

Caracterización de hongos ectomicorrícicos en un bosque de *Pinus jeffreyi* y su uso potencial como inóculo



**GOBIERNO
FEDERAL**

SEMARNAT



Vivir Mejor

**Caracterización de hongos
ectomicorrícicos en un bosque
de *Pinus jeffreyi* y su uso
potencial como inóculo**

Comisión Nacional Forestal

Gerencia de Desarrollo y Transferencia de Tecnología

Periférico Pte. #5360

Colonia San Juan de Ocotán

Zapopan, Jalisco C.P. 45019

Tel: 01 800 73 70000 y (33) 37 77 70 17

www.conafor.gob.mx

tt@conafor.gob.mx

Universidad Autónoma de Baja California

Instituto de Ciencias Agrícolas

Avenida Álvaro Obregón y Julián Carrillo

Mexicali, Baja California.

www.uabc.mx

Técnico Responsable del proyecto / Onécimo Grimaldo Juárez

ogrimaldoj@hotmail.com

Colaborador / Selene Aguilar Aguilar

Colaborador / Daniel González Mendoza

ÍNDICE

Introducción	6
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
Alcances del proyecto	9
1 Colecta de carpóforos (cuerpo fructífero)	9
Análisis de los carpóforos	13
2 Colecta de raíces micorrizadas de árboles adultos	13
Identificación de la ectomicorriza en raíces	14
Identificación de los morfotipos	14
Morfología de la asociación-ectomicorriza	15
Longitud	15
Morfotipo de la micorriza según su ramificación	16
Orden del sistema de ramificación	17
Abundancia de micorrizas en la raíz	18
Diámetro del eje principal	18
Presencia y abundancia de rizomorfos	19
Forma de la terminación en la raíz ectomicorrizada	19
Presencia o tipo de estructuras que se generan en la asociación ectomicorrícica	20
Color de las terminaciones	20
Características del sitio de muestreo	21
Tipo de sustrato	21

Características físicas del sustrato	21
Clasificación taxonómica de la especie de pino asociado al HEM	22
Evaluación del porcentaje de colonización en las raíces	22
Número de morfotipos por raíz	24
3 Producción de inóculo esporal	25
Colecta de cuerpos fructíferos	26
Separación de los cuerpos fructíferos.	27
Deshidratación	28
Molido de los pileos.	29
Envasado	30
4 Inoculación de plántulas de <i>Pinus jeffreyi</i> con inóculo esporal en polvo en condiciones asépticas	31
5 Tipos de inóculos	34
Conclusiones	35
Literatura citada	36

Introducción

La palabra “micorriza” se formó a partir del término griego *mycos* (hongo) y del vocablo latín *rhiza* (raíz) y fue acuñada como tal, por primera vez, por Frank en 1885. El hongo coloniza la raicilla y llega a ser parte integrante de ella, desarrollando un filamento micélico (de micelio: conducto extenso compuesto por varias hifas) que a modo de sistema radical y altamente efectivo, ayuda a la planta a adquirir diversos nutrientes, entre los más importantes el nitrógeno y fósforo, además de proveerle una mayor capacidad de absorción y retención de humedad del suelo por medio de las hifas asociadas (Páez *et al.*, 2006; Pérez-Moreno y Read, 2004).

A cambio, el hongo recibe hidratos de carbono (azúcares, almidones, entre otros) que necesita para su alimentación, estos hidratos de carbono provienen de la fotosíntesis de la planta. Así, esta asociación (hongo-raíz) favorece el crecimiento y el desarrollo, tanto de la planta como del hongo (Páez *et al.*, 2006).

Las ectomicorrizas se caracterizan por ser asociaciones mutualistas que han evolucionado a través del tiempo (130-180 millones de años) lo cual ha generado una amplia diversificación de los micobiontes, principalmente en los bosques templados y boreales en donde alrededor del 95 por ciento de las raíces de las especies forestales establecen la asociación ectomicorrízica.

Los hongos que forman las ectomicorrizas son en su gran mayoría basidiomicetos, aproximadamente 5 mil especies. Los ascomicetos se asocian con unas 3 mil especies de plantas y en menor proporción los zygomycetos (Castellano y Molina, 1989; García-Rodríguez *et al.*, 2006).

La asociación de los hongos ectomicorrízicos (ECM) y las plantas es el resultado de una compleja red de mecanismos a nivel bioquímico y se inicia a través de la germinación de la espora, la cual produce hifas monocarióticas que se fusionan y forman el micelio dicariótico, este micelio interactúa con el sistema radicular de las plantas. Posteriormente, las hifas se adhieren a la superficie de las raíces formando una estructura conocida como manto fúngico que tiene

generalmente un espesor de 20 a 100 μm .

En las últimas décadas, el uso de micorrizas en el ámbito forestal ha tenido un importante avance. Recientes estudios dirigen su atención en la adaptación de algunas especies de hongos micorrícicos a diferentes condiciones ambientales, para poder ser inoculados en pinos y lograr incrementar la sobrevivencia y la producción en las plantaciones forestales (González-Ochoa *et al.*, 2003). Por lo tanto, la presencia de hongos ectomicorrícicos es un prerequisite fundamental para un óptimo desarrollo de las especies de “pináceas” (Barroetaveña y Rajchenberg, 2003).

Debido a los beneficios que provee la ectomicorriza a las plantas forestales, se desarrolló el presente manual que plantea los siguientes objetivos.

Objetivo general

Evaluar la presencia de hongos ectomicorrícicos (HEM) en poblaciones de *Pinus jeffreyi*, de la reserva de Sierra de Juárez (Parque Constitución de 1857).

Objetivos específicos

- 1.- Evaluar la presencia de cuerpos fructíferos en las poblaciones de *Pinus jeffreyi*, en la reserva del Parque Nacional Constitución de 1857 en la Sierra de Juárez.
- 2.- Identificar la presencia de los morfotipos de ectomicorrizas asociadas al sistema radicular de *Pinus jeffreyi*.
- 3.- Colecta de cuerpos fructíferos de HEM para la producción de un inoculante esporal a partir de especies de HEM identificadas en la reserva de Sierra de Juárez.

