



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGÍA
MANEJO INTEGRAL DE ECOSISTEMAS**

**PROPAGACIÓN DE CEPAS DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS
CON FINES DE INOCULACIÓN**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

Rodolfo Enrique Ángeles Argáiz

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL
INSTITUTO DE BIOLOGÍA UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. MIGUEL ULLOA SOSA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA UNAM
DR. SIGFRIDO SIERRA GALVÁN
FACULTAD DE CIENCIAS UNAM**

MÉXICO, D.F.

AGOSTO DE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de mayo de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ÁNGELES ARGÁIZ RODOLFO ENRIQUE** con número de cuenta **513023819** con la tesis titulada **"PROPAGACIÓN DE CEPAS DE HONGOS ECTOMICORRÍZICOS CON FINES DE INOCULACIÓN"**, realizada bajo la dirección de la **DR. ROBERTO GARIBAY ORIJEL**:

Presidente: DR. MAURICIO ALBERTO TRUJILLO ROLDAN
Vocal: DR. JESÚS PÉREZ MORENO
Secretario: DR. MIGUEL ARMANDO ULLOA SOSA
Suplente: DRA. HERMELINDA MARGARITA VILLEGAS RÍOS
Suplente: DRA. MARÍA DEL PILAR ORTEGA LARROCEA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de julio de 2015.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, el Instituto de Biología y la Universidad Nacional Autónoma de México, por mi formación como Maestro en Ciencias.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca de manutención.
- A la Red Temática de Investigación de Códigos de Barras de la Vida del CONACYT (MEXBOL) (CONACYT 194045), por su financiamiento en los análisis moleculares y secuenciación de DNA.
- A los Dres. Roberto Garibay Orijel, Miguel Ulloa y Sigfrido Sierra, por su asesoría y participación como Comité Tutorial.

Agradecimientos a título personal

- Al Dr. Mauricio Trujillo Roldán, Dr. Jesús Pérez Moreno, Dra. Margarita Villegas Ríos y Dr. Pilar Ortega Larrocea, por revisar mi tesis y por sus nutritivos comentarios.
- Al grupo de trabajo del Laboratorio de Sistemática, Ecología y Aprovechamiento de Hongos Ectomicorrízicos, por el apoyo moral, técnico y académico brindado.
- Al equipo de LABCYTEC, por el apoyo técnico y el préstamo del biorreactor.
- A la Dra. Pilar Ortega y a la M. en C. Iris Suárez por el acceso al invernadero y a los microcosmos.
- A la Dra. Patricia Lappe y al Biól. Samuel Aguilar por los consejos sobre microbiología, reactivos y nutrientes, por el acceso a las incubadoras y a la campana de flujo, y de manera particular al Dr. Miguel Ulloa, por permitirme trabajar en su laboratorio.
- Al Dr. Gerardo Mata, por la estancia de investigación en su laboratorio.
- Al Ing. Agrónomo Ulises Salas, por su colaboración en el aislamiento de cepas.

Índice

Agradecimientos	1
Agradecimientos a título personal	2
Índice.....	3
Lista de figuras y cuadros	5
Cuadros	5
Figuras.....	6
Resumen.....	9
Abstract.....	11
1 Introducción.....	13
1.1 Funciones ecológicas	13
2 Marco teórico	17
2.1 El cultivo de hongos ectomicorrízicos.....	17
2.2 Cinética del crecimiento microbiano	21
2.3 Crecimiento de hongos filamentosos en cultivos sumergidos	23
2.4 Escalamiento del cultivo	36
3 Antecedentes	38
4 Justificación.....	42
5 Objetivos	43
5.1 General.....	43
5.2 Particulares.....	43
6 Método	44
6.1 Obtención de material biológico.....	44
6.2 Aislamiento de cepas.....	44
6.3 Determinación de los esporomas utilizados	46
6.4 Métodos moleculares.....	47
6.5 Cinéticas.....	49
6.6 Peso seco.....	52
6.7 Prueba del ácido dinitrosalicílico para cuantificación de azúcares	52
7 Resultados	54
7.1 Material biológico.....	54
7.2 Cinéticas.....	56
8 Discusión.....	69
8.1 Aislamiento de cepas e identificación	69

8.2 El género <i>Laccaria</i> como modelo de estudio	72
8.3 Experimento 1: cinética multifactorial en medio sólido	74
8.4 Experimento 2: Cinética en medio líquido en matraz.....	89
8.5 Experimento 3: Cinética en medio líquido en tubos falcon	91
8.6 Experimento 4: Cinética en biorreactor.....	93
9 Conclusiones.....	96
10 Referencias	98

Lista de figuras y cuadros

Cuadros

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo utilizados.....	46
Cuadro 2. Cepas de hongos ectomicorrízicos obtenidas a partir de esporomas.....	54
Cuadro 3. Cepas de hongos no ectomicorrízicos obtenidas a partir de esporomas y ectomicorrizas.....	55
Cuadro 4. Experimento 1, promedios de área proyectada (mm) de cada tratamiento en la cinética multifactorial en medio sólido.....	59
Cuadro 5. Cuadro 5. Experimento 1, “Cinética multifactorial en medio sólido”, pesos secos finales de cada tratamiento.....	65
Cuadro 6. Experimento 2 “Cinética en medio líquido de la cepa EF36. Promedios y promedios móviles de glucosa residual a través del tiempo.....	66
Cuadro 7. Experimento 3 “Cinética destructiva en tubos”. Promedios y promedios móviles de peso seco de biomasa y sustrato residual a través del tiempo	67
Cuadro 8. Experimento 4, “Cinética en biorreactor”, promedios de peso seco de biomasa y consumo de sustrato a través del tiempo	68
Cuadro 9. Análisis de correlación de Spearman y de Kendal para los valores de las áreas exterior e interior, y peso seco del experimento 1, “Cinética multifactorial en placa”.....	76
Cuadro 10. Prueba Tukey <i>post hoc</i> al análisis de varianza, para el área exterior en función de los medios nutritivos.....	77
Cuadro 11. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área exterior en función de los medios nutritivos.	77
Cuadro 12. Prueba Tukey <i>post hoc</i> al análisis de varianza para el área interior en función de los medios nutritivos	78
Cuadro 13. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área interior en función de los medios nutritivos.....	78
Cuadro 14. Prueba Tukey <i>post hoc</i> al análisis de varianza para el área exterior en función de temperaturas	79
Cuadro 15. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área exterior en función de temperaturas	79

Cuadro 16. Prueba Tukey <i>post hoc</i> al análisis de varianza para el área interior en función de temperaturas	80
Cuadro 17. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área interior en función de temperaturas	80
Cuadro 18. . Prueba Tukey <i>post hoc</i> al análisis de varianza para el área exterior en función de los pH	81
Cuadro 19. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área exterior en función de los pH..	81
Cuadro 20. Prueba Tukey <i>post hoc</i> al análisis de varianza para el área interior en función de los pH.....	81
Cuadro 21. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área interior en función de los pH...	82
Cuadro 22. Prueba Tukey <i>post hoc</i> al análisis de varianza para pesos secos en función de medios nutritivos y temperaturas	83
Cuadro 23. Prueba Tukey, grupos homogéneos para pesos secos en función de medios nutritivos y temperaturas	83
Cuadro 24. Prueba Tukey <i>post hoc</i> al análisis de varianza para pesos secos en función de medios nutritivos y temperaturas	84
Cuadro 25. Prueba Tukey, grupos homogéneos para pesos secos en función de medios nutritivos y temperaturas	85
Cuadro 26. Prueba Tukey <i>post hoc</i> al análisis de varianza para pesos secos de cada tratamiento.....	86
Cuadro 27. Prueba Tukey, grupos homogéneos para pesos secos de cada tratamiento	88

Figuras

Figura 1. Microfotografía electrónica de barrido de <i>pellets</i> de <i>Epicoccum purpurascens</i> cultivados con diferentes fuentes de nitrógeno.....	27
Figura 2. Curva tipo de glucosa para DNS.....	53
Figura 3. Morfología de la colonia de EF36 en distintos medios de cultivo y pH.....	58
Figura 4. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo PDA a 23° C y a diferentes pH.....	60
Figura 5. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo PDA a 25° C y a diferentes pH.....	60

Figura 6. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo PDA a 28° C y a diferentes pH.....	61
Figura 7. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo MMN a 23° C y a diferentes pH.....	61
Figura 8. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo MMN a 25° C y a diferentes pH.....	62
Figura 9. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo MMN a 28° C y a diferentes pH.....	62
Figura 10. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo BAF a 23° C y a diferentes pH.....	63
Figura 11. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo BAF a 25° C y a diferentes pH.....	63
Figura 12. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo BAF a 28° C y a diferentes pH.....	64
Figura 13. Comparación de las áreas finales exterior e interior de la cinética en medio sólido.....	64
Figura 14. Análisis de varianza, efecto del medio nutritivo sobre el crecimiento de las áreas exterior e interior de las colonias de EF36. $F = 33.957$, $p = 0.00$	77
Figura 15. Análisis de varianza, efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las áreas exterior e interior. $F = 37.373$, $p = 0.00$	79
Figura 16. . Análisis de varianza, efecto del pH sobre el crecimiento de las áreas exterior e interior. $F = 6.9816$, $p = 0.00$	81
Figura 17. Análisis de varianza, efecto del medio nutritivo y la temperatura sobre el peso seco. $F = 9.0553$, $p = 0.00$	82
Figura 18. Análisis de varianza, efecto del medio nutritivo y pH sobre el peso seco. $F = 3.6305$, $p = 0.00778$	84
Figura 19. Promedios de los pesos secos en cada tratamiento en medio sólido. Las letras representan los grupos homogéneos	86
Figura 20. Cinética del consumo de sustrato en el cultivo de EF36 en matraz	89
Figura 21. Experimento 3. Cinética de acumulación de biomasa en el cultivo de EF36 en tubos	91

Figura 22. Experimento 3. Cinética del consumo de sustrato en el cultivo de EF36 en tubos.....	92
Figura 23. Experimento 4. Cinética de acumulación de biomasa en el cultivo de EF36 en biorreactor.....	93
Figura 24. Experimento 4. Cinética del consumo de sustrato en el cultivo de EF36 en biorreactor.....	93

Resumen

Los hongos ectomicorrízicos otorgan a sus plantas simbiotes múltiples beneficios, los cuales se traducen en sobrevivencia y salud para la planta. Por este motivo se usan algunas especies de estos hongos para inocular plantulas y así incrementar la producción forestal. Para esto, es necesario seleccionar especies de hongos locales, así como especies ecológicamente funcionales. Hasta ahora, sólo algunas especies de hongos ectomicorrízicos han podido ser cultivadas en medios nutritivos. La producción a gran escala de micelio de hongos ectomicorrízicos es, de entre los varios métodos de inoculación, uno de los que ofrece la oportunidad de abastecer las demandas de inóculo de la industria forestal. Por estas razones, se planteó el objetivo de desarrollar una técnica de aislamiento, mantenimiento y propagación de micelio de *Laccaria trichodermophora* en biorreactor de agitación mecánica. De manera particular: aislar cepas de hongos ectomicorrízicos, y seleccionar la mejor en cuanto a su ecología y su crecimiento en medio puro; para la cepa EF36 de *L. trichodermophora* determinar las mejores condiciones para la producción de biomasa, en cuanto a pH medio nutritivo, temperatura, agitación y porcentaje de inóculo iniciador del cultivo; y evaluar el crecimiento de la cepa EF36 en un biorreactor agitado mecánicamente. Para esto, se realizaron salidas al campo para la recolecta de hongos ectomicorrízicos. También se utilizaron ejemplares expuestos en la XV Exposición Nacional de Hongos, así como micorrizas de las raíces de pinos en microcosmos y bioensayos del Instituto de Geología UNAM. Se aislaron 15 cepas de hongos ectomicorrízicos, así como 36 de hongos no ectomicorrízicos, entre los que destacan un gran número de hongos endófitos. Se seleccionó como cepa de trabajo a EF36 de *Laccaria trichodermophora* Muell., para estudiar su comportamiento en cultivo. El primer experimento fue una cinética multifactorial en medio sólido, donde se usaron como variables independientes el medio nutritivo (PDA, MMN y BAF), la temperatura (23°, 25° y 28° C) y el pH (4.5, 5.5 y 6.5). Las variables dependientes evaluadas fueron el área proyectada y la biomasa final. El tratamiento que presentó un mayor incremento en biomasa fue la combinación de BAF, pH 5.5 y 25° C. Sobre estos resultados se plantearon las cinéticas en medio líquido. El segundo experimento se llevó a cabo en matraz *bafleado* con agitación orbital de 100 rpm. Tuvo como finalidad identificar la capacidad de reactivación de la cepa EF36 posterior a la congelación con glicerol 10%. En este experimento, ninguno de los tratamientos tratados con glicerol presentaron crecimiento. El tratamiento sin glicerol y almacenado a 25° C por resiembras

seriales presentó un buen crecimiento y un rendimiento de 0.253 g_B/g_S. El tercer experimento se realizó en tubos falcon de 50 ml, con las mismas condiciones de cultivo y formulación del medio. Tuvo como finalidad identificar la respuesta cinética de la cepa EF36 al porcentaje de inóculo iniciador de la fermentación. El tratamiento inoculado con 2% de inóculo alcanzó un rendimiento de 0.289 g_B/g_S, mientras que el inoculado con 20% alcanzó 0.119 g_B/g_S. Finalmente, se ensayó el cultivo de la cepa EF36 en un biorreactor de 4 L con agitación por turbina Rushton e inyección de aire no enriquecido. Esta última fermentación alcanzó un rendimiento de 0.073 g_B/g_S. Se observó que el mayor rendimiento se obtuvo en matraz agitado, y que un menor porcentaje de inóculo iniciador genera un mayor crecimiento y rendimiento. También se observó que la agitación mecánica usada en el biorreactor disminuyó fuertemente el rendimiento y crecimiento de la cepa EF36. La posterior investigación sobre tipos de agitación y composición del medio permitirá obtener mayores rendimientos. Con el máximo rendimiento alcanzado en este trabajo se tiene la capacidad de producir, en fermentaciones de 4 semanas, inóculo vegetativo suficiente para micorrizar 7000 plantas/L.

Abstract

Ectomycorrhizal fungi provide their symbiont plants multiple benefits, which positively influence the survival and health of the plant. For this reason some species of these fungi are used to inoculate seedlings to increase forest productivity. To achieve this is necessary to select local species with ecological functionality. So far, only some species of ectomycorrhizal fungi have been grown in nutritive media. The large-scale production of ectomycorrhizal fungal mycelia is, among the various methods of inoculation, the only one that fulfills the forest industry inoculum demand. For these reasons, we had the goal of developing a technique for isolation, maintenance and propagation of *Laccaria trichodermophora* mycelium in a mechanical agitation bioreactor. In particular: to isolate strains of ectomycorrhizal fungi, and select the best in terms of ecology and growth in pure media; to determine the best biomass production conditions for the strain EF36 of *L. trichodermophora* (pH, temperature, agitation rate and inoculum starter culture); and to assess the growth of *L. trichodermophora* EF36 strain in a mechanically stirred bioreactor. For these, we collected ectomycorrhizal fungi at field. We also used some specimens exposed at the “XV Exposición Nacional de Hongos” and mycorrhizal roots tips of pine microcosms and bioassays from UNAM Institute of Geology. We isolated 15 ectomycorrhizal fungi strains and 36 non ectomycorrhizal fungi, where endophytes predominated. To continue the study we selected the strain EF36 of *Laccaria trichodermophora* Muell. The first experiment was a solid medium multifactorial kinetics, where the independent variables were the nutrient medium (PDA, MMN and BAF), temperature (23°, 25°, and 28° C) and pH (4.5, 5.5 and 6.5). The dependent variables were the projected area and the final biomass. The treatment that showed a bigger biomass increase was the combination BAF, pH 5.5, and 25° C. The following kinetics were raised in liquid medium using this results as baseline. The second experiment was conducted in baffled flasks with 100 rpm orbital shaking. It was aimed to identify the regeneration capabilities of EF36 strain after freezing with 10% glycerol. In this experiment, none of the treatments treated with glycerol was reactivated. The treatment without glycerol and stored at 25° C by serial passaging showed good growth and a yielded 0.253 g_B/g_S. The third experiment was performed in 50 ml falcon tubes, with the same culture conditions and medium formulation. It was aimed to identify the kinetic response to the initiation inoculum percentage. The treatment inoculated with 2% initial inoculum yielded 0.289 g_B/g_S, while the 20% initial

inoculum treatment yielded 0.119 g_B/g_S. Finally, EF36 strain culture was tested in a 4 L bioreactor with Rushton turbine stirring and air injection unenriched. The latter fermentation reached a yield of 0.073 g_B/g_S. It was observed that the highest yield was obtained in shaken flasks and a lower percentage of initial inoculum. It was also observed that the mechanical agitation used in the bioreactor strongly decreased the performance and growth of EF36 strain. Subsequent research on agitation types and medium composition would allow higher yields. With our maximum performance we have the potential capability to produce enough vegetative inoculum to inoculate 7000 plants/L at 4 weeks fermentations.

1 Introducción

Durante un paseo de verano por el bosque, muchos de nosotros hemos sido víctimas de la fascinación al encontrar la abrumadora diversidad de hongos que emergen del suelo, ostentando brillantes y llamativos colores. Algunos curiosos se detienen a observar y se llevan otra sorpresa cuando al inclinarse descubren una segunda oleada de hongos, parecieran haber aparecido justo en ese momento y mantenerse discretos entre la hojarasca. En este escenario nos encontramos rodeados de esporomas, los cuales son las estructuras macroscópicas de reproducción sexual de los hongos. Sólo hasta que se patear un tronco o se remueve la capa de hojarasca es cuando uno se encuentra frente a frente con el micelio.

El micelio, la “dimensión” vegetativa de los hongos ectomicorrízicos (HEM) (y de los hongos en general), es una de las cuatro fases en que estos se encuentran en su medio. Sin embargo, no siempre se le ha prestado suficiente atención a su estudio en comparación con los esporomas, ectomicorrizas, esporas u otras estructuras de resistencia (Anderson y Cairney 2007). Esa gran diversidad de hongos que se aprecia de manera epígea se ve opacada cuando se conoce la verdadera diversidad presente en el sitio, y para poder conocerla no basta con las estimaciones de riqueza que se hacen a partir de los esporomas (Gardes y Bruns 1996). En los hongos un mismo “individuo” (=geneto) (Dahlberg y Stenlid 1995) se manifiesta en las dimensiones de lo micro- y lo macro- a lo largo de su vida y a través de las generaciones.

1.1 Funciones ecológicas

El micelio de los HEM es un talo filamentoso conformado por una trama de hifas que crecen explorando el suelo en busca de nutrientes y simbiontes vegetales. Dada su nutrición por absorción, el micelio constantemente está vertiendo exudados en su medio. Son principalmente enzimas celulolíticas y ligninolíticas como endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, lacasa, lignina peroxidasa y manganeso-peroxidasa (Schlegel 1993), cuya acción es degradar los sustratos para que puedan ser asimilados como moléculas simples. Una buena porción de estas moléculas quedan disponibles para otros microorganismos (MOs) del suelo. Esto moldea la actividad microbiológica del suelo y otorga características particulares como acidez, disponibilidad de micro- y macronutrientes, acelera la tasa de

degradación de la materia orgánica, e incluso puede determinar la composición de la comunidad de MOs en el suelo (van Elsas y Boersma 2011).

Cohabitando la rizósfera e hifósfera existe una compleja comunidad de bacterias, a las cuales se les ha llamado “bacterias ayudadoras de micorrizas” (BAM). Estas bacterias son representantes de los géneros *Streptomyces* (Schrey *et al.* 2012), *Sphingomonas* (Hryniewicz *et al.* 2009), *Paenibacillus* (Aspray *et al.* 2006), *Pseudomonas*, *Azospirillum* (Peroto y Bonfante 1997) y *Bacillus* (Bending *et al.* 2002), entre otras. Las BAM participan en el reconocimiento hongo-raíz, promueven la receptividad de la raíz, incrementan el crecimiento hifal y posibilitan la germinación de las esporas de algunos HEM (Garbaye 1994). También en la hifósfera se encuentran representantes de los géneros *Burkholderia* y *Serratia*, que por el contrario, actúan inhibiendo el desarrollo de algunos otros HEM (Bending *et al.* 2002).

Las características estructurales del micelio le dan la propiedad de penetrar entre los agregados y los poros del suelo. Las hifas exploran las películas de agua, los fragmentos de materia orgánica y la fracción mineral que integran al suelo. Es decir, el micelio de los HEM, con su trama filamentosa, también da estructura al suelo. No obstante, los hongos micorrízico arbusculares tienen una mayor influencia en la estructura del suelo, debido a la secreción y a la presencia de glomalina en su pared celular (Rillig y Mummey 2006).

La ectomicorriza es una estructura que se forma en las raíces de algunas plantas (representantes de las familias Asteraceae, Betulaceae, Caesalpiniaceae, Casuarinaceae, Cistaceae, Cyperaceae, Dipterocarpaceae, Ericaceae, Fagaceae, Gnetaceae, Juglandaceae, Meliaceae, Mimosaceae, Myrtaceae, Nothofagaceae, Nyctaginaceae, Papilionaceae, Phyllanthaceae, Pinaceae, Polygonaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Salicaceae, Sapotaceae, Sarcolaenaceae y Tiliaceae), al ser colonizadas por los HEM (Agerer 1987-2008; Brundrett 2009; Peterson *et al.* 2004).

De manera directa, la planta adquiere ventajas de la asociación, como el incremento en la superficie de exploración/absorción, dado por la abundante ramificación de las raíces micorrizadas, el transporte de agua y nutrientes y la protección contra patógenos. Estos efectos se traducen en el establecimiento de las plantas jóvenes, mayor longevidad y un incremento en la producción primaria neta (Smith y Read 2008).

El intercambio de nutrientes entre la planta y el hongo se da en la ectomicorriza, pero la exploración del suelo, la absorción de agua, la asimilación de micro- y macronutrientes, el

almacenamiento y el transporte son funciones propias del micelio (Smith y Read 2008). A través del micelio se interconectan muchas plantas entre sí, fenómeno conocido como “red ectomicorrízica”. Las plantas maduras y bien establecidas presentan una producción primaria considerablemente mayor que la de las plantas jóvenes. En ocasiones la planta joven no es capaz de realizar una fotosíntesis exitosa, ya que a nivel de sotobosque la luz es un recurso limitado. En este escenario el micelio funciona como vínculo entre plantas jóvenes y maduras, donde el transporte de nutrientes y carbohidratos ocurre en dirección de las plántulas (Simard y Durall 2004).

Con el uso de técnicas basadas en isótopos estables y radiactivos, se ha demostrado la movilización de C y N a través de micelio, provenientes, tanto de otras plantas, como de materia orgánica en descomposición (Hobbie y Högborg 2012; Hobbie y Werner 2004). Incluso participan las plantas micoheterótrofas, como los géneros *Monotropa* y *Pterospora*, los cuales carecen de clorofila, por lo que obtienen la totalidad de los productos carbonados de la red ectomicorrízica (Simard y Durall 2004).

Todas estas funciones son de vital importancia en los ecosistemas ectomicorrízicos, como el bosque templado, mediterráneo y boreal. Sin embargo, en otros ecosistemas, los HEM también determinan el éxito de algunas plantas. En ecosistemas xericos, representantes del género *Quercus* aprovechan el C proveniente de la red, a través de la mixotropía, para suplir sus necesidades justo en el momento más seco del año, cuando no tienen hojas para fotosintetizar y sus reservas energéticas no son suficientes (Bréda *et al.* 2013).

A escala global, el micelio ectomicorrízico tiene repercusión en la captura de CO₂ atmosférico, ya que incrementa la producción primaria en los ecosistemas en los que se desarrolla, los cuales suelen ser dominados por plantas asociadas a HEM (Hobbie 2006).

No se puede pasar por alto la participación de los HEM en las cadenas tróficas. Microartrópodos como nemátodos, ácaros y colémbolos, que representan la mayor parte de la mesofauna en el suelo, se alimentan de micelio (Kurakov *et al.* 2006). A partir del micelio de los HEM, surgen los esporomas, de los que se alimentan vertebrados que van desde ratones, ardillas voladoras y jabalíes, hasta grandes venados (Maser *et al.* 2008; Castillo-Guevara *et al.* 2012). La gente también consume esporomas de HEM, de las casi 400 especies de hongos consumidos tradicionalmente en México, más de la mitad son HEM (Garibay-Orijel y Ruan-Soto, 2014). Hongos de los géneros, *Boletus*, *Cantharellus*, *Lactarius*,

Tricholoma y *Tuber* presentan producciones de cientos de toneladas anuales, y valores en el mercado global que ascienden a billones de dólares (Hall *et al.* 2003).

2 Marco teórico

Una vez que se han mencionado las características biológicas de los HEM, así como las ventajas que la simbiosis otorga a las plantas y a los ecosistemas, es turno de revisar las estrategias de inoculación de plantas con HEM seleccionados. Repác (2011) revisa y discute los métodos de inoculación y los clasifica en naturales, por esporas y vegetativos. Los métodos naturales consisten en sembrar las plantas en suelo de monte, humus, hojarasca o cualquier sustrato extraído del ambiente natural donde el inóculo de HEM pueda encontrarse presente. Los métodos a base de esporas se refieren a la aplicación de éstas, ya sea disueltas en el agua de riego o mezcladas en el sustrato, antes, durante o después de la siembra. Este es el método más popular. El inóculo de píleo seco molido también se incluye en esta clasificación. Los inóculos vegetativos consisten en la aplicación de micelio vivo y metabólicamente activo en la rizósfera de la planta. El micelio se puede aplicar en el agua de riego, mezclado con el sustrato o transportado en diversos agentes protectores.

