

EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN EL DESARROLLO DE *Suillus granulatus* (L.) Roussel y *S. brevipes* (Pk.) KuntzeEFFECT OF CULTURE MEDIUM ON DEVELOPMENT OF *Suillus granulatus* (L.) Roussel AND *S. brevipes* (Pk.) KuntzeDulce Ma. Murrieta-Hernández¹; Juan C. Noa-Carrazana¹; Martín Mata-Rosas²; María del R. Pineda-López¹; Ramón Zulueta-Rodríguez³; Norma Flores-Estévez¹.¹Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Universidad Veracruzana. Av. de las Culturas núm. 101, col. Emiliano Zapata. C. P. 91090. Xalapa, Veracruz, MÉXICO.

Correo-e: dulcemaria_m@yahoo.com Tel.: +52 228 8422773 (Autora para correspondencia).

²Instituto de Ecología, A. C. Carretera antigua a Coatepec 351, El Haya. C. P. 91070. Xalapa Veracruz, MÉXICO.³Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana. Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria. C. P. 91090. Xalapa, Veracruz, MÉXICO.

RESUMEN

La tasa de crecimiento micelial de los hongos ectomicorrícicos *Suillus granulatus* y *S. brevipes*, se evaluó en tres medios de cultivo (PDA, BAF y MNM) con dos valores de pH (4.8 y 5.8), con el fin de seleccionar el mejor medio de cultivo. Las cepas se aislaron de esporomas colectados en el bosque de *Pinus hartwegii* del Parque Nacional Cofre de Perote, Veracruz, México. Se encontraron diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) en el área de crecimiento de ambas especies; los valores más altos se registraron en el medio PDA. Respecto a los valores de pH evaluados, no hubo diferencias significativas. Cada uno de los medios evaluados se puede utilizar para el cultivo de las cepas *S. granulatus* y *S. brevipes* dependiendo de los objetivos. El medio PDA fue el mejor sustrato para el crecimiento de las cepas. Se sugiere utilizar el medio BAF para la producción masiva de micelio para inóculo y el medio MNM se recomienda ya sea para el mantenimiento de las cepas o para pruebas de micorrización.

PALABRAS CLAVE: Boletaceos, bosque templado, ectomicorrizas, hongos comestibles, pinos.

ABSTRACT

The mycelial growth rates of ectomycorrhizal fungi *Suillus granulatus* and *S. brevipes* were assessed in three culture media (PDA, BAF and MMN) at two pH values (4.8 and 5.8) in order to select the best culture medium. The strains were isolated from sporocarps collected in a *Pinus hartwegii* forest in Cofre de Perote National Park, Veracruz, Mexico. Significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) in the growth area of both species were found. The highest values were recorded in the PDA medium. Concerning the pH values tested, there were no significant differences. Each of the tested media can be used for culturing the *S. granulatus* and *S. brevipes* strains, depending on the objectives. The PDA medium was the best substrate for the growth of the strains. We suggest using the BAF medium for mass production of mycelium for inoculum, and the MMN medium for either strain maintenance or mycorrhization testing.

KEYWORDS: Boletes, temperate forest, ectomycorrhizae, edible mushrooms, pines.

INTRODUCCIÓN

Los hongos silvestres comestibles son uno de los grupos más importantes de la gama de productos forestales no maderables. Muchos de ellos forman una asociación micorrícica con especies forestales contribuyendo a mantener e incrementar la biodiversidad de los suelos, así como el funcionamiento del ecosistema (Smith & Read, 1997), especialmente en bosques de coníferas de zonas templadas (Sylvia, 1999). Algunas especies de hongos ectomicorrícicos pueden cultivarse en laboratorio para su posterior uso en micorrizaciones controladas de plantas en vivero. De este modo, la selección adecuada de hongos micorrícicos como simbiosis y su posterior manipulación, tanto en laboratorio como en vivero, pueden ser aspectos clave para el éxito del establecimiento de especies vegetales en campo (Honrubia, Torres, Díaz, & Cano, 1992).

El uso de la asociación micorrícica, a partir de inóculos, en la propagación de plantas en vivero se realiza por lo general con cepas de procedencia extranjera. Esta práctica es común pero tiene implicaciones importantes en la economía de los productores al adquirir productos importados y provoca impacto en la biodiversidad fúngica local (Pérez-Moreno, 2012), ya que cada especie tiene sus propias limitaciones ecológicas, y las condiciones del sitio pueden afectar el desarrollo o actividad de los hongos ectomicorrícicos. Por tanto, resulta significativo integrar a los programas de reforestación, plántulas con micorrizas de especies regionales adaptadas a las condiciones del sitio donde serán utilizadas. En este sentido, Pereira, Herrera, Machuca, y Sánchez (2007) sugieren que las primeras especies a estudiar sean aquellas que crecen en forma natural en los sitios de interés.

