipes*, *S. tomentosus*, *Suillus* sp. and *Terfezia olbiensis*. The tested pH values were 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0. The variables studied were average growth rate, final diameter and dry weight of the fungal colonies. *Amanita muscaria* strains had slow growth, without statistical significant differences at 4 to 7 pH; *Laccaria bicolor* had its larger growth at pH of 6 and 7; *Pisolithus arrhizus* at pH of 4 to 6; *Rhizopogon* sp. at 5 and 6; *Scleroderma polyrhizum* at 6 and *Suillus* at 4 to 6. In contrast, strain of *Terfezia olbiensis* was the only one that grew better at pH of 8.0, and its growth was so faster that the experiment was concluded at 18 days.

Key words: ectomycorrhizal fungi, pH, *Amanita*, *Laccaria*, *Pisolithus*, *Suillus*, *Scleroderma*, *Terfezia*.

Introducción

El pH del suelo es muy importante porque influye en la población microbiana, así como en la disponibilidad de nitrógeno, fósforo, calcio y magnesio, entre otros (Bockheim, 1991), considerándose que la mayoría de los nutrientes están disponibles para las plantas a los pH de 6.5 a 7.5 (Tamhane *et al.*, 1986).

Sin embargo, la intervención del hombre induce cambios importantes en el pH edáfico; así, en los suelos en los que se han extraído minerales con su posterior acumulación en la superficie, el pH se modifica notablemente (Malajczuk *et al.*, 1994), en tanto muchos suelos de Europa y Norteamérica se han acidificado por la precipitación de soluciones sulfúricas y ácidos nítricos, o el depósito de bióxido de azufre, óxidos de nitrógeno o partículas que contienen sulfato o nitrato de amonio (Freedman, 1989; Willenborg *et al.*, 1990). Estos cambios ocasionan graves daños en los procesos edáficos.

La ectomicorriza es la asociación mutualista entre las raíces de plantas como las coníferas y el micelio de algunos hongos del suelo; en esta asociación, el hongo rodea las raíces secundarias de las plantas formando una red de hifas entrelazadas llamado manto; intercelularmente, el hongo rodea a las células corticales formándose la red de Hartig (Smith y Read, 1997). En esta asociación se favorece la captación de agua y nutrientes del suelo, se provee a la planta de resistencia a condiciones ambientales extremas como sequía, pH y temperatura, y se proporciona protección contra patógenos (Honrubia *et al.*, 1992).

La susceptibilidad de las plántulas a ser micorrizadas depende de factores ambientales y químicos como disponibilidad de nutrientes, temperatura y pH, donde la tolerancia de los hongos a estos factores puede influir en la colonización y establecimiento de las micorrizas. Estas características podrían ser utilizadas como uno de los criterios de selección de hongos, para que puedan ser útiles en los programas de reforestación, sobre todo en lugares con condiciones adversas (Hormilla *et al.*, 1994).

Cada tipo de hongo puede tener diferentes reacciones en cada valor de pH, pero la información concerniente al pH óptimo necesario para el establecimiento de una simbiosis entre un hongo específico y las raíces de su hospedero es todavía limitada (Hung y Trappe, 1983). El pH del medio de cultivo afecta el crecimiento de los hongos ectomicorrizógenos (Zak, 1973) y aunque se han registrado datos experimentales que indican un buen crecimiento a pH desde 3.2 hasta 6.5, el óptimo oscila entre 4.5 y 5.5 para la mayoría de los aislamientos probados. También existen algunas especies con buen crecimiento a un pH de 6.8 y 8.3 (Hung y Trappe, 1983). No obstante, los experimentos *in vitro* que miden el efecto del pH sobre el crecimiento fúngico deben ser interpretados con precaución, ya que los resultados pueden ser afectados por la duración del ensayo, la fuente de nitrógeno o la adición de sales de hierro antes o después de la esterilización del medio (Hung y Trappe, 1983).

En México, el pH de los suelos está sujeto a cambios dramáticos (Castro-Servín, 1995); por un lado, los problemas de la contaminación por gases y lluvia ácida han afectado a las zonas boscosas aledañas a las grandes ciudades durante los últimos años (Arnolds, 1991), en tanto que, por otro lado, los problemas de desertificación por degradación ecológica (Llerena-Villalpando y Sánchez-Bernal, 1992) afectan cerca del 54 % de la superficie total de la República Mexicana, la cual está en peligro de convertirse en zonas tepetatosas (Werner, 1992). Por lo anterior, es necesario emprender nuevas formas de protección y conservación, así como detectar qué hongos ectomicorrizógenos son capaces de tolerar los cambios en el suelo y lograr que la asociación se desarrolle para el mejor establecimiento de las plantas utilizadas con fines de rehabilitación. Es por esto, que el propósito de este trabajo fue determinar la influencia que tiene el pH sobre el desarrollo de cepas de hongos ectomicorrizógenos bajo condiciones de cultivo axénico, así como observar su tolerancia a la acidez y/o alcalinidad, para proporcionar las bases que permitan su empleo en vivero y/o campo.

Materiales y métodos

Las cepas estudiadas, que se encuentran depositadas en el cepario de hongos ectomicorrizógenos del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, se obtuvieron a partir de cuerpos fructíferos procedentes de diferentes localidades del estado de Tlaxcala y pertenecen a siete géneros. Asimismo, se incluyó una cepa proveniente del estado de Oaxaca (Cuadro 1). Los materiales de referencia se encuentran depositados en el herbario TLXM de la misma institución.

Para el crecimiento activo, las cepas seleccionadas se sembraron en medio papa-dextrosa-agar (PDA) (Bioxon Becton Dickinson de México) y se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante cuatro semanas.