2.1 El cultivo de hongos ectomicorrízicos

El cultivo de hongos se ha estudiado principalmente en especies saprobias (Martínez-Carrera *et al.* 2010; Sanchez y Mata 2012). Ésto es debido a que los HEM poseen un conjunto enzimático limitado y presentan la necesidad de su simbionte vegetal para cumplir su ciclo de vida. Se produce inóculo vegetativo a través de la propagación de una cepa de HEM en particular. El micelio obtenido es aplicado al sustrato o a la rizósfera (Repác 2011). Los métodos de producción de micelio, así como su concentración y modo de inoculación en la planta ha variado en los diferentes trabajos (Cline y Reid 1982; Gagnon *et al.* 1991; Gangé *et al.* 2005).

2.1.1 Medios nutritivos

Para cualquiera de los métodos de inoculación vegetativos se requiere de la propagación de cepas de HEM en medios nutritivos apropiados. Ésto se hace, tanto para la propagación del inóculo (producto final para la inoculación de la planta), del preinóculo (inóculo “semilla” a partir del cual se inocula el reactor o el sustrato de propagación), como para el mantenimiento de las cepas.

Un medio de cultivo es una matriz diseñada para el crecimiento de MOs en condiciones aisladas. En el medio de cultivo se incluyen los nutrientes que el MO es capaz de asimilar y requiere para su crecimiento. Estos nutrientes se clasifican en macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes son glúcidos, proteínas, lípidos y ácidos orgánicos. De estos compuestos los MOs obtienen C, H, N, P y S. Dentro de los macronutrientes está el carbono, el cual es el componente central de la biomasa microbiana, además de ser fuente de energía, por lo que se considera como el elemento principal, y muchas veces el factor limitante en el cultivo.

Los micronutrientes son los requeridos en muy pequeñas concentraciones, en su mayoría vitaminas y minerales, los cuales actúan como cofactores par la actividad enzimática (Hogg, 2005). La biología propia de cada MO determina los contenidos de los medios de cultivo a usarse.

2.1.2 Obtención de cepas

La obtención y aislamiento de cepas se realiza partiendo de material biológico recolectado en campo. Los HEM son comúnmente aislados de esporomas, pero pueden ser aislados de ectomicorizas, esclerocios, rizomorfos y esporas (Molina y Palmer 1982). Se ha dado preferencia a los esporomas debido a su fácil identificación (en comparación con las ectomicorizas, rizomorfos o esporas) y a la accesibilidad que presentan. El trabajo de Molina y Palmer (1982) es la referencia clásica sobre el aislamiento, mantenimiento y cultivo puro de HEM. Pero en los más de 30 años que han pasado desde su publicación, se han propuesto numerosas modificaciones a sus protocolos, aunque todas conservan los mismos principios básicos (Repác 2011).

Los esporomas son la estructura de reproducción sexual de los HEM, son la fase más evidente del ciclo de vida y por eso la más conocida y aprovechada. La taxonomía de hongos está basada en las estructuras de reproducción sexual, ya que presentan la mayor cantidad de caracteres discriminatorios (McNelly y Turland, 2011). Sin embargo, los esporomas presentan algunas complicaciones para aislar cepas. La fructificación de los HEM ocurre exclusivamente en estado silvestre, de manera estacional, anual y heterogénea de una año a otro, además está restringida a los sitios en donde se distribuyen sus hospederos (Gardes y Bruns 1996). Para obtener una cepa a partir de un esporocarpo es necesario seleccionar a

uno en estado joven, fresco y sin evidencia de micofagia, parasitismo, daño mecánico o descomposición. Los aislamientos se ensayan partiendo del contexto sano del esporoma (Molina y Palmer 1982).

Para obtener cepas a partir de ectomicorrizas, se recolectan y se depositan en agua para su breve transporte. Pocas horas después se limpian sutilmente con pincel y aguja, se depositan en una solución de monoleato de polioxietileno sorbitán (Tween 80) al 0.01% para romper la tensión superficial y facilitar el lavado. A continuación, se realiza una esterilización superficial sumergiendo la ectomicorriza en hipoclorito de calcio 1% (Yamada *et al.* 2001b) o en peróxido de hidrógeno al 33% (Menkis *et al.* 2005). Los aislamientos se ensayan partiendo de fragmentos de ectomicorriza y el micelio puede desarrollarse, ya sea del manto, o de la red de Hartig.

Para obtener cepas a partir de esporas, estas son recuperadas de esporadas. De manera general, las esporas de HEM no presentan germinación *in vitro*, por lo que se usan promotores de la germinación como el ácido abiético, fragmentos de raíz o extractos de raíz (Fries 1989; Fries *et al.* 1987).

Para obtener cepas a partir de esclerocios se usa un protocolo similar al de ectomicorrizas. Previamente se tamiza una muestra de suelo en maya de 0.5 mm y se resuspende la fracción rescatada en solución de glucosa 0.25 M, para finalmente descartar a mano los esclerocios y separarlos de fragmentos de similar tamaño y flotabilidad (Molina y Palmer 1982; Utkhede y Rahe 1978).

2.1.3 Mantenimiento de cepas

Cuando se requiere preservar una colección de cepas por un período prolongado de tiempo (años) es necesario mantenerlas en condiciones separadas a las cepas de trabajo. Las colecciones de hongos originalmente se mantuvieron por transferencias en serie a medio fresco (Molina y Palmer 1982). Este subcultivo de rutina no es un método muy práctico para el almacenamiento de un gran número de cultivos de hongos. Consume mucho tiempo y recursos, es propenso a la contaminación, y no impide los cambios genéticos y fisiológicos (degeneración y/o envejecimiento) durante los subcultivos a largo plazo (Homolka 2013).

Existen otras alternativas para su almacenamiento, todas coinciden en someter a las cepas a condiciones de bajas temperaturas para disminuir las tasas metabólicas. Usualmente se

mantienen en medio nutritivo en tubos de ensaye a 4° C en medio Melin-Norkrans modificado (MMN) o papa dextrosa agar (PDA) (Marx 1969; Molina y Palmer 1982), pero también existen otras opciones. En algunos hongos, la preservación bajo una capa de aceite mineral, en medio nutritivo adicionado con glicerol, en gel de sílice, suelo o arena han demostrado ser eficientes (Repác 2011).

Kitamoto *et al.* (2002) proponen el método del “aserrín congelado” y ponen a prueba la capacidad de reactivar cepas (de todos los phyla) almacenadas a -85° C en sustrato compuesto por PDA, aserrín de *Fagus*, arroz y glicerol 10%.

El método “criovial” (Crahay *et al.* 2013 a, b) consiste en congelar la cepa a -130° C, las cepas crecidas en MMN (Colpaert *et al.* 2000) dentro de tubos de ensaye, se cubren con una capa de glicerol (para proteger del congelamiento) y posteriormente se enfrían gradualmente hasta alcanzar los -130° C. Charlotte *et al.* (2013) compararon este método con el método típico (4° C, Molina y Palmer 1982) y encontraron que no hubo grandes repercusiones en cuanto a la capacidad de formar micorrizas en las raíces de *Pinus sylvestris* por HEM de los géneros *Hebeloma*, *Laccaria*, *Paxillus* y *Pisolithus*, y tampoco afectó la capacidad de transportar P ni de NH⁴⁺.

Se pueden mantener cepas por largo tiempo en ultracongeleación siguiendo el protocolo “perlita en nitrógeno líquido” sin perder viabilidad (Homolka 2013). La liofilización es otro método de preservación y se propuso desde 1943 para cepas de hongos esporulantes, aunque no tuvo mucho éxito en las cepas de hongos con micelios esteriles (Antheunisse 1973; Hwang *et al.* 1976; Raper y Alexander 1945 en: Homolka 2013). Posteriores modificaciones, entre las cuales la más destacada es incluir crioprotectores como la glicerina, convirtieron a la liofilización en el método más recomendable para preservación de hongos filamentosos, aunque no se aplica de manera generalizada (Homolka 2013).

2.2 Cinética del crecimiento microbiano

Una de las maneras de describir a un hongo en cultivo es trazar su curva de crecimiento o cinética (Doran 1995, Madigan *et al.* 2004). Es importante conocer la cinética de crecimiento de los hongos, pues de este modo, se pueden hacer predicciones sobre el desarrollo de un cultivo, el consumo del sustrato, la producción de biomasa y, si se desea, también sobre la acumulación de productos y la liberación de CO₂.

La cinética de crecimiento varía de un microorganismo a otro. Está sujeta a las condiciones de cultivo y a la composición del medio nutritivo, además de la propia biología del MO en particular (Cossart *et al.* 2004). Es por esto que se hace importante conocer y calcular la cinética para así poder predecir el comportamiento de un cultivo en diferentes condiciones.

Durante un cultivo discontinuo, la biomasa aumenta a lo largo del tiempo. Este aumento en masa se consigue a partir de la oxidación del sustrato. El sustrato es la fuente principal de C, generalmente son azúcares simples, aunque en muchos cultivos se pueden usar fuentes de carbono complejas. La concentración del sustrato decrece de forma proporcional al aumento en biomasa (Doran 1995). El sustrato que se consume no solo se destina a la biomasa, también fracciones importantes se transforman en una gran variedad de productos y en CO₂. Teniendo esto en cuenta, se pueden calcular diferentes índices o coeficientes de productividad, que representan la relación entre el crecimiento o producción, y el consumo de sustrato en condiciones de cultivo particulares.

La productividad celular (q_x) representa el aumento en la biomasa y se expresa en unidades de peso seco en función de volumen y de tiempo.

$$q_x = (X_{t1} - X_{t0}) / (t1 - t0) \quad (1)$$

Donde X son los gramos de biomasa, t_0 y t_1 son los tiempos en comparación.

La tasa específica de consumo se refiere a la velocidad con que el hongo consume el sustrato, y se calcula con la siguiente ecuación:

$$q_s = Y_{x/s} / \mu \quad (2)$$

Donde $Y_{x/s}$ es el rendimiento celular en función del sustrato, y μ es la tasa de crecimiento.

$$Y_{X/S} = (X_{t1} - X_{t0}) / (S_{t0} - S_{t1}) \quad (3)$$

y

$$\mu = \mu_{\max} (S / (K_s + S)) \quad (4)$$

$\mu_{\max}$ es la velocidad máxima de crecimiento que el hongo alcanza en la fase de crecimiento exponencial, S es la concentración del sustrato y K_s es la concentración del sustrato en la que se alcanza una $\mu = \mu_{\max} / 2$ (Doran 1995, Madigan *et al.* 2004).

Para definir μ en la ecuación de Monod (4), es necesario usar la ecuación 5 y 10. La ecuación 5 representa la cinética considerando que; el incremento en el número de células (dN) por el incremento en tiempo (dt) es proporcional al número de células presentes en el cultivo (N) y a μ .

$$dN/dt = \mu N \quad (5)$$

Integrando esta ecuación se tiene:

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (6)$$

Al transformar esta ecuación exponencial (6) a una recta, resulta:

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t \quad (7)$$

Se debe considerar que:

$$N = N_0 2^{t/T} \quad (8)$$

Donde t es el tiempo transcurrido y T es el tiempo generacional.

La ecuación 8 también se transforma a una recta:

$$\ln N = \ln N_0 + t/T \ln 2 \quad (9)$$

Por lo que se concluye que:

$$\mu = \ln 2/T \quad (10)$$

Para poder realizar los cálculos anteriores es necesario conocer la concentración de biomasa y de sustrato en varios tiempos a lo largo del cultivo, y se cumplen sólo si el crecimiento no está condicionado por la concentración del sustrato. También se asume que el sustrato es la única limitante al crecimiento y que los demás nutrientes se encuentran en concentraciones excesivas (Cossart *et al.* 2004, Doran 1995).

2.3 Crecimiento de hongos filamentosos en cultivos sumergidos

El cultivo sumergido (CS) de hongos filamentosos (HF) es un sistema utilizado actualmente de manera extensiva en varios sectores de la industria (Tang *et al.* 2007). Fisiológicamente, una de las características principales de los HF es la capacidad de verter en el medio un gran número de sustancias, como ácidos orgánicos, polisacáridos, enzimas, factores reguladores de desarrollo vegetal, alcaloides, pigmentos, micotoxinas y antibióticos. Géneros como *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Tolypocladium* y *Acremonium*, empleados en la producción de penicilina, cefalosporina o ciclosporina, son ejemplos claros del desarrollo en la producción de metabolitos usando HF en CS (El-Enshasy 2007; Gibbs *et al.* 2000).

No obstante la relevancia del tema, dados los aspectos económicos y de salud humana involucrados, la teoría respecto a la cinética del crecimiento de HF en CS sigue en desarrollo. Más aún, en lo que respecta a HEM, los trabajos dedicados a conocer el modo en que el micelio se comporta en CS son escasos y no se tiene conocimiento de algún trabajo de revisión en donde se condense la información (ej. Kim *et al.* 2010; Kuek 1996; Li *et al.* 2013; Rossi y Oliveira 2011). Por estos motivos, en esta sección, la revisión se fundamenta en conceptos teóricos y estudios de caso realizados en HF saprobios de interés industrial.

2.3.1 Crecimiento hifal

La dinámica celular durante el crecimiento de los HF es responsable de la fisiología y el comportamiento de los CS, tanto del crecimiento como de la producción de sustancias.

Según El-Elshasy (2007), en general, las células fúngicas siguen tres pasos en CS. Comienza por el “crecimiento micromorfológico”, caracterizado por el incremento en la turgencia de las esporas, su posterior germinación, extensión de células hifales y ramificación. A continuación, el “crecimiento macromorfológico”, donde ocurre la formación, ya sea del micelio disperso filamentoso o del *pellet*. Posteriormente viene la “autólisis celular”, donde inicia la senescencia, caracterizada por abundante vacuolación y transporte de citoplasma.

Un parámetro de crecimiento hifal comúnmente usado es G (Caldwell y Trinci 1973), que se define como la longitud total hifal, es decir, la hifa principal más las ramificaciones, dividida entre el número de puntas hifales. Por lo tanto la disminución en la longitud de la hifa o el aumento en la ramificación resultan en una disminución de G . No obstante se ha discutido una mejor definición de G , con los resultados experimentales que muestran, mediante autoradiografía, que no todas las puntas hifales contribuyen de igual modo al crecimiento, ya que algunas no son viables o sencillamente no crecen a la misma tasa (Pitt y Bull 1982). También se debe considerar el diámetro hifal, por lo que han sido reportados valores de G en base a volumen (G_{vol}) (Cox *et al.* 1998). Con argumentos similares se propuso usar el valor G_{mass} , aunque debido a su difícil cálculo se ha usado sólo para modelaciones (Nielsen, *et al.* 1993). También, se ha usado el área proyectada para calcular el crecimiento, la cual es un valor de dos dimensiones calculado por la proyección del *pellet*. La relación entre el perímetro del agregado hifal y el perímetro del núcleo del agregado hifal también se ha considerado. En estos últimos casos se aplica para *pellets* holgados y poco compactos (Gibbs *et al.* 2000). Se han utilizado también, análisis basados en teoría de fractales para calcular el valor D , principalmente para medir el crecimiento de colonias, aunque se discute que este parámetro es método-dependiente y no se propone una metodología estándar (Soddell y Seviour 1994).

Se ha observado, mediante técnicas de inmunocitometría, que en una misma colonia las funciones fisiológicas se encuentran compartamentalizadas, es decir, distintas áreas del micelio se encuentran realizando funciones particulares y expresando juegos genéticos y metabólicos distintos. Las células terminales en las hifas de crecimiento, generalmente carecen de organelos y estructuras membranosas, con la importante excepción de una gran cantidad de vesículas de diferentes tamaños que suelen migrar en dirección a los ápices hifales. Las vesículas están involucradas en el transporte de proteínas que han pasado por un proceso de maduración en organelos de células de otras regiones del micelio y se dirigen

a la membrana plasmática. Además, las propias vesículas aportan membrana plasmática para el crecimiento hifal (El-Enshasy 2007; Peberdy 1994). Por otra parte, enzimas involucradas en procesos degradativos están asociadas a fases celulares de síntesis y no de crecimiento, lo que ha sido observado, por ejemplo, en la secreción de enzimas lignolíticas en las regiones de alta ramificación.

2.3.2 Morfología en cultivo sumergido

Los HF desarrollan morfologías drásticamente distintas a las que presentan bacterias o levaduras, ya que estas últimas se distribuyen de manera homogénea en el caldo. El talo filamentoso tiene implicaciones importantes en la reología del caldo, y esto a su vez puede determinar el crecimiento de los HF, así como la producción y excreción de metabolitos (Charles 1978).

Los HF pueden manifestar, ya sea un crecimiento hifal disperso y continuo en el caldo, o bien la formación de entidades discretas denominadas *pellets*. Esto es resultado directo de la morfología hifal, la cual varía entre la formación de largos filamentos lineales, hasta complejos densamente ramificados e intrincados (Gibbs *et al.* 2000; Paul y Tomas 1998). Así mismo, los *pellets* varían en tamaño, forma y textura. Estas diferencias se manifiestan incluso en la misma cepa y son, en muchos casos, dependientes de las condiciones de cultivo y de los componentes del medio (Gibbs *et al.* 2000) (Figura 1).

Fermentaciones con micelio creciendo de modo disperso tienden a ser muy viscosas y la dinámica del fluido presenta un comportamiento “no Newtoniano”, donde la velocidad de agitación no es equivalente al esfuerzo de agitación. En estos casos el caldo presenta apariencia pseudo-plástica (Braun y Vecht-Lifshitz 1991). En las regiones próximas a las paletas de agitación, a los *baffles* o a las columnas de burbujas, los agregados miceliales formados por la trama de hifas son disociados rápidamente. El comportamiento del fluido en estas zonas es muy distinto al comportamiento del caldo en general, donde la fuerza aplicada por la agitación es menor, presentando zonas fluidas en las inmediaciones de la fuente de agitación, y otras densamente viscosas en las regiones con tasas de agitación baja.

La alta viscosidad y la pseudoplasticidad de la suspensión causa problemas durante el cultivo, ya que disminuye la transferencia de masa y la transferencia de calor. Cuando esto ocurre, sólo algunas partes del caldo presentan las condiciones deseadas. Incrementando la

agitación se consigue aumentar la transferencia de momentum para así homogeneizar la mezcla, aunque esto incrementa el consumo energético. Los daños por estrés mecánico que sufren las células bajo altas tasas de agitación pueden tener repercusiones inesperadas. Estos problemas son particularmente serios en fermentaciones a gran escala (Vardar 1983). En fermentaciones de mezcla heterogénea prevalece la tendencia a formar zonas de “estancamiento” en el caldo. Esto, además de generar gradientes de concentración de nutrientes, propicia condiciones de limitación oxigénica, lo cual es un problema importante a considerar en las fermentaciones aerobias (McNeli *et al.* 1989).

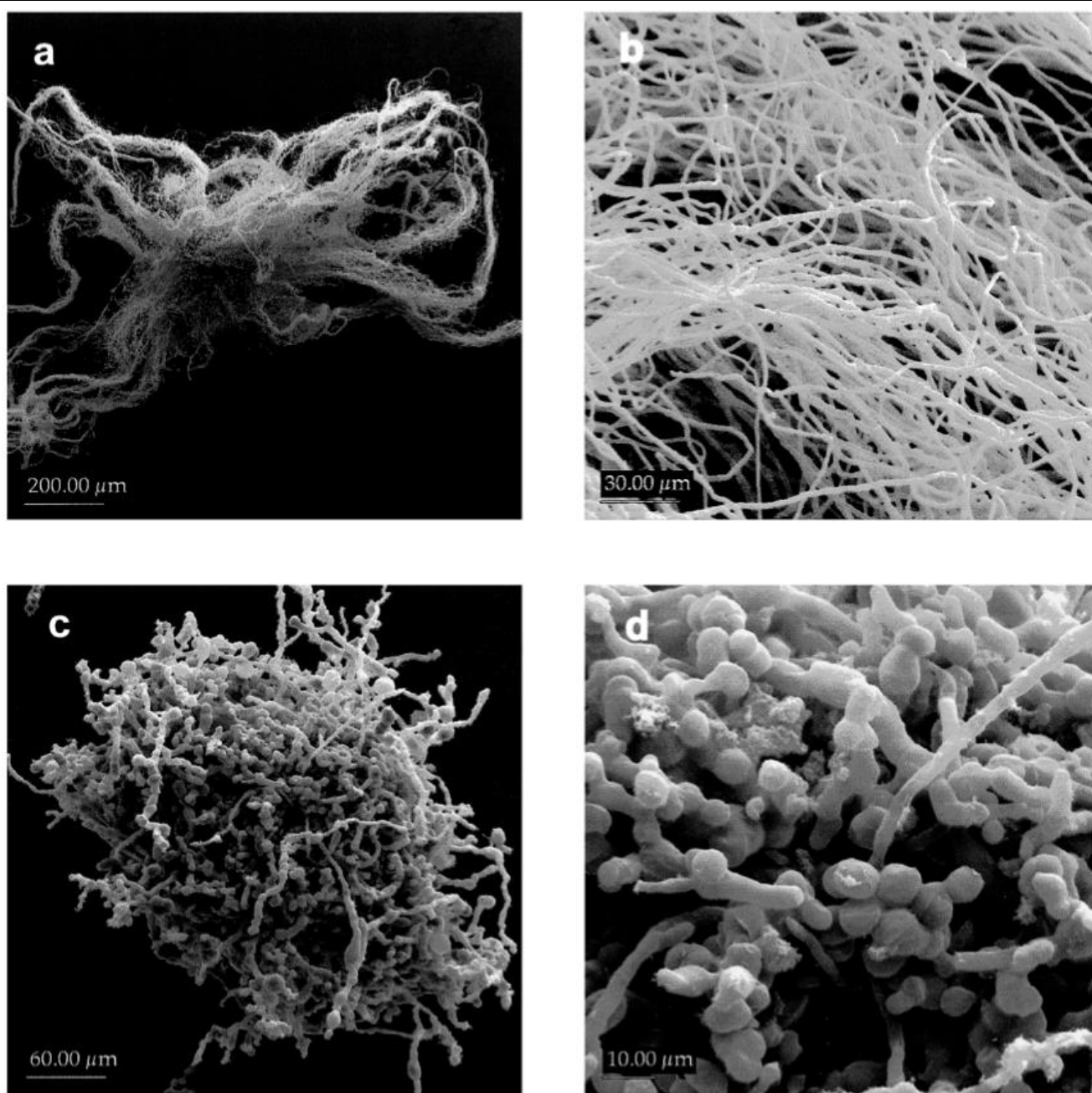


Figura 1. Microfotografía electrónica de barrido de *pellets* de *Epicoccum purpurascens* cultivados con diferentes fuentes de nitrógeno; a y b con NaNO_3 ($0.49 \text{ gl}^{-1} \text{ N}$) muestra *pellets* con bordes filamentosos, que consisten en largas hifas no ramificadas, c y d con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($0.49 \text{ gl}^{-1} \text{ N}$) muestra *pellets* pequeños compactos, con bordes filamentosos e hifas hinchadas desiguales. Tomada de Gibbs *et al.* 2000.

Algunos cultivos presentan una viscosidad dependiente del tiempo, es decir, al estar sometidos a agitación constante la viscosidad disminuye gradualmente. Esto es resultado de la alineación de los filamentos que se genera por las trayectorias periódicas y repetitivas de

las paletas de agitación (Oolman y Blanch 1986). Los CS en los que se forman *pellets* son típicamente mucho menos viscosos, debido a que los *pellets* son entidades discretas y discontinuas las cuales no ejercen influencia en el líquido circundante. Se acepta de manera general que únicamente los polisacáridos generan contribuciones significativas a la reología del caldo (Gibbs *et al.* 2000; El-Eshasy 2007).

Es deseable la formación de *pellets* en un CS, dado que la viscosidad del caldo es mínima, por lo que la transferencia de momentum, masa y calor es mejor. Sin embargo, a escala microscópica, los *pellets* presentan cierto grado de regionalización, lo que a su vez genera heterogeneidad en el acceso a los nutrientes y al O₂. Acorde al tamaño y la compactación de los *pellets*, en su centro, la concentración de O₂ puede llegar a cero, propiciando autólisis celular y limitando el crecimiento y/o producción a las capas periféricas del *pellet* (König y Schügerl 1982). Cuando un *pellet* excede cierto tamaño se asume que el crecimiento está limitado a la periferia, para lo que se ha propuesto que la biomasa producida se puede calcular utilizando la fórmula conocida como la ley de la raíz cúbica (El-Enshansy 2007):

$$M^{1/3} = kt + M_0^{1/3} \quad (11)$$

Donde M_0 es la biomasa inicial y k es una constante de velocidad, asumiendo que un cultivo puede consistir en un número n de *pellets* esféricos conocido, de un radio r y densidad ρ iguales, con una capa de micelio activo de espesor w creciendo a una tasa específica μ , entonces k se calcula usando la siguiente fórmula:

$$k = (4/3 \pi \rho n)^{1/3} \mu w \quad (12)$$

Esto se ha comprobado de manera experimental en repetidas ocasiones (El-Enshansy 2007), pero tiene la limitante de no considerar la transferencia de masa, la oxigenación ni la concentración del sustrato en el crecimiento. Además, cuando la morfología del *pellet* es holgada, abierta y/o felposa, el crecimiento exponencial se puede presentar en todo el micelio. Otra debilidad en el cálculo es que se asume al sistema como homogéneo y estático lo que dista en gran medida de representar un sistema real de CS de HF.

2.3.3 Morfología del *pellet*

Una descripción detallada de la morfología del *pellet* es de interés debido a que se pueden encontrar correlaciones entre la morfología y la productividad, que pueden ser usadas para la optimización de procesos (El-Enshasy 2007). Los tres pasos principales de crecimiento micromorfológico suelen determinar el crecimiento macromorfológico, es decir, si el CS formará *pellets* o será disperso y filamentoso.

Con base en el mecanismo de formación de *pellets* se propuso una clasificación macromorfológica de ellos (Gibbs *et al.* 2000): 1) coagulantes, caracterizados por la aglomeración de esporas, la germinación da lugar a una red de hifas entrelazadas; 2) no coagulantes, donde cada espora genera un *pellet*, el número de *pellets* es igual al número de esporas viables con las que se inoculó el caldo; 3) aglomerativos, donde las hifas al encontrarse en su libre viaje por el caldo, se aglomeran y forman un macizo de hifas que eventualmente se modifica a *pellets*.