En la propagación micelial, el crecimiento de las cepas de hongos ectomicorrícicos es afectado por las condiciones de cultivo, principalmente el pH, temperatura y composición de los medios. El estudio del comportamiento y requerimientos de estos microorganismos en cultivo puro, constituye la base de la producción de inóculo; etapa necesaria para la micorrización controlada en plantas de interés forestal y posterior producción de esporomas (Díaz, Flores, & Honrubia, 2009a; Hatakeyama & Ohmasa, 2004a).

Los medios más utilizados para hongos ectomicorrícicos, ya sea para el aislamiento (medios sólidos) o la micorrización (medios líquidos), son el BAF (biotina-aneurina-ácido fólico), MNM (Melin-Norkrans modificado) y PDA (papa-dextrosa-agar) (Chávez, Pereira, & Machuca, 2009; Díaz, Carrillo, & Honrubia, 2009b; García-Rodríguez, Pérez-Moreno, Aldrete, Cetina-Alcalá, & Vaquera-Huerta, 2006; Vázquez-García, Santiago-Martínez, & Estrada-Torres, 2002). Estos medios de cultivo han sido probados con diferentes especies y se han obtenido diversos resultados respecto al éxito de crecimiento y desarrollo del micelio (Díaz et al., 2009b; García-Rodríguez et al., 2006; Pereira et al., 2007; Sánchez, Honrubia, & Torres, 2000; Torres & Honrubia, 1991;

INTRODUCTION

Wild edible mushrooms are one of the most important non-timber forest product groups. Many of them form a mycorrhizal association with forest species, helping maintain and increase soil biodiversity and ecosystem functioning (Smith & Read, 1997), especially in coniferous forests in temperate areas (Sylvia, 1999). Some species of ectomycorrhizal fungi can be cultured in the laboratory for later use in controlled mycorrhizations of nursery plants. Thus, the proper selection of mycorrhizal fungi as symbionts and their subsequent handling, both in the laboratory and in the nursery, can be essential to the successful establishment of plant species in the field (Honrubia, Torres, Díaz, & Cano, 1992).

The use of mycorrhizal association, from inocula, in the propagation of plants in the nursery is usually done with strains of foreign origin. This practice is common but it has an economic impact on the producers who buy these imported products and it has an impact on local fungal biodiversity (Pérez-Moreno, 2012), as each species has its own ecological constraints and site conditions can affect the development or activity of ectomycorrhizal fungi. It is therefore important for reforestation programs to include seedlings with regional mycorrhizal species adapted to the conditions of the site where they will be used. In this regard, Pereira, Herrera, Machuca, and Sánchez (2007) suggest that the first species to study are those that grow naturally in places of interest.

In mycelial propagation, growth of ectomycorrhizal fungi strains is affected by growing conditions, mainly pH, temperature and medium composition. The study of the behavior and requirements of these microorganisms in pure culture is the basis for the production of inoculum, which is a necessary step for controlled mycorrhization in plants of forest interest and subsequent production of sporocarps (Díaz, Flores, & Honrubia, 2009a; Hatakeyama & Ohmasa, 2004a).

The most commonly used media for ectomycorrhizal fungi, either for isolation (solid media) or mycorrhization (liquid media), are BAF (biotin-aneurine-folic acid), MMN (modified Melin-Norkrans) and PDA (potato-dextrose-agar) (Chávez, Pereira, & Machuca, 2009; Díaz, Carrillo, & Honrubia, 2009b; García-Rodríguez, Pérez-Moreno, Aldrete, Cetina-Alcalá, & Vaquera-Huerta, 2006; Vázquez-García, Santiago-Martínez, & Estrada-Torres, 2002). These culture media have been tested with different species and varying degrees of success in terms of mycelial growth and development have been obtained (Díaz et al., 2009b; García-Rodríguez et al., 2006; Pereira et al., 2007; Sánchez, Honrubia, & Torres, 2000; Torres & Honrubia, 1991; Vázquez-García et al., 2002). The aim of this work was to determine the best medium for the fastest growth of two species of *Suillus*, for mass production of inoculum and for use in the mycorrhization of pine plants.

Vázquez-García et al., 2002). El objetivo de este trabajo fue seleccionar el medio que permita la mayor velocidad de crecimiento de dos especies de *Suillus*, la producción masiva de inóculo y su utilización en la micorrización de plantas de pino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas se aislaron de esporomas recolectados en el bosque de *Pinus hartwegii* del Parque Nacional Cofre de Perote, Veracruz, México. Las especies identificadas con base en sus características morfológicas fueron *Suillus granulatus* (L.) Roussel y *S. brevipes* (Peck) Kuntze, de acuerdo con las descripciones de Breitenbach y Fränzlin (1991) y Ground y Harrison (1976).