Alcances del proyecto

El presente documento pretende mostrar el proceso de elaboración de inoculantes a partir de cuerpos fructíferos de hongos ectomicorrícicos para emplearse en plántulas de *Pinus jeffreyi* como una alternativa para mejorar su calidad y sobrevivencia en futuras reforestaciones en la Sierra de Juárez, así como un primer acercamiento al tipo de micorrizas que se encuentran presentes en las inmediaciones de la reserva natural del Parque Nacional Constitución de 1857.

1 Colecta de carpóforos (cuerpo fructífero)

La colecta de carpóforos se realiza durante las mañanas (de 8:00 a 10:00 am) cuando la temperatura es la óptima para la fructificación de los hongos. Los meses más recomendables para las colectas son julio y agosto y dependiendo de las condiciones de humedad del año, es posible encontrar algunos cuerpos fructíferos en los meses de septiembre y octubre y ocasionalmente en mayo.

Los factores que se consideraron para el muestreo fueron: tipo de vegetación, suelo, cubierta de materia orgánica, accesibilidad, perturbación y aspectos topográficos. Posteriormente, se delinearon transectos de 100x10 metros para el conteo y colecta de los carpóforos. Se recomienda realizar la colecta con precaución para no alterar el sustrato donde se ubiquen las diferentes especies. Las especies encontradas, así como su descripción taxonómica y su simbiosis se describe a continuación.

Clasificación de los cuerpos fructíferos colectados y su identificación taxonómica



Suillus sp. Gray

Himenio compuesto de tubos soldados entre sí, suelen ser de colores claros y brillantes: amarillos, vedes... La cutícula es de colores variados, sin restos, viscosa y pegajosa, característica que diferencia este género. Abundantes en los bosques, especialmente de coníferas, en el otoño. Los pies son variados, en algunos casos fibrosos o membranosos, con anillos gelatinosos o sin ellos (Arora, 1986).

HEM: SI



Lycoperdon perlatum Pers.

De forma más o menos globosa con la parte superior algo puntiaguda provisto de pie, coloración blanquecina de joven, más pardusco con la edad; recubierto de espinas o verrugas piramidales individuales de diversos tamaños. Al madurar se abre un orificio apical por donde salen las esporas. Comestible de joven mientras la gleba es blanca.

De hábitat variado, normalmente en el interior de los bosques, sobre el mantillo, pero también en zonas herbosas. Es una especie común que aparece formando grupos, a veces cespitosos, de mediados de verano a mediados de otoño (Ayala y Ochoa, 1998; Arora, 1986).

HEM: NO



Laccaria laccata Peck.

Pileo convexo con una ligera depresión central, margen ondulado. Láminas cerosas, gruesas, adheridas. Estípite fibroso, estriado. Esporas subglobosas a globosas, ligeramente ornamentadas, hialinas.

Habita en bosque de *Quercus* o mixto (Ayala y Ochoa, 1998).

HEM: SI



Geastrum floriforme Vittad.

Basidiocarpos pequeños, gregarios, de nueve a 17 milímetros de ancho cuando están cerrados, subglobosos a globoso deprimidos, algunas veces con el ápice en punta. Exoperidio higroscópico con ocho a diez (rara vez de siete a 11) rayos enrollados sobre el endoperidio cuando secos, con las puntas hacia arriba cuando húmedos, la capa externa del exoperidio blanco-grisácea, capa interna pardo-grisácea a grisácea. Endoperidio sésil, delgado, sub-globoso con un pedistoma poco levantado, fibroso irregularmente, concolor con el peridio. Columela pequeña, pardo a blanco-grisáceo. Gleba café-ocre. En suelo arenoso, en chaparral con chamizo y matorral costero (Ayala y Ochoa, 1998).

HEM: NO



Mycenastrum corium Guers.

Carpóforo globoso sin base estéril. Peridio grueso de dos capas. Gleba polvorienta olivácea. Dehiscencia esteliforme. Esporas globosas a subglobosas, verrugosa de apariencia reticulada. Capilicio espinoso fragmentado ramificado. Habita en suelos arenosos a los bordes de caminos, márgenes de arroyos, en pastizales, matorral costero y bosque de encino, a fines de invierno y primavera (Ayala y Ochoa, 1998).

HEM: SI



Astraeus hygrometricus Pers.

Basidiocarpó sésil en forma de estrella. Exoperidio grueso de consistencia cartilaginosa. Gleba polvorienta. Esporas globosas, grandes y ornamentadas. Capilicio ramificado con paredes gruesas, septado con abundantes fibulas. Habita en pastizales subáridos, matorrales áridos, bosque de *Quercus*, *Platanus* y *Pinus*, en todo el año; desde el nivel del mar hasta los 2 400 metros (Ayala y Ochoa, 1998; Arora, 1986).

HEM: SIZ

Nota:

Los cuerpos fructíferos del género *Suillus* no se identificaron hasta el nivel de especie, debido a que el estado de madurez que presentaban a la hora de la colecta no permitió la identificación de sus estructuras microscópicas en el laboratorio.

Análisis de los carpóforos

Los carpóforos recién recolectados se enjuagan con agua destilada y estéril. Luego se desinfectan externamente con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 por ciento por un minuto. Posteriormente son lavados con agua destilada y estéril para eliminar el desinfectante. Una muestra de las especies colectada es caracterizada y herborizada siguiendo las técnicas de Cifuentes et al. (1986). La identificación taxonómica se obtiene a través de la caracterización de las estructuras microscópicas y macroscópicas.