Sin embargo, se propuso una nueva clasificación atendiendo a la morfología celular (Jin, *et al.* 1999): 1) micelio disperso con filamentos difusos, 2) micelio plumoso con filamentos difusos, 3) micelio con agregados grandes, *pellets* con núcleos compactos y límites difusos, y, 4) finalmente, *pellets* compactos como esferas con superficies lisas.

Tanto el crecimiento como la morfología de un HF varía atendiendo a múltiples factores; en general, estos factores pueden dividirse en tres categorías principales: factores dependientes de la cepa, dependientes de la composición del medio y factores dependientes de las condiciones de cultivo. Las interacciones entre estos factores deben ser consideradas, por lo tanto, no es fácil (o lógico) determinar o discutir algunos de estos factores por separado. Por ejemplo, tanto el tamaño del inóculo, como la forma del recipiente y la agitación, son factores que inciden en la oxigenación del medio y el oxígeno disponible para los HF.

2.3.4 Factores dependientes de la cepa

Lo primero que tenemos que considerar en este apartado es que entre especies, e incluso entre cepas, se presentan comportamientos específicos, además de que existen especies que simplemente no forman *pellets* (El-Enshasy 2007; Gibbs *et al.* 2000).

Para los casos en que el caldo se inocula con esporas se desea una fase corta de germinación con el fin de disminuir el tiempo de cultivo. La eficiencia de la fermentación

también está condicionada por la sincronización del proceso de germinación y el número de tubos de germinación formados por cada espora (Morozova *et al.* 2001).

El uso de esporas y micelio como inóculo fue comparado, poniendo en evidencia que el tipo de inóculo no genera diferencias significativas en la morfología de los *pellets* (Jin *et al.* 1999). En contraste, también se ha reportado que altas concentraciones de inóculo suelen resultar en un crecimiento micelial disperso. Una relación inversa fue encontrada entre la concentración del inóculo y el tamaño del *pellet* (Metz y Kossen 1977).

Una cepa mutante para los genes *fadA*^{G203R} y *ΔflbA*, involucrados en la ramificación del tubo germinativo, resulta en la formación de tubos más largos y delgados, lo que a su vez da mayor tamaño de *pellet* y micelio disperso (Molnár *et al.* 2004).

Como se puede apreciar en la figura 1, la composición de los medios nutritivos modifica drásticamente la morfología del *pellet*. La concentración de sacarosa en el medio tiene efectos distintos dependiendo del organismo probado en varios trabajos. En algunos casos se observó que el diámetro del *pellet* disminuyó al incrementar la concentración inicial de sacarosa. En otro estudio el tamaño aumentó al incrementar la concentración de 20 g/l a 60 g/l, pero al exceder 80 g/l no se presentó formación de *pellet* y el caldo presentó un crecimiento filamentoso disperso. En otro estudio, se observó que usando sacarosa o xilosa como fuente de carbono se presentó formación de pequeños *pellets* de no más de 400 μm de diámetro, mientras que al utilizar fructosa no se presentó formación de *pellet* (El-Enshansy *et al.* 2001; El-Enshansy, 2007).

2.3.5.1 Fuente de nitrógeno

El tipo y la concentración de N se encuentran entre los factores más importantes que afectan el desempeño de los CS. El decremento en dos órdenes de magnitud en la concentración de NH₄NO₃ modifica la forma de los *pellets* de pequeños y compactos a grandes y difusos. El incremento en la concentración de peptona en el medio coincidió con la formación de *pellets* más pequeños y numerosos (Gibbs *et al.* 2000). También se ha observado que aumentar las concentraciones de amonio en el CS causa que el tamaño de *pellet* aumente pero disminuya en densidad y en número (El-Enshansy 2007).

2.3.5.2 Fuente de fosfato

Con bajas concentraciones de fosfato inicial (0.3 gL^{-1}) se forman bajas cantidades de *pellets* inicialmente, pero rápidamente se convierten en aglomeraciones. A una concentración de fosfato intermedia (1.05 gL^{-1}) se forman *pellets*. En concentraciones altas concentraciones (2.1 gL^{-1}) se forman aglomeraciones nuevamente (Gerlach *et al.* 1998).

El fosfato es componente importante en la pared celular de los HF, por lo que altas concentraciones en el medio pueden propiciar hifas más hidrofóbicas, aunque se discute que la reacción ante la concentración de fosfato es cepa específica (El-Enshansy 2007).

2.3.5.3 Relación C/N

Un aumento gradual en la relación C/N ha demostrado que resulta en el aumento del crecimiento micelial. Por el contrario, el uso de un medio de glucosa y peptona, la formación de *pellets* se dio en alto C/N, mientras que en forma de micelio disperso se presentó a C/N relativamente menores (El-Enshansy, 2007).

2.3.5.4 Partículas insolubles

A menudo, formulaciones de medio para fermentaciones piloto a escala industrial contienen componentes sólidos o semisólidos debido a consideraciones económicas. Estos componentes pueden proporcionar sitios de anclaje para el crecimiento de hongos, lo que propicia la formación de agregados de hifas amorfos en oposición a los *pellets* de forma regular comúnmente vistas en los medios sintéticos (Gibbs *et al.* 2007). En las fermentaciones con soporte las partículas insolubles son de tamaños considerables y con poros. Estas partículas, además de servir de soporte, protegen al micelio del estrés mecánico (Tang *et al.* 2007).

2.3.5.5 Surfactantes

En general, la adición de sustancias de superficie activa afecta el crecimiento de *pellets*. El uso de Tween 80 no tiene el mismo efecto sobre la formación de precipitado en todas las especies. Por ejemplo, en un trabajo se mostró que la agregación se incrementó y se

formaron *pellets* más grandes con una estructura flexible. Sin embargo, también se ha mostrado que el uso de Tween 80 en el medio inhibió la formación de *pellets* (Metz y Kossen 1977).

2.3.5.6 Cationes bivalentes

La extensión de las hifas de los HF es un ejemplo de crecimiento celular polarizado, ya que todo el crecimiento se localiza en una pequeña región en el ápice de las hifas y puede alcanzar velocidades de extensión altas de hasta $100 \mu\text{m min}^{-1}$. Se ha propuesto que en este fenómeno los gradientes iónicos desempeñan un papel importante, por lo que el Ca^{2+} aplicado en el CS puede afectar el crecimiento de los HF. Se ha reportado que en condiciones limitadas de Ca^{2+} la extensión hifal y la síntesis de biomasa son impares y las hifas presentan malformaciones (Robson *et al.* 1996).

2.3.6 Factores dependientes de las condiciones del cultivo

2.3.6.1 Potencial de hidrógeno

Posiblemente el factor más estudiado e influyente en el crecimiento en cultivos líquidos es el pH. Durante el cultivo el pH cambia constantemente; esto se debe a la secreción de enzimas sobre el sustrato, lo que generalmente acidifica el caldo. El incremento de la concentración de peptona en el medio coincide con el incremento numérico de *pellets* y la disminución en su tamaño, pero se argumenta que se debe al cambio en el pH del cultivo. A pH 5.0 se forman *pellets*, mientras que a pH 8.0 el crecimiento es filamentoso disperso (Kobayashi y Suzuki 1972). En otro estudio se reporta el crecimiento miceliar en un pH de 3.0 a 3.5, mientras que de 4.0 a 6.0 se desarrollan *pellets* compactos. Sin embargo, utilizando los mismos valores de pH, una cepa distinta de la misma especie desarrolla *pellets* compactos en pH de 3.4 a 4.5 y micelio disperso en pH 3.0, pero de modo sorprendente una tercer cepa no muestra formación de *pellets* en ningún valor de pH de 3.0 a 6.0 (Jin *et al.* 1999). Otros reportes muestran la formación de *pellets* en valores de pH de 3.0 a 5.0 y micelio disperso en valores mayores a 5.0 (Braun y Vecht-Lifshitz 1991). Estos resultados permiten notar que, como en casi todos los parámetros, el comportamiento es distinto entre las especies usadas, e incluso cada cepa se puede comportar de modo particular individualmente, por lo que la

selección de cepas y el conocimiento de la cinética particular de la cepa seleccionada, así como el desarrollo de experimentos piloto, son pasos esenciales en el diseño de cualquier CS.

2.3.6.2 Temperatura

De manera general, se considera que las temperaturas de crecimiento altas favorecen el desarrollo, la producción de biomasa y la excreción de metabolitos. En cuanto a la morfología, se ha observado que cuando la temperatura de un CS se cambia de 25° a 30° C la morfología hifal pasa de presentar agregados de ramificación corta a agregados de largos filamentos. Un incremento posterior a 35° C propicia la desaparición de los *pellets* y un crecimiento filamentos disperso (Gibbs *et al.* 2007). No obstante, las temperaturas de mejor crecimiento y desarrollo dependen fuertemente de la autoecología de cada especie.

2.3.6.3 Oxidación y estrés oxidativo

La concentración de O₂ disuelto en el caldo se expresa como pO₂. Se ha demostrado que incrementando la tasa de aireación se incrementa la ramificación hifal. También se han observado células altamente vacuoladas en tasas altas de aireación. Típicamente bajo condiciones limitantes de O₂ (0 a 10% pO₂) se presentan hifas largas con ramificaciones distantes. En condiciones enriquecidas de O₂ (30 a 50% pO₂) se presentan elementos hifales de ramificación abundante e hifas cortas. Cuando las condiciones son de saturación, las cuales se dan al inyectar O₂ puro en el cultivo, se presentan *pellets* muy densos y sin hifas filamentosas en el borde ni en el caldo. En casos de pO₂ muy bajo, se presentan *pellets* laxos y poco compactos. Sin embargo, la biomasa por volumen de *pellets* aumenta con la pO₂ y disminuye con el tamaño de los *pellets*. Esto significa que los gránulos más pequeños formados a una pO₂ más alto tenían mayor resistencia intrínseca (Cho *et al.* 2002; El-Enshansy 2007).

En respuesta al estrés oxidativo, se ha detectado que algunos HF excretan H₂O₂, lo que resulta en hifas más cortas que las de los cultivos control y el aumento de la formación de *pellets* grandes. El crecimiento disminuye en cultivos oxidativamente estresados, con los valores más bajos cuando se presenta H₂O₂ (El-Enshansy 2007).

Por otra parte, algunos estudios muestran que aunque el pO_2 no tuvo efectos considerables en la morfología hifal o en la formación del *pellet*, sí influyó fuertemente en la reología del caldo. Esto lo argumentaron diciendo que a pO_2 altos las paredes celulares formadas son delgadas, lo que le da mayor flexibilidad a la hifas y por lo tanto la viscosidad disminuye en CS de crecimiento disperso filamentoso (Gibbs *et al.* 2000).

2.3.6.4 Dióxido de carbono

La producción de CO_2 en grandes cantidades es común en algunas fermentaciones aeróbicas como consecuencia de la respiración celular. La presencia de CO_2 influye en la morfología de varios hongos filamentosos. Con un pH estable a 6.5 y en CS, valores de 3 a 5% de pCO_2 incrementaron la frecuencia de ramificación, pero cuando el pCO_2 se elevó de 15 a 20% (consecuencia natural de las fermentación), la morfología cambió a hifas cortas e hinchadas, altamente ramificadas y tendiente a la formación de *pellets* (Gibbs *et al.* 2007). Se ha argumentado que el CO_2 estimula la síntesis de quitina en las hifas terminales y en la pared celular subapical, lo que está relacionado con el incremento en la ramificación y en la plasticidad de la pared (Edwards y Ho 1988). La formación de células “aberrantes” propiciada por altas pCO_2 resulta en la formación de *pellets* frágiles y tasas elevadas de muerte celular a causa de estrés mecánico.

Es importante considerar que la pCO_2 , y sus manifestaciones en el CS, se encuentran relacionadas estrechamente con otros factores, como la concentración de fuentes de C, el pH y la temperatura. Por ejemplo, en algunos CS altas pCO_2 se relacionan con baja en la viscosidad (debida a los factores celulares antes mencionados), lo que a su vez traduce en una mejor transferencia de O_2 . Así mismo, altas pCO_2 pueden interferir en la optimización de la producción de muchos metabolitos de interés (Gibbs *et al.* 2007).

2.3.6.5 Agitación

Este es uno de los factores con mayor influencia en los CS. Son varias las interacciones entre la agitación y otras variables dependientes de la composición y de la inoculación. La finalidad principal de la agitación es lograr en el caldo una mezcla homogénea, con el fin de permitir una buena transferencia de calor y masa. Una buena mezcla permite eliminar del

caldo los gradientes de concentración de nutrientes. El dinamismo en el caldo también afecta tanto la pO_2 como la pCO_2 .

De manera general, se acepta que incrementando la fuerza de agitación el tamaño de los *pellets* disminuye, lo cual puede ser causado por el desprendimiento de fragmentos de la periferia del mismo. En un trabajo clásico, y muy citado (Dion et al. 1954), analizan el efecto de la agitación en la morfología hifal; usan recipientes en un rango de volumen entre 10 y 10,000 L y concluyen que la longitud hifal disminuye mientras que la ramificación aumenta en una marcada correlación con el incremento en la agitación (Dion et al. 1954).

Alta agitación en las fases iniciales de la fermentación propicia la dispersión de las esporas (cuando el caldo se inocula con estas), lo que a su vez traduce en la imposibilidad de formación de *pellets* del tipo coagulante. También, puede aumentar el grado de ramificación hifal debido al incremento en el pO_2 y los *pellets* formados en estas condiciones son generalmente densos y compactos. En etapas en las que la formación de *pellets* se ha consumado, la agitación promueve tanto el crecimiento hifal como la fragmentación de las mismas, lo que propicia la presencia de hifas libres en el caldo. Se ha reportado la presencia de hifas cortas y anchas en los CS de alta agitación (El-Enshansy 2007; Prosser y Toug 1991). No obstante, hay reportes en los cuales la agitación no parece tener implicaciones significativas en la morfología de algunas especies como *Penicillium chrysogenum* o *P. variable* (Dion et al. 1954; Gibbs, et al. 2000), por lo que se considera que este también es un factor que genera respuestas dependientes de la especie y la cepa.

2.3.6.6 Tipo de biorreactor

Principalmente se han usado 5 tipos de biorreactores para cultivar HF; frascos de agitación, biorreactor de ciclón, biorreactor de cama fluida, biorreactor airlift y biorreactor columna de burbujas.

La mayoría de sistemas de CS agitados mecánicamente están equipados con impulsores Rushton. Sin embargo, varios diseños de impulsores alternativos parecen ser más eficaces en el logro de la mezcla a grandes escalas de CS de HF dada la viscosidad que suelen presentar. Paletas tipo flujo axial, flujo radial “Prochem aerodeslizador” o cinta helicoidal se han utilizado ya que las paletas Rushton generan fuerte estrés mecánico, tanto en HF formadores de *pellet* como filamentos dispersos. A pesar de esto, los impulsores tipo

Rushton siguen siendo los más usados, con la excepción de las fermentaciones destinadas a la producción de polisacáridos. El remplazar las paletas de un reactor ciclón, en algunos casos, ha modificado tanto la morfología como la producción de sustancias por parte de los HF (Gibbs *et al.* 2000).

En una comparación hecha entre el desempeño del caldo en frascos de agitación contra airlift, se observó que la morfología de los HF en el primer caso fue de *pellets* con filamentos difusos, y en el segundo *pellets* compactos de borde liso. La morfología observada en airlift es similar a la producida en frasco de agitación pero de mayor tamaño y menor agregación (Yin *et al.* 1998). En varios estudios, optimizar la frecuencia de pulsación tuvo dos efectos; obtención de *pellets* de tamaño reducido, lo que mejora la calidad del fluido y a su vez propicia el incremento de la producción de metabolitos (El-Enshasy 2007). El uso tanto de biorreactores de cama fluida como airlift o airlift de columna es preferente sobre la agitación por paletas, debido a los efectos que el estrés mecánico tiene en las hifas. Además en los cultivos viscosos, el consumo energético incrementa los costos del proceso. También la forma del recipiente, ya sea a pequeña o gran escala, influye en el crecimiento. La presencia de “baffles o topes o bordes” en las paredes del recipiente previene la formación de *pellets* tipo coagulantes (El-Enshasy 2007; Gibbs *et al.* 2000).

2.4 Escalamiento del cultivo

Para el escalamiento de un proceso productivo se debe también considerar los factores de condición de cultivo, tamaño del proceso y métodos analíticos que permitan la reproductividad de los resultados.

Los cultivos se pueden realizar en tres escalas (Doran 1995).

1.- Escala experimental, donde se manejan volúmenes de cultivo de pocos litros; se adquieren o aíslan las cepas de interés; se compara experimentalmente el desempeño de varias cepas; se estandarizan las técnicas de medición; se explora experimentalmente parámetros de viscosidad, oxigenación, pH y agitación; se mejora la composición de los medios de cultivo; se experimenta sobre la inoculación y los precultivos; y se realizan balances de producción.

2.- Escala piloto, donde se usan volúmenes de 10 a 100 litros; se llevan a cabo y se complementan los resultados experimentales, se explora experimentalmente la purificación y preservación de productos, se comprueba la reproductividad de los procesos, y se diseñan estrategias para el manejo de los residuos.

3.- Escala de producción, donde los volúmenes pueden ser tan grandes como los rendimientos y la infraestructura lo requieran o permitan; se llevan a cabo para complementar los resultados pilotos en la producción.

El escalamiento de los cultivos está muy lejos del simple incremento en los volúmenes trabajados. Parámetros como la agitación la oxigenación, y el mantenimiento de las temperaturas, pueden ser factores cruciales en cuanto a la puesta en marcha de un cultivo a diferentes escalas. La rápida acidificación del medio debida a la actividad fúngica, debe ser prevista y controlada con la adición de compuestos básicos que no interfieran en el crecimiento (Doran 1995). La viscosidad, particularmente propia de algunos hongos filamentosos, hace que el caldo de cultivo pueda ser casi imposible de agitar u homogeneizar. Las temperaturas, dimensiones y consumo energético del motor necesario para agitar grandes volúmenes de caldo viscoso pueden hacer muy complicado o incosteable el escalamiento de algunos cultivos. La transferencia de O_2 en caldos muy viscosos puede dificultar la respiración en sectores de cultivo e inducir la fermentación anaerobia en algunos MOs o la formación de zonas necróticas en otros (Doran 1995).

3 Antecedentes

El cultivo axénico de HEM es una actividad a la cual se le ha prestado atención por distintos motivos. El primero de ellos es la generación de inoculantes ectomicorrízicos miceliares, con la finalidad de estudiar la respuesta de la planta hospedera. En este sentido, se cuenta con abundantes investigaciones en las que se describe la capacidad infectiva de los HEM y las especies que generan mejor respuesta de la planta, aunque poco se describen las condiciones de cultivo del micelio y el desempeño de las cepas (de Oliveira *et al.* 2006; Pera y Parladé 2005; Quoreshi y Timmer 2000). Existen algunas excepciones a esta tendencia, entre las que se destacan por ejemplo el trabajo de Rossi y Oliveira (2011), en el que se detallan los efectos de la composición del medio en el crecimiento de una cepa de *Pisolithus macrocarpus*, y el trabajo de Kuek (1996) para *Laccaria laccata* en medio líquido agitado.

Otro motivo es la propagación de hongos comestibles; en este caso también es necesaria la inoculación de la planta, sin embargo, los trabajos en este respecto suelen abundar en la caracterización cinética de los HEM en cultivo, así como en la descripción de la capacidad saprobia y la asimilación de los sustratos. Es notable que el grueso de los trabajos de este tema provienen de países asiáticos y europeos, en los cuales los hongos silvestres son altamente valorados por sus cualidades culinarias, como lo son algunas especies de *Tricholoma* (ej. Akata *et al.* 2012; Balogh-Brunstad *et al.* 2008; Guerin-Laguette *et al.* 2003; Kawagishi *et al.* 2004; Kawagoe *et al.* 1999; Kim *et al.* 2010; Kusuda *et al.* 2007; Shimomura *et al.* 2012; Vaario *et al.* 2002). También existe una tercer pregunta que ha guiado investigaciones en cuanto al cultivo de HEM, es el hallazgo y la producción de metabolitos de importancia médica o alimentaria (Kim *et al.* 2010; Li *et al.* 2013).

Se conocen algunas características generales de los HEM en cultivo. Morfológicamente se sabe que no presentan esporulación de ningún tipo (Hutchison 1989), también se conoce que su capacidad saprobia es muy variada entre especies, pero de manera general es reducida, por lo que suelen presentar un crecimiento lento y rara vez logran rebasar los 7 cm de diámetro de la colonia en medio sólido (Hutshison 1991).

Varios estudios coinciden en demostrar la plasticidad fenotípica que se presenta entre una cepa y otra de la misma especie (Hung 1983; Matsuda 2006), lo cual se destaca al conocer las tasas de crecimiento a diferentes condiciones de cultivo y la sensibilidad a promotores o

inhibidores del crecimiento (Kawagishi *et al.* 2004; Kusuda *et al.* 2007; Pereira *et al.* 2007; Vaario *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2010).

La expresión genética y enzimática también ha sido investigada (Tarkka *et al.* 2013). Se ha demostrado, que al contrario del supuesto general, de que “los HEM no pueden completar su ciclo de vida en cultivo axénico”, especies como *Boletus* sp. (Ohta y Fujiwara 2003), *Lyophyllum shimeji* (Ohta 1994), *L. tylicolor* (Yamanaka 1994), *Phlebopus portentosus* (Sanmee *et al.* 2010) y *Tylopilus castaneiceps*, (Kikuchi *et al.* 2009) que al ser cultivadas y suplementadas con vitaminas, detergentes y otros promotores de la fructificación, han generado esporomas o primordios *in vitro* en ausencia de un socio vegetal. No obstante, estas especies son consideradas ectomicorrízicas no estrictas, o pertenecen a clados de saprobios facultativos.

En cuanto a las metodologías utilizadas para el cultivo de HEM, se han reportado fermentaciones en medio sólido en caja Petri, fermentaciones líquidas en matraz y en biorreactores de distintos tipos. Los cultivos en placa son sencillos de manipular, presentan menor riesgo de contaminación y permiten la caracterización morfológica de las colonias (Iotti *et al.* 2002; Sánchez *et al.* 2000). Este tipo de cultivos también han sido utilizados para evaluar el desempeño cinético de algunas cepas, para lo cual se ha considerado la medición de parámetros como diámetro de la colonia, área de la colonia y peso seco final (Guerin-Laguet *et al.* 2003; Santiago-Martínez *et al.* 2003; Vázquez-García *et al.* 2002).

Santiago-Martínez *et al.* (2003) describieron las características morfológicas de una cepa de *L. laccata* al ser cultivada en siete medios nutritivos. Encuentran que en los medios ensayados, las colonias coinciden en presentar crecimientos lentos, texturas aterciopeladas y coloraciones blanquecinas-lilas a violetas-grisáceas. En este ese trabajo también llevan a cabo la síntesis *in vitro* de la ectomicorriza con pino. Vázquez-García *et al.* (2002) estudiaron el efecto del pH en el crecimiento de 15 cepas de HEM de diferentes especies, entre las cuales una cepa de *L. laccata*. Ellos identifican que los pH muy ácidos inhibieron su crecimiento, obteniendo los mejores resultados a pH 6 y 7.

Uno de los antecedentes más directos a nuestro trabajo es el de Kuek (1996), quien estudió el desempeño de una cepa de *L. laccata* cultivada en medio líquido con agitación orbital en matraz, y su repuesta de la tasa de crecimiento a la variación en algunos parámetros fisicoquímicos como la agitación, el tamaño del inóculo y la concentración de P y glucosa. Kuek (1996) encontró que el aumento en el tamaño del inóculo reduce la duración del cultivo,

pero también la biomasa final. El mayor crecimiento se presentó a 20° C. Presentó buenos crecimientos tanto a 200 como a 100 rpm de agitación orbital. También encontró mayor crecimiento a 1% ($Y_{X/S}$ 0.74 g_B/g_S) de glucosa que a 2% ($Y_{X/S}$ 0.63 g_B/g_S).

T. matsutake es un hongo con un gran valor comercial, por lo que existe una investigación importante sobre el desempeño en medios líquidos. Entre los HEM cultivados, es representante de un género relativamente cercano, filogenéticamente, al género *Laccaria* (Tricholomataceae dentro del clado V “Tricholomatoide”, e Hydnangiaceae dentro del clado VI “Agaricoide” respectivamente, Matheny *et al.* 2006).

Kawagishi *et al.* (2004) detectaron que la adición de D-isoleucina promueve significativamente el crecimiento y ramificación del micelio de *T. matsutake*, no así con los otros aminoácidos. Kusuda *et al.* (2007) identificaron importantes diferencias en cuanto al consumo de sustrato y crecimiento de cepas de *T. matsutake*, idénticas en el marcador ITS, pero recolectadas unas de bosques de coníferas y otras de latifoliadas. Observaron que un incremento en la concentración de glucosa a 5% inhibe el crecimiento micelial, debido al estrés osmótico. También mostraron que la adición de almidón de papa y de camote incrementa el crecimiento, principalmente en las cepas propias de coníferas, efecto que no se observó con almidón procedente de otras plantas.

Akata *et al.* (2012) investigaron la respuesta de *T. anatolicum* y otros HEM a diferentes fuentes de C. Ellos encuentran que *T. anatolicum* presenta una mayor crecimiento con glucosa, pero también obtienen buenos crecimientos con fructuosa, arabinosa y sacarosa, lo cual difiere de los otros HEM probados, lo que habla de la capacidad saprobia de este género de HEM.

Se ha estudiado la producción a gran escala de micelio de HEM. Kawagoe *et al.* (1999) investigaron el desempeño de *T. matsutake* cultivado en dos tipos de biorreactores, “airlift” y de columna de burbujas. Ellos detectan que la agitación es un factor determinante en la morfología micelial y en el crecimiento; observaron que a mayores agitaciones la “fase lag” es más prolongada. Kim *et al.* (2010) también investigan el efecto de la agitación en el crecimiento de *T. matsutake*, así como la producción de exopolisacáridos. Ellos realizaron sus fermentaciones en un reactor de 5 L agitado por turbina Rushton y encontraron que el pO₂ y la agitación presentan una relación directa sobre el crecimiento y la producción, a mayor pO₂, el cual se obtiene con mayor agitación, se obtiene un menor crecimiento micelial,

pero una mayor producción de exopolisacáridos. Resulta interesante que la concentración de β -glucanos del caldo sea mayor que la del micelio y del esporoma.