El aislamiento se hizo de acuerdo con el método propuesto por Honrubia, Torres, Díaz & Morte (1995). Los hongos se seleccionaron en buen estado, se diseccionaron en condiciones asépticas y se extrajeron pequeños fragmentos del tejido ubicado encima del himenio, que es la parte que no presenta contaminantes. Los fragmentos se depositaron en cajas de Petri con medio nutritivo y se incubaron a 25 °C en condiciones de oscuridad. Aproximadamente 20 días después, las cepas se transfirieron a cajas con medio nuevo.

Con el fin de seleccionar el mejor medio de cultivo para *Suillus*, se realizaron pruebas con los siguientes medios sólidos: Papa-dextrosa-agar (PDA) (Bioxon, Bencton Dickinson, México), biotina-aneurina-ácido fólico (BAF) (Moser, 1960) y Melin-Norkrans modificado (MMN) (Marx, 1969). Además, para cada tipo de medio se probaron dos valores de pH (4.8 y 5.8) reportados por Pereira et al. (2007) para el género *Suillus*.

La tasa de crecimiento y el área de las colonias se determinaron utilizando discos (5 mm de diámetro) de medio de cultivo con micelio de cada cepa, los cuales fueron inoculados en el centro de las cajas de Petri (50 x 9 mm). Posteriormente, las cajas se incubaron a 25 °C en condiciones de oscuridad durante 30 días. El crecimiento de la colonia se midió cada seis días, delimitando el área en el fondo de la caja de Petri con un marcador indeleble. El área (cm²) se calculó con el programa Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems, Inc., 2010). Al final del experimento, la tasa de crecimiento se estimó con la fórmula $TC = [(\text{crecimiento final} - \text{crecimiento inicial}) / \text{tiempo de incubación}]$ (Guigón-López et al., 2010).

El experimento se llevó a cabo con un diseño completamente al azar con arreglo factorial, considerando tres factores: 1) cepas de hongos ectomicorrícicos (*S. granulatus* y *S. brevipes*), 2) medios de cultivo (PDA, BAF y MMN) y 3) pH (4.8 y 5.8); en total se aplicaron 12 tratamientos con cinco repeticiones. La unidad experimental fue la caja de Petri, considerando la colonia de crecimiento como unidad de estudio. Los datos se sometieron a una prueba de normalidad de acuerdo con la prueba de Levene (1960). Posteriormente

MATERIALS AND METHODS

The strains were isolated from sporocarps collected in a *Pinus hartwegii* forest in Cofre de Perote National Park, Veracruz, Mexico. The species identified based on their morphological characteristics were *Suillus granulatus* (L.) Roussel and *S. brevipes* (Peck) Kuntze, according to the descriptions of Breitenbach and Fränzlin (1991) and Ground and Harrison (1976).

The isolation was done according to the method proposed by Honrubia, Torres, Díaz & Morte (1995). Fungi in good condition were selected, dissected under aseptic conditions and small fragments of tissue located above the hymenium, which is the part that does not have contaminants, were removed. The fragments were placed in Petri dishes with nutrient medium and incubated at 25 °C under conditions of darkness. Approximately 20 days later, the strains were transferred to dishes with new medium.

In order to select the best culture medium for *Suillus*, tests were conducted with the following solid media: Potato-dextrose-agar (PDA) (Bioxon, Bencton Dickinson, Mexico), biotin-aneurine-folic acid (BAF) (Moser, 1960) and modified Melin-Norkrans (MMN) (Marx, 1969). Furthermore, for each type of medium, two pH values (4.8 and 5.8) reported by Pereira et al. (2007) for the genus *Suillus* were tested.

Growth rate and colony area were determined using disks (5 mm in diameter) of culture medium with mycelia of each strain, which were inoculated in the center of the Petri dishes (50 x 9 mm). Subsequently, the dishes were incubated at 25 °C under conditions of darkness for 30 days. The growth of the colony was measured every six days, delimiting the area at the bottom of the Petri dish with a permanent marker. The area (cm²) was calculated with the Adobe Photoshop CS5 program (Adobe Systems, Inc., 2010). At the end of the experiment, the growth rate was estimated with the formula $GR = [(\text{final growth} - \text{initial growth}) / \text{incubation time}]$ (Guigón-López et al., 2010).