El pH del medio biotina-aneurina-ácido fólico agar (BAF) (Moser, 1960) se ajustó a los pH de 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 y 8.0, agregando HCl o KOH 1N, según fuera necesario.

La colonia en crecimiento activo se cuadrículó con un bisturí estéril, cortando fragmentos de 5 mm por lado y transfiriendo un cuadro a cada caja de Petri con el medio de cultivo BAF previamente ajustado a los diferentes valores de pH. Se sembraron cuatro repeticiones para cada una de las pruebas y se incubaron a 25°C en la oscuridad durante 30 días. El diámetro de la colonia se midió cada tercer día para poder estimar la velocidad de crecimiento.

En cada tratamiento se midió el pH inicial y final del medio de cultivo con un potenciómetro modelo PHI 34 marca Beckman provisto con un electrodo para sólidos.

Cuadro 1. Listado de especies estudiadas

Núm. de Cepa	Taxon	Material de referencia	Procedencia	Vegetación
TLAX 22	<i>Amanita muscaria</i> (L.) Hook.	AME 1045	1	I
TLAX 27	<i>A. muscaria</i>	AKL 2252	1	I
TLAX 30	<i>Laccaria bicolor</i> (Maire) P. D. Orton	CLV 55	1	I
TLAX 13	<i>Pisolithus arrhizus</i> (Scop.) Rauschert.	ENCB 5	2	II
TLAX 37	<i>P. arrhizus</i>	AME 1177	3	III
TLAX 28	<i>Rhizopogon</i> sp.	AKL 2254	1	I
TLAX 38	<i>Scleroderma polyrhizum</i> (J. F. Gmel.) Pers.	AME 1263	3	IV
TLAX 10	<i>Suillus glandulosipes</i> Thiers & A. H. Sm.	SMG 284	4	V
TLAX 5	<i>S. glandulosipes</i>	AKL 1588	4	V
TLAX 35	<i>S. glandulosipes</i>	AKL 2296	4	V
TLAX 9	<i>S. tomentosus</i> (Kauffman) Singer	SMG 276	1	I
TLAX 24	<i>S. tomentosus</i>	AME 1009	1	I
TLAX 20	<i>Suillus</i> sp.	AKL 1970	5	VII
TLAX 32	<i>Suillus</i> sp.	AKL 2264	6	VIII
TLAX 16	<i>Terfezia olbiensis</i> Tul.	AKL 1594	4	IV

Procedencia: (1) Cañada Grande, Ladera Este, Volcán la Malintzin, Mpio. Huamantla, Tlax. (2) Oaxaca. (3) 1 km al N de Sn Francisco Temezontla, Mpio. de Panotla, Tlax. (4) Cerro Tepeticpac, Mpio. de Totolac, Tlax. (5) El Peñón, N del Rosario, Mpio de Tlaxco, Tlax. (6) 2 km al NW de Miltepec, Mpio. de Españita, Tlax. *Vegetación:* (I) bosque de *Pinus-Abies*; (II) *Juglans*; (III) bosque de *Quercus*; (IV) bosque de *Pinus leiophylla* y *Arbutus*; (V) área reforestada con *Pinus*; (VI) matorral secundario y bosque residual de *Quercus*; (VII) bosque de *Abies*, *Pinus* y *Quercus*; (VIII) bosque de *Quercus-Arbutus-Juniperus*.

Con los datos de los diámetros coloniales obtenidos cada tercer día, se realizó un análisis de regresión lineal para obtener el valor de la pendiente de cada tratamiento. A estas pendientes se les consideró como la velocidad media de crecimiento de la colonia considerando los criterios de Santiago-Martínez (1992). El diámetro final es la última medición del diámetro colonial.

Al terminar el periodo de incubación, se determinó la producción de biomasa a través del peso seco de la colonia con la técnica modificada de Chapman *et al.* (1990), la cual consistió en eliminar el agar poniendo la colonia en agua hirviendo, posteriormente ésta se enjuagó con agua caliente y se colocó en un horno a 80°C, hasta obtener peso constante.

A los datos obtenidos de velocidad media de crecimiento, diámetro final y producción de biomasa de cada cepa en los diferentes pH se les aplicó análisis de varianza simple o bifactorial, según el caso, para comparar el crecimiento en los diferentes pH entre cepas del mismo género, así como la prueba múltiple de Tukey con nivel de significancia de $P=0.05$ para establecer los tratamientos en los que hubo diferencias estadísticas. Para esto se utilizó el programa estadístico SAS, Institute (1985).

Resultados y discusión

Con base en los resultados de los análisis estadísticos, podemos determinar que el crecimiento de las cepas fue afectado por el pH, observándose que el valor óptimo para la mayoría de los aislamientos varía entre 4.0 y 6.0 y sólo la cepa de *Terfezia olbiensis* TLAX 16 tiene su crecimiento óptimo en pH de 8.0. Esto puede deberse a las condiciones en que crece este hongo en el campo, ya que se encontró en un lugar donde predominan los suelos calcáreos, con valores de pH básicos.

El crecimiento de las cepas de *Amanita muscaria* fue lento, comenzando a formar hifas a los cuatro días aproximadamente. La cepa TLAX 22 presentó crecimiento únicamente en los pH de 4 a 7 y la cepa TLAX 27 creció en todos los tratamientos aunque los valores más altos de las variables estudiadas los presentó en los mismos valores de pH en los que se desarrolló la otra cepa de esta especie. Los análisis de varianza bifactoriales nos indicaron que no hay diferencias significativas de los crecimientos en los pH de 4.0 a 7.0; pero al comparar el crecimiento entre cepas, la TLAX 22 tiene mayor crecimiento con diferencias significativas, aunque es importante señalar que no se desarrolló en los valores de pH extremos; únicamente se observó interacción entre cepas y pH del medio en la producción de biomasa. Torres y Honrubia (1991) dieron resultados parecidos, ya que en ambos estudios no hay diferencias significativas entre los tratamientos para cada cepa (Cuadros 2, 3 y 4, Figs. 1-4).