De Oliveira *et al.* (2006) estudiaron la viabilidad e infectividad del micelio de *Rhizopogon nigrescens* cultivado en un biorreactor “airlift” e inmovilizado en perlas de alginato. Ellos encuentran que esta técnica de inmovilización otorga un 100% de viabilidad del inóculo a los 18 meses de almacenamiento, además de ofrecer protección al estrés mecánico para el micelio. Sin embargo, en este trabajo no se abunda sobre el desempeño del micelio en cultivo.

4 Justificación

De entre los varios métodos de inoculación de HEM conocidos, la única manera de satisfacer las grandes demandas de la industria forestal es la producción masiva de inóculos vegetativos, es decir, el cultivo de micelio (Repác, 2011). Para 2005 la demanda mundial de madera fue de alrededor de 3 mil millones de m³ (FAO 2006). Rossi *et al.* (2007) calculan, basados en los datos anteriores, que se requiere inocular cerca de 12 mil millones de plantas para recuperar las superficies deforestadas y mantener la producción. Por lo que considerando que se producen alrededor de 14,000 plantas por m³ de sustrato y que a su vez se suele inocular con 5 g de micelio (peso seco) cada m³ de sustrato, se requieren 4.3 toneladas de micelio seco para satisfacer la demanda total mundial.

Experimentalmente, la síntesis de HEM en condiciones controladas es importante para la verificación de la compatibilidad entre hongos y hospederos, para los estudios morfoanatómicos, fisiológicos, bioquímicos y de regulación genética de la simbiosis (Agerer 1987-2008; Leake *et al.* 2001; Peterson *et al.* 2004; Tarkka *et al.* 2013). Debido a todo lo anterior, es necesario generar inóculo específico para las plantas y las condiciones edáficas a tratar, eficiente en cuanto a su capacidad infectiva y su efecto benéfico para las plantas, y en cantidad suficiente que permita solventar las necesidades de los viveros de producción a gran escala.

5 Objetivos

5.1 General

Desarrollar una técnica de aislamiento, mantenimiento y propagación de micelio del HEM *Laccaria trichodermophora* en biorreactor de agitación mecánica.

5.2 Particulares

1.- Aislar cepas de hongos ectomicorrízicos, y seleccionar la mejor en cuanto a su ecología y su crecimiento en medio puro.

2.- Determinar las mejores condiciones de crecimiento, en cuanto a pH medio nutritivo, temperatura, agitación y porcentaje de inóculo iniciador del cultivo, que generan alta producción de biomasa de la cepa EF32 de *L. trichodermophora*.

3.- Evaluar el crecimiento de la cepa EF32 de *L. trichodermophora* en un biorreactor agitado mecánicamente.

6 Método

De manera general, el proyecto comenzó con el aislamiento de cepas a partir de material biológico obtenido tanto de campo (esporomas) como de bioensayos de invernadero (ectomicorrizas). Las cepas fueron identificadas a nivel de especie con el uso de criterios taxonómicos y moleculares. A partir de las cepas aisladas se efectuó una selección de acuerdo con criterios ecológicos y técnicos. La cepa seleccionada fue la EF36, identificada como *Laccaria trichodermophora* Muell. Se realizaron 4 experimentos que permitieron conocer la respuesta de la cepa EF36 a tres medios nutritivos, pH, temperatura, agitación y el porcentaje de inoculación, así como plantear hipótesis para su posterior optimización y escalamiento.

6.1 Obtención de material biológico

Se efectuaron recolectas de esporomas de Ascomycota y Basidiomycota en varios volcanes del Eje Neovolcánico Transversal Mexicano (ENTM) durante las temporadas lluviosas de 2013 y 2014, también se aprovecharon algunos ejemplares de la XV Exposición Nacional de Hongos en el Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México, en 2013 (XVENH). Además, se disectaron ectomicorrizas de microcosmos que contenían *Pinus montezumae* creciendo en suelo del corredor biológico Sierra del Chichinautzin en los límites del estado de Morelos y el Distrito Federal, montado y mantenido por el laboratorio Microcosmos Bioedáfico del Instituto de Geología de la UNAM, así como de un bioensayo con pinos de la misma especie, inoculados con *L. trichodermophora*, *L. laccata* y *L. bicolor* montado por nuestro grupo de investigación.

6.2 Aislamiento de cepas

Para cumplir con el objetivo 1 (aislar cepas de hongos ectomicorrízicos, y seleccionar la mejor en cuanto a su ecología y su crecimiento en medio puro) se efectuaron aislamientos de cepas de HEM partiendo de distintas fuentes biológicas.

a) A partir de esporomas. En la campana de flujo laminar y en condiciones de asepsia, se tomó un fragmento de aproximadamente 3 mm del contexto de los esporomas utilizando un bisturí y unas pinzas de disección las cuales fueron flameadas previamente. Se procuró

tomar el contexto del píleo que se encontró en la inmediación al himenio, pero en los casos en los que el píleo fue muy delgado, como en las especies de *Laccaria*, también se tomó tejido del estípite.

b) A partir de ectomicorrizas de microcosmos y bioensayos. Los microcosmos fueron placas acrílicas de 40 X 40 cm de alto y ancho, y 1 cm de profundidad, los cuales se abrieron en una de sus caras. Usando unas pinzas de relojero, se tomaron muestras de ectomicorrizas directamente de la rizósfera y sin afectar la integridad de los sistemas del microcosmo. Adicionalmente, se tomaron muestras de esclerocios de los mismos sistemas radicales. Los bioensayos fueron tubetes de 35 cm³, a los cuales se les extrajo el cepellón. Las raíces micorrizadas, tanto de microcosmos como de bioensayos, se colocaron en tubos Ependorff rotulados y llenos de agua destilada, y estos se transportaron en una hielera con hielo para realizar las siembras alrededor de dos horas después de ser recolectadas.

Para efectuar los aislamientos, se usaron cajas Petri de 10 cm de diámetro que contenían 25 ml de medios PDA, MMN, BRBC o MMN-RB sólido (Cuadro 1); y en algunos casos adicionados con cloranfenicol a una concentración de 0.1 g/l para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes. Se colocaron de 4 a 6 fragmentos de contexto en cada placa, con 4 a 6 repeticiones por hongo. Se realizaron 78 aislamientos de 17 géneros de hongos ectomicorrízicos distintos. Los aislamientos se incubaron a 25° C en la obscuridad.

Las colonias que crecieron a partir de los fragmentos de contexto se sembraron en placas nuevas para así lograr aislamientos puros (AP). Se dio preferencia a las colonias que presentaran macromorfología similar a la que se ha reportado para HEM, es decir crecimiento lento (diámetro < 4 cm a 20 días de la siembra) y ausencia de estructuras reproductoras (Hutchison 1989).

Cuadro 1. Composición de los medios de cultivo utilizados.

Reactivo	MMN	BAF	DRBC	PDA
Dextrosa	10 g	30 g	10 g	20 g
Peptona	ni	2 g	5 g	ni
Extracto de malta	3 g	ni	ni	ni
Extracto de levadura	ni	0.2 g	ni	ni
Infusión de papa	ni	ni	ni	*
CaCl ₂	0.05 g	100 mg	ni	ni
NaCl	0.025 g	ni	ni	ni
KH ₂ PO ₄	0.05 g	0.5 g	1 g	ni
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.025 g	ni	ni	ni
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.15 g	0.5 g	ni	ni
FeCl ₃ (1%)	0.012 mg	10 mg	ni	ni
ZnSO ₄	ni	1 mg	ni	ni
MnSO ₄	ni	5 mg	ni	ni
Tiamina HCL	100 µg	100 µg	ni	ni
Biotina	ni	1 µg	ni	ni
Ác. fólico	ni	100 µg	ni	ni
Inocitol	ni	50 µg	ni	ni
Rosa de Bengala	ni	ni	25 mg	ni
Dicloran	ni	ni	2 mg	ni
Cloranfenicol	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g
Bacto Agar	15 g	15 g	15 g	15 g
Agua	1000 ml	1000 ml	1000 ml	1000 ml

MMN = Melin Norkrans Modificado (Marx 1969), BAF = Biotina ácido fólico (www.dsmz.de), DRBC = Dicloran, rosa de bengala, cloranfenicol (www.dsmz.de), PDA = Papa, dextrosa, agar, ni = no incluido, * Se usa ron 200 g/l de papa y del líquido obtenido se aforó a 1 L.

6.3 Determinación de los esporomas utilizados

A partir de los esporomas recolectados se realizaron descripciones macromorfológicas del esporoma (Delgado-Fuentes *et al.* 2005) y micromorfológicas del himenio. Se usaron las claves para la determinación atendiendo al grupo taxonómico (Bessette *et al.* 2000; Trappe *et al.* 2007; Tylutki 1993).

Las descripciones de las cepas, tanto macro- como micromorfológicas, se efectuaron siguiendo los criterios y con la terminología propuesta por Hutchinson (1991).

6.4 Métodos moleculares

La secuenciación del DNA de los materiales se realizó tanto para las cepas como para los esporomas a partir de los cuales se obtuvieron dichas cepas. Esto con el fin de identificar las especies aisladas y para corroborar la identidad del material usado en los experimentos de crecimiento.

6.4.1 Extracción de DNA

Este paso se realizó a partir de todas las colonias aisladas. En los casos que crecieron varias colonias diferentes a partir de un mismo esporoma, estas se aislaron y se secuenciaron de manera independiente. También se extrajo el DNA de los voucher a partir de los que se obtuvieron cepas. La extracción del DNA total se realizó utilizando el kit X-N-Amp (Sigma-Aldrich®), que consta de 2 pasos. Primero, se colocan 10 µl de la solución de extracción con una muestra del tejido de un tamaño aproximado de 1 mm³, seguido de una incubación a 65° C por 10 mins y 95° C por 10 mins; posteriormente se añadieron 30 µl de la solución de dilución y se incubó 30 mins a temperatura ambiente antes de ser almacenado a 4° C.

6.4.2 PCR

Los iniciadores usados fueron ITS1-F con ITS4 o ITS4-B (Gardes y Bruns 1993) y LR0R con LR5-F (Amend *et al.* 2010). El primer ITS1-F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) es un oligonucleótido “forward” o izquierdo, específico para hongos, que se alinea a la región del SSU 18s del rDNA nuclear. El primer ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) es un “reverse” o derecho, generalista para eucariontes que se sitúa al inicio de la región LSU 28s del rDNA

nuclear. El primer ITS4-B (CAGGAGACTTGTACACGGTCC) es un reverso específico para basidiomicetes que se alinea a la derecha del primer ITS4. Estas combinaciones permiten amplificar una pequeña sección del SSU, ITS1, 5.8 e ITS2 completos, y una sección pequeña del LSU de un total aproximado de 740 pb (Gardes y Bruns 1993). El primer LR0R-F (CCGCTGAACTTAAGCATATCAATA) es “forward” específico para hongos, se aparea al inicio de la región LSU del nrDNA, y el LR5-F (CGATCGATTTGCACGGA) es “reverse” específico de hongos que se sitúa entre la región D3 y D4 del LSU, por lo que en combinación amplifican regiones de alrededor de 900 pb (Amend *et al.* 2010).

La PCR se realizó utilizando el kit Ruby Taq PCR Master Mix (Affymetrix, Inc.); la mezcla consta de DNA polimerasa Taq, dNTPs, buffer y 2 colorantes inertes. Los ciclos de la PCR fueron 1 min inicial de desnaturalización a 94° C, seguido de 34 ciclos que constaron de 1 min a 94° C de desnaturalización, 1 min de alineamiento de iniciadores a 51° C para ITS y 54° C para LSU y 1 min de extensión a 72° C, seguido de una extensión final de 8 min a 72° C para ser almacenado a 4° C, en reacciones de 20 µl. Estos parámetros atienden a la temperatura de desnaturalización del DNA, a la temperatura de polimerización de la polimerasa Taq y a las temperaturas de alineamiento de los iniciadores, que para el caso del ITS1-F es de 57° C mientras que para el ITS4 es de 53° C (Gardes y Bruns 1993). Para LR0R-F la temperatura de alineamiento es de 53° C y la de LR5-F es de 52° C, es decir, las temperaturas usadas son ideales para los iniciadores específicos para hongos, aunque no es la mejor para el primer generalista, esto es bueno porque así se disminuye la probabilidad de amplificar DNA contaminante.

6.4.3 Electroforesis

Se comprobó la intensidad de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los colorantes incluidos en el “master mix” de la Ruby Taq permiten apreciar a simple vista el producto de PCR en el gel de agarosa y precipitarlo al fondo del pozo sin la necesidad de agregar azul de bromofenol (Agrawal 2008). También, se realizaron electroforesis de algunas extracciones de muestras problemáticas, para comprobar la presencia de DNA genómico, en estos casos fue indispensable el uso del azul de carga.

6.4.4 Limpieza de los productos de PCR

Para eliminar los oligonucleótidos remanentes, previo a la reacción de secuenciación, se utilizó el kit ExoSAP-IT (GE-USB). Este kit consta de dos enzimas, la exonucleasa I degrada todo el DNA monocatenario, es decir los iniciadores y otros amplicones “extraños” producidos por la PCR, mientras que la fosfatasa alcalina hidroliza los dNTPs residuales. Se utilizó el ExoSAP en una dilución de 0.5 de lo recomendado por el fabricante. Se añadió 2µl de ExoSAP diluido a 3.5µl de producto de PCR, se incubó por 45 mins a 37° C para la actividad enzimática (el triple del tiempo de lo recomendado por el fabricante para compensar la dilución) y posteriormente 15 mins a 80° C para inactivar las enzimas.

6.4.5 Secuenciación

Los productos de PCR limpios fueron entregados al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud (LSGBS), perteneciente al Instituto de Biología de la UNAM, donde las muestras fueron secuenciadas en ambas direcciones mediante dideoxinucleótidos terminales y electroforesis capilar, en un secuenciador 3130 (Applied Biosystems).

6.4.6 Edición de secuencias y BLAST

El resultado final de los protocolos de biología molecular fueron electroferogramas, mismos que fueron editados manualmente usando el programa Geneious 4.8.4. Las secuencias editadas, en algunos casos, secuencias consenso, se alinearon en la base de datos GenBank del National Center of Biotechnology Information (NCBI), usando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), para así conocer otras secuencias publicadas con un porcentaje de identidad mayor a 97%.

6.5 Cinéticas

Se evaluaron 4 cinéticas de crecimiento, todas usando la cepa EF-36 de *L. trichodermophora*.

6.5.1 Experimento 1: Cinética multifactorial en medio sólido

Para cumplir con el objetivo 2 (determinar las mejores condiciones de crecimiento, en cuanto a pH medio nutritivo, temperatura, agitación y porcentaje de inóculo iniciador del cultivo, que generan alta producción de biomasa de la cepa EF32 de *L. trichodermophora*), se diseñó un experimento prospectivo, longitudinal y multifactorial. El sujeto experimental fue la cepa EF-36 de *L. trichodermophora*. La identidad de la cepa usada como inóculo se comprobó a través de la secuenciación de la región de los ITS.

El experimento presentó como factores causales el medio nutritivo (PDA, MMN y BAF, Cuadro 1), la temperatura de incubación (23°, 25° y 28° C), y el pH (4.5, 5.5, 6.5). Cada tratamiento estuvo compuesto por cinco repeticiones. Cada unidad experimental fue una caja de Petri de 10 cm con 25 ml de medio sólido. El experimento tuvo una duración de 48 días. Fue inoculado con fragmentos de alrededor de 50 mm² de colonias de 20 días.

Se hicieron mediciones a dos variables de respuesta que dan información sobre el crecimiento y acumulación de biomasa: el área proyectada de la colonia y el peso seco final. Para el área proyectada se fotografió la caja de Petri por su cara inferior cada tercer día. El área se calculó con el uso del software ImageJ (1.47v). Para medir el peso seco, al finalizar el experimento, se tomó la totalidad del medio de cultivo de cada caja, con la colonia creciendo en él, y se calentó en un vaso de precipitados sobre una parrilla de calentamiento. Una vez que el agar se licuó, se siguió el método descrito en el apartado 6.6. El análisis estadístico de los datos se hizo en el software STATISTICA por medio de ANOVA mutivariada, y correlación múltiple no paramétrica (Zar 2010).

6.5.2 Experimento 2: Cinética en medio líquido en matraz

Para cumplir con el objetivo 2 (determinar las mejores condiciones de crecimiento, en cuanto a pH medio nutritivo, temperatura, agitación y porcentaje de inóculo iniciador del cultivo, que generan alta producción de biomasa de la cepa EF32 de *L. trichodermophora*) se realizó una cinética en medio líquido. Se usaron las condiciones en las cuales se alcanzó un mayor crecimiento en el experimento 1 (Cinética multifactorial en medio sólido); medio de cultivo BAF (Cuadro 1), pH 5.5 y 25° C de incubación, además se usaron 100 rpm de agitación orbital (Kuek 1996).

Este experimento tuvo como finalidad identificar la viabilidad y velocidad de reactivación de la cepa posterior a ser almacenada en tres condiciones distintas; con glicerol estéril 10% a 4° C y a -70° C, y resiembras seriales en PDB a 25° C. El micelio “semilla” fue crecido en tubos falcon de 50 ml con 20 ml de medio BAF durante 4 semanas, posteriormente se agregó glicerol 10% estéril en un volumen equivalente al del caldo. Los tubos con glicerol fueron almacenados a 4° C y a -70° C y permanecieron en esas condiciones durante 2 semanas antes de ser utilizados. Los tratamientos experimentales estuvieron constituidos por tres matraces con *baffles* de 500 ml con 300 ml de medio y fueron inoculados con un volumen del 6.7%. La cinética tuvo una duración de 5 semanas.

Las variables de respuesta que se midieron fueron el consumo de sustrato y la biomasa acumulada. Para esto, se tomó una muestra de 10 ml de caldo tres veces por semana, a partir de la cual se ensayó por triplicado la prueba DNS (Gusakov *et al.* 2011). También se tomó el dato de peso seco constante para conocer la biomasa final. Para trazar la curva de consumo de sustrato se calcularon los promedios móviles de los datos.

6.5.3 Experimento 3: Cinética en medio líquido en tubos falcon

Esta cinética también estuvo vinculada con el objetivo 2 (determinar las mejores condiciones de crecimiento, en cuanto a pH medio nutritivo, temperatura, agitación y porcentaje de inóculo iniciador del cultivo, que generan alta producción de biomasa de la cepa EF32 de *L. trichodermophora*), en particular fue diseñado para conocer la influencia de la concentración del inóculo iniciador en la curva de crecimiento de la cepa y la acumulación de biomasa final. El experimento tuvo como variable independiente el volumen de inóculo iniciador, y como variables dependientes el peso seco de la biomasa y el consumo de sustrato. Utilizando las mismas condiciones de crecimiento y composición del medio, se ensayó una cinética en tubos falcon de 50 ml, cada uno con 20 ml de caldo inoculado. Se tuvieron dos tratamientos, uno con 2% y el otro con 20% de inóculo, lo que corresponde a 0.4 y 4 ml, respectivamente. Estos valores de porcentaje de inoculación se encuentran en los mismos ordenes de magnitud que los reportados por Kuek (1996). Se inocularon un total de 30 tubos por tratamiento.

Los muestreos de esta cinética fueron destructivos, es decir se tomó la totalidad del contenido de tres tubos por tratamiento en cada muestreo. Los datos tomados fueron

biomasa y consumo de sustrato utilizando los mismos protocolos que los experimentos anteriores.

6.5.4 Experimento 4: Cinética en biorreactor

Esta cinética se realizó para cumplir con los objetivos 2 y 3 (determinar las mejores condiciones de crecimiento, en cuanto a pH medio nutritivo, temperatura, agitación y porcentaje de inóculo iniciador del cultivo, que generan alta producción de biomasa de la cepa EF32 de *L. trichodermophora*, y evaluar el crecimiento de la cepa EF32 en un biorreactor agitado mecánicamente). El inóculo fue crecido en matraces en agitación, en el mismo medio nutritivo, temperatura y pH inicial que los usados en el reactor. Se usó un biorreactor (Eppendorf BioFlo/CelliGen 115) de 4 L con 1.2 L de medio BAF líquido. Se inoculó con 300 ml de cultivo líquido de micelio de la cepa EF-36 de *L. trichodermophora*. De este modo, el volumen final del caldo fue de 1.5 L. Se agregó cloranfenicol a una concentración del 1% durante la inoculación para eliminar el riesgo de contaminación que este paso conlleva. La temperatura se mantuvo constante a 25° C durante todo el proceso, el pH inicial se ajustó a 5.5 y se mantuvo constante mediante la adición automática de HCl y NaOH. Para la inyección de aire se utilizó aire filtrado a través de un filtro absoluto sin enriquecimiento de O₂. Finalmente, se tomaron los datos de peso seco y consumo de sustrato.

6.6 Peso seco

Para conocer el peso seco de la biomasa, esta fue filtrada a través de un papel filtro grado 1, 1:11 µm (Wathman) con el uso de un matraz kitazato, un embudo y una bomba de vacío. Los papeles filtro que se usaron fueron previamente numerados, secados a peso constante a +/- 60° C, y su peso individual capturado en una base de datos. El dato de biomasa fue el peso seco del micelio y se calculó restando el peso del papel filtro al peso del mismo una vez filtrada la muestra del caldo. Para pesar se usó una balanza analítica (Uni Block ATX 124).

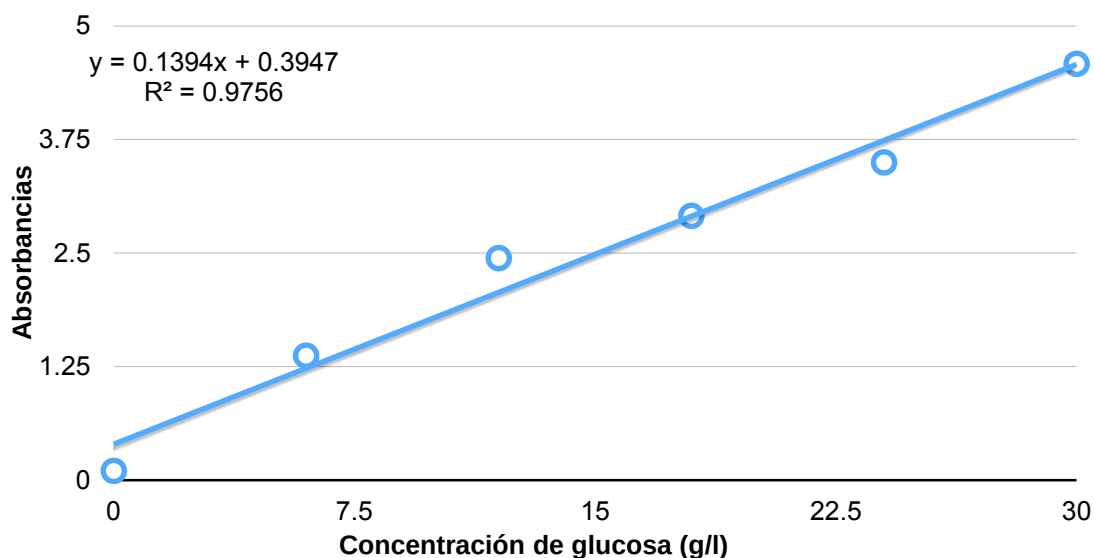
6.7 Prueba del ácido dinitrosalicílico para cuantificación de azúcares

Para el consumo de sustrato se utilizó la fracción del caldo que pasó a través del papel filtro. Posteriormente, se usó la prueba para cuantificación de azúcares reductores (en este caso glucosa) por ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Gusakov *et al.* 2011).

Las muestras libres de células fueron diluidas con agua destilada, de tal forma que la concentración final fuera de máximo 1mg/mL. Dada la concentración inicial de glucosa en el cultivo (3%) se realizó una dilución serial 1:10 seguida de 1:3. A continuación se colocó en una gradilla por triplicado, el número de tubos de ensayo correspondiente al número de muestra a procesar. Se rotularon apropiadamente los tubos de ensayo. Se adicionó a cada tubo 1.0 mL de la muestra diluida previamente, se agregó 2 mL del reactivo de DNS y mezcló con ayuda de un vórtex. Posteriormente, se colocaron los tubos en baño maría con agua en ebullición durante 5 minutos, para después colocarlos en un recipiente con agua fría, lo que detiene la reacción. Se adicionaron 5 mL de agua destilada a los tubos fríos y se homogeneizó en vórtex. Finalmente, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Jenway), a 550 nm, con dH₂O como referencia.

Para trazar la curva del reactivo se utilizó una muestra con concentraciones de glucosa conocidas y se siguió el mismo protocolo. Finalmente, se calculó el valor promedio de cada muestra, después se calculó la diferencia de absorbancia entre el valor promedio de las muestras y el blanco. Se calculó la concentración de la muestra con ayuda de la ecuación de la recta, misma que se obtuvo de la curva tipo de glucosa (Figura 2). Se multiplicó el valor obtenido por el factor de dilución y se reportó el resultado en g/L (Gusakov *et al.* 2011).

Figura 2. Curva tipo de glucosa para DNS.



7 Resultados

7.1 Material biológico

Durante las dos temporadas de recolecta (lluvias de 2013 y 2014) se recolectaron 64 y 24 esporomas de HEM respectivamente. A partir de estos se aislaron un total de 15 cepas de los géneros *Amanita*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Morchella*, *Tylopilus* y *Suillus* (Cuadro 2). En contraste, las cepas obtenidas a partir de ectomicorrizas no fueron especies de HEM (Cuadro 3).

Cuadro 2. Cepas de hongos ectomicorrízicos obtenidas a partir de esporomas.