The experiment was carried out with a completely randomized design with a factorial arrangement, considering three factors: 1) strains of ectomycorrhizal fungi (*S. granulatus* and *S. brevipes*), 2) culture media (PDA, BAF and MMN) and 3) pH (4.8 and 5.8). In total, 12 treatments were applied with five replications. The experimental unit was the Petri dish, considering colony growth as the unit of study. The data were submitted to a normality test in accordance with Levene's test (1960). An analysis of variance (ANOVA) and Tukey's range test ($P \leq 0.05$) were subsequently performed with the Statistica version 7 software package (StatSoft, Inc., 2007).

RESULTS AND DISCUSSION

At three days of isolation, the mycelium began to grow in the medium, with white tissue being observed at the periphery of the fragment. At 12 days, the mycelium changed to

se hizo un análisis de varianza (ANDEVA) y comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) con el paquete Statistica versión 7 (StatSoft, Inc., 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A los tres días del aislamiento, el micelio comenzó a crecer en el medio observándose tejido de color blanco en la periferia del fragmento. A los 12 días, el micelio cambió a color beige con un margen blanquecino; la colonia se veía café rojizo por la parte posterior de la caja, coincidiendo con la descripción de Hutchison (1991). Simultáneamente, el medio de cultivo cambió de color amarillo café a café rojizo, debido a los metabolitos exudados por los hongos, lo cual fue más evidente en el medio BAF.

En la Figura 1 se puede observar la tasa de crecimiento de *S. granulatus* en cada medio con los dos tipos de pH. La cepa alcanzó su mayor tasa de crecimiento en el día 24 y empezó a descender hacia los 30 días. En el medio MNM con pH 4.8 se observó un comportamiento diferente debido a una disminución a los 18 días y un incremento a los 24 días; este tratamiento presentó la menor tasa de crecimiento. Las mayores tasas de crecimiento se registraron en el medio PDA con pH 5.8 ($0.64 \text{ cm}^2 \cdot \text{día}^{-1}$, EE = 0.11) y 4.8 ($0.56 \text{ cm}^2 \cdot \text{día}^{-1}$, EE = 0.12).

En la Figura 2 se observa la tasa de crecimiento de *S. brevipes*, la cual tuvo un comportamiento diferente con cada uno de los medios utilizados. La mayor tasa de crecimiento de *S. brevipes* se logró con el medio PDA con pH 5.8 ($0.64 \text{ cm}^2 \cdot \text{día}^{-1}$, EE = 0.07). En el medio BAF con pH 5.8 y el me-

a beige color with a whitish margin; the colony was reddish brown at the back of the dish, matching the description of Hutchison (1991). Simultaneously, the culture medium changed from brownish yellow to reddish brown, due to metabolites exuded by the fungi, which was more evident in the BAF medium.

Figure 1 shows the growth rate of *S. granulatus* in each medium with the two types of pH. The strain reached its highest growth rate at day 24 and began to decrease by day 30. In the MNM medium with pH 4.8, different behavior was observed due to a decrease at 18 days and an increase at 24 days; this treatment had the lowest growth rate. The highest growth rates were recorded in the PDA medium with pH 5.8 ($0.64 \text{ cm}^2 \cdot \text{day}^{-1}$, SE = 0.11) and 4.8 ($0.56 \text{ cm}^2 \cdot \text{day}^{-1}$, SE = 0.12).

Figure 2 shows the growth rate of *S. brevipes*, which had a different behavior with each one of the media used. The highest growth rate of *S. brevipes* was achieved with the PDA medium with pH 5.8 ($0.64 \text{ cm}^2 \cdot \text{day}^{-1}$, SE = 0.07). In the BAF medium with pH 5.8 and the PDA medium with pH 4.8, the highest growth rate was reached at day 30, whereas in the rest of the treatments, the maximum increase was recorded at day 24. Again, the MNM medium produced the smallest increases.

In general, the largest increase in the colonies occurred at day 24. This suggests that it may be necessary at this point to renew the medium, because the nutrients may have been exhausted, which also coincides with the color change from yellow to brown.

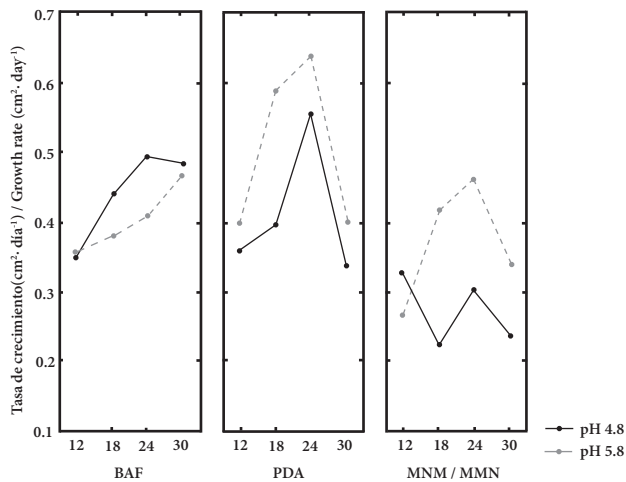


FIGURA 1. Tasa de crecimiento de *Suillus granulatus* durante 30 días en tres medios de cultivo: BAF (biotina-aneurina-ácido fólico), PDA (papa-dextrosa-agar) y MNM (Melin-Norkrans modificado).