2 Colecta de raíces micorrizadas de árboles adultos

En los sitios donde se encuentran los carpóforos de los HEM, se colectan muestras de las raíces de los árboles presentes. Para esto se seleccionan al azar cuatro árboles de *Pinus*, ubicando en cada uno de ellos el punto de goteo en relación a los límites de la copa del árbol. Una vez ubicado este punto, se realiza una excavación en un cuadrante de un metro cuadrado con 20 centímetros de profundidad, en el cual se extraen las muestras de raíces de *Pinus*. Finalmente, todas las muestras son etiquetadas indicando el número de árbol, número de muestra y la fecha de colecta. Las raíces colectadas se lavan con agua destilada y estéril y se conservan en una solución de alcohol-formol-ácido acético (en proporción 1:1:1) para su preservación y observación posterior al microscopio estereoscópico con la finalidad de identificar las estructuras ectomicorrícicas ó morfotipos presentes (Garza et al., 2002). El promedio de la edad en los árboles de *Pinus jeffreyi* muestreados es entre 80 y 100 años, esto debido a que la zona muestreada se encuentra dentro de una reserva y los árboles dentro de ella son en su mayoría longevos.

Identificación de la ectomicorriza en raíces

La identificación de la asociación de las raíces con los HEM se realizó seleccionando raicillas secundarias, las cuales son recolectadas usando pinzas de disección de punta fina y colocándolas en una caja de Petri previamente dividida en cuadrículas de un centímetro cuadrado. Posteriormente, las estructuras ectomicorrícicas fueron identificadas bajo el estereoscopio usando las lentes de aumento de 20X y 40X. Las estructuras se aprecian como un cambio en el desarrollo radicular, “deformación”, del sistema radicular, en donde cada tipo de HEM presenta una “deformación” característica. En la figura 1, se muestran los morfotipos que se encuentran en *Pinus jeffreyi* en la zona de la Sierra de Juárez.

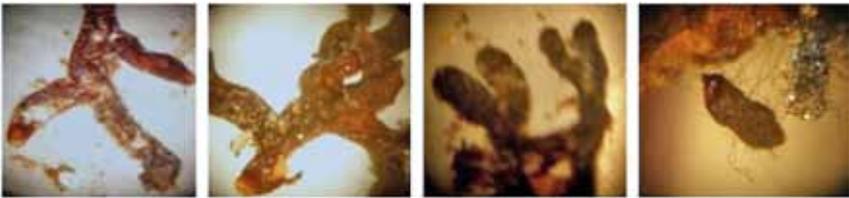


Figura 1. Morfotipos de ectomicorrizas observadas en *Pinus jeffreyi*.

Identificación de los morfotipos

Para la identificación de morfotipos ectomicorrícicos, se emplean claves establecidas para tal fin, en este caso se utilizaron las publicadas en el sistema de Información para la caracterización y determinación de ectomicorrizas DEEMY (Agerer y Rambold, 2004–2009).

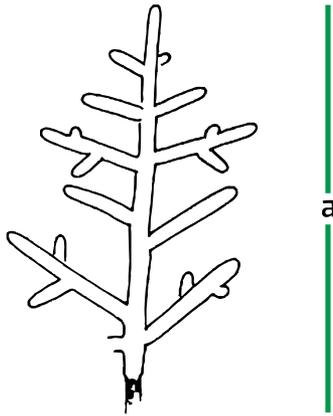
A continuación se presentan las principales características para describir los morfotipos de HEM encontradas en asociación con las especies forestales de la Sierra de Juárez.

Morfología de la asociación-ectomicorriza

Longitud

La longitud de un sistema de micorrizas es considerada como la longitud de la última rama (ápice del eje principal) al punto donde se encuentran las partes más viejas donde el manto todavía es reconocible. Si los mantos están muy delgados, es difícil determinar esta medición. El rango de valores debe determinarse, ej. 5–25 (50) milímetros; el valor en paréntesis simboliza una dimensión excepcional.

Ejemplo:



Morfotipo de la micorriza según su ramificación



1 Ausente



2 Monopodial – pinnada



3 Monopodial-piramidal



4 Dicotómica



5 Irregular pinnada



6 Coraloide



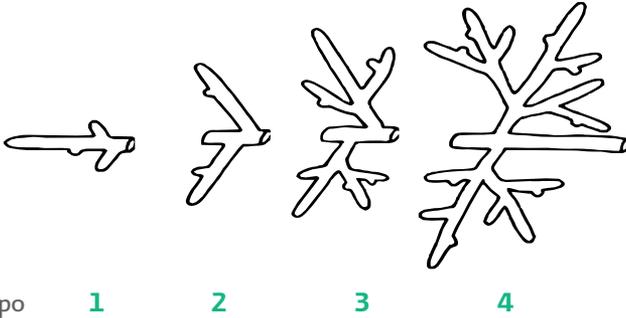
7 Con tubérculos



8 Trenzada

Orden del sistema de ramificación

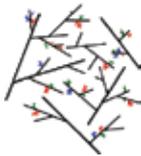
En algunos casos se pueden encontrar secciones sin ramificación (morfotipo 1) y posteriormente ramificarse una (morfotipo 2), dos (morfotipo 3) y tres veces más (morfotipo 4).



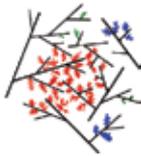
El registro de información de la ramificación se realiza de la siguiente manera: 0-1 (sin ramificación, una ramificación a cada lado), 0-2 (doble o más ramificaciones a los lados). El '0' siempre debe agregarse, ya que representa el principio de un sistema en vías de desarrollo.

Abundancia de micorrizas en la raíz

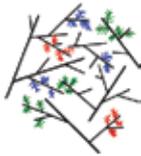
Se determina al observar la abundancia y niveles de diferenciación como se muestra en las siguientes figuras



1 Solitarias o en baja frecuencia



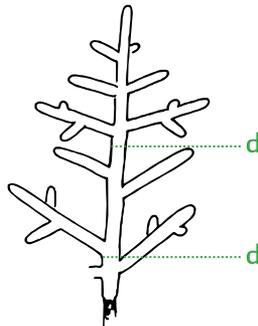
2 En forma de nido, hifas esteras



3 Abundante , denso

Diámetro del eje principal

Para medir el diámetro se obtiene el promedio de dos mediciones del eje principal, realizadas en la zona intermedia de la raíz colonizada, como se muestra en la figura, sin embargo en sistemas coraloides no es común encontrar diferencia entre el diámetro de extremos sin ramificación.