Cepa	Taxon	MEXU	Secuencias	Localidad
EF31	<i>Amanita multisquamosa</i>	27573	*	El Pelado, Morelos-D.F.
EF98	<i>Laccaria amethystina</i>	27574		La Malinche, Tlaxcala-Puebla
EF36	<i>Laccaria trichodermophora</i>	27575	*	Chichinautzin, Morelos-D.F.
EF69	<i>Laccaria trichodermophora</i>	27576		La Malinche, Tlaxcala-Puebla
EF74	<i>Laccaria trichodermophora</i>	27577		La Malinche, Tlaxcala-Puebla
EF76	<i>Laccaria trichodermophora</i>	27578		La Malinche, Tlaxcala-Puebla
EF97a	<i>Laccaria trichodermophora</i>	27579		La Malinche, Tlaxcala-Puebla
EF97b	<i>Laccaria trichodermophora</i>	27580		La Malinche, Tlaxcala-Puebla
EF100	<i>Laccaria trichodermophora</i>	27581		La Malinche, Tlaxcala-Puebla
EF101	<i>Laccaria trichodermophora</i>	27582		La Malinche, Tlaxcala-Puebla
EF45	<i>Lactarius subindigo</i>	27583	*	XVENH
EF65	<i>Morchella frustata</i>	27584	*	Ajusco, D.F.
EF66	<i>Morchella frustata</i>	27585	*	Ajusco, D.F.
EF50b	<i>Suillus luteus</i>	27586	*	XVENH

Cuadro 2. Cepas de hongos ectomicorrízicos obtenidas a partir de esporomas.

Cepa	Taxon	MEXU	Secuencias	Localidad
EF53	<i>Tylopilus</i> sp.	27587	*	La Malinche, Tlaxcala-Puebla

MEXU = número de registro del voucher en el Herbario Nacional UNAM, XVENH = XV Exposición Nacional de Hongos. * Se obtuvo la secuencia del ITS.

Cuadro 3. Cepas de hongos no ectomicorrízicos obtenidas a partir de esporomas y ectomicorrizas.

Cepa	Taxon	MEXU	Secuencias ITS	Localidad
C-67b	<i>Allanothopomopsis lycopodina</i>	27588	*	Ajusco, D.F.
C-32c	Ascomycota	2757	*	El Pelado, Morelos-D.F.
C-60a	<i>Calcarisporium arbuscula</i>	27589	*	Ajusco, D.F.
C-60b	<i>Calcrisporium</i> sp.	27589	*	Ajusco, D.F.
C-38	<i>Candida</i> sp.	27590	*	El Pelado, Morelos-D.F.
C-68c	<i>Ceuthospora</i> sp.	27591	*	Ajusco, D.F.
P10-17a	<i>Chaetomium elatum</i>	-	*	Microcosmos P10
C-68b	<i>Diaporthe longicola</i>	27591	*	Ajusco, D.F.
C-70c	<i>Epiccocum nigrans</i>	27592	*	Ajusco, D.F.
P10-18a	Eurotiales	-	*	Microcosmos P10
C-70b	<i>Hypocrea pullulifera</i>	27592	*	Ajusco, D.F.
C-50a	Hypocreales	27586	*	XVENH
P10-15a	Hypocreales	-	*	Microcosmos P10
C1-1ab	<i>Mortierella alpina</i>	-	*	Microcosmos C1
C1-2	<i>Mortierella alpina</i>	-	*	Microcosmos C1
C-73a	<i>Mortierella elongata</i>	27593	*	Ajusco, D.F.
P8-8	<i>Nectria</i> sp.	-	*	Microcosmos P8
P10-17b	<i>Nectria ipomoeae</i>	-	*	Microcosmos P10
C-35a	<i>Neonectria veuillotiana</i>	27594	*	El Pelado, Morelos-D.F.

Cuadro 3. Cepas de hongos no ectomicorrízicos obtenidas a partir de esporomas y ectomicorizas.

Cepa	Taxon	MEXU	Secuencias ITS	Localidad
C-67a	<i>Nigrospora</i> sp.	27588	*	Ajusco, D.F.
P10-15b	<i>Penicillium</i> sp.	-	*	Microcosmos P10
P10-16c	<i>Penicillium</i> sp.	-	*	Microcosmos P10
P10-18b	<i>Penicillium</i> sp.	-	*	Microcosmos P10
C-40	<i>Penicillium angulare</i>	27595	*	El Pelado, Morelos-D.F.
C-49	<i>Penicillium camemberti</i>	27596	*	XVENH
C-73c	<i>Penicillium canecens</i>	27593	*	Ajusco, D.F.
C-73d	<i>Penicillium melinii</i>	27556	*	Ajusco, D.F.
C1-1aa	<i>Pestalotopsis clavispora</i>	-	*	Microcosmos C1
P8-7	<i>Pestalotopsis clavispora</i>	-	*	Microcosmos P8
C-71	<i>Phoma</i> sp.	27595	*	Ajusco, D.F.
C-68d	<i>Phoma herbarum</i>	27591	*	Ajusco, D.F.
C-33	Sordariomycota	27597	*	El Pelado, Morelos-D.F.
C-70a	<i>Trichoderma</i> sp.	27592	*	Ajusco, D.F.
C-73b	<i>Trichoderma atroviride</i>	27593	*	Ajusco, D.F.
P10-14	<i>Umbelopsis vinacea</i>	-	*	Microcosmos P10
C-44	<i>Volutella</i> sp.	27598	*	REPSA, D.F.

MEXU = número de registro del voucher en el Herbario Nacional UNAM, XVENH = XV Exposición Nacional de Hongos, REPSA = Reserva Ecológica del Pedregal San Angel. * Se obtuvo la secuencia del ITS

7.2 Cinéticas

Se seleccionó a *Laccaria trichodermophora* Muell. cepa EF36 para realizar los ensayos sobre desempeño en cultivo puro. Esto debido primeramente a que dicha cepa creció bien y sobrevivió a las resiembras. Se ha comprobado el buen desempeño del género *Laccaria* en cultivo líquido (Kuek 1996). Se han utilizado especies de *Laccaria* en numerosos trabajos sobre micorrización (Parladé *et al.* 1999; Pera y Parladé 2005; Pera *et al.* 1999). Además, en este género se encuentra la cepa modelo S238N de *L. bicolor*, sobre la cual se han realizado

numerosos estudios fisiológicos (Kemppanien *et al.* 2010; Mansouri-Bauly *et al.* 2006), de micorrización (Di Battista *et al.* 1996) y cuyo genoma completo fue el primero secuenciado para HEM (Martin *et al.* 2008).

7.2.1 Experimento 1: cinética multifactorial en medio sólido

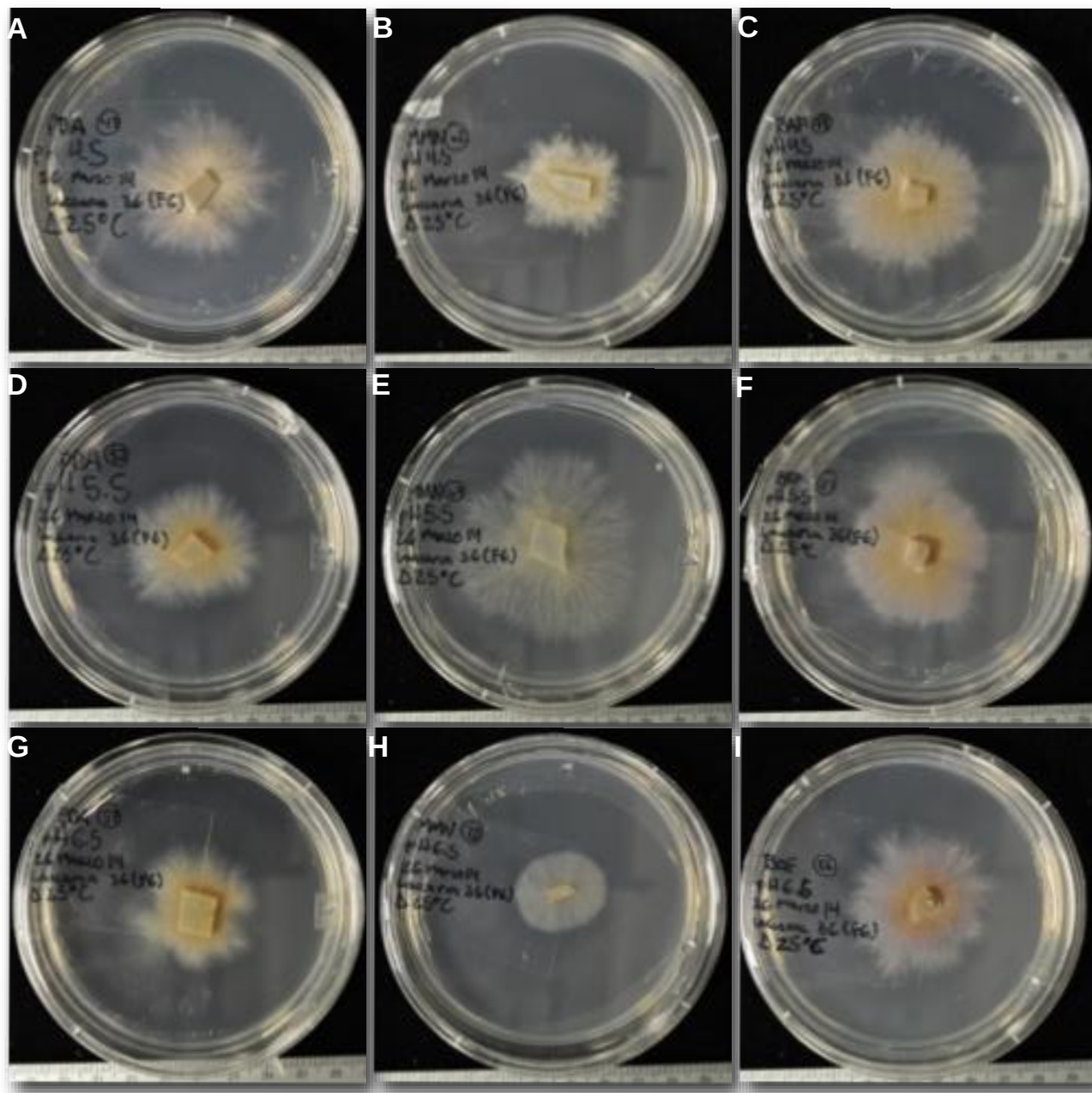
La cepa mostró siete morfologías distintas, las cuales se podrían clasificar en cuatro grupos principales (Figura 3):

- 1.- Colonias densas, irregulares, de márgenes definidos (Figura 3 F, G) .
- 2.- Colonias densas, irregulares, de márgenes difusos con micelio exploratorio agregado (Figura 3 B, C, D, I).
- 3.- Colonias laxas, de márgenes definidos (Figura 3 H).
- 4.- Colonias laxas, de márgenes difusos, con micelio exploratorio disperso (Figura 3 A, E).

Se consideró como área exterior al borde más externo de las colonias, constituido por los ápices de crecimiento del micelio exploratorio, y como área interior al segundo frente de crecimiento, constituido por micelio denso y muy ramificado.

Utilizando los datos de área proyectada (Cuadro 4) se trazaron las curvas de crecimiento (Figuras 4 a 12).

Figura 3. Morfología de la colonia de la cepa EF36 en distintos medios de cultivo y pH. A) PDA, pH 4.5; B) MMN, pH 4.5; C) BAF, pH 4.5; D) PDA, pH 5.5; E) MMN, pH 5.5; F) BAF, pH 5.5; G) PDA, pH 6.5; H) MMN, pH 6.5; I) BAF pH 6.5.



Cuadro 4. Experimento 1, promedios de área exterior proyectada (mm) de cada tratamiento en la cinética multifactorial en medio sólido.

Tratamiento / Días	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40	42	44	46	48
4.5 pH 23° C PDA	0.00	0.000	41.598	110.71	231.12	351.53	531.89	641.74	855.60	1,110.4	1,110.4	1,469.0	1,469.0	1,893.6	2,158.2	2,178.4	2,403.6	2,633.7	2,719.3	2,882.1	2,903.4	3,015.6	3,087.5	3,149.2	3,210.8
5.5 pH 23° C PDA	0.00	0.000	16.060	63.724	115.32	166.91	240.33	300.50	386.02	520.04	520.04	713.00	713.00	920.67	1,041.2	1,091.0	1,225.0	1,397.1	1,423.6	1,538.2	1,626.2	1,727.1	1,828.8	1,916.0	2,003.2
6.5 pH 23° C PDA	0.00	0.000	18.305	40.101	76.752	113.40	175.58	226.38	311.16	420.61	420.61	629.99	629.99	847.40	1,015.0	977.86	1,239.1	1,405.5	1,473.1	1,624.4	1,705.9	1,828.7	1,938.8	2,033.1	2,127.4
4.5 pH 23° C MMN	0.00	0.000	6.511	54.310	78.351	102.39	207.69	283.67	400.18	551.02	551.02	742.43	742.43	855.33	971.25	913.38	945.57	932.61	925.95	921.64	892.99	881.59	860.03	841.55	823.06
5.5 pH 23° C MMN	0.00	0.000	0.993	36.154	103.81	171.48	320.55	448.38	576.64	845.30	845.30	1,338.5	1,338.5	1,833.1	2,248.1	2,413.0	2,727.5	3,175.4	3,305.9	3,284.3	3,325.0	3,323.2	3,344.2	3,362.1	3,380.1
6.5 pH 23° C MMN	0.00	0.000	31.749	61.641	109.71	157.79	260.12	371.69	452.80	740.24	740.24	1,045.5	1,045.5	1,369.2	1,635.8	1,992.2	2,130.8	2,555.4	2,697.4	2,945.7	3,049.5	3,242.1	3,401.6	3,538.4	3,675.1
4.5 pH 23° C BAF	0.00	0.000	2.101	20.832	81.554	142.27	272.74	382.74	529.84	720.18	720.18	1,102.6	1,102.6	1,466.0	1,685.5	1,817.1	2,109.0	2,338.2	2,524.1	2,572.1	2,847.2	2,960.8	3,170.2	3,349.6	3,529.0
5.5 pH 23° C BAF	0.00	0.000	1.559	15.952	77.119	138.28	248.11	359.87	473.60	687.86	687.86	1,040.0	1,040.0	1,391.4	1,585.9	1,779.8	2,021.4	2,327.6	2,466.1	2,639.9	2,810.8	2,975.0	3,155.5	3,310.1	3,464.8
6.5 pH 23° C BAF	0.00	0.000	0.000	2.701	34.565	66.429	149.54	204.02	287.05	427.20	427.20	705.57	705.57	994.47	1,131.9	1,289.2	1,531.2	1,736.3	1,832.4	1,982.4	2,137.6	2,281.6	2,442.7	2,580.8	2,718.9
4.5 pH 25° C PDA	0.00	0.000	42.515	102.84	183.09	263.35	418.27	516.13	661.17	826.59	826.59	1,131.8	1,131.8	1,420.7	1,613.2	1,646.5	1,832.2	1,921.3	1,958.4	1,956.1	2,093.2	2,132.9	2,228.1	2,309.7	2,391.3
5.5 pH 25° C PDA	0.00	0.000	17.714	60.463	122.20	183.95	299.47	354.08	477.40	645.14	645.14	888.81	888.81	1,104.6	1,264.6	1,338.3	1,486.6	1,692.1	1,759.0	1,792.9	1,914.0	1,972.4	2,069.0	2,151.8	2,234.6
6.5 pH 25° C PDA	0.00	0.000	28.135	74.586	130.61	186.64	289.59	319.07	460.70	564.49	564.49	821.37	821.37	1,053.8	1,174.3	1,252.8	1,438.4	1,608.8	1,760.6	1,790.9	1,902.0	1,955.0	2,043.3	2,119.1	2,194.8
4.5 pH 25° C MMN	0.00	0.000	3.284	20.816	38.842	56.868	104.80	137.78	239.13	379.22	379.22	601.81	601.81	786.04	860.57	865.98	929.57	955.06	952.86	933.72	921.02	904.77	889.19	875.82	862.46
5.5 pH 25° C MMN	0.00	0.000	4.503	33.409	81.638	129.86	240.78	288.82	489.46	704.83	704.83	1,168.6	1,168.6	1,754.9	2,027.9	2,127.5	2,464.5	2,666.3	2,786.7	2,783.0	2,799.8	2,802.4	2,812.8	2,821.8	2,830.7
6.5 pH 25° C MMN	0.00	0.000	16.199	33.478	53.466	73.454	113.86	132.28	193.78	286.00	286.00	389.54	389.54	524.77	588.45	717.36	803.59	940.39	1,047.4	1,085.5	1,257.7	1,334.2	1,468.1	1,582.9	1,697.6
4.5 pH 25° C BAF	0.00	0.000	26.071	80.905	186.58	292.26	424.90	518.23	751.41	1,010.6	1,010.6	1,320.2	1,320.2	1,673.3	1,862.9	1,912.5	2,124.6	2,343.3	2,490.1	2,507.2	2,593.0	2,629.9	2,695.9	2,752.5	2,809.2
5.5 pH 25° C BAF	0.00	0.000	7.326	43.224	136.21	229.19	358.73	454.62	679.07	879.70	879.70	1,295.6	1,295.6	1,745.6	1,962.9	2,136.4	2,528.7	2,726.0	3,079.6	3,024.2	3,245.2	3,275.5	3,410.9	3,526.9	3,642.9
6.5 pH 25° C BAF	0.00	0.000	6.994	44.084	96.030	147.97	193.41	279.77	420.08	575.96	575.96	873.58	873.58	1,334.1	1,547.5	1,736.3	2,102.0	2,258.9	2,565.4	2,627.2	2,755.9	2,834.6	2,946.3	3,042.0	3,137.8
4.5 pH 25° C PDA	0.00	0.000	34.725	68.103	110.41	152.72	207.73	237.01	358.36	425.01	425.01	584.07	584.07	767.55	841.64	918.73	982.51	1,043.3	1,073.3	779.25	1,011.5	890.06	949.73	1,000.8	1,052.0
5.5 pH 28° C PDA	0.00	0.000	32.965	62.109	111.27	160.43	237.07	268.97	380.28	470.49	470.49	631.94	631.94	836.51	910.19	968.29	1,016.3	1,085.4	1,123.1	1,105.7	1,098.1	1,084.5	1,073.0	1,063.2	1,053.4
6.5 pH 28° C PDA	0.00	0.000	8.246	12.768	31.684	50.600	82.776	104.83	171.66	232.89	232.89	344.33	344.33	483.02	375.78	631.41	728.68	844.61	922.51	972.90	994.94	1,034.3	1,067.3	1,095.7	1,124.0
4.5 pH 28° C MMN	0.00	0.000	27.015	3.236	20.382	37.528	92.229	111.01	184.32	249.63	249.63	355.12	355.12	576.24	624.89	673.53	733.60	743.37	778.13	767.33	762.61	754.18	747.09	741.02	734.95
5.5 pH 28° C MMN	0.00	0.000	0.000	12.564	36.324	60.084	81.188	110.97	186.73	231.33	231.33	362.05	362.05	539.72	608.06	676.39	750.15	856.18	902.85	898.65	896.81	893.53	890.78	888.42	886.06
6.5 pH 28° C MMN	0.00	0.000	5.424	13.377	25.280	37.183	59.336	81.111	122.83	142.27	142.27	225.09	225.09	269.72	312.60	355.48	395.90	413.24	450.66	472.09	481.47	498.22	512.29	524.35	536.40
4.5 pH 28° C BAF	0.00	0.000	8.767	49.805	95.418	141.03	198.67	286.67	395.83	509.78	509.78	825.03	825.03	985.02	1,139.4	1,190.1	1,305.1	1,370.3	1,419.7	1,398.0	1,388.5	1,371.6	1,357.4	1,345.1	1,332.9
5.5 pH 28° C BAF	0.00	0.000	12.607	61.246	116.39	171.53	244.97	310.40	434.06	545.75	545.75	908.98	908.98	1,105.0	1,295.4	1,391.5	1,542.2	1,700.9	1,773.0	1,861.2	1,899.8	1,968.7	2,026.5	2,076.2	2,125.8
6.5 pH 28° C BAF	0.00	0.000	2.701	28.821	51.735	74.648	130.31	112.80	210.58	282.65	381.02	479.38	533.43	587.47	687.88	788.30	871.12	979.80	1,067.2	1,157.0	1,196.2	1,266.3	1,325.2	1,375.7	1,426.1

Figura 4. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo PDA a 23° C y a diferentes pH.

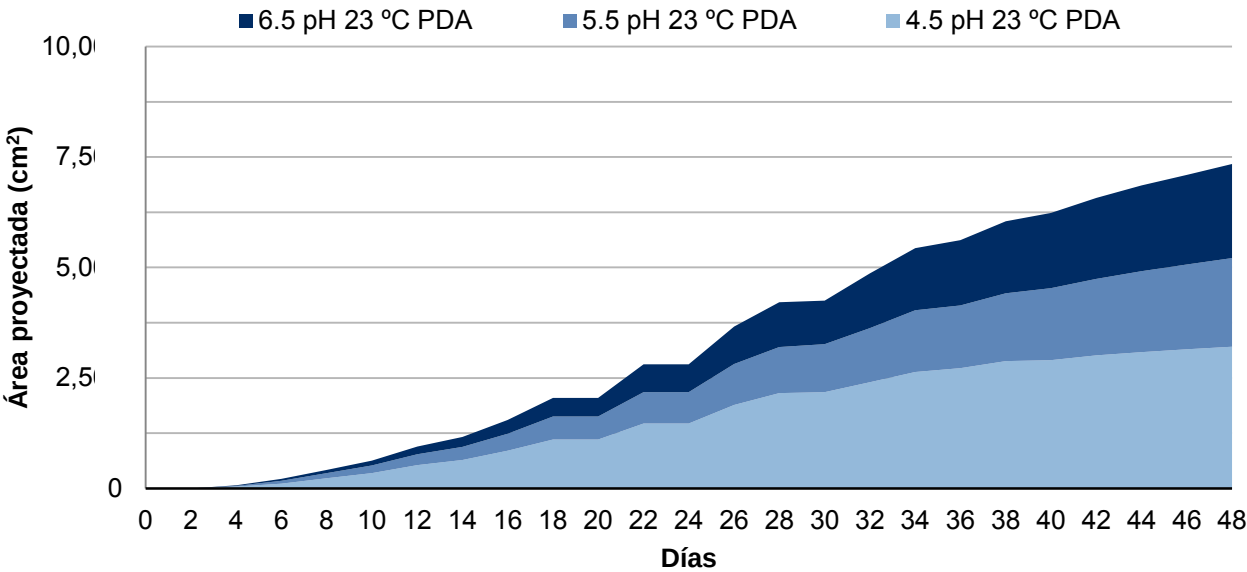


Figura 5. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo PDA a 25° C y a diferentes pH.

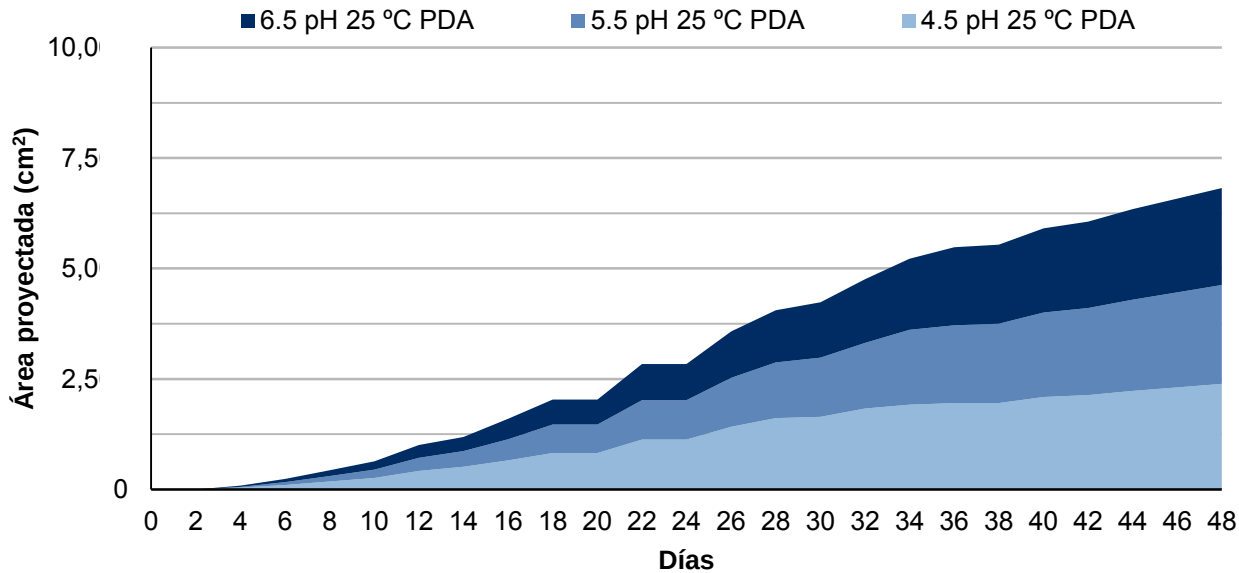


Figura 6. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo PDA a 28° C y a diferentes pH.