FIGURE 1. Growth rate of *Suillus granulatus* for 30 days in three culture media: BAF (biotin-aneurine-folic acid), PDA (potato-dextrose-agar) and MNM (modified Melin-Norkrans).

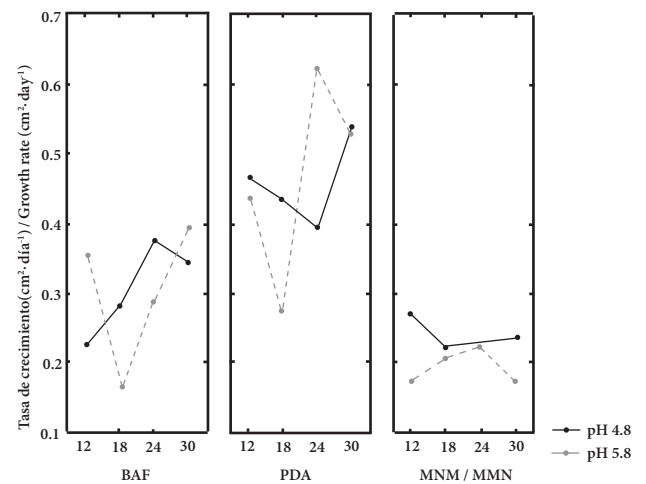


FIGURA 2. Tasa de crecimiento de *Suillus brevipes* durante 30 días en tres medios de cultivo: BAF (biotina-aneurina-ácido fólico), PDA (papa-dextrosa-agar) y MNM (Melin-Norkrans modificado).

FIGURE 2. Growth rate of *Suillus brevipes* for 30 days in three culture media: BAF (biotin-aneurine-folic acid), PDA (potato-dextrose-agar) and MNM (modified Melin-Norkrans).

dio PDA con pH 4.8, la mayor tasa de crecimiento se alcanzó en el día 30, mientras que en el resto de los tratamientos, el máximo incremento se registró en el día 24. Nuevamente, el medio MNM produjo los menores incrementos.

En general, el mayor incremento de las colonias ocurrió a los 24 días. Lo anterior indica que posiblemente en este punto es necesario renovar el medio, pues los nutrientes pudieron haberse agotado, lo cual también coincide con el cambio de color amarillo a café.

En la Figura 3 se puede observar el área alcanzada por las colonias de *S. granulatus* y *S. brevipes*. Las mayores áreas de crecimiento se observaron en el medio PDA, sin diferencia significativa entre los dos pH probados ($F = 1.4$, $P = 0.24$). En cambio, entre las dos especies de hongos si se observaron diferencias estadísticas significativas ($F = 18.6$; $P = 0.00$). En general, la especie *S. granulatus* creció más que *S. brevipes* en todos los tratamientos, a excepción del PDA con pH 4.8. El ANDEVA mostró diferencias significativas ($F = 44.8$, $P = 0.00$) entre los medios de cultivo. De acuerdo con la prueba de Tukey, el medio PDA fue el mejor pues indujo las mayores áreas de crecimiento de *S. granulatus* (13.0 cm^2 , $EE = 0.85$) y

Figure 3 shows the area reached by the *S. granulatus* and *S. brevipes* colonies. The largest growth areas were observed in the PDA medium, with no significant difference between the two pH levels tested ($F = 1.4$, $P = 0.24$). By contrast, between the two fungal species, statistically significant differences ($F = 18.6$; $P = 0.00$) were observed. In general, the species *S. granulatus* outgrew *S. brevipes* in all treatments, except for the PDA with pH 4.8. The ANOVA showed significant differences ($F = 44.8$, $P = 0.00$) between the culture media. According to the Tukey test, the PDA medium was the best because it induced the largest growth areas of *S. granulatus* (13.0 cm^2 , $SE = 0.85$) and *S. brevipes* (12.4 cm^2 , $SE = 0.67$), followed by the BAF medium (*S. granulatus*: 11.2 cm^2 , $SE = 0.98$; *S. brevipes*: 8.1 cm^2 , $SE = 0.36$). The smallest areas were obtained with the MMN medium (*S. granulatus*: 10.1 cm^2 , $SE = 0.44$; *S. brevipes*: 7.3 cm^2 , $SE = 0.86$).