En cuanto al crecimiento de las cepas de *Pisolithus arrhizus*, se observó que la cepa procedente de Oaxaca (TLAX 13) tiene mayor crecimiento que la TLAX 37 presentando diferencias estadísticas entre ellas; en los pH de 4.0, 5.0 y 6.0, se encontraron los valores más altos en las tres variables para las dos cepas, presentando diferencias estadísticas con los valores de los pH de 7.0 y 8.0 (Cuadros 2, 3 y 4). La cepa TLAX 37 es más sensible a los pH básicos, ya que no creció en pH 8.0. La interacción entre cepas y medios no fue significativa.

Hung y Trappe (1983) observaron que algunas cepas de *Pisolithus arrhizus* pueden crecer en condiciones alcalinas, pero las cepas mexicanas estudiadas desarrollan sólo algunas hifas sobre el cuadro del inóculo cuando se pasan a medios de cultivo con pH de 7.0 y 8.0.

Las cepas del género *Suillus* presentaron gran variabilidad en cuanto a su patrón de crecimiento. Así, *S. glandulosipes* TLAX 10 se desarrolló bien en los pH de 3.0 a 6.0, obteniendo su mayor velocidad de crecimiento y diámetro final en el pH de 3.0 y su mayor producción de biomasa en el de 5.0. La cepa de *S. glandulosipes* TLAX 5 mostró su mayor velocidad de crecimiento y diámetro final en el pH de 7.0 y su mayor producción de biomasa en el pH de 5.0; finalmente, la cepa TLAX 35 presentó su mayor desarrollo en el pH de 6.0, siendo la única cepa de *Suillus* que creció en el pH de 8.0 (Cuadros 2, 3 y 4).

La cepa de *Suillus tomentosus* TLAX 9 presentó su mayor diámetro final y producción de biomasa en el pH de 4.0 y la mayor velocidad media de crecimiento en el de 6.0; mientras tanto la cepa TLAX 24 de la misma especie creció bien en los

pH de 3.0 a 7.0, determinándose como pH óptimo el de 5.0 para producción de biomasa y el de 7.0 para la velocidad de crecimiento y el diámetro final (Cuadros 2, 3 y 4).

La cepa de *Suillus* sp. TLAX 20 tuvo su mayor desarrollo en el pH de 6.0, en tanto la cepa de *Suillus* sp. TLAX 32 presentó su máximo crecimiento en los pH de 4.0 y 6.0 en la velocidad de crecimiento y diámetro final, y su mayor producción de biomasa en el de 6.0 (Cuadros 2, 3 y 4).

Las cepas de *Suillus* comenzaron su crecimiento a partir del cuarto día; sin embargo las cepas TLAX 5 y TLAX 20 presentaron un crecimiento lento que se aceleró hasta los 12 días.

El análisis bifactorial nos indicó que las cepas que presentaron mejor crecimiento en las tres variables fueron *Suillus glandulosipes* TLAX 10 y TLAX 5, y *Suillus* sp. TLAX 32; los valores de pH en los que crecieron estas cepas van de 3.0 a 6.0 (Cuadros 2, 3 y 4). El análisis también indicó que la interacción entre las cepas y los pH del medio fue significativa, es decir, las cepas respondieron de forma diferente a los distintos valores de pH.

La cepa de *Laccaria bicolor* TLAX 30 fue sensible a pH muy ácidos (3.0) no creciendo en dicha condición. También se pudo observar que las colonias obtuvieron sus mayores velocidades de crecimiento y diámetro final en los pH de 6.0 y 7.0 (Cuadros 2 y 3), aunque su mayor producción de biomasa se encontró en el pH de 6.0 (Cuadro 4). Jongbloed y Borst-Pauwels (1990) informaron que esta especie alcanza su mayor diámetro colonial en pH de 6.0, sin embargo, también señalaron que la mayor producción de biomasa se obtiene en pH de 4.8. El crecimiento de la colonia en pH de 8.0 fue escaso con un micelio postrado en el medio.

La cepa de *Rhizopogon* sp. TLAX 28 creció bien en pH de 6.0, con los valores más altos en las tres variables (Cuadros 2, 3 y 4). También presentó tolerancia para crecer en pH muy ácidos (3.0) o básicos (8.0), concordando con lo que manifiesta Jha *et al.* (1990) para un aislamiento de *R. luteolus*. Dennis (1985) registró que algunas cepas de *R. rubescens* y *R. vulgaris* presentan crecimiento óptimo en pH 6.0; por otro lado, Torres y Honrubia (1991) y Hung y Trappe (1983) estudiaron algunas cepas de *Rhizopogon* registrando su mayor crecimiento en otros valores de pH a los registrados en este estudio para la cepa TLAX 28. La cepa comenzó su crecimiento entre los 8 y 10 días de haberse sembrado.

La cepa de *Scleroderma polyrhizum* TLAX 38 alcanzó su mayor desarrollo en los pH de 5.0 y 6.0 en las tres variables (Cuadros 2, 3 y 4). Dennis (1985) registró una cepa de *Scleroderma bovista* con crecimiento óptimo en el mismo valor de pH. Esta cepa tiene un periodo de acondicionamiento al medio de cultivo de 12 días.