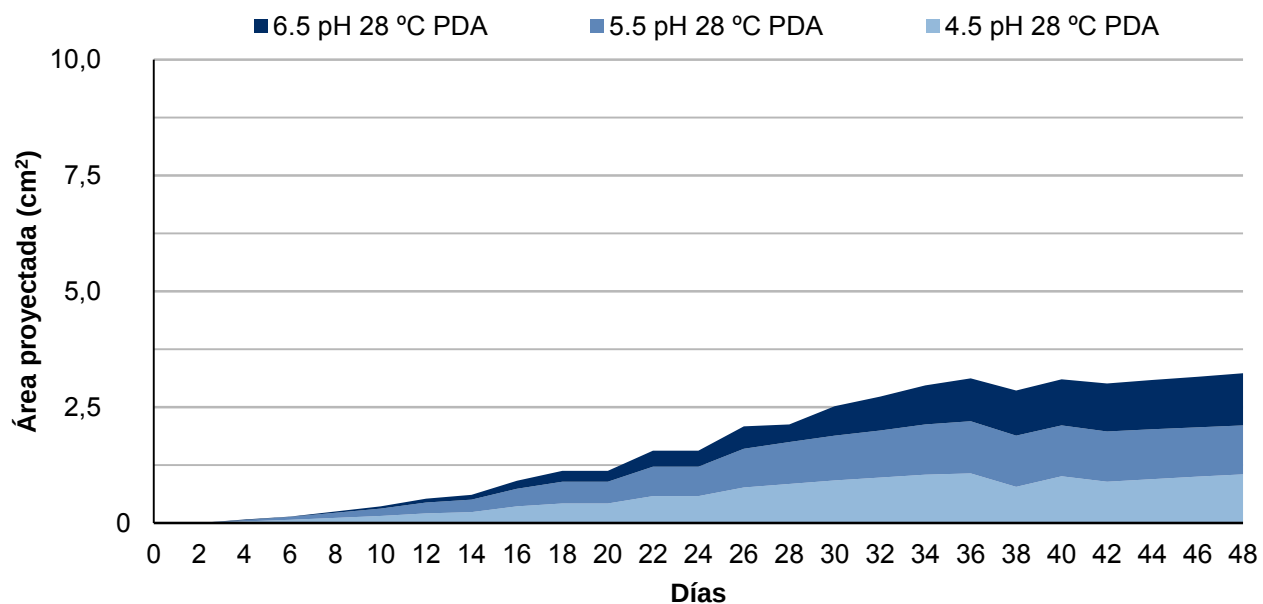


Figura 7. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo MMN a 23° C y a diferentes pH.

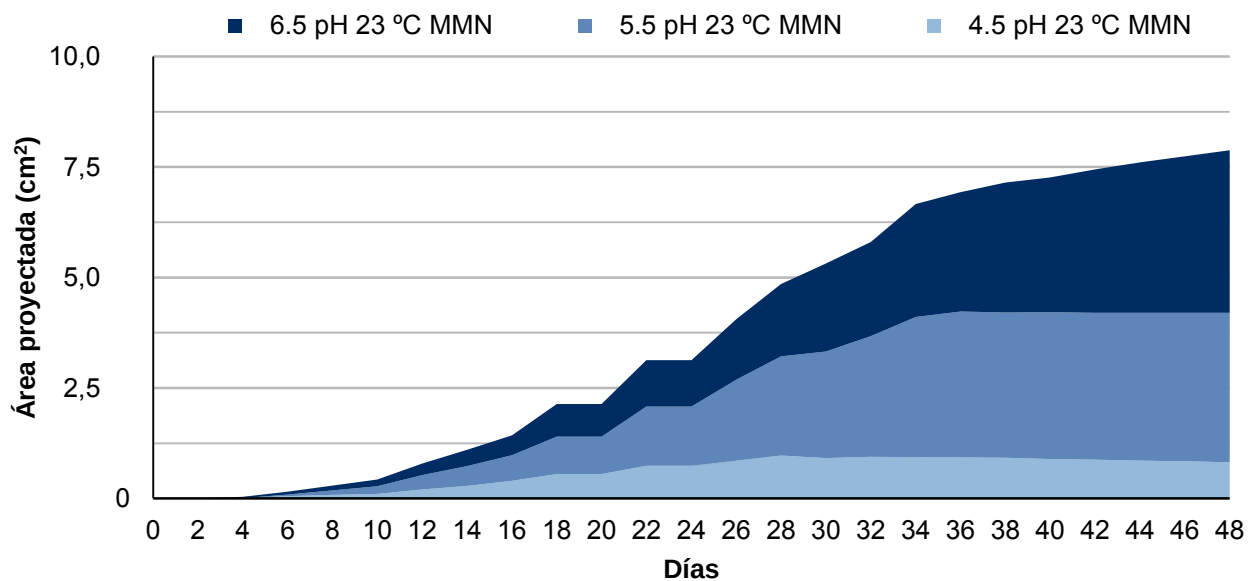


Figura 8. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo MMN a 25° C y a diferentes pH.

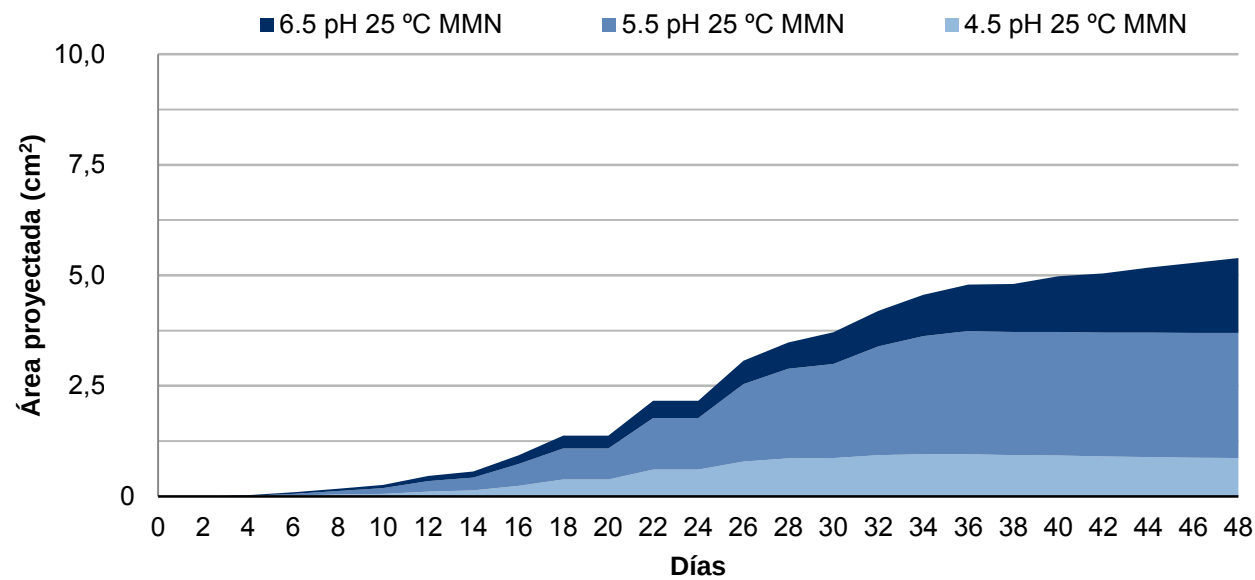


Figura 9. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo MMN a 28° C y a diferentes pH.

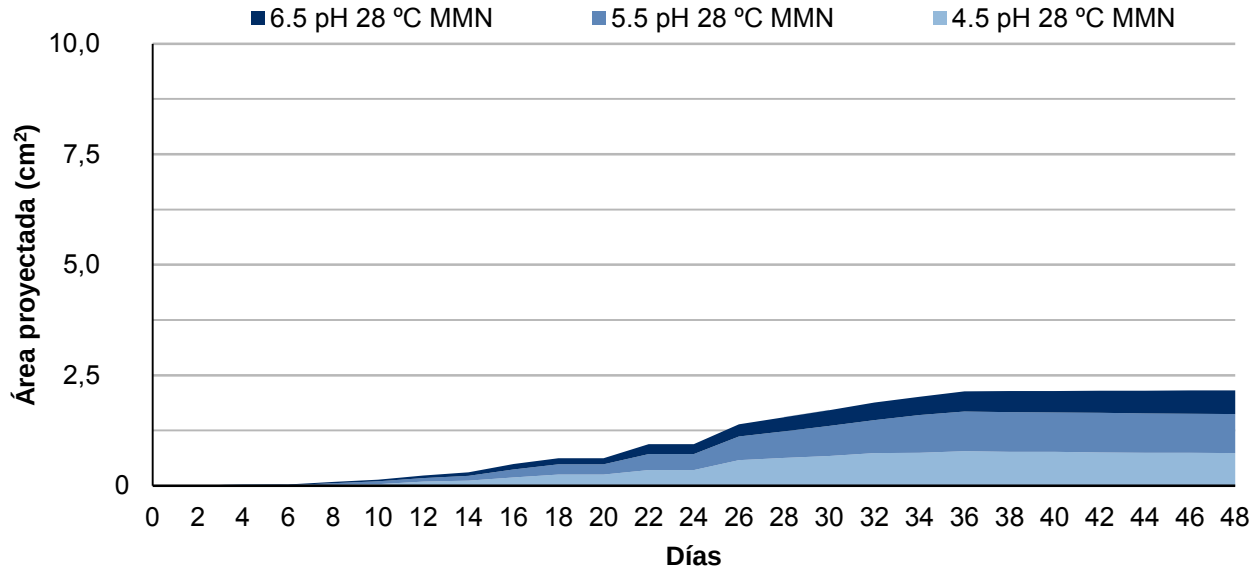


Figura 10. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo BAF a 23° C y a diferentes pH.

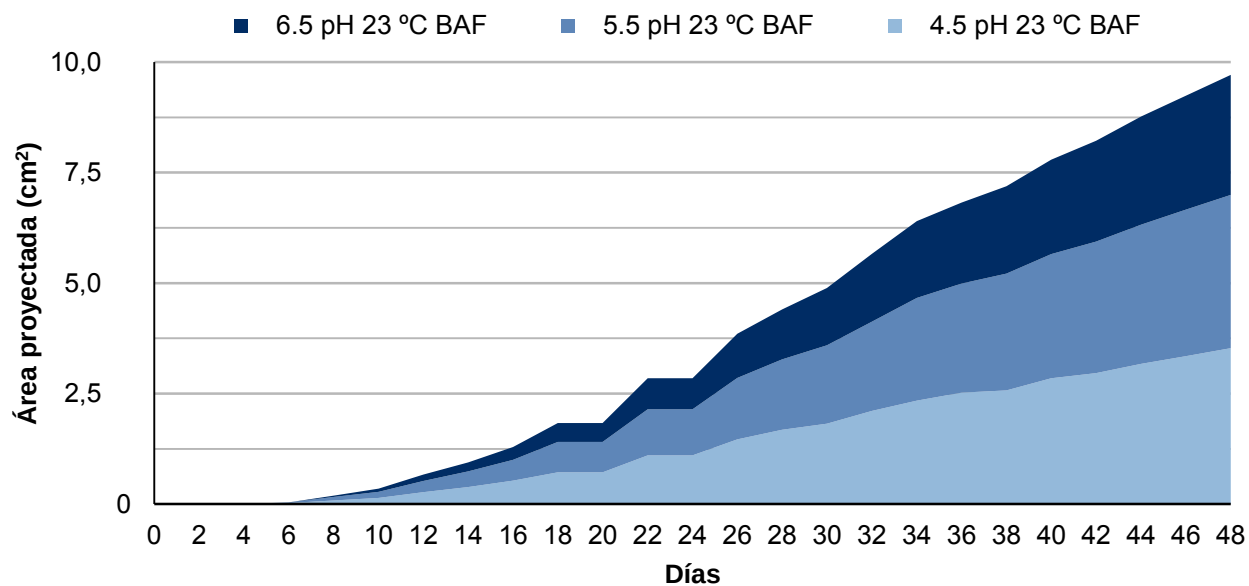


Figura 11. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo BAF a 25° C y a diferentes pH.

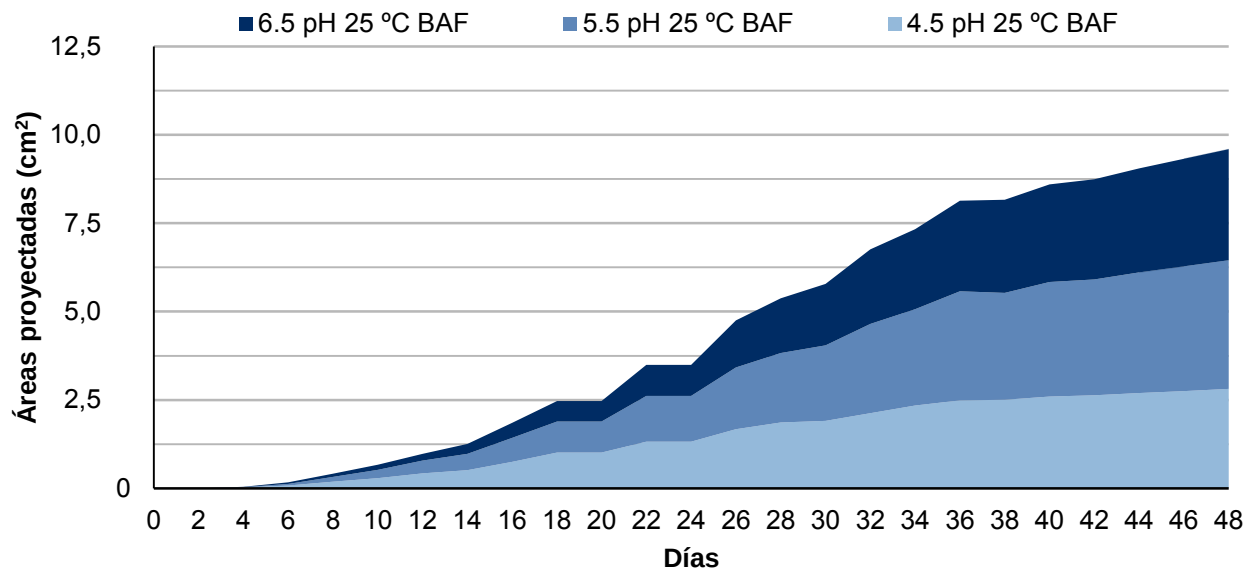
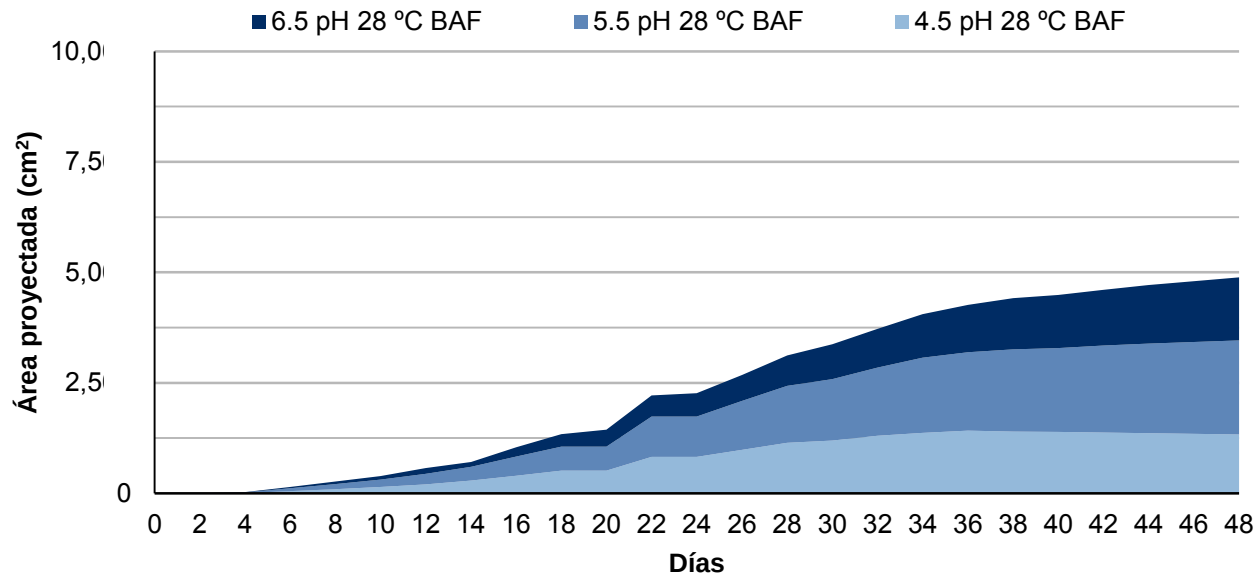
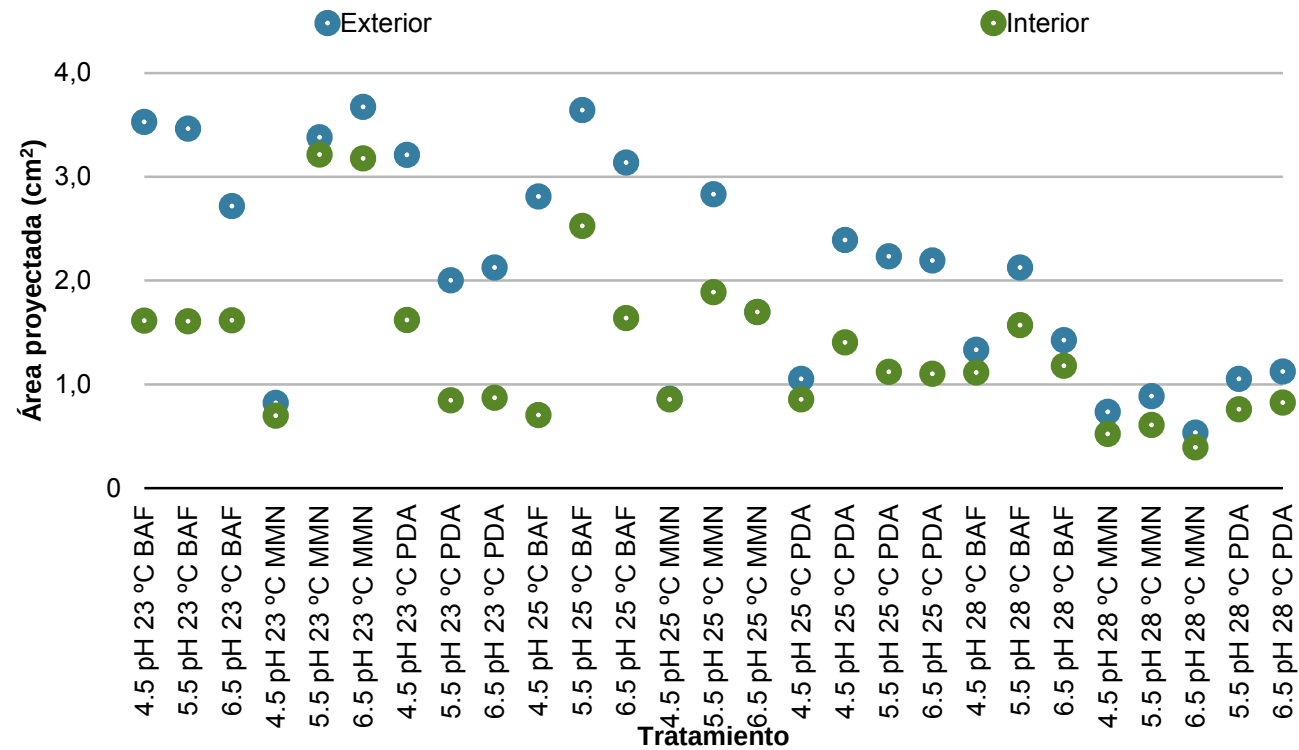


Figura 12. Cinética en medio sólido de la cepa EF36 en medio nutritivo BAF a 28° C y a diferentes pH.



En algunos tratamientos, atendiendo a la morfología de las colonias, las áreas interior y exterior coinciden en sus valores (Figura 13).

Figura 13. Comparación de las áreas finales exterior e interior de la cinética en medio sólido.



Las áreas totales mayores fueron generadas por el medio BAF a 23° y 25° C, y a pH de 5.5 y 6.5 (Cuadro 4, Fig. 12), los máximos en acumulación de biomasa también fueron generados por el medio BAF a 23° y 25° C, así como a pH tendientes a la neutralidad. La combinación BAF, 25° C, pH 5.5 fue la que generó una mayor producción de biomasa (Cuadro 5)

Cuadro 5. Experimento 1, “Cinética multifactorial en medio sólido”, pesos secos finales de cada tratamiento.

Tratamiento			Peso (mg)	
Temperatura (°C)	Medio	pH	Promedio	DS
25	BAF	5.5	79	15
25	BAF	6.5	75	9
23	PDA	4.5	73	18
25	BAF	4.5	64	11
23	BAF	6.5	59	10
23	BAF	4.5	57	5
28	BAF	5.5	56	7
23	BAF	5.5	55	7
28	PDA	5.5	49	17
28	PDA	6.5	49	12
25	MMN	6.5	46	19
28	PDA	4.5	46	16
28	BAF	6.5	41	6
23	PDA	5.5	40	6
25	PDA	5.5	40	5
23	MMN	6.5	40	38
28	BAF	4.5	40	5
23	MMN	5.5	38	12
25	PDA	4.5	36	6
23	PDA	6.5	36	23
25	PDA	6.5	29	5
25	MMN	4.5	27	5
23	MMN	4.5	26	8
25	MMN	5.5	25	7
28	MMN	6.5	25	25
28	MMN	4.5	14	4
28	MMN	5.5	6	3

DS = Desviación estándar

7.2.2 Experimento 2: Cinética en medio líquido en matraz

De los tres tratamientos inoculados para esta cinética, los dos tratamientos en los que se aplicó glicerol 10%, no presentaron recuperación. El tratamiento en el que sí se observó crecimiento fue el inoculado a partir de micelio resembrado y crecido a 25° C. En este caso

se observó un incremento en biomasa de 2.53 g/L, así como un consumo de sustrato de 9.988 g/L, lo que representa un rendimiento de $Y_{X/S} = 0.253 \text{ g}_B/\text{g}_S$ (Cuadro 6).

Cuadro 6. Experimento 2 “Cinética en medio líquido de la cepa EF36. Promedios y promedios móviles de glucosa residual a través del tiempo.

Días	Promedio (g/L)	DS	Promedio móvil
0	30.000		
2	29.075	0.095	29.538
4	24.503	0.132	26.789
7	25.743	0.124	25.123
9	26.099	0.227	25.921
11	22.784	0.093	24.441
14	19.726	0.106	23.377
16	24.899	0.137	22.313
18	20.850	0.070	22.875
21	29.331	0.094	25.090
23	18.261	0.076	23.796
25	25.012	0.060	21.637
28	*	*	25.012
30	21.159	0.045	21.159
32	21.301	0.082	21.230
35	20.472	0.093	20.886

DS = Desviación estándar, * Mediciones no obtenidas

7.2.4 Experimento 3: cinética en medio líquido en tubos falcon

El experimento diseñado para conocer el efecto de la inoculación en el desempeño de la cepa, presentó crecimiento apreciable en ambos tratamientos. Para el tratamiento de 20% de inoculación, se observó un incremento en biomasa de 0.36 g/L, así como un consumo de sustrato de 2.98 g/L, lo que representa un rendimiento de $Y_{X/S} = 0.119 \text{ g}_B/\text{g}_S$. Para el tratamiento de 2% de inoculación se observó un incremento en biomasa de 1.62 g/L, así como un consumo de sustrato de 5.60 g/L, lo que representa una tasa de rendimiento de $Y_{X/S} = 0.29 \text{ g}_B/\text{g}_S$. Los datos de consumo de sustrato y de producción de biomasa de presentan en

el cuadro 7. Se puede apreciar que el usar un menor volumen de inóculo resulta en una mayor acumulación de biomasa, al igual que un mayor consumo de sustrato y un $Y_{X/S}$ mayor.

Cuadro 7. Experimento 3 “Cinética destructiva en tubos”. Promedios y promedios móviles de peso seco de biomasa y sustrato residual a través del tiempo.

Días	Biomasa g/L						Glucosa residual g/L					
	2%			20%			2%			20%		
	M	DS	MM	M	DS	MM	M	DS	MM	M	D.S.	MM
0	3.0950	0.1908	3.0233	3.9917	0.9716	3.8067	30.000	0.8980	29.632	30.000	0.0159	28.185
3	2.9517	0.2702	3.1433	3.6217	0.1710	3.2358	29.263	0.6290	29.677	26.369	1.4245	29.899
7	3.3350	1.3576	3.2338	2.8500	0.0990	3.2050	30.091	0.5190	30.091	33.430	0.7634	29.244
10	3.1325	0.3288	3.0313	3.5600	0.1556	3.4525	*		29.808	25.059	0.0604	26.903
14	2.9300	0.4172	3.0475	3.3450	0.1697	3.4388	29.808	0.8890	29.371	28.748	0.2082	27.609
17	3.1650	0.1626	3.0150	3.5325	0.0389	3.3363	28.933	0.5954	22.593	26.470	0.1248	24.399
21	2.8650	0.1909	2.9138	3.1400	0.0	3.1400	16.252	0.1851	17.946	22.329	1.1681	25.119
24	2.9625	0.3147	3.1688	*	*	*	19.639	0.5237	19.776	27.910	1.5408	25.030
28	3.3750	0.0778	3.3788	*	*	3.9050	19.913	0.5463	18.178	22.150	0.8786	22.934
31	3.3825	0.1308	4.0475	3.9050	0.1626	4.1263	16.442	1.0903	20.419	23.719	0.2518	25.370
35	4.7125	0.7955	*	4.3475	1.4531	*	24.397	0.7541	*	27.021	0.3428	*

M = Promedio, MM = Promedio móvil, DS = Desviación estándar, * Mediciones no obtenidas.

7.2.3 Experimento 4: Cinética en biorreactor

La cinética en biorreactor tuvo una duración final de 2 semanas. Esto atendiendo al bajo desempeño de la cepa en cultivo y a la limitada respiración, consumo de sustrato y acumulación de biomasa que presentó en ese período de tiempo (Cuadro 8).

La cepa presentó un incremento en biomasa de 0.195 g/L y un consumo de sustrato de 12.518 g/L, lo que representa un rendimiento de $Y_{X/S} = 0.0727 \text{ g}_B/\text{g}_S$.

Cuadro 8. Experimento 4, “Cinética en biorreactor”, promedios de peso seco de biomasa y consumo de sustrato a través del tiempo.

Días	Biomasa g/L	Sustrato g/L	
		Promedio	DS
0	3.1133	30.0000	8.4969
2	2.6842	23.2965	6.6007
4	3.0675	26.6343	7.5464
7	3.3993	17.4816	4.9531
9	3.6893	29.9342	8.4813
11	3.9004	32.5167	9.2131

DS = Desviación estándar

8 Discusión

8.1 Aislamiento de cepas e identificación

Se lograron aislar cepas de tres fuentes biológicas, pero al corroborar la identidad de los aislados mediante morfología y biología molecular, se notó que únicamente algunos aislamientos obtenidos de esporomas frescos correspondieron a especies de HEM (Cuadro 3), mientras que un gran número de aislamientos correspondieron a especies no ectomicorrízicas (Cuadro 3).