Presencia y abundancia de rizomorfos

Estas estructuras pueden formarse como estructuras robustas, cortas y cónicas que consisten en hifas densamente aglutinadas y se originan principalmente en ángulos muy inclinados y puntos restringidos del manto formando una estructura similar a la pierna de un insecto. Los términos 'frecuente' y 'poco frecuente' están determinados a criterio personal. Si hay alguna dificultad para decidir si 'frecuente o poco frecuente' debe usarse, en ambos.

1	Ausente
2	Presente
3	Poco frecuente
4	Abundante

Forma de la terminación en la raíz ectomicorrizada

-  Directa o recta
-  Inclínada
-  Sinuosa
-  Tortuosa
-  Estrechado entre las partes más viejas y más jóvenes
-  Adornado con cuentas

Presencia o tipo de estructuras que se generan en la asociación ectomicorrícica

Considerando que los rizomorfos son fácilmente inapreciables o confusos, hay dificultades para distinguirlos. Como regla general, los cystidia son caracterizados por una longitud corta y se encuentran particularmente cuando es muy densa una zona aterciopelada de vellos extendidos alrededor del manto. Las hifas a menudo se encuentran emanando y cystidia en el contorno.



Figura 2. Tipo de estructuras en las asociaciones ectomicorrícicas.

Color de las terminaciones

La coloración se determina observando las ectomicorrizas en un estereoscopio. Puede haber algunas combinaciones en descripciones de color como castaño rojizo, verde azulado o verde amarillento. Los códigos deben traducirse en colores básicos como los que se muestran a continuación.

1	Negro	11	Lila, rojizo azul
2	Castaño oscuro	12	Violeta, rojizo azul oscuro
3	Castaño	13	Azulado
4	Parduzco	14	Azul
5	Ocre, castaño amarillento,	15	Verdoso
6	Amarillo	16	Verde
7	Amarillento	17	Grisáceo
8	Naranja	18	Gris
9	Rojizo	19	Blanco
10	Rojo	20	Blanquecino

Características del sitio de muestreo

Tipo de sustrato

Se describen las características o tipo de sustrato donde fueron colectadas las raíces que se analizaron. Los principales sustratos donde son encontrados los hongos ectomicorrícicos son los que se mencionan a continuación.

1	Capa orgánica
2	Horizonte mineral orgánicamente enriquecido
3	Tierra mineral
4	Madera deteriorándose
5	Alrededor de excremento de mamífero
6	En rocas
7	En turba
8	Debajo de musgos
9	Sustrato artificial

Características físicas del sustrato

Se determina el pH, textura, porosidad, estructura, contenido de materia orgánica y contenido de algunos minerales como el nitrógeno, fósforo y potasio del suelo o capa de sustrato en la que se encuentren las raíces muestreadas para tener referencia de las condiciones en las que se desarrollan los hongos ectomicorrícicos asociados a la especie de pino que se esté estudiando.

Clasificación taxonómica de la especie de pino asociado al HEM

Otra característica que se debe observar es el grupo taxonómico al que pertenece el pino asociado a la ectomicorriza que se quiere identificar. La característica más importante es el número de hojas aciculares. En el caso de la Sierra de Juárez, las especies de pinos que se encuentran ahí pertenecen al grupo 2, al menos las dos especies más importantes en estos bosques: *Pinus jeffreyi* y *P. coulteri*.

Grupo	Número de hojas aciculares
1	Pino de dos hojas aciculares
2	Pino de tres hojas aciculares
3	Pino de cinco hojas aciculares

Evaluación del porcentaje de colonización en las raíces

Para realizar el conteo de las raíces colonizadas y obtener el porcentaje de micorrización mediante el método de intersección de cuadrantes, se corta la raíz en segmentos y se colocan en una caja de Petri, con cuadrícula de un centímetro cuadrado. Posteriormente, se realiza la observación al microscopio estereoscópico, se examinan las raíces, evaluando las intersecciones en un sentido vertical y horizontal. Finalmente, se observa toda la longitud de la raíz y se cuantifica la presencia de estructuras ectomicorrícicas (Figura 3) (Ferrera-Cerrato, 2001; Carrillo., 2000; Garza et al., 2002).



Figura 3. Cuantificación de la longitud radical.

Para calcular el porcentaje de raíz colonizada, se cuentan las raíces observadas, separando las colonizadas y sin colonizar. El conteo se realiza en cada centímetro cuadrado, siguiendo la metodología antes descrita. Posteriormente con los datos obtenidos se realiza el cálculo de la longitud radical colonizada para obtener el porcentaje de micorrización, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$\% \text{ Micorrización} = \frac{\text{Longitud colonizada}}{\text{Longitud total}}$	<p>Ejemplo: % Micorrización = (15/35) X 100 Micorrización = 42 % Longitud radical total = 35 Raíz colonizada = 15</p>
---	--

Los resultados obtenidos se pueden presentar en un cuadro para su mejor interpretación, ver ejemplo (Tabla 1).

Sitio	Raíces Colonizadas (centímetro)	Raíces sin colonizar (centímetro)	Longitud radical total (centímetro)	Micorrización %
1	10	30	40	25.0
2	38	29	67	56.7
3	16	21	37	43.2
4	6	11	17	35.2
5	43	37	80	47.7
6	39	32	71	54.9
7	24	19	43	72.7
8	47	30	77	61.0
9	25	17	42	59.5

Tabla 1. Cuantificación del porcentaje de micorrización de acuerdo al método de intersección de cuadrantes (datos obtenidos de las raíces muestreadas en la Sierra de Juárez).

Número de morfotipos por raíz

Otro parámetro de interés en la identificación de las estructuras es la de evaluar los morfotipos para visualizar la diversidad de los hongos ectomicorrícicos en la raíz. Para realizar la identificación de los morfotipos se realiza de acuerdo a la metodología previamente descrita. Finalmente, siguiendo este método, se reportan los diferentes morfotipos (estructuras ectomicorrícicas) presentes en cada sitio de estudio (Tabla 2).