La cepa de *Terfezia olbiensis* TLAX 16 fue la única que presentó su mayor velocidad de crecimiento, diámetro final y biomasa (Cuadro 2, 3 y 4) en el pH de 8.0, por lo que se consideró como su pH óptimo, siendo sensible a los pH muy ácidos (3.0 y 4.0) y tolerante al pH de 5.0. Dado el desarrollo acelerado que presentó en el pH de 8.0, el experimento se concluyó antes del tiempo señalado en la metodología, ya que cubrió las cajas de petri a los 18 días. Se han realizado pocos estudios

Cuadro 2. Velocidad media de crecimiento (mm/día)

CEPA		3	4	5	6	7	8	\bar{x} CEPAS	
1	TLAX 22	\bar{x} e	no creció	0.35 0.16	0.41 0.16	0.38 0.16	0.28 0.22	no creció	0.36a
	TLAX 27	\bar{x} e	0.10 0.0	0.20 0.16	0.24 0.0	0.24 0.16	0.15 0.0	0.12 0.0	0.18b
	\bar{x} pH		0.10b	0.27a	0.33a	0.31a	0.22a	0.12ab	
2	TLAX 13	\bar{x} e	1.78 0.16	1.50 0.5	2.43 0.22	2.03 0.22	1.06 0.4	0.10 0.05	1.48a
	TLAX 37	\bar{x} e	0.62 0.3	0.94 0.22	0.94 0.3	1.17 0.3	0.005 0.03	no creció	0.74b
	\bar{x} pH		1.20ab	1.22ab	1.68a	1.60a	0.53b	0.10c	
3	TLAX 10	\bar{x} e	1.48 0.16	1.31 0.16	1.27 0.22	1.26 0.16	0.44 0.11	no creció	1.15a
	TLAX 5	\bar{x} e	0.73 0.16	1.0 0.16	1.17 0.09	1.12 0.16	1.36 0.16	no creció	1.07a
	TLAX 35	\bar{x} e	1.24 0.16	0.84 0.22	0.95 0.22	1.27 0.11	1.08 0.16	0.08 0.08	0.91b
	TLAX 9	\bar{x} e	no creció	0.99 0.16	0.75 0.11	1.06 0.16	0.49 0.22	no creció	0.82b
	TLAX 24	\bar{x} e	0.84 0.16	0.87 0.22	0.92 0.22	0.91 0.3	0.94 0.11	no creció	0.90b
	TLAX 20	\bar{x} e	0.48 0.22	1.03 0.07	1.29 0.16	1.40 0.16	0.27 0.16	no creció	0.89b
	TLAX 32	\bar{x} e	no creció	1.44 0.16	1.17 0.09	1.41 0.16	0.61 0.16	no creció	1.16a
\bar{x} pH		0.95b	1.07b	1.07b	1.21a	0.74c	0.08d		
4	TLAX 30	\bar{x} e	no creció	1.77ab 0.0	2.43a 0.16	2.67a 0.16	2.66a 0.16	1.1b 0.4	
5	TLAX 28	\bar{x} e	0.43c 0.16	0.88ab 0.16	1.19a 0.16	1.28a 0.16	0.46bc 0.3	0.06c 0.16	
6	TLAX 38	\bar{x} e	no creció	0.28b 0.07	0.91a 0.16	1.13a 0.16	0.27b 0.09	0.07b 0.16	
7	TLAX 16	\bar{x} e	no creció	no creció	2.59b 0.4	3.95ab 0.3	3.24ab 0.3	4.6a 0.4	

1) *Amanita muscaria*; 2) *Pisolithus arrhizus*; 3) *Suillus* spp.; 4) *Laccaria bicolor*; 5) *Rizopogon* sp.; 6) *Sclerotium polyrhizum*; 7) *Terfezia obliensis*. \bar{x} promedio de 4 repeticiones; e error estándar; letras iguales no hay diferencias significativas P=0.05.

Cuadro 3. Diámetro final (mm)

CEPA		3	4	5	6	7	8	\bar{x} CEPAS
1	TLAX 22	\bar{x} no creció	13.6	16.1	15.2	12.7	no	14.4a
		ϵ	0.9	0.8	1.2	1.1	creció	
	TLAX 27	\bar{x} 7.1	10.9	12.2	11.9	9.1	7.1	9.7b
	ϵ 0.4	0.8	0.6	0.8	0.5	0.4		
	\bar{x} pH	7.1b	12.2ab	14.2a	13.5a	10.9ab	7.1b	
2	TLAX 13	\bar{x} 52.7	58.5	69.5	59.2	37.5	7.0	47.4a
		ϵ 0.7	1.0	1.3	1.2	1.9	0.9	
	TLAX 37	\bar{x} 22.5	32.5	33.4	38.2	5.4	no	26.4b
	ϵ 1.6	1.2	1.3	1.3	0.6	creció		
	\bar{x} pH	37.6b	45.5ab	51.4a	48.7ab	21.4c	5.9c	
3	TLAX 10	\bar{x} 44.6	42.9	40.6	40.2	19.4	no	37.5a
		ϵ 0.9	0.7	1.1	0.9	0.6	creció	
	TLAX 5	\bar{x} 25.0	32.1	35.4	32.0	40.1	no	32.9ac
		ϵ 0.7	0.8	0.7	1.0	1.0	creció	
	TLAX 35	\bar{x} 40.1	26.6	30.1	39.6	32.6	7.1	29.4bc
		ϵ 1.0	1.3	1.3	0.5	1.0	0.6	
	TLAX 9	\bar{x} no creció	36.0	25.9	34.2	19.7	no	29bc
		ϵ 0.7	0.6	0.8	1.2	1.2	creció	
	TLAX 24	\bar{x} 26.1	27.7	27.9	27.7	28.0	no	27.5c
		ϵ 0.9	1.4	1.3	1.5	0.8	creció	
TLAX 20	\bar{x} 18.7	33.6	38.7	41.5	13.7	no	29.3bc	
	ϵ 1.0	0.6	0.7	0.7	0.9	creció		
TLAX 32	\bar{x} no creció	44.4	37.7	44.9	23.1	no	37.5ab	
	ϵ 0.6	0.5	0.6	0.6	0.8	creció		
	\bar{x} pH	30.9ab	34.8a	33.8a	37.2a	25.2b	7.1c	
4	TLAX 30	\bar{x} no creció	52.1ab	70.1a	78.0a	79.0a	35.7b	
	ϵ	0.5	1.0	1.1	1.1	2.3		
5	TLAX 28	\bar{x} 17.5cd	30.5ab	35.7a	40.9a	18.6bc	6.2d	
	ϵ 0.5	0.8	0.9	0.9	1.4	1.0		
6	TLAX 38	\bar{x} no creció	14.2c	32.0b	38.2a	12.5cd	8.5d	
	ϵ	0.2	0.8	0.8	0.5	0.5		
7	TLAX 16	\bar{x} no creció	no creció	48.6b	70.2ab	60.5ab	80.0a	
	ϵ			1.7	1.1	1.3	1.5	