The PDA was the best culture medium. This result is suitable for the selection and isolation of the strains as it is an easy medium to prepare. However, for inoculum production, where liquid medium is required, it is suggested to use the BAF medium since it was the second best after PDA. In the MMN medium, the *Suillus* strains developed very little, coinciding with the findings reported by Torres and Honrubia (1991) who evaluated *S. granulatus* in the same medium. The results obtained are similar to those observed in the fungi *S. Bellini* and *S. luteus*, with average areas of 14.5 and 6.2 cm^2 at pH 5.8 and 4.8, respectively (Pereira et al., 2007). Vázquez-García et al. (2002) mention that strains of the genus *Suillus* showed great variability in growth patterns, although they generally preferred acidic pH (3-6).

Ectomycorrhizal fungi have little ability to break down polysaccharides such as cellulose or hemicellulose and grow slowly on artificial media (Ohta, 1997). Therefore, only glucose and some other monosaccharides and disaccharides can be used for growth (Kusuda et al., 2007). It is possible that the low glucose level in the MMN medium (10 g-liter^{-1}) was the reason the mycelium grew less, because, as reported by Hatakeyama and Ohmasa (2004a), many *Suillus* and *Boletinus* strains grew better at relatively high glucose concentrations (3.33 to 10 %), as in the case of the BAF medium (30 g-liter^{-1}), while growth in other species was inhibited at this concentration (Hakateyaa & Ohmasa, 2004b). The PDA medium is a medium rich in starch; Ohta (1997) showed that *Tricholoma matsutake* has the ability to use starch as a carbon source. Certainly *S. granulatus* and *S. brevipes* also used the starch in the medium.

The MMN medium can be considered the best for maintaining the strains under study, since by growing more slowly the medium will not need to be changed until after a longer period of time than that suggested by Brundrett, Bougher, Dell, Grove and Malajczuc (1996), that is, two to three months. On the other hand, the BAF medium is the best suited for the production of inoculum on inert substrates, since it induced a higher growth rate, which is important for mass production of mycelium.

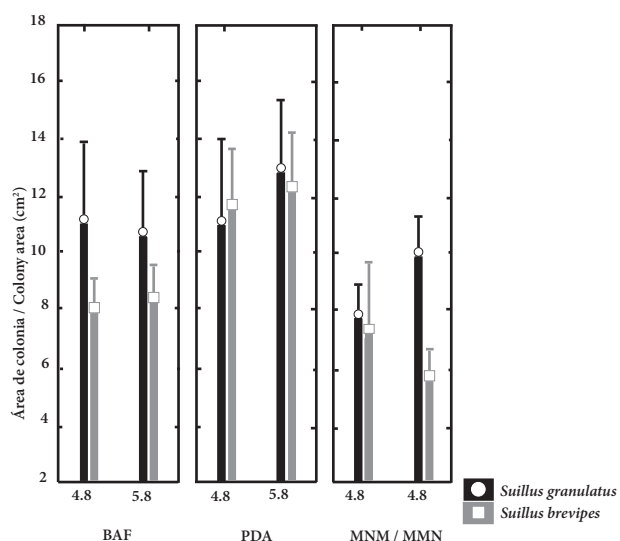


FIGURA 3. Área de crecimiento de *Suillus granulatus* y *S. brevipes* en tres medios de cultivo (BAF: biotina-aneurina-ácido fólico, PDA: papa dextrosa agar, MNM: Melin-Norkrans modificado) con dos valores de pH. Las barras indican desviación estándar de la media ($n = 5$). Letras distintas indican diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre columnas de los tratamientos.

FIGURE 3. Growth area of *Suillus granulatus* and *S. brevipes* in three culture media (BAF: biotin-aneurine-folic acid), PDA (potato-dextrose-agar) and MMN (modified Melin-Norkrans) at two pH values. The bars indicate standard deviation from the mean ($n = 5$). Different letters indicate significant differences (Tukey, $P \leq 0.05$) between columns of the treatments.

S. brevipes (12.4 cm², EE = 0.67), seguido por el medio BAF (*S. granulatus*: 11.2 cm², EE = 0.98; *S. brevipes*: 8.1 cm², EE = 0.36). Las áreas más pequeñas se obtuvieron con el medio MNM (*S. granulatus*: 10.1 cm², EE = 0.44; *S. brevipes*: 7.3 cm², EE = 0.86).

El PDA fue el mejor medio de cultivo. Este resultado es conveniente para la selección y el aislamiento de las cepas pues es un medio fácil de preparar. Sin embargo, para la producción de inóculo, donde se necesita medio líquido, se sugiere utilizar el medio BAF que fue el mejor después del PDA. En el medio MNM, las cepas de *Suillus* se desarrollaron muy poco, coincidiendo con lo reportado por Torres y Honrubia (1991) quienes evaluaron *S. granulatus* en el mismo medio. Los resultados obtenidos son similares a los observados en los hongos *S. bellini* y *S. luteus*, con áreas promedio de 14.5 y 6.2 cm² en pH 5.8 y 4.8, respectivamente (Pereira et al., 2007). Vázquez-García et al. (2002) mencionan que las cepas del género *Suillus* presentaron gran variabilidad en los patrones de crecimiento, aunque en general prefirieron pH ácido (3-6).