Sitio	Morfotipo	Numero
1	Dicotómica	2
	Irregular pinnada	5
2	Dicotómica	18
	Irregular pinnada	1
3	Dicotómica	7
	Irregular pinnada	2
	Digitiforme	2
4	Dicotómica	9
	Irregular pinnada	3
5	Dicotómica	31
6	Dicotómica	52
	Coraloide	3
7	Dicotómica	2
8	Irregular pinnada	2
	Dicotómica	41
	Coraloide	3

Tabla 2. Numero de morfotipos encontrados en *Pinus jeffreyi* por sitio muestreado.

3 Producción de inóculo esporal

Para la elaboración del inóculo esporal es necesario tener plenamente identificada la especie de HEM asociada a la especie de pino que se quiere inocular. La problemática existente para la producción de inóculo en el norte del país, es la corta temporada de lluvias y la sequía que predomina en la mayor parte del año, lo cual reduce de manera significativa la presencia de cuerpos fructíferos del hongo y por tanto son insuficientes para la producción de inóculo esporal. Ante esta situación, se tiene la opción de obtener cuerpos fructíferos frescos de otros estados de la República, donde las temporadas de lluvias son más favorables y la fructificación es más abundante.

Se debe tomar la precaución de adquirir o coleccionar los hongos asociados a las especies de pinos que se requiera inocular, ya que de lo contrario al no estar asociados el proceso de inoculación será inútil. Otros de los aspectos que se deben tener en cuenta es el estado de los hongos al ser deshidratados, estos deben estar frescos y sin presentar características de descomposición o pudrición. La conservación de los cuerpos fructíferos depende de cada especie ya que existen algunas especies que sólo se pueden conservar en buen estado 24 horas después de colectadas o algunos otros como los *Boletus* que se pueden conservar en buen estado un promedio de 48 horas, por lo anterior se debe programar la deshidratación de los cuerpos fructíferos a más tardar 24 horas después de la adquisición de éstos. Una vez deshidratados los cuerpos fructíferos se pueden moler y conservar en frascos oscuros y totalmente herméticos durante uno o dos años sin que las esporas sufran algún daño.

Este tipo de inóculo se aplica en seco (dos gramos de inóculo por planta), esto le da la ventaja de poder ser almacenado durante varios meses, a diferencia del inóculo líquido el cual se puede almacenar en refrigeración en buen estado sólo por tres semanas.

La preparación del inóculo esporal en polvo consta de las siguientes etapas:

Colecta de cuerpos fructíferos

La primera etapa para la producción de inóculo es la adquisición o colecta de cuerpos fructíferos de los hongos ectomicorrícicos identificados en asociación con la especie de pino que se requiere inocular. Para el caso de Baja California, específicamente en la Sierra de Juárez, lugar donde se desarrolló parte del presente manual, la producción de cuerpos fructíferos de los hongos en los años de 2007 y 2008 fue muy escasa, debido en parte a la escasez de lluvias de años anteriores y a las condiciones específicas del bosque en esta zona. Resultado de lo anterior: no fue posible producir el inóculo suficiente para realizar la inoculación de plantas de *Pinus Jeffreyi*, principal especie de interés forestal en la Sierra de Juárez. No obstante, con la identificación de la especie *Laccaria laccata* en el área mencionada, se realizó la colecta de cuerpos fructíferos de este hongo, en otras zonas del país donde se tiene registro de la presencia de esta especie (Figura 4). Lo cual permitió obtener la cantidad requerida de cuerpos fructíferos para la producción del inóculo.



Figura 4. Colecta de cuerpos fructíferos en un mercado regional de Ozumba, estado de México.

Separación de los cuerpos fructíferos.

Una vez obtenida la cantidad adecuada de cuerpos fructíferos, es necesario separar los píleos de los estípites de los cuerpos fructíferos, debido a que sólo se utilizarán los píleos que son los que contienen las esporas. El material necesario para la separación depende de la especie, si se trata de hongos con estípite delgado y fibroso se pueden utilizar unas tijeras afiladas, en caso de que se trabaje con especies de hongos con estípite grueso y carnoso se recomienda usar navaja. En este paso se debe tener cuidado de no maltratar el píleo para evitar la caída de esporas.



Deshidratación

Posteriormente a la separación de los píleos y los estípites, se procede a la deshidratación del material fúngico en un deshidratador de tipo charolas, en el que se debe programar una máxima temperatura de 30 grados centígrados para evitar que las esporas se dañen, las temperaturas óptimas para la deshidratación deben oscilar entre 26 y 28 grados centígrados. El tiempo que se deben dejar los cuerpos fructíferos en el deshidratador depende de cada especie debido a la diferencia en la cantidad de agua. Los cuerpos fructíferos deben ser revisados y extraídos del horno cuando estén totalmente deshidratados y tengan una consistencia crujiente.



Figura 5. Deshidratación de hongos en un deshidratador de frutas tipo charolas.

Ya deshidratados los píleos se colocan en bolsas de plástico selladas para evitar que absorban nuevamente humedad. Las bolsas deben ser etiquetadas debidamente con el nombre de la especie y la fecha de deshidratación.

Molido de los píleos.

La etapa final de la producción del inóculo es el molido de los píleos para lo cual se requiere de un molino de granos para procesar muestras secas (existen varios modelos en el mercado), otra opción para moler los píleos es utilizar una licuadora aunque esta opción es menos recomendable ya que algunas esporas son dañadas al realizar la molienda. Durante este proceso es necesario protegerse totalmente de la respiración de esporas, ya que estas estructuras son microscópicas y pueden entrar fácilmente a los pulmones y causar daños.



Figura 6. Molienda de píleos secos en molino.