1) *Amanita muscaria*; 2) *Pisolithus arrhizus*; 3) *Suillus* spp.; 4) *Laccaria bicolor*; 5) *Rizopogon* sp.; 6) *Scleroderma polyrhizum*; 7) *Terfezia obliensis*. \bar{x} promedio de 4 repeticiones; ϵ error estándar; letras iguales no hay diferencias significativas $P=0.05$.

referentes a este taxón y hasta el momento se tiene información de que este género se asocia con plantas arbustivas como *Helianthemum* y *Cistus* entre otras, encontrándose frecuentemente en suelos con pH alcalinos (Leduc *et al.*, 1986).

El pH del medio de cultivo puede modificar el patrón de ramificación de las hifas; un ejemplo muy evidente se presentó en la cepa de *Laccaria bicolor* TLAX 30 que en el pH de 8.0 presentó un micelio escaso y laxo, en tanto en el pH de 6.0 la colonia fue más compacta con micelio aéreo abundante; *Terfezia olbiensis* TLAX 16 presentó una colonia laxa y postrada en el medio con pH 5.0, pero la colonia fue más densa y con micelio aéreo abundante en el pH 8.0.

La mayoría de las cepas provienen de suelos forestales, donde el pH varía desde 5.0 hasta 6.5; otras cepas provienen de una zona de lomeríos de origen calcáreo donde el valor del pH del suelo es de 8 a 8.5. Las cepas se desarrollaron bien en los valores de pH probados en el laboratorio que se acercan a los pH de los suelos de los lugares de donde fueron recolectadas, por ejemplo, la cepa de *Laccaria bicolor*, que proviene de un suelo forestal con pH de 6.5, presentó un pH óptimo entre 6.0 y 7.0 en las pruebas de laboratorio (Cuadro 2, 3 y 4).

Las cepas de *S. glandulosipes* presentaron un comportamiento acidófilo a pesar de que provienen de un lugar con suelo calcáreo; estas cepas proceden de una plantación de pinos o de los manchones residuales de bosque que aún quedan en el sitio en que fueron recolectadas y normalmente se encuentran en lugares completamente cubiertos con hojarasca, lo que posiblemente disminuya el pH del área en la que están creciendo. Por otro lado, la cepa TLAX 35 presentó un crecimiento escaso en el pH de 8.0 en comparación con las otras cepas de *Suillus* que no crecieron en dicho valor de pH (Cuadro 3).

La única cepa que presentó su pH óptimo en valores alcalinos fue la de *Terfezia olbiensis*, ya que obtuvo su mayor desarrollo en pH de 8.0, teniendo el suelo de su lugar de procedencia las mismas condiciones de alcalinidad (Cuadros 2, 3 y 4).

Por otro lado, se ha observado que el pH de un medio de cultivo puede cambiar durante el crecimiento de los hongos y estos cambios pueden afectar la composición del medio. Además, se menciona que el efecto en el cambio del pH de una solución puede ser el resultado de la actividad metabólica de los hongos (Lilly y Barnett, 1951).

En el cuadro 5 se muestra como los pH iniciales son modificados por la acción de cada una de las cepas probadas. Así, las cepas de *Amanita muscaria* TLAX 22 y 27 incrementaron los valores en menos de media unidad en los pH de 3.0 y 4.0; en el pH de 6.0, el valor disminuyó hasta una unidad. Hung y Trappe (1983) reportaron una cepa de *Amanita muscaria* que disminuyó el pH de 6.0 hasta 3.4.