La metodología ensayada para el aislamiento a partir de ectomicorrizas incluyó un paso de desinfección superficial con H_2O_2 (Molina y Palmer 1982). Debido a que las ectomicorrizas y los esclerocios están en contacto con el suelo, su limpieza es fundamental. El H_2O_2 es un compuesto altamente reactivo que al entrar en contacto con materia orgánica la oxida e hidroliza en una reacción fuertemente exotérmica. Por esto lisa las células bacterianas y fúngicas que se encuentren en la superficie de contacto y posiblemente también mató las células del manto de la ectomicorriza. Ensayos con menos tiempo de exposición al reactivo o con menores concentraciones podrían dar buenos resultados.

Para discriminar de entre los aislamientos a las colonias de HEM de las de otros MOs, como primer paso, se eliminaron las colonias lechosas, de crecimiento rápido y/o esporulantes descartando así bacterias, levaduras y hongos anamórficos. Ya que todos los aislamientos obtenidos a partir de esclerocios presentaron características no ectomicorrízicas, fueron descartados en esta etapa. Posteriormente, se realizó la secuenciación de la región nuclear de los ITS y su identificación mediante BLAST. De las 52 cepas secuenciadas, 36 pertenecieron a hongos no ectomicorrízicos mientras que 15 a HEM (Cuadros 2 y 3).

De las cepas aisladas a partir de esporomas 14 fueron de hongos reportados en la literatura como endófitos, 1 de hojarasca, 2 del aire, 1 parásito de plantas, 2 parásitos de hongos y 3 habitantes del suelo. De las cepas aisladas a partir de ectomicorrizas 10 representaron hongos endófitos y 3 hongos habitantes del suelo. Esto sin considerar las 15 cepas de HEM, todas ellas aisladas de esporomas.

La presencia de hongos habitantes del suelo en las ectomicorrizas de los bioensayos pudo deberse a que estos hongos se encontraban en el suelo de los microcosmos, o a que actuaban como saprobios en la corteza radical en las inmediaciones de la ectomicorriza.

La presencia de hongos endófitos en las ectomicorrizas de los bioensayos sugiere que se encuentran como habitantes internos de las raíces de los pinos. No es raro encontrar hongos endófitos de raíz, los cuales colonizaban tejidos internos de la raíz como los haces vasculares (Reininger y Sieber 2012). Estos tejidos no son colonizados por los HEM, los cuales únicamente rodean la raíz o invaden los espacios intercelulares de la corteza (Agerer 1987-2008; Peterson *et al.* 2004). Por este motivo los HEM estuvieron fuertemente expuestos al H₂O₂, a diferencia de los endófitos protegidos por la propia raíz, por lo que al no entrar en contacto directo con el reactivo sobrevivieron a la desinfección superficial, para posteriormente emerger de los cortes e invadir el medio de cultivo en placa. No es extraño obtener hongos endófitos a partir de aislamientos ensayados con tejidos vegetales (Abello y Kelemu 2006; Lu *et al.* 2012; Reininger y Sieber 2012), pero es interesante encontrar hongos reportados como endófitos al realizar aislamientos a partir de contexto de esporomas frescos. Es el caso de 14 cepas obtenidas de esta fuente. Dados los objetivos del proyecto, no se profundizó en el estudio de estas cepas. Sin embargo, resulta interesante la evidencia de una posible interacción biológica entre plantas y varios hongos con estilos de vida diferentes, por lo que las secuencias, tanto de los aislamientos de esporoma como de ectomicorriza, se han puesto a disposición pública en GenBank de NCBI para posteriores investigaciones (Cuadro 3).

Se obtuvieron 2 cepas de *Morchella frustata*. Se ha propuesto que dentro del género existen especies saprobias y otras micorrízicas (Hobbie *et al.* 2001), aunque también se ha dicho que la misma especie puede cumplir de su ciclo de vida como un hongo de vida libre al mismo tiempo que presenta la capacidad de asociarse a un hospedero dentro de la familia Pinaceae (Dahlstrom *et al.* 2000).

Este género ha sido objeto del estudio de producción de metabolitos en cultivo puro, y su cultivo axénico ha sido ensayado exitosamente en varios trabajos (ej. Frank 1960; Li *et al.* 2013, Meng *et al.* 2010; Winder 2006).

Una cepa de *Lactarius subindigo* (Verbeken & Horak) fue aislada. El esporoma del cual se aisló esta cepa fue un ejemplar expuesto en la VXENH, no tiene completos sus datos de recolecta, por lo que no fue seleccionada para su caracterización cinética. La caracterización

morfológica de la colonia de cepas norteamericanas de *L. indigo* fue reportada (Hutchison 1991), así como la de varias especies de *Lactarius* neotropicales, incluyendo una de *L. indigo* (Flores *et al.* 2008). Para esta especie, la región de los ITSs del nrDNA es un marcador parálogo, lo que fue evidente en los cromatogramas obtenidos de esta cepa. Ya que la secuenciación se realizó en ambos sentidos, fue evidente que se presentaron algunos sitios heterócigos con concentraciones similares de ambas bases.

La cepa de *Suillus luteus* también fue aislada de un esporoma expuesto en la XVENH. El cultivo axénico de *S. luteus* ha sido reportado (Hatakeyama y Ohmasa 2004; Hung y Trappe 1983; Hutchison 1989; Santelices *et al.* 2012), y también la síntesis *in vitro* de la ectomicorriza con pino (Yamada *et al.* 2001 a). En co-cultivo, inhibe el crecimiento de *Trichoderma* (Mucha 2011). Su crecimiento en placa es estimulado por adenosina (Zhang *et al.* 2010). Se ha identificado la producción de citocinina por este HEM en cultivo (Kraigher *et al.* 1991), así como su actividad antibiótica (Sasek y Musilek 1967). *S. luteus* también es un buen candidato para la producción de inóculo ectomicorrízico vegetativo. El genoma de esta especie fue secuenciado recientemente (Kohler *et al.* 2015).

Solo se tiene conocimiento de un trabajo en el que se ha cultivado una especie de *Tylopilus* (Straatsma *et al.* 1986), mientras que no se conoce ninguno en el que se reporte el cultivo de *Amanita multisquamosa*. Sin embargo, estas dos cepas no sobrevivieron tras la tercera resiembra por lo que su cultivo serial no ofrece buenas expectativas.

De las 15 cepas de HEM obtenidas (Cuadro 2) 8 pertenecen a *L. trichodermophora*, debido a que la cepa EF36 representa a esta especie y fue elegida al inicio del proyecto para realizar la exploración cinética. El segundo año de recolecta y obtención de cepas los esfuerzos se enfocaron en obtener cepas de *L. trichodermophora*, para así lograr un conjunto de cepas de la misma especie pero de distintas poblaciones y localidades.

Las diferencias intraespecíficas en el desempeño de las cepas en cultivo puro, la preferencia por algunos sustratos sobre otros y la producción de enzimas ha sido identificada para varias especies de HEM (Hung 1983; Matsuda 2006; Pereira *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2010), en particular algunas representantes de la familia Tricholomataceae (Kawagishi *et al.* 2004; Kusuda *et al.* 2007; Vaario *et al.* 2002), así como para *Laccaria* (Di Battista *et al.* 1996). La experimentación paralela con distintas cepas se considera una de las características de los cultivos experimentales, permite encontrar diferencias intraespecíficas y seleccionar una “mejor cepa”.

8.2 El género *Laccaria* como modelo de estudio

El género *Laccaria* ha sido utilizado como modelo de estudio, en particular la cepa S238N de *L. bicolor*. Originalmente, se reportó el comportamiento diferencial entre cepas de S238 aisladas de *Pseudotsuga*, y re-aisladas de las micorrizas sintetizadas y de esporomas producidos por la síntesis (Di Battista *et al.* 1996). Se destacan las diferencias en morfología y coloración de las colonias, crecimiento radial en placa, colonización de raíces de pinos, morfología de los esporomas y ornamentación de las esporas (Di Battista *et al.* 1996). En esta misma cepa se observó que la expresión de la enzima 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfato reductasa, involucrada en la asimilación de azufre, se ve promovida por las bajas concentraciones del mismo. También reportan que, a diferencia de otros hongos, la asimilación de azufre no es inhibida por la presencia de glutatión (Mansouri-Bauly *et al.* 2006).

En cuanto al metabolismo del nitrógeno, *L. bicolor* regula conjuntamente transportadores de nitrógeno y enzimas nitrato y nitrito reductasas, mismos que son reprimidos en presencia de amonio, promovidos en altas concentraciones de nitrato, presencia de urea, L-glutamina y L-asparagina (Kemppainen *et al.* 2010). Gracias a la transformación exitosa de S238N mediante *Agrobacterium* (Kemppainen *et al.* 2005; Kemppainen y Pardo 2011) se realizaron estudios posteriores sobre la regulación de la asimilación de nitrógeno en S238N, silenciada para nitrato reductasa, poniendo en evidencia que esta enzima no es central en la asimilación de N, ni en el patrón de expresión de otros genes relacionados (Kemppainen *et al.* 2010).

El genoma de *L. bicolor* S238N ya ha sido secuenciado (Martin *et al.* 2008). Tiene un tamaño cercano a 65 megabases, que codifican para alrededor de 20,000 proteínas predichas, entre las que se destacan una gran cantidad de transposones y secuencias repetitivas. Con los datos genómicos se respalda la hipótesis del biotrofismo/saprotrofismo facultativo (Martin *et al.* 2008). Posteriormente, y sobre estos resultados se publicaron, por ejemplo, el interactoma de *L. bicolor* y *Populus tremeloides* (Larsen *et al.* 2011), las vías metabólicas y los perfiles transcriptómicos de los carbohidratos (Deveau *et al.* 2008; Veneault-Fourrey *et al.* 2014). S238N modifica los patrones de expresión enzimática de las raíces de álamo, principalmente los relacionados con la asimilación de P (Courty *et al.* 2011),

así como cerca de 200 genes en interacción con pino (Flores-Monterroso *et al.* 2013). Reduce los efectos negativos que propician algunos hongos endófitos de septo obscuro (Reininger y Siber 2012). Expresa un grupo genético de regulación de la simbiosis de manera general, al que se le ha llamado MiSSP7 (Plett *et al.* 2014), así como genes particulares en interacción con diferentes hospederos (Plett *et al.* 2011; 2015). El hospedero también modifica sus patrones de expresión genética, principalmente en el metabolismo de ácidos aromáticos, orgánicos y grasos involucrados en la respuesta inmune (Tschaplinski *et al.* 2014).

La cepa S238N se ha usado para estudiar el efecto de BAM en la morfología y colonización de raíces de pinos (Aspray *et al.* 2006). También, se identificó que promueve la proliferación de BAM mediante la acumulación de trehalosa en las hifas, mientras que la BAM secreta tiamina, la cual a su vez promueve el crecimiento micelial de *L. bicolor* (Deveau *et al.* 2010). También, se han estudiado sus perfiles transcriptómicos en interacción con algunas bacterias del suelo (Deveau *et al.* 2014).

Recientemente, fue publicado el genoma de *L. amethystina*, en un estudio que pone en evidencia las convergencias evolutivas que permitieron el establecimiento de la simbiosis ectomicorrízica por múltiples linajes fúngicos, así como algunas peculiaridades para cada grupo (Kohler *et al.* 2015).

Aunque algunas especies de *Laccaria* presentan cierto grado de especificidad (Mueller 1992), el género se ha considerado generalista, ya que se distribuye en bosques templados, mediterráneos, boreales y alpinos de prácticamente todo el globo, inclusive hay especies propias de dunas. Además se asocia con *Abies*, *Alnus*, *Betula*, *Dryas*, *Eucalyptus*, *Fagus*, *Notofagus*, *Picea*, *Pinus*, *Populus*, *Pseudotsuga*, *Quercus*, *Salix* y *Tsuga* (Brun *et al.* 1994; Finaly *et al.* 1992; Flores-Monterroso *et al.* 2013; Mueller y Strack 1992; Osmundson *et al.* 2005; Regvar *et al.* 1997; Vaario y Suzuk 2004).

Laccaria es un HEM comestible y comercializable (Zambonelli y Bonito 2012), común de los bosques jóvenes (Frankland 1998), genera abundantes fructificaciones en los bosques en los que habita, aunque fructifica aún más abundantemente en plantíos en áreas sin vocación forestal (Savoie y Largeau 2011). La prevalencia de *Laccaria* ha sido detectada después del trasplante en las raíces de planta inoculada, tanto en sitios en regeneración posterior a incendios forestales (Franco *et al.* 2014) así como en sitios conservados en competencia con otros HEM nativos (Villeneuve *et al.* 1991).

Se han descrito técnicas asépticas y no asépticas para la inoculación con *Laccaria* (Duponnis y Garbaye 1991; Peterson y Chakravarty 1991; Repák 2011). La inoculación de *Eucalyptus* con esferas de hidrogel con micelio activo encapsulando de *Laccaria* presenta buenos resultados (Kuek *et al.* 1992). En México este género suele ser dominante en los bosques en los que habita (Garibay-Orijel *et al.* 2009; Reverchón *et al.* 2010). Se ha usado experimentalmente para la inoculación de pinos, siendo uno de los géneros que presentan mejores resultados en cuanto a sobrevivencia de la planta en vivero (Perez-Moreno *et al.* 2009). Se han descrito morfoanatómicamente las ectomicorrizas formadas entre especies mexicanas de *Laccaria*, *Pinus* y *Pseudotsuga* (Carrasco-Hernández *et al.* 2010).

Varios trabajos coinciden en reportar porcentajes de micorrización que oscilan entre el 40% y el 60% en *Pseudotsuga* y *Pinus*, a varias concentraciones de inóculo vegetativo de *Laccaria* (Parladé 1992, Pera 1992, Rincón *et al.* 2001; Villeneuve *et al.* 1991).

Laccaria mejora el crecimiento de plántulas de pino y la asimilación de K y Mg, principalmente mediante el aumento de la absorción de nutrientes disueltos, ligado a una mejor exploración y explotación del suelo por las raíces micorrizadas (Christophe *et al.* 2010). En coinoculación con *Thelephora* incrementan el tamaño y peso de plántulas de pino al compararlo con las de inoculación individual (Sudhakara y Natarajan 1997).

Laccaria trichodermophora es una especie que se distribuye en Norteamérica y México (Mueller 1992; Osmundson *et al.* 2005), presenta la capacidad de asociarse a tanto a coníferas como a latifoliadas (Mueller 1992). Es un HEM comestible que se comercializa en mercados del centro del país (Montoya *et al.* 2004) y suele fructificar durante toda la temporada de lluvias (Montoya *et al.* 2004).

8.3 Experimento 1: cinética multifactorial en medio sólido

Como una de las variables independientes en este experimento, se usaron tres medios de cultivo conocidos. El medio PDA es un medio complejo, ampliamente usado y de fácil elaboración. Los medios BAF y MMN son parcialmente definidos en cuanto a la presencia de algunos compuestos químicos, aunque también son complejos, ya que en su formulación se incluyen extracto de levadura y extracto de malta, respectivamente (Cuadro 1). Estos tres medios se encuentran entre los más populares en cuanto al cultivo de HEM (Hutchison 1991; Molina y Palmer 1991).

Los HEM tienen una limitada batería enzimática, por lo cual no son capaces de asimilar compuestos carbonados complejos (Hobbie *et al.* 2013; Lindahl y Tunlid 2015; Wolfe *et al.* 2012), de modo que la fuente energética debe estar en forma de azúcares simples como la glucosa.

Atendiendo a la composición del medio y a las condiciones de cultivo, las colonias desarrolladas presentaron distintas morfologías (Figura 2). Colonias grandes con coloraciones lilas en su periferia, y tonalidades ocre en el segundo frente de crecimiento, fueron generadas 25 y 23° C; esta misma tendencia se presentó al usar PDA o BAF como medio de cultivo, mientras que en temperaturas de 28° C o en medio MMN las colonias fueron blancas o amarillentas.

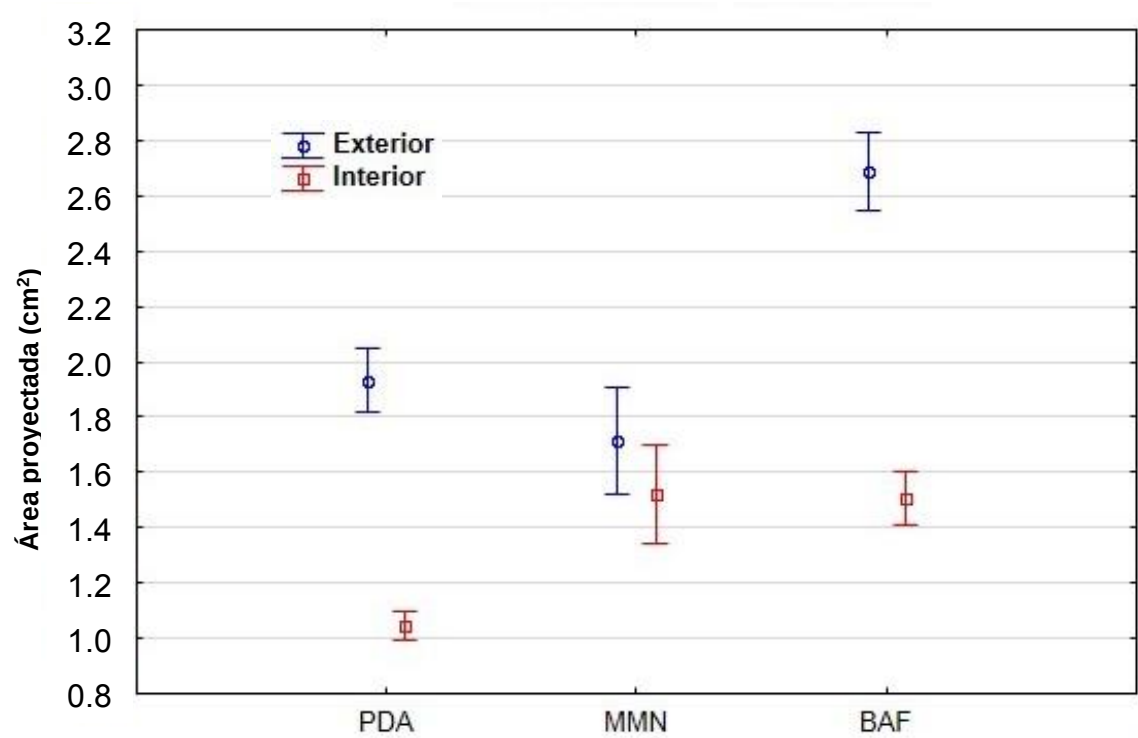
Es interesante que en algunos tratamientos las colonias de EF36 presentaron dos frentes de crecimiento muy evidentes, mientras que en otros tratamientos las colonias fueron más uniformes (Figura 2 y 12). Ya que algunas morfologías generadas fueron más densas y compactas que otras se realizó la comparación de los valores de área final de la colonia contra peso seco final mediante las pruebas de Spearman y Kendal (Cuadro 9). Ambas pruebas indican correlaciones entre peso y área, aún que en todos los casos los valores de R o de coeficiente τ son bajos (Cuadro 9). Por lo que el dato área no se considera informativo para hacer inferencias sobre la acumulación de biomasa (Cuadros 4, 5 y 9). Con el uso del software ImageJ (1.47v), la función “wand tracing tool” con tolerancia de 10 unidades y después de aumentar el contraste, así como trazando los contornos manualmente, se midieron las áreas interior y exterior de las colonias (en caso de que presentaran ambas) y se hizo la comparación (Figura 12). Mientras que en las colonias densas, irregulares, de márgenes difusos con micelio exploratorio agregado, la acumulación de peso seco fue buena, en las colonias laxas, de márgenes difusos, con micelio exploratorio disperso se encontró una pobre acumulación de biomasa. Es posible que se tratara de una exploración impulsada por un déficit de nutrientes.

Cuadro 9. Análisis de correlación de Spearman y de Kendal para los valores de las áreas exterior e interior, y peso seco del experimento 1, “Cinética multifactorial en placa”. Los datos destacados con color rojo indican las correlaciones significativas ($P < 0.05$).

Spearman	Exterior	Interior	Peso	Kendal	Exterior	Interior	Peso
Exterior	1.000000	0.721749	0.560409	Exterior	1.000000	0.562410	0.401837
Interior	0.721749	1.000000	0.366030	Interior	0.562410	1.000000	0.260663
Peso	0.560409	0.366030	1.000000	Peso	0.401837	0.260663	1.000000

Al agrupar los datos por medio de cultivo se pone en evidencia que para el medio MMN los valores de las áreas interior y exterior son muy similares, mientras que para BAF y PDA se presentaron mayores diferencias (Figura 13). Esto se relaciona con lo discutido anteriormente sobre las morfologías. El análisis de varianza de área proyectada en función de los medios nutritivos encuentra diferencias significativas ($F_{6,212} = 33.957$, $p = 0.000$). El valor más alto fue para el medio nutritivo BAF en el área exterior, y el más bajo para PDA en el área interior (Figura 13). Los valores de la prueba *post hoc* Tukey y los grupos homogéneos se presentan en los cuadros 10 a 13.

Figura 14. Análisis de varianza, efecto del medio nutritivo sobre el crecimiento de las áreas exterior e interior de las colonias de EF36. F = 33.957, p = 0.00.



Las marcas centrales representan los promedios de los tratamientos y los segmentos representan los errores estándar.

Cuadro 10. Prueba Tukey *post hoc* al análisis de varianza, para el área exterior en función de los medios nutritivos. Los datos resaltados en rojo representan diferencias significativas.

	PDA	MMN	BAF
PDA		0.057642	0.000114
MMN	0.057642		0.000114
BAF	0.000114	0.000114	

Cuadro 11. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área exterior en función de los medios nutritivos.

Medio	Medias	a	b
MMN	1714.081	****	
PDA	1932.441	****	
BAF	2687.541		****

Cuadro 12. Prueba Tukey *post hoc* al análisis de varianza para el área interior en función de los medios nutritivos. Los datos resaltados en rojo representan diferencias significativas.

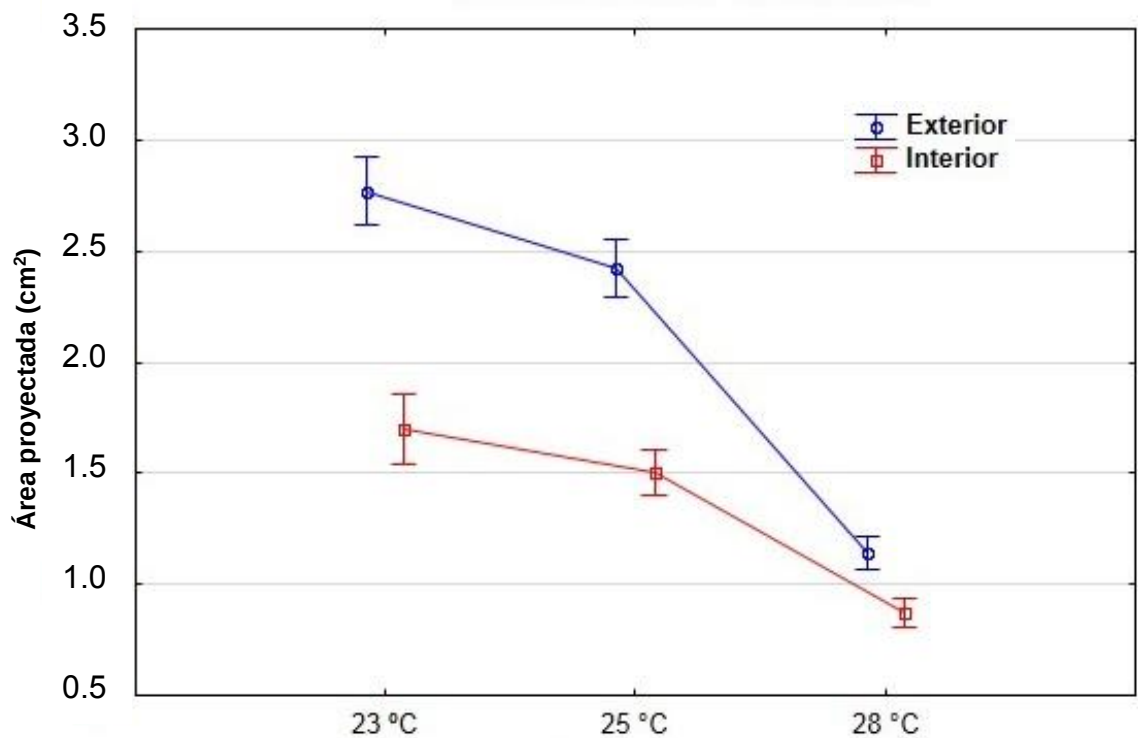
	PDA	MMN	BAF
PDA		0.000142	0.000158
MMN	0.000142		0.994203
BAF	0.000158	0.994203	

Cuadro 13. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área interior en función de los medios nutritivos.

Medio	Medias	a	b
PDA	1045.140		****
BAF	1508.119	****	
MMN	1518.728	****	

Al agrupar los datos en función de las temperaturas se pone en evidencia que, tanto para las áreas exterior como interior, el diámetro aumenta en relación al decremento en la temperatura. Al mismo tiempo, cuando las temperaturas disminuyen los valores de las áreas interior y exterior se hacen más distantes (Figura 14). Dado que *L. trichodermophora* es un HEM nativo de bosques de alta montaña (> 3,000 msnm) es de esperar que se desarrolle bien a temperaturas de 23° a 25° C y no en temperaturas superiores a 35° C como otros MOs. El análisis de varianza del área proyectada en función de las temperaturas encuentra diferencias en los tres grupos para el área exterior, mientras que sólo detecta diferencias para el grupo de 28° C en el área interior ($F_{6, 212} = 37.373$, $p = 0.000$) (Figura 14). Los valores de la prueba *post hoc* Tukey y los grupos homogéneos se presentan en los cuadros 14 a 17.

Figura 15. Análisis de varianza, efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las áreas exterior e interior. F= 37.373, p = 0.00.



Las marcas centrales representan los promedios de los tratamientos y los segmentos representan los errores estándar.

Cuadro 14. Prueba Tukey *post hoc* al análisis de varianza para el área exterior en función de temperaturas. Los datos resaltados en rojo representan diferencias significativas.