Los hongos ectomicorrícicos tienen poca habilidad de decomponer polisacáridos como la celulosa o hemicelulosa y crecen lento en medio artificial (Ohta, 1997). Por tanto, únicamente la glucosa y algunos otros monosacáridos y disacáridos pueden utilizarse para el crecimiento (Kusuda et al., 2007). Es posible que el bajo contenido de glucosa en el medio MNM (10 g·litro⁻¹) fue la causa de que el micelio creciera menos pues, según lo reportado por Hatakeyama y Ohmasa (2004a), muchas cepas de *Suillus* y *Boletinus* crecieron mejor en concentraciones relativamente altas de glucosa (3.33 a 10 %), como es el caso del medio BAF (30 g·litro⁻¹), mientras que el crecimiento de otras especies se inhibió a esta concentración (Hakateyaa & Ohmasa, 2004b). El medio PDA es un medio rico en almidón; Ohta (1997) mostró que *Tricholoma matsutake* tiene la habilidad de utilizar almidón como fuente de carbón. Seguramente *S. granulatus* y *S. brevipes* también utilizan el almidón del medio.

Se puede considerar que el medio MNM fue el mejor para el mantenimiento de las cepas en estudio, pues al crecer más lento, el cambio de medio se hará en un tiempo mayor al sugerido por Brundrett, Bougher, Dell, Grove y Malajczuc (1996); es decir, de dos a tres meses. Por otra parte, el medio BAF sería el más indicado para la producción de inóculo en sustratos inertes, pues indujo mayor velocidad de crecimiento, lo cual es importante para la producción masiva del micelio.

CONCLUSIONES

El medio PDA fue el mejor sustrato para el crecimiento de las cepas, por lo que se sugiere utilizarlo para aislamiento, mientras que el medio BAF se sugiere utilizar para la producción masiva de micelio para inóculo, donde se requiere de medio líquido. El medio MNM se recomienda ya sea para el mantenimiento de las cepas o para pruebas de micorrización porque contiene poca glucosa, lo que puede facilitar la asociación hongo-planta.

CONCLUSIONS

The PDA medium produced the best growth of the strains, so it is suggested to use it for isolation, while the BAF medium is suggested for use in mass production of mycelium for inoculum, where liquid media is required. The MNM medium is recommended either for maintaining the strains or mycorrhization testing because it contains little glucose, which can facilitate the fungus-plant association.

ACKNOWLEDGEMENTS

The first author is grateful to CONACYT, Mexico's Science and Technology Council, for granting scholarship 54427 to enable her to carry out postgraduate studies at INBIOTECA, U. V, and to doctors Enrique Alarcón and Antero Ramos for their critical review of the manuscript.

End of English Version

AGRADECIMIENTOS

La primera autora agradece a CONACYT por la beca 54427 para estudios de posgrado en INBIOTECA, U. V, y a los doctores Enrique Alarcón y Antero Ramos por la revisión crítica del manuscrito.