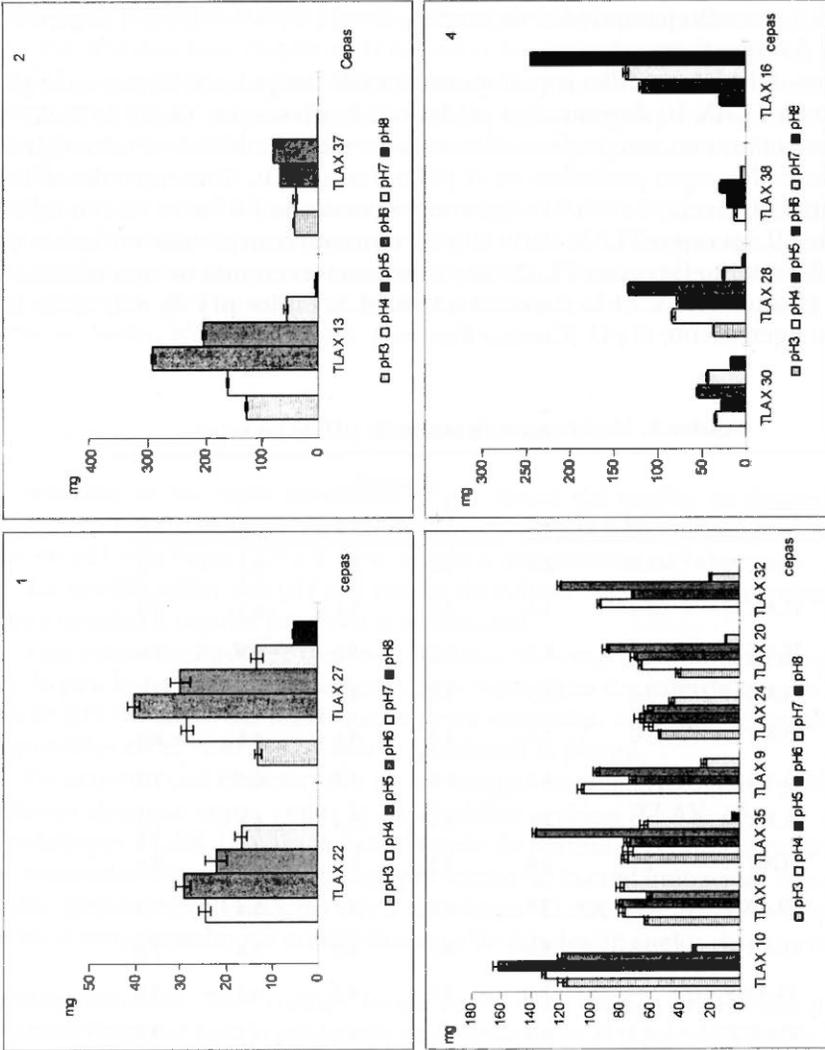
La cepa de *Laccaria bicolor* TLAX 30 aumentó ligeramente los valores de pH iniciales 3.0, 4.0 y 5.0; en tanto disminuyó los de 6.0, 7.0 y 8.0.

El patrón de variación del pH de las cepas de *Pisolithus arrhizus* es diferente entre ambas. La cepa TLAX 13 disminuyó a 3.3 y 4.1 los pH de 5.0 y 6.0 respectivamente; mientras que la cepa TLAX 37 decrementó el pH desde 6.0 hasta 4.6.

Cuadro 4. Producción de biomasa (mg)

CEPA		3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	\bar{x} CEPAS
1	TLAX 22	\bar{x} no e creció	24.8 1.3	29.5 1.6	22.3 2.4	16.9 1.2	no creció	23.4a
	TLAX 27	\bar{x} 13.2 e 0.7	28.7 1.3	40.4 1.4	30.2 2.2	13.4 1.3	5.3 0.2	21.9a
	\bar{x} pH	13.2a	26.7a	34.9a	26.2a	15.1a	5.3a	
2	TLAX 13	\bar{x} 127.1 e 2.4	160.9 3.0	292.9 4.1	202.7 4.0	57.6 2.8	5.8 1.1	141.2a
	TLAX 37	\bar{x} 43.1 e 1.3	98.7 3.2	67.8 2.0	80.0 1.6	1.4 0.3	no creció	58.2b
	\bar{x} pH	85.1bc	129.8ab	180.3a	141.3ab	29.5c	5.8c	
3	TLAX 10	\bar{x} 118.7 e 3.1	131.1 1.4	162.3 3.3	119.8 2.7	30.8 1.4	no creció	112.5a
	TLAX 5	\bar{x} 63.2 e 1.3	78.7 2.2	80.9 2.1	60.9 1.9	80.4 2.9	no creció	72.0b
	TLAX 35	\bar{x} 77.1 e 2.1	75.1 3.4	75.4 2.3	137.6 1.7	64.4 2.6	4.2 0.8	73.1b
	TLAX 9	\bar{x} no e creció	106.4 2.0	71.9 2.1	95.8 2.4	23.8 1.9	no creció	74.5b
	TLAX 24	\bar{x} 53.6 e 1.2	60.9 3.0	67.0 3.3	61.2 3.3	45.1 1.8	no creció	57.5b
	TLAX 20	\bar{x} 41.2 e 2.0	66.3 1.3	70.8 1.9	89.2 2.2	9.6 0.6	no creció	55.4b
	TLAX 32	\bar{x} no e creció	93.7 1.4	71.6 1.0	120.7 1.5	19.7 0.8	no creció	76.b
	\bar{x} pH	70.8a	87.5a	85.7a	97.9a	39.8b	4.2b	
4	TLAX 30	\bar{x} no e creció	34.6a 1.7	27.2a 1.4	54.6a 1.7	44.3a 1.9	16.1a 1.9	
5	TLAX 28	\bar{x} 36.7bcd e 0.7	83.3ab 1.5	76.3bc 2.8	133.6a 1.8	25.3cd 1.6	3.7d 1.0	
6	TLAX 38	\bar{x} no e creció	13.0bc 0.4	21.2ab 0.6	29.0a 1.4	5.6c 0.7	0.5c 0.2	
7	TLAX 16	\bar{x} no e creció	no creció	28.9c 1.4	118.3b 2.5	136.8b 2.5	244.8a 1.4	

1) *Amanita muscaria*; 2) *Pisolithus arrhizus*; 3) *Suillus* spp.; 4) *Laccaria bicolor*; 5) *Rhizopogon* sp.; 6) *Sclerotium polyrhizum*; 7) *Terfezia olbiensis*. \bar{x} promedio de 4 repeticiones; e error estándar; letras iguales no hay diferencias significativas P=0.05.