Envasado

Una vez que se obtiene el inóculo, éste debe ser conservado en frascos totalmente herméticos y secos para impedir la entrada o presencia de humedad y en refrigeración a cuatro grados centígrados en completa oscuridad para evitar la activación de las esporas.

Los frascos deben ser etiquetados con los datos de la procedencia de los hongos, fecha de recolección y almacenamiento, así como información taxonómica de la especie del hongo.



Figura 7. Inóculo esporal conservado en frascos de plástico con etiqueta de identificación.

4 Inoculación de plántulas de *Pinus jeffreyi* con inóculo esporal en polvo en condiciones asépticas

El inóculo producido se puede emplear en plántulas de las especies de pinos relacionadas con los hongos ectomicorrícicos identificados. El proceso de la inoculación es el siguiente:

1) Verificar que la planta a inocular esté libre de patógenos, para lo cual se recomienda, primero desinfectar la semilla en una solución de hipoclorito al dos por ciento sumergiéndolas en la solución durante 10 minutos, después enjuagar tres veces con agua corriente. Posteriormente, la semilla se escarifica sumergiendo en agua estéril tibia por 24 horas.



Figura 8. Germinación de semillas (*Pinus jeffreyi*) después de siete días.

2) Una vez terminada la escarificación, la semilla húmeda se pone en refrigeración a temperaturas de cuatro grados centígrados durante cinco días. Esto último tiene el propósito de activar el proceso de germinación de la semilla. Después de este periodo la semilla es colocada en charolas o cajas de Petri a luz indirecta o en una cámara de germinación a una temperatura promedio de 25 grados centígrados. Las charolas o cajas de Petri deben contener en su base un sustrato (papel filtro o toallas de papel) húmedo con agua estéril, de esta manera se suministrará la humedad requerida durante la germinación, la cual requiere un periodo de entre siete y 15 días.

3) Posteriormente, y antes del trasplante de las plantas a los contenedores forestales tipo tubetes con sustrato esterilizado, se deposita el inóculo (aproximadamente 10 mil esporas) a una profundidad de cinco centímetros del sustrato (Figura 9a). En este caso la cantidad de esporas requeridas se obtuvo con dos gramos del inóculo. Dos meses después del trasplante de las plantas, se realizará una segunda inoculación con igual cantidad de inóculo que en la primera ocasión, para compensar la pérdida por lixiviación de las esporas por el riego (Figura 9b).

En caso de que las plántulas presenten alguna infección por hongos fitopatógenos, es recomendable aplicar fungicidas como: Benomil (Promil)[®] y Carbendazim[®], los cuales están reportados como no dañinos en el desarrollo del hongo ectomicorrízico, en especial el Benomil[®] que es el más adecuado cuando se está trabajando con planta inoculada.

Para más información técnica de estos productos consulte de la página 38 a 41



Figura 9. Proceso de inoculación de HEM en vivero.

(A) Inoculación antes del trasplante y

(B) inoculación a los dos meses de establecimiento de las plántulas.

Finalmente se recomienda que la planta micorrizada se lleve a campo cuando cumpla un año de permanecer en los contenedores y al inicio de la época de lluvias.

5 Tipos de inóculos

Las tres principales fuentes de inóculo para la ectomicorrización de plantas en viveros forestales son el propio suelo del bosque, las esporas y los micelios vegetativos de los hongos. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas, dependiendo de los objetivos y del costo del programa de inoculación (Castellano y Molina 1989). En el Cuadro 3 se presentan las ventajas y desventajas de los principales inóculos.

Tipo de inóculo	Ventajas	Desventajas
Inóculo de suelo	<ul style="list-style-type: none"> • Bajo costo y fácil de obtener • Fácil tratamiento de secado al sol 	<ul style="list-style-type: none"> • Se requiere gran cantidad de suelo. • Alto riesgo de introducción de patógenos y malezas • La concentración de esporas podría ser baja • Alto impacto ecológico para la zona de recolección
Inóculo esporal	<ul style="list-style-type: none"> • Medio muy eficiente para inocular gran cantidad de plantas en vivero • No requiere equipamientos y procedimientos especializados 	<ul style="list-style-type: none"> • La colecta de cuerpos fructíferos puede ser muy complicada • Puede ser poco efectiva si se dañan las esporas en el proceso de elaboración • Riesgo de contaminación por patógenos
Inóculo esporal en polvo	<ul style="list-style-type: none"> • Largo periodo de almacenamiento en total ausencia de humedad y luz 	<ul style="list-style-type: none"> • Suministros y equipos costosos para deshidratación y molido de los cuerpos fructíferos
Inóculo esporal en solución	<ul style="list-style-type: none"> • Rapidez de elaboración • No requiere equipos especializados 	<ul style="list-style-type: none"> • Poca duración en almacenamiento
Inóculo miceliar	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de inóculos puros de hongos seleccionados 	<ul style="list-style-type: none"> • Suministros y equipos costosos • Personal altamente entrenado

Cuadro 3. Ventajas y desventajas de los inóculos ectomicorrícicos más utilizados.

Conclusiones

La presencia o fructificación de hongos ectomicorrícicos asociados a los pinos, representa una oportunidad para su identificación y producción de inóculo para emplearse en el establecimiento de nuevas plantaciones. Hay especies de hongos ectomicorrícicos identificados en las regiones del país donde la fructificación de hongos no es la suficiente para la producción de inóculo. Para el caso de Baja California, específicamente en la Sierra de Juárez, lugar donde se desarrolló parte del presente manual, la producción de cuerpos fructíferos de los hongos en los años de 2007 y 2008 fue muy escasa, debido en parte a la escasez de lluvias de años anteriores y a las condiciones específicas del bosque en esta zona. Resultado de lo anterior: no fue posible producir el inóculo suficiente para realizar la inoculación de plantas de *Pinus jeffreyi*, principal especie de interés forestal en la Sierra de Juárez. No obstante, con la identificación de la especie *Laccaria laccata* en el área mencionada, se procedió a la colecta de la biomasa de este hongo en otras zonas en donde se tiene registro de la presencia de esta especie. Lo cual permitió obtener la cantidad requerida de cuerpos fructíferos para la producción del inóculo.