REFERENCIAS

- Adobe Systems, Inc. (2010). *Adobe Photoshop Extended CS5®. Computer software para Windows vista 7, XP*. San José, CA, USA: Autor.
- Breitenbach, J., & Kränzlin, F. (1991). *Fungi of Switzerland. Vol. 3 Boletes and agarics*. Lucerne, Switzerland: Mykologia Lucerne.
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., & Malajczuc, N. (1996). *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Camberra, Australia: ACIAR. Obtenido de http://aciargov.au/files/node/2241/mn32_pdf_66358.pdf
- Chávez, D., Pereira, G., & Machuca, A. (2009). Efecto de tipos de inóculos de tres especies fúngicas en la micorrización controlada de plántulas de *Pinus radiata*. *Bosque*, 30, 4–9. Obtenido de <http://www.scielo.cl/pdf/bosque/v30n1/art02.pdf>
- Díaz, G., Flores, R., & Honrubia, M. (2009a). Descripción de cultivos miceliarios de Boletales neotropicales y europeos (*Boletus* grupo *edulis*, *Boletellus* y *Suillus*) y formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro. *Revista Mexicana de Micología*, 30, 1–7. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v30/v30a1.pdf>
- Díaz, G., Carrillo, C., & Honrubia, M. (2009b). Production of *Pinus halepensis* seedlings inoculated with the edible fungus *Lactarius deliciosus* under nursery conditions. *New Forests*, 38, 215–227. doi: 10.1007/s11056-009-9142-y
- García-Rodríguez, J. L., Pérez-Moreno, J., Aldrete, A., Cetina-Alcalá, V. M., & Vaquera-Huerta, H. (2006). Caracterización del hongo silvestre ectomicorrízico *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch en cultivo y en simbiosis con eucalipto y pino. *Agrociencia*, 40, 665–676. Obtenido de <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2006/sep-oct/art-11.pdf>
- Guigón-López, C., Guerrero-Prieto, V., Vargas-Albores, F., Carvajal-Millán, E., Ávila-Quezada, G. D., Bravo-Luna, L.,... Lorito, M. (2010). Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28, 87–96. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/612/61218468002.pdf>
- Ground, D. W., & Harrison, K. A. (1976). *Nova Scotian Boletes*. Germany: J. Cramer.
- Hatakeyama, T., & Ohmasa, M. (2004a). Mycelial growth of strains of the genera *Suillus* and *Boletinus* in media with a wide range of concentrations of carbon and nitrogen sources. *Mycoscience*, 45, 169–176. doi: 10.1007/s10267-003-0169-1
- Hatakeyama, T., & Ohmasa, M. (2004b). Mycelial growth characteristics in a split-plate culture of four strains of the genus *Suillus*. *Mycoscience*, 45, 188–199. doi:10.1007/s10267-003-0174-4
- Honrubia, M., Torres, P., Díaz, G., & Cano, A. (1992). *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales*. Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, ICONA.
- Honrubia, M., Torres, M., Díaz, G., & Morte, A. (1995). *Bioteconología forestal: Técnicas de micorrización y micropropagación de plantas*. Murcia, España: Universidad de Murcia.
- Hutchison, L. J. (1991). Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon*, 42, 387–504.
- Kusuda, M., Ueda, M., Konishi, Y., Yamanaka, K., Terashita, T., & Miyatake, K. (2007). Effects of carbohydrate substrate on the vegetative mycelial growth of an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake* isolated from *Quercus*. *Mycoscience*, 48, 358–364. doi: 10.1007/s10267-007-0384-2
- Levene, H. (1960). Robust test for equality of variances. In I. Olkin, H. Hotelling, W. Hoefding, W. C. Madow, & H. B. Mann (Eds.), *Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling* (pp. 278–292). USA: Stanford University Press.
- Marx, D. H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59, 153–163. Obtenido de http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1970Articles/Phyto60n10_1472.pdf
- Moser, M. (1960). *Die Pilze Mitteleuropas: Die Gattung Phlegmacium (Schleimköpfe)*. Helbrunn, Österreich: J. Klinkhardt.
- Ohta, A. (1997). Ability of ectomycorrhizal fungi to utilize starch and related substrates. *Mycoscience*, 38, 403–408. doi:10.1007/BF02461680
- Pereira, G., Herrera, J., Machuca, A., & Sánchez, M. (2007). Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrízicos recolectados en plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque*, 28, 215–219. Obtenido de <http://www.scielo.cl/pdf/bosque/v28n3/art05.pdf>
- Pérez-Moreno, J. (2012). Los hongos comestibles ectomicorrízicos y su biotecnología. In J. E. Sánchez, & G. Mata (Eds.), *Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica: Investigación y desarrollo en un entorno multicultural* (pp. 19–28). Tapachula, Chiapas: Colegio de la Frontera Sur.
- Sánchez, F., Honrubia, M., & Torres, P. (2000). Características culturales de algunos hongos ectomicorrízicos en cultivo puro. *Revista Iberoamericana de Micología* 17, 127–134. Obtenido de <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/127134.pdf>
- Smith, S. E., & Read, D. J. (1997). *Mycorrhizal symbiosis* (2nd ed.). London: Academic Press.
- Sylvia, D. M. (1999). Mycorrhizal symbiosis. In D. M. Sylvia, J. J. Fuhrmann, P. G. Hatel, & D. A. Zuberer (Eds.), *Principles and applications of soil microbiology* (pp. 408–426). New Jersey, USA: Prentice Hall.
- StatSoft, Inc. (2007). *STATISTICA (Data analysis software system). Version 7.0 para windows*. USA.
- Torres, O., & Honrubia, M. (1991). Dinámica de crecimiento y caracterización de algunos hongos ectomicorrízicos en cultivo. *Cryptogamie Mycologie*, 12, 183–192.
- Vázquez-García, A., Santiago-Martínez, G., & Estrada-Torres, A. (2002). Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrízicos. *Anales del Instituto de Biología*, 73, 1–15. Obtenido de <http://www.ejournal.unam.mx/bot/073-01/BOT73101.pdf>