Figs. 1-4. 1, producción de biomasa (mg) producida por las cepas de *Amanita* en los diferentes pH; 2, producción de biomasa (mg) producida por las cepas de *Fisolithus arrhizus* en los diferentes pH; 3, producción de biomasa (mg) producida por las cepas de *Suillus* en los diferentes pH; 4, producción de biomasa (mg) producida por las diferentes cepas probadas en los diferentes pH.

Hung y Trappe (1983) reportaron cambios de 2.25 hasta 2.55 unidades para una cepa de *Pisolithus arrhizus* en esos mismos valores de pH.

Con *Rhizopogon* sp. TLAX 28, el pH de 6.0 bajó hasta 4.7, en tanto para los demás valores de pH la variación es de menos de media unidad.

Scleroderma polyrhizum TLAX 38 incrementó ligeramente los pH de 3.0 a 3.2 y de 4.0 a 4.1, no sobrepasando 0.5 de unidad; los pH de 6.0, 7.0 y 8.0 llegaron a 5.4, 6.6 y 7.5 respectivamente.

Las cepas del género *Suillus* spp. respondieron de la siguiente forma: en el pH de 3.0, la cepa TLAX 10 disminuyó el pH hasta 2.8; y las cepas TLAX 5, 35, 24 y 20 lo incrementaron en menos de media unidad; en el pH de 4.0, el valor disminuyó con todas las cepas probadas; en el pH inicial de 5.0, disminuyó desde 0.5 hasta 1.0 unidad; en el pH de 6.0 la disminución va desde 1.0 hasta 1.5 unidades; en el pH de 7.0, las cepas TLAX 10, 9, 20 y 32 disminuyeron el valor en menos de una unidad, en tanto las cepas TLAX 10 y 5 lo hicieron en más de una unidad, y solamente la cepa TLAX 24 lo disminuyó hasta 4.5. En los pH de 8.0, todas las cepas bajan ligeramente el pH (Cuadro 5).

Cuadro 5. Modificación del valor de pH de las cepas

Cepa	pH inicial					
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
TLAX 22	3.6	4.4	5.0	5.1	6.3	7.9
TLAX 27	3.4	4.3	4.6	5.1	6.3	8.0
TLAX 30	3.4	4.3	5.2	5.6	6.9	7.6
TLAX 13	3.0	3.3	3.3	4.1	6.4	7.6
TLAX 37	3.0	3.6	4.3	4.6	6.5	8.0
TLAX 28	3.3	4.0	4.6	4.7	6.5	7.7
TLAX 38	3.2	4.1	5.1	5.4	6.6	7.5
TLAX 10	2.8	3.9	4.5	5.2	6.3	7.8
TLAX 5	3.1	3.8	4.3	4.7	5.4	7.9
TLAX 35	3.1	3.9	4.3	4.5	5.4	7.3
TLAX 9	---	3.6	3.9	4.5	6.3	7.8
TLAX 24	3.2	3.9	4.1	4.6	4.5	7.9
TLAX 20	3.2	3.9	4.5	4.7	6.6	7.7
TLAX 32	---	3.6	4.1	4.5	6.3	7.7
TLAX 16	3.1	3.9	5.4	5.9	6.7	7.0

Terfezia olbiensis TLAX 16 incrementó en menos de media unidad los pH del 3.0 a 5.0; en los demás valores, el cambio también fue menor de 0.5 de unidad y sólo en el pH de 8.0 lo bajó hasta 7.0, siendo en ese pH donde la cepa obtuvo su mayor crecimiento.

Podemos decir que las cepas fueron capaces de modificar el pH del medio de cultivo y se puede notar que, por lo general, las mayores modificaciones coinciden con los tratamientos donde se obtuvieron los mayores valores en las diferentes variables estudiadas. Las modificaciones de los valores del pH del medio posiblemente tengan que ver con una estrategia de estos hongos para regular el ambiente en el que se desarrollan, tendiendo a modificar el pH hacia sus valores óptimos de crecimiento.

Las cepas estudiadas presentaron una gran variación intraespecífica, ya que cepas de la misma especie obtuvieron diferencias en la producción de metabolitos que confirieron distintas coloraciones al micelio y medio de cultivo en los diferentes valores de pH, tal como se notó con las cepas de *Amanita muscaria*, *Pisolithus arrhizus*, *Suillus glandulosipes* y *S. tomentosus*.

Conclusiones

La mayoría de las cepas modifican el pH inicial del medio, es decir, en los pH alcalinos y neutro se presenta una disminución a pH ligeramente ácidos, en tanto que en pH más bajos (3.0 y 4.0) se tiende a incrementar su valor.

La modificación del pH del medio de cultivo sugiere que la mayoría de las cepas tienden a regular la acidez o alcalinidad.

Con estos resultados se tienen candidatos de hongos que toleran diversos valores de pH, lo que permitirá utilizar cepas específicas de acuerdo con las condiciones de pH del suelo del lugar que se desee reforestar, así como de las condiciones disponibles en el vivero en el que se producirá la planta.

De acuerdo con el desarrollo de los hongos ectomicorrizógenos probados podríamos destinar cepas como la de *Pisolithus arrhizus* TLAX 13 o la de *Suillus glandulosipes* TLAX 10 para la introducción de plántulas ectomicorrizadas en suelos sometidos a fuerte acidificación por efecto de la contaminación; o cepas como *Suillus glandulosipes* TLAX 5 y 35; *S. tomentosus* TLAX 24 y *Terfezia olbiensis* TLAX 16 en la recuperación y/o establecimiento de árboles en suelos de origen calcáreo.