Por otra parte, para la obtención del inóculo, es necesario disponer de equipos como deshidratador (horno deshidratador de frutas tipo charolas o deshidratador solar de alimentos de CONAFOR), molino para procesar muestras secas y refrigerador, con el propósito de obtener y mantener las esporas viables por varios meses. En el proceso de inoculación, es importante manejar recipientes, sustrato y semilla desinfectada, para no afectar el establecimiento inicial del HEM.

Se recomienda realizar al menos dos aplicaciones del inoculante a las plantas durante la fase de vivero. La primera se debe realizar una semana antes de la plantación en los contenedores y la segunda dos meses después para garantizar el establecimiento de colonización del HEM a la planta de pino.

Literatura citada

ARORA, D. 1986. *Mushrooms Demystified. A Comprehensive Guide to the Fleshy Fungi*. Second Edition. Ten Speed Press. Berkeley, California. USA. 959 pp.

AGERER, R; RAMBOLD, G: (2004-2007) DEEMY - An information system for determination and characterisation of ectomycorrhizae. - www.deemy.de. München, Germany, (2007).

AYALA, N; OCHOA M. C., (1998). *Hongos conocidos de Baja California*. Universidad Autónoma de Baja California. B.C. México. 161pp.

BARROETAVEÑA C., RAJCHENBERG M. 2003. Las micorrizas y la producción de plántulas de *Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws. en la Patagonia, Argentina. *BOSQUE* 24(1): 17-33.

CARRILLO S. C. 2000. Tercer Curso Avanzado de Viveros y Producción de Planta Forestal. Técnicas de micorrización en vivero con hongos ectomicorrícicos. Experiencias realizadas en el Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo". Centro Nacional de Mejora Forestal "El Serranillo", Ministerio de Medio Ambiente. Guadalajara. España.

CASTELLANO, M. A.; MOLINA, R. 1989. Mycorrhizae. In: LANDIS, T. D.; TINUS, R. W.; MCDONALD, S. E.; BARNETT, J. P. *The Container Tree Nursery Manual*, Volume 5. Agric. Handbk. 674. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service: 101-167. BARROETAVEÑA C., RAJCHENBERG M. 2003. Las micorrizas y la producción de plántulas de *Pinus ponderosa* Dougl. ex Laws. en la Patagonia, Argentina. *BOSQUE* 24(1): 17-33.

CIFUENTES, B. J., VILLEGAS-RÍOS Y L. PÉREZ-RAMÍREZ. 1986. Hongos. In *Manual de Herbario: administración y manejo de colección. Técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos*, A. Lot, F. Chiang (eds.) Consejo Nacional de la Flora México A. C., México, D. F. p. 55-64.

FERRERA-CERRATO R. 2001. Simbiosis Micorrizica, Capitulo 2. En: Alarcón, A.; J.J. Almaraz S., R. Ferrera-Cerrato, M.C.A. González-Chávez, M.E. Lara H., M.J. Manjarrez M., R. Quintero L. y S. Santamaría R. Manual: Tecnología de hongos micorrícicos en la producción de especies forestales en vivero. R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcón y M.E. Lara H. (eds). Colegio de Postgraduados, Montecillo. SEMARNAT-PRONARE. México. 98 p.

GARCÍA-RODRÍGUEZ J. L., PÉREZ-MORENO, J., ALDRETE, A., CETINA-ALCALÁ, V., VAQUERA-HUERTA H. 2006. Caracterización del hongo silvestre ectomicorrícico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Cooke et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia* 40:665-676.

GARZA O. F., GARCÍA J. J., ESTRADA C. E., VILLALÓN M. H. 2002. Macromicetos, Ectomicorrizas y Cultivos de *Pinus culminicola* en Nuevo León. *Ciencia UANL*, abril-junio, año/vol. V, número 002. Universidad de Nuevo León. Monterrey, México. 204-210 pp.

GONZÁLEZ-OCHOA A., DE LAS HERAS J., TORRES P. AND SÁNCHEZ-GÓMEZ E. 2003. Mycorrhization of *Pinus halepensis* Mill and *Pinus pinaster* Aiton seedlings in two commercial nurseries. *Ann. For. Sci.* 60 43-48.

PÁEZ O., BERNAZA G., Y ACOSTA M. 2006. Las Micorrizas: Alternativa Ecológica para una Agricultura Sostenible. Página: <http://www.soil-fertility.com/micorhize/espagnol/index.shtml>.

PEREZ-MORENO, JESÚS Y READ, DAVID J. 2004. Los hongos ectomicorrícicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *INCI*, vol.29, no.5, p.239-247.

BENOMILO

AGRICOLA

APLICACION AL FOLLAJE EN LOS CULTIVOS DE:

Presentación	Equivalente g l.A./l o kg	Categoría Toxicológica	Uso Autorizado	LMR (ppm)	IS (Días)
POLVO HUMECTABLE	500	IV	AGUACATERO	3	30
			ALMENDRO	1	S/LIMITE
			APIO	3	7
			ARROZ	5	S/LIMITE
			BULBOS DE ORNAMENTALES	EXENTO	S/LIMITE
			CACAHUATE	0.2	14
			CALABACITA	1	S/LIMITE
			CALABAZA	1	S/LIMITE
			CIRUELO	15	S/LIMITE
			COL	0.2	S/LIMITE
			DURAZNO	15	S/LIMITE
			FRESA	5	S/LIMITE
			FRIJOL	2	14
			JITOMATE	5	1
			LIMONERO	10	1
			MANDARINO	10	1
			MANGO	3	14
			MANZANO	7	S/LIMITE
			MELON	1	S/LIMITE
			NARANJO	10	1
			PEPINO	1	S/LIMITE
			PERAL	7	S/LIMITE
			PIÑA	35	S/LIMITE
			PLATANO	1	7
			ROSAL	EXENTO	S/LIMITE
			SANDIA	***	14
			SOYA	0.2	14
			TORONJO	10	1
			VID	10	7

*** ESTOS PRODUCTOS PLAGUICIDAS ENTRARAN A PROCESO DE REVISION Y ACTUALIZACION RESPECTO AL LIMITE MAXIMO DE RESIDUO PARA LA COMBINACION PLAGUICIDA/CULTIVO

PARA USO EXCLUSIVO EN PLANTAS FORMULADORAS DE PLAGUICIDAS AGRICOLAS

POLVO TECNICO	900	IV			
	950	IV			
	950	IV			

BENOMILO

USO: AGRICOLA E INDUSTRIAL

Nombre Químico: Metil 1-(butilcarbamoil)bencimidazol-2-il carbamato

CAS: 17804-35-2

Fórmula: C₁₄H₁₈O₃N₄

Peso Molecular: 290.62

DL50 Oral (mg/kg): > 10000 (RATA)

DL50 Dérmica (mg/kg): > 10000 (CONEJO)

Categoría Tóxica: IV

IDA 0.01 mg/kg.

Clasificación: BENZIMIDAZOL

Tipo de plaguicida: FUNGICIDA

EFFECTOS EN LA SALUD

Exposición aguda:

Irritante dérmico yocular

Exposición crónica:

Posibles efectos teratogénicos (UM)

EFFECTOS AL MEDIO AMBIENTE

Toxicidad: Moderadamente tóxico para las aves, altamente tóxico a peces, letal para lombrices de tierra, no tóxico para abejas.

Persistencia: Altamente persistente, su vida media es hasta de 12 meses. Se metaboliza a carbendazim.

EN CASO DE INTOXICACION

Primeros Auxilios: Lavar las zonas afectadas con abundante agua y dar tratamiento sintomático.

RECOMENDACIONES DE USO Y MANEJO

Uso: No mezclar con aceites

Equipo Mínimo de Protección: Overol de manga larga, guantes, calzado, sombrero

CARBENDAZIM

AGRICOLA

APLICACION AL FOLLAJE EN LOS CULTIVOS DE:

Presentación	Equivalente g l.A./l o kg	Categoría Toxicológica	Uso Autorizado	LMR (ppm)	IS (Días)
DISP.(EMULSION ACEITE EN AGUA)	511	IV	CACAHUATE	0.1	14
FLOABLE	500	IV	FRIJOL	2	14
POLVO HUMECTABLE	500	IV	ORNAMENTALES	EXENTO	S/LIMITE
SUSPENSION ACUOSA	357	IV	SOYA TABACO		

TRATAMIENTO DE PLANTAS EN ALMACIGOS:

MICROGRANULADO DISP. EN AGUA	500	IV	CACAHUATE ORNAMENTALES SOYA TABACO		
------------------------------	-----	----	---	--	--

APLICACIÓN EN DRENCH AL CUELLO DE LA PLANTA EN EL CULTIVO DE:

SUSPENSIÓN ACUOSA	600	IV	NARDOS	EXENTO	S/LIMITE
-------------------	-----	----	--------	--------	----------

PARA USO EXCLUSIVO EN PLANTAS FORMULADORAS DE PLAGUICIDAS AGRICOLAS.

POLVO TECNICO	900	IV			
	950	IV			
	990	IV			
SOLIDO TECNICO	980	IV			
	990	IV			

URBANO

PARA USO EXCLUSIVO DE APLICADORES DE PLAGUICIDAS EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES FUNGOSAS EN AREAS VERDES

DISP.(EMULSION ACEITE EN AGUA)	511	IV			
--------------------------------	-----	----	--	--	--

CARBENDAZIM

USO: AGRICOLA E INDUSTRIAL

Nombre Químico: Metilbenzimidazol-2-il carbamato

CAS: 10605-21-7

Fórmula: C₉H₉N₃O₂

Peso Molecular: 191.2

DL50 Oral (mg/kg): > 1500 (RATA)

DL50 Dérmica (mg/kg): > 2000 (RATA)

Categoría Tóxica: IV

IDA 0.03 mg/kg.

Clasificación: BENZIMIDAZOL

Tipo de plaguicida: FUNGICIDA

RIESGOS Y PELIGROS

No se debe agregar a plaguicidas alcalinos como el sulfato de cobre básico, caldo bordelés ni sulfuro de calcio.

EFFECTOS EN LA SALUD

Exposición aguda:

Irritante ocular, dérmico y de mucosas

Exposición crónica:

No se han encontrado efectos en los estudios realizados en animales

EFFECTOS AL MEDIO AMBIENTE

Toxicidad: Tóxico a peces y otros organismos acuáticos.

Persistencia: Poco persistente. Descompuesto principalmente por microorganismos, 2-Aminobenzimidazol principal producto de degradación.

EN CASO DE INTOXICACION

Primeros Auxilios: Lavar con abundante agua las zonas afectadas, quitar la ropa contaminada. retirar al paciente del lugar del incidente, inducir el vómito.

RECOMENDACIONES DE USO Y MANEJO

Uso: Evite la dispersión del polvo. Evite la exposición de mujeres embarazadas, adolescentes y niños, con el fuego se producen gases o humos tóxicos e irritantes. No aplicar con menos de 200 litros de agua/ha

Equipo Mínimo de Protección: Mascarilla y lentes de seguridad

Equipo Mínimo de Protección: Overol de manga larga, guantes, calzado, sombrero

Se agradece a la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP), la cual a través de la dirección del Parque Nacional Constitución de 1857, Ing. Santos Soto Jaime, gestiono la autorización de los permisos para las colectas dentro del Área Natural Protegida, además brindo facilidades para utilizar sus instalaciones durante las estancias en las que se realizaron las colectas. Al Colegio de Posgraduados a través del asesoramiento del Dr. Jesús Pérez Moreno para el desarrollo de la metodología para producción del inóculo.

CONAFOR

Comisión Nacional Forestal

Coordinación General de Educación y Desarrollo Tecnológico

Gerencia de Desarrollo y Transferencia de Tecnología