Agradecimientos. Este trabajo forma parte del proyecto "Selección de hongos ectomicorrizógenos para la producción de inoculantes en el estado de Tlaxcala", financiado por CONACYT, convenio número 4690-N9406.

Literatura citada

- ARNOLDS, E., 1991. Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe. *Agriculture Ecosystems and Environment* 35:209-244.
- BOCKHEIM, J. G., 1991. Suelos forestales. In: R. A. Young (ed.) *Introducción a las ciencias forestales*. Limusa, México, D. F.
- CASTRO-SERVÍN, J. M., GONZÁLEZ-KLADIANO V. Y T. HERNÁNDEZ-TEJEDA, 1995. Metales pesados en los suelos del Desierto de los Leones, Distrito Federal. *Revista Ciencia Forestal en México* 20:101-112.
- CHAPMAN, W. K., S. M. BERGH Y T. M. BALLARD, 1990. *In vitro* growth of ectomycorrhizal fungi on dilute agar. *Mycologia* 82:526-527
- DENNIS, J. J., 1985. *Effect of pH and temperature on in vitro growth of ectomycorrhizal fungi*. Report BC-X-273. Canadian Forestry Service, Pacific Forestry Centre, Vancouver.
- FREEDMAN, B., 1989. *Environmental ecology: The impacts of pollution and other stresses on ecosystem structure and function*. Academic, San Diego, California.
- HORMILLA S., M. K. DUÑABEITIA, J. M. BEGERRIL, P. CABRERIZO Y J. I. PEÑA, 1994. Growth of several ectomycorrhizal fungi in response to different pure culture conditions. In: *Current of Fourth European Symposium on Mycorrhizas*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada.
- HONRUBIA, M. P. TORRES, G. DÍAZ Y A. CANO, 1992. *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales*. Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. LUDECME VIII. Monografías 54. Murcia.
- HUNG, L. L. Y J. M. TRAPPE, 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH *in vitro*. *Mycologia* 75:234-241.
- JHA, B. N., SHARMA Y R. R. MISHRA, 1990. Effect of the growth of ectomycorrhizal fungi *in vitro*. In: B. L. Jalali, y H. Chand (eds.) *Current trends in mycorrhizal research. Proceedings of the National Conference on Mycorrhiza, held at Haryana Agricultural University, Hisar, India*, pp. 66-67.
- JONGBLOED R. H. Y G. W. F. H. BORST-PAUWELS, 1990. Effects of ammonium and pH on growth of some ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Acta Botanica Neerlandica* 39:349-358.
- LEDUC, J. P., J. DEXHEIMER Y G. CHEVALIER, 1986. Etude ultrastructurale comparée des associations de *Terfezia leptoderma* avec *Helianthemum salicifolium*, *Cistus albidus* et *C. salviaefolius*. In: V. Gianinazzi-Pearson y S. Gianinazzi. *Physiological and genetical aspects of Mycorrhizae*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, pp. 291-295.
- LLERENA-VILLALPANDO F. A. Y B. SÁNCHEZ-BERNAL, 1992. Recuperación de tepetates en la vertiente oriental del Valle de México. *Terra* 10, No. Especial :302-308.
- LILLY, V. G. Y H. L. BARNETT, 1951. *Physiology of the fungi*. Mc Graw-Hill, New York.
- MALAJCZUK, N., P. REDDELL Y M. BRUNDRETT, 1994. Role of ectomycorrhizal fungi in minesite reclamation. In: F. L. Pflieger y R. G. Linderman (eds.) *Mycorrhizae and plant health*. APS, St. Paul, Minnesota.
- MOSER, M., 1960. Die Gattung *Phlegmacium* (Schleimköpfe) in *Die Pilze Mitteleuropas* 4:1-440. Julius Klinkhardt, Bad Heilbrunn.
- SANTIAGO-MARTÍNEZ, M. G., 1992. *Pruebas de crecimiento, síntesis in vitro y caracterización de 10 cepas de hongos ectomicorrizógenos*. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- SAS Institute, 1985. *SAS® introductory guide for personal computers*, version 6 edition. SAS Institute, Cary, North Carolina.

- SMITH, S. E. Y D. J. READ, 1997. *Mycorrhizal symbiosis. Structure and development of ectomycorrhizal roots*. Academic, New York, pp. 161-290.
- TAMHANE, R. V., D. P. MOTHRAMANI, Y. P. BALI Y R. L. DONAHUE, 1986. *Suelos: su química y fertilidad en zonas tropicales*, 4a edición, Diana, México, D. F.
- TORRES, P. Y M. HONRUBIA, 1991. Dinámica de crecimiento y caracterización de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo. *Cryptogamie Mycologie* 12:183-192.
- WERNER, G., 1992. Suelos volcánicos endurecidos (tepetates) en el estado de Tlaxcala: distribución, rehabilitación, manejo y conservación. *Terra* 10, No. Especial:318-331.
- WILLENBORG, A., D. SCHMITZ Y J. LELLEY, 1990. Effects of enviromental stress factors on ectomycorrhizal fungi *in vitro*. *Canadian Journal of Botany* 68:1741-1746.
- ZAK, B., 1973. Classification of ectomycorrhizae. In: G. C. Marks y T. T. Kozlowski (eds.) *Ectomycorrhizae. Their ecology and physiology*. Academic, New York.

Recibido: 17-07-2001

Aceptado: 29-04-2002