	23 °C	25°C	28°C
23 °C		0.001117	0.000114
25 °C	0.001117		0.000114
28 °C	0.000114	0.000114	

Cuadro 15. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área exterior en función de temperaturas.

Temperatura	Medias	a	b	c
28 °C	1141.328	****		
25 °C	2422.418		****	
23 °C	2770.316			****

Cuadro 16. Prueba Tukey *post hoc* al análisis de varianza para el área interior en función de temperaturas. Los datos resaltados en rojo representan diferencias significativas.

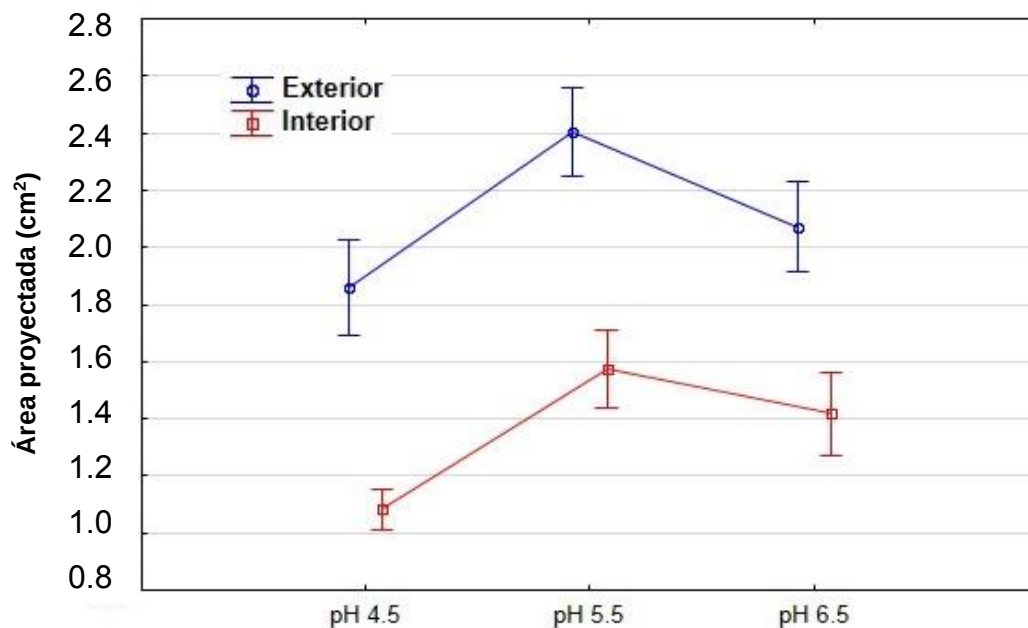
	23 °C	25 °C	28 °C
23 °C		0.157902	0.000114
25 °C	0.157902		0.000114
28 °C	0.000114	0.000114	

Cuadro 17. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área interior en función de temperaturas.

Temperatura	Medias	A	B
28 °C	870.023		****
25 °C	1505.981	****	
23 °C	1695.983	****	

Al agrupar los datos en función del pH y hacer el análisis de varianza ($F_{6, 212} = 6.9816$, $p = 0.000$), se detectó que para el área exterior el único grupo diferente fue el de pH 5.5, donde se encontró un mayor crecimiento. Mientras que para el área interior las diferencias se encontraron en el grupo de 4.5, que presentó el crecimiento más bajo. (Figura 15). Los valores de la prueba *post hoc* Tukey y los grupos homogéneos se presentan en los cuadros 18 a 21.

Figura 16. Análisis de varianza, efecto del pH sobre el crecimiento de las áreas exterior e interior. $F= 6.9816$, $p = 0.00$.



Las marcas centrales representan los promedios de los tratamientos y los segmentos representan los errores estándar.

Cuadro 18. Prueba Tukey *post hoc* al análisis de varianza para el área exterior en función de los pH. Los datos resaltados en rojo representan diferencias significativas.

	pH 4.5	pH 5.5	pH 6.5
pH 4.5		0.000114	0.070424
pH 5.5	0.000114		0.001925
pH 6.5	0.070424	0.001925	

Cuadro 19. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área exterior en función de los pH.

pH	Medias	a	b
pH 4.5	1860.664	****	
pH 6.5	2070.958	****	
pH 5.5	2402.441		****

Cuadro 20. Prueba Tukey *post hoc* al análisis de varianza para el área interior en función de los pH. Los datos resaltados en rojo representan diferencias significativas.

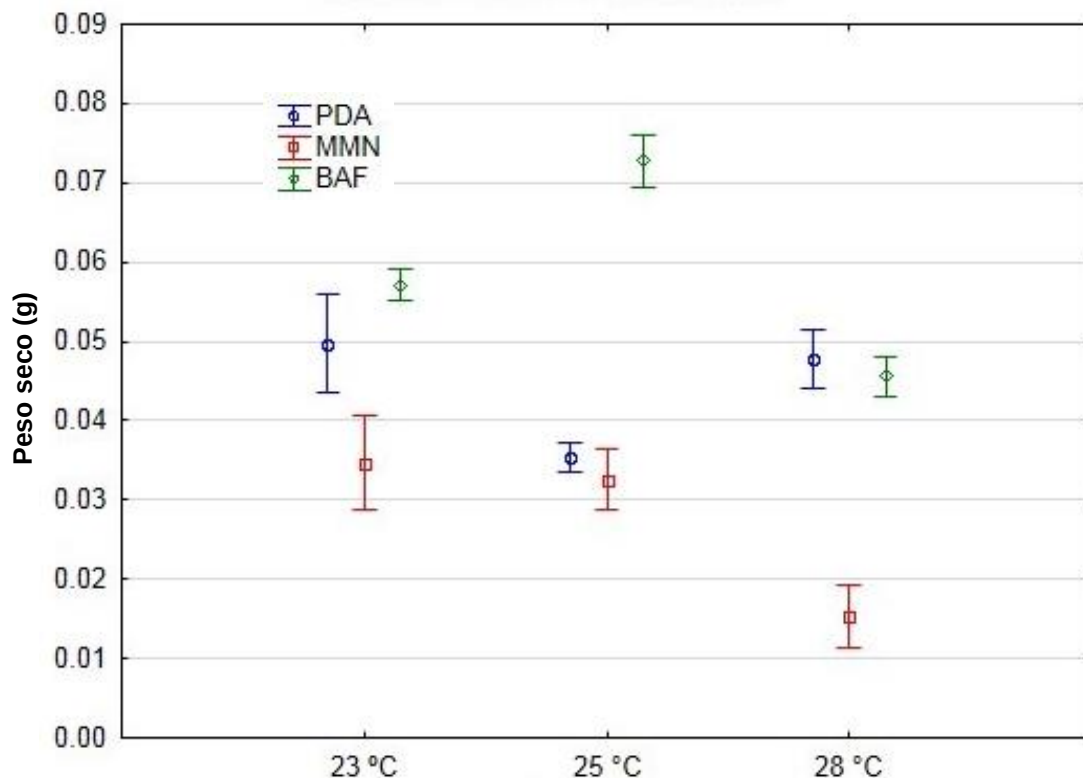
	pH 4.5	pH 5.5	pH 6.5
pH 4.5		0.000130	0.004525
pH 5.5	0.000130		0.290594
pH 6.5	0.004525	0.290594	

Cuadro 21. Prueba Tukey, grupos homogéneos para el área interior en función de los pH.

pH	Medias	A	B
pH 4.5	1083.769		****
pH 6.5	1416.680	****	
pH 5.5	1571.537	****	

Ya se ha dicho aquí que no hubo relaciones entre los valores de área y biomasa, por lo que análisis de varianza similares se hicieron para peso seco. En este análisis de varianza se disgregaron los tratamientos de cada medio de cultivo y se analizaron en función de la temperatura ($F_{12, 280.74} = 9.0553$, $p = 0.000$). Se detectaron diferencias para el tratamiento de MMN a 28° C, y este fue el de menor acumulación de biomasa. BAF a 23° y 25° C conformaron el grupo con mayor acumulación de biomasa. Los valores de la prueba *post hoc* Tukey y los grupos homogéneos se presentan en los cuadros 22 y 23.

Figura 17. Análisis de varianza, efecto del medio nutritivo y la temperatura sobre el peso seco. $F = 9.0553$, $p = 0.00$.



Las marcas centrales representan los promedios de los tratamientos y los segmentos representan los errores estándar.

Cuadro 22. Prueba Tukey *post hoc* al análisis de varianza para pesos secos en función de medios nutritivos y temperaturas. Los datos resaltados en rojo representan diferencias significativas.

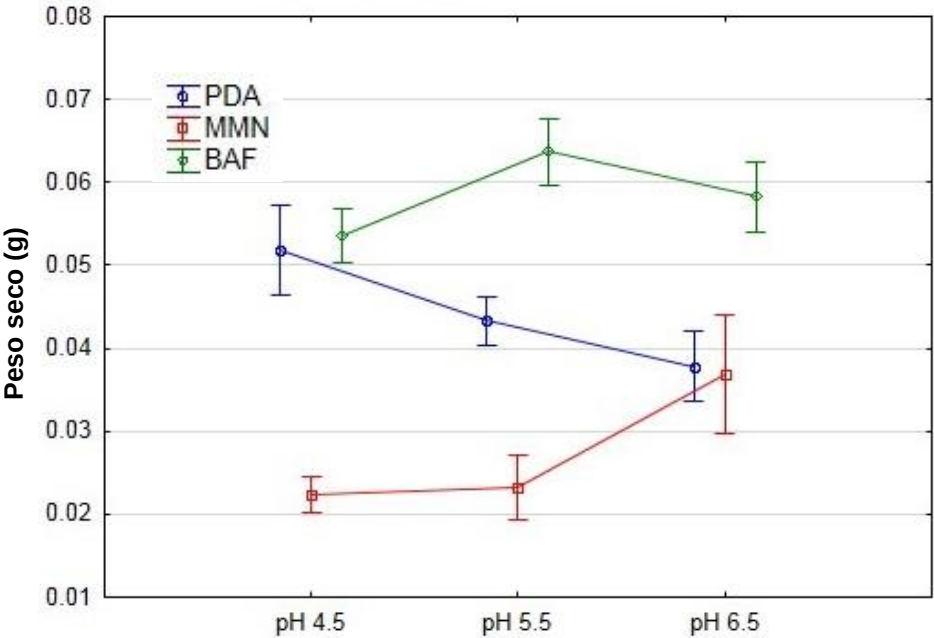
Tratamiento			1	2	3	4	5	6	7	8	9
23 °C	PDA	1		0.081035	0.870032	0.111038	0.025720	0.000556	0.999990	0.000131	0.996412
23 °C	MMN	2	0.081035		0.000789	1.000000	0.999977	0.000131	0.192615	0.006518	0.429391
23 °C	BAF	3	0.870032	0.000789		0.001221	0.000251	0.060782	0.661000	0.000131	0.368017
25 °C	PDA	4	0.111038	1.000000	0.001221		0.999824	0.000131	0.249185	0.004249	0.513804
25 °C	MMN	5	0.025720	0.999977	0.000251	0.999824		0.000131	0.072415	0.024244	0.204143
25 °C	BAF	6	0.000556	0.000131	0.060782	0.000131	0.000131		0.000221	0.000131	0.000143
28 °C	PDA	7	0.999990	0.192615	0.661000	0.249185	0.072415	0.000221		0.000131	0.999962
28 °C	MMN	8	0.000131	0.006518	0.000131	0.004249	0.024244	0.000131	0.000131		0.000131
28 °C	BAF	9	0.996412	0.429391	0.368017	0.513804	0.204143	0.000143	0.999962	0.000131	

Cuadro 23. Prueba Tukey, grupos homogéneos para pesos secos en función de medios nutritivos y temperaturas.

Tratamiento	Temperatura	Medio	Medias	a	b	c	d	e
8	28 °C	MMN	0.015293	****				
5	25 °C	MMN	0.032567		****			
2	23 °C	MMN	0.034653		****	****		
4	25 °C	PDA	0.035293		****	****		
9	28 °C	BAF	0.045647		****	****	****	
7	28 °C	PDA	0.047873		****	****	****	
1	23 °C	PDA	0.049740			****	****	
3	23 °C	BAF	0.057133				****	****
6	25 °C	BAF	0.072773					****

Al hacer el mismo análisis de varianza ($F_{4, 126} = 3.6305$, $p = 0.00778$), pero en función del pH el medio BAF alcanzó valores elevados en todos los casos, mientras que MMN presentó los valores bajos. BAF con pH 5.5 fue el de mayor biomasa, con diferencias significativas con los demás tratamientos, excepto con los otros tratamientos de BAF y el de PDA pH 4.5 (Figura 17). Los valores de la prueba *post hoc* Tukey y los grupos homogéneos se presentan en los cuadros 24 y 25.

Figura 18. Análisis de varianza, efecto del medio nutritivo y pH sobre el peso seco. F= 3.6305, p = 0.00778.



Las marcas centrales representan los promedios de los tratamientos y los segmentos representan los errores estándar.

Cuadro 24. Prueba Tukey *post hoc* al análisis de varianza para pesos secos en función de medios nutritivos y temperaturas. Los datos resaltados en rojo representan diferencias significativas.

			1	2	3	4	5	6	7	8	9
PDA	pH 4.5	1		0.907014	0.369155	0.000102	0.000165	0.278566	0.999998	0.598416	0.981063
PDA	pH 5.5	2	0.907014		0.994011	0.020611	0.032625	0.982732	0.763400	0.027177	0.270394
PDA	pH 6.5	3	0.369155	0.994011		0.230698	0.305798	1.000000	0.206939	0.000999	0.026613
MMN	pH 4.5	4	0.000102	0.020611	0.230698		1.000000	0.312678	0.000024	0.000010	0.000010
MMN	pH 5.5	5	0.000165	0.032625	0.305798	1.000000		0.400451	0.000040	0.000010	0.000011
MMN	pH 6.5	6	0.278566	0.982732	1.000000	0.312678	0.400451		0.145512	0.000525	0.015961
BAF	pH 4.5	7	0.999998	0.763400	0.206939	0.000024	0.000040	0.145512		0.791109	0.998002
BAF	pH 5.5	8	0.598416	0.027177	0.000999	0.000010	0.000010	0.000525	0.791109		0.994304
BAF	pH 6.5	9	0.981063	0.270394	0.026613	0.000010	0.000011	0.015961	0.998002	0.994304	

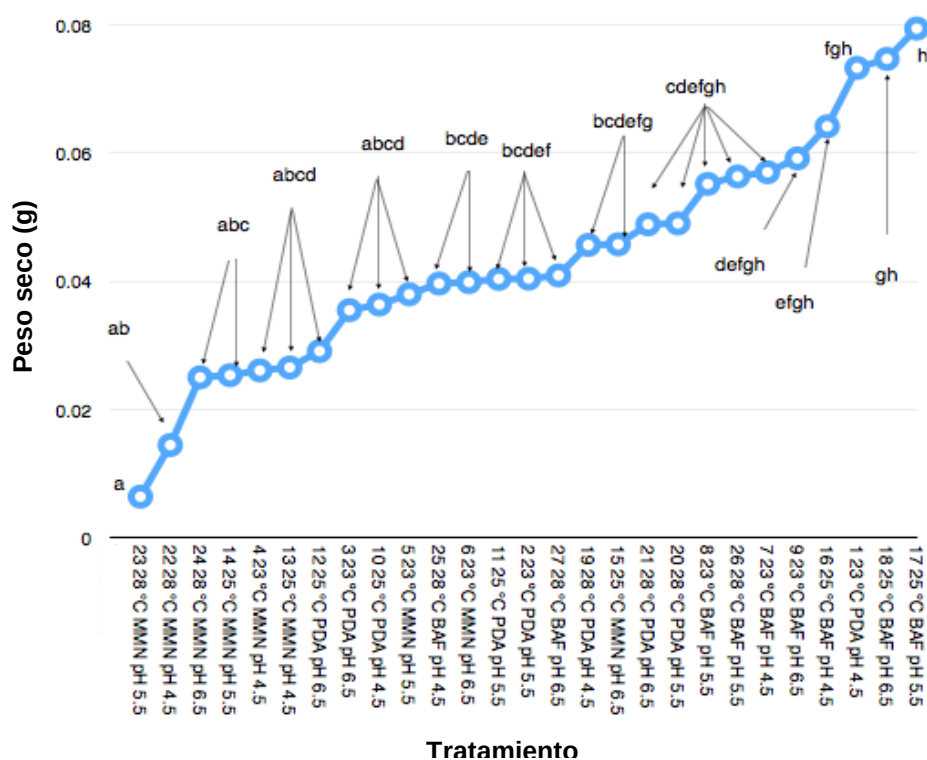
Cuadro 25. Prueba Tukey, grupos homogéneos para pesos secos en función de medios nutritivos y temperaturas.

Tratamiento	Medio	pH	Medias	a	b	c	d
4	MMN	pH 4.5	0.022373	****			
5	MMN	pH 5.5	0.023247	****			
6	MMN	pH 6.5	0.036893	****	****		
3	PDA	pH 6.5	0.037840	****	****		
2	PDA	pH 5.5	0.043280		****	****	
1	PDA	pH 4.5	0.051787		****	****	****
7	BAF	pH 4.5	0.053620		****	****	****
9	BAF	pH 6.5	0.058267			****	****
8	BAF	pH 5.5	0.063667				****

Finalmente, se realizó el análisis de varianza para cada tratamiento y se presenta gráficamente la comparación de peso seco (Figura 18). Destacaron los tratamientos BAF, 25° C con pH de 5.5 y 6.5, así como PDA 23° pH 4.5 (Figura 18). Los valores de la prueba *post hoc* Tukey y los grupos homogéneos se presentan en los cuadros 26 y 27.

Con los resultados de esta cinética se decidió usar BAF, 25° C, pH 5.5 para realizar las siguientes exploraciones en medio líquido.

Figura 19. Promedios de los pesos secos en cada tratamiento en medio sólido. Las letras representan los grupos homogéneos.



Cuadro 26. Prueba Tukey *post hoc* al análisis de varianza para pesos secos de cada tratamiento. Los datos resaltados en rojo representan diferencias significativas.

				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
23 °C	PDA	pH 4.5	1		0.05 6563	0.00 9125	0.00 0300	0.02 3804	0.04 7041	0.98 2498	0.94 2877	0.99 7457	0.01 2921	0.05 5804	0.00 0704	0.00 0330	0.00 0264	0.26 9819	0.99 9999	1.00 0000	1.00 0000	0.26 3394	0.52 4363	0.51 2204	0.00 0182	0.00 0182	0.00 0252	0.04 3585	0.97 2015	0.06 6839
23 °C	PDA	pH 5.5	2	0.05 6563		1.00 0000	0.99 6866	1.00 0000	1.00 0000	0.97 7894	0.99 5058	0.91 8918	1.00 0000	1.00 0000	0.99 9936	0.99 8070	0.99 3603	1.00 0000	0.56 8031	0.00 5564	0.03 4770	1.00 0000	1.00 0000	1.00 0000	0.38 2176	0.03 8136	0.99 1376	1.00 0000	0.98 6526	1.00 0000
23 °C	PDA	pH 6.5	3	0.00 9125	1.00 0000		0.99 9998	1.00 0000	1.00 0000	0.75 5270	0.87 4540	0.57 5028	1.00 0000	1.00 0000	0.99 9999	0.99 9992	0.99 9989	0.20 1432	0.00 0767	0.00 5170	0.99 9991	0.99 8662	0.99 8869	0.79 0590	0.18 0005	0.99 9984	1.00 0000	0.80 3177	1.00 0000	
23 °C	MMN	pH 4.5	4	0.00 0300	0.99 6866	0.99 9998		0.99 9845	0.99 8237	0.10 6332	0.18 0005	0.05 2856	0.99 9989	0.99 6991	1.00 0000	1.00 0000	1.00 0000	0.87 5612	0.00 8156	0.00 0185	0.00 0235	0.88 0889	0.63 9301	0.65 1281	0.99 9891	0.87 4540	1.00 0000	0.99 8631	0.12 9581	0.99 4869
23 °C	MMN	pH 5.5	5	0.02 3804	1.00 0000	1.00 0000	0.99 9845		1.00 0000	0.90 6982	0.96 6344	0.77 9090	1.00 0000	1.00 0000	0.99 9999	0.99 9923	0.99 9567	1.00 0000	0.36 3527	0.00 2039	0.01 3971	1.00 0000	0.99 9957	0.99 9966	0.58 9011	0.08 6602	0.99 9333	1.00 0000	0.93 3414	1.00 0000
23 °C	MMN	pH 6.5	6	0.04 7041	1.00 0000	1.00 0000	0.99 8237	1.00 0000		0.96 8045	0.99 1950	0.89 4930	1.00 0000	1.00 0000	0.99 9974	0.99 8970	0.99 6170	1.00 0000	0.52 0885	0.00 4456	0.02 8610	1.00 0000	0.99 9999	0.99 9999	0.42 5767	0.04 6075	0.99 4674	1.00 0000	0.97 9721	1.00 0000
23 °C	BAF	pH 4.5	7	0.98 2498	0.97 7894	0.75 5270	0.10 6332	0.90 6982	0.96 8045		1.00 0000	1.00 0000	0.81 8039	0.97 7259	0.24 5927	0.12 2144	0.08 4433	0.99 9942	1.00 0000	0.68 3323	0.95 5208	0.99 9932	1.00 0000	1.00 0000	0.00 1312	0.00 0200	0.07 5714	0.96 3200	1.00 0000	0.98 4740
23 °C	BAF	pH 5.5	8	0.94 2877	0.99 5058	0.87 4540	0.18 0005	0.96 6344	0.99 1950	1.00 0000		1.00 0000	0.91 6452	0.99 4869	0.37 2797	0.20 3564	0.14 6373	0.99 9998	0.99 9999	0.52 6104	0.88 5013	0.99 9998	1.00 0000	1.00 0000	0.00 2740	0.00 0230	0.13 2654	0.99 0280	1.00 0000	0.99 6991
23 °C	BAF	pH 6.5	9	0.99 7457	0.91 8918	0.57 5028	0.05 2856	0.77 9090	0.89 4930	1.00 0000	1.00 0000		0.65 1281	0.91 7280	0.13 7381	0.06 1717	0.04 0924	0.99 8869	1.00 0000	0.84 2286	0.99 0442	0.99 8722	0.99 9992	0.99 9989	0.00 0581	0.00 0187	0.03 6289	0.88 3991	1.00 0000	0.93 7599
25 °C	PDA	pH 4.5	10	0.01 2921	1.00 0000	1.00 0000	0.99 9989	1.00 0000	0.81 8039	0.91 6452	0.65 1281		1.00 0000	1.00 0000	0.99 9996	0.99 9959	0.99 9998	0.25 2074	0.00 1082	0.00 7403	0.99 9998	0.99 9544	0.99 9621	0.72 4094	0.14 0602	0.99 9930	1.00 0000	0.85 8950	1.00 0000	
25 °C	PDA	pH 5.5	11	0.05 5804	1.00 0000	1.00 0000	0.99 6991	1.00 0000	0.97 7259	0.99 4869	0.91 7280	1.00 0000		0.99 9940	0.99 8158	0.99 3830	1.00 0000	0.56 4533	0.00 5474	0.03 4276	1.00 0000	1.00 0000	1.00 0000	0.38 5326	0.03 8682	0.99 1667	1.00 0000	0.98 6096	1.00 0000	
25 °C	PDA	pH 6.5	12	0.00 0704	0.99 9936	1.00 0000	1.00 0000	0.99 9999	0.99 9974	0.24 5927	0.37 2797	0.13 7381	1.00 0000	0.99 9940		1.00 0000	1.00 0000	0.97 6936	0.02 6206	0.00 0203	0.00 0444	0.97 8516	0.86 2381	0.87 0196	0.99 5600	0.65 8089	1.00 0000	0.99 9982	0.28 8425	0.99 9862
25 °C	MMN	pH 4.5	13	0.00 0330	0.99 8070	0.99 9999	1.00 0000	0.99 9923	0.99 8970	0.12 2144	0.20 3564	0.06 1717	0.99 9996	0.99 8158	1.00 0000		1.00 0000	0.89 8739	0.00 9801	0.00 0187	0.00 0256	0.90 3374	0.67 8317	0.68 9963	0.99 9787	0.84 8354	1.00 0000	0.99 9208	0.14 8056	0.99 6738
25 °C	MMN	pH 5.5	14	0.00 0264	0.99 3603	0.99 9992	1.00 0000	0.99 9567	0.99 6170	0.08 4433	0.14 6373	0.04 0924	0.99 9959	0.99 3830	1.00 0000	1.00 0000		0.83 2301	0.00 6045	0.00 0184	0.00 0218	0.83 8582	0.57 5028	0.58 7265	0.99 9967	0.91 0502	1.00 0000	0.99 6929	0.10 3758	0.99 0116
25 °C	MMN	pH 6.5	15	0.26 9819	1.00 0000	0.99 9989	0.87 5612	1.00 0000	0.99 9942	0.99 9998	0.99 8869	0.99 9998	1.00 0000	0.97 6936	0.89 8739	0.83 2301		0.93 2700	0.04 3282	0.18 8972	1.00 0000	1.00 0000	1.00 0000	0.09 3977	0.00 4799	0.81 0005	1.00 0000	0.99 9981	1.00 0000	
25 °C	BAF	pH 4.5	16	0.99 9999	0.56 8031	0.20 1432	0.00 8156	0.36 3527	0.52 0885	1.00 0000	0.99 9999	1.00 0000	0.25 2074	0.56 4533	0.02 6206	0.00 9801	0.00 6045	0.93 2700		0.99 2359	0.99 9983	0.92 9043	0.99 3127	0.99 2225	0.00 0211	0.00 0182	0.00 5255	0.50 1822	1.00 0000	0.61 1655
25 °C	BAF	pH 5.5	17	1.00 0000	0.00 5564	0.00 0767	0.00 0185	0.00 2039	0.00 4456	0.68 3323	0.52 6104	0.84 2286	0.00 1082	0.00 5474	0.00 0203	0.00 0187	0.00 0184	0.04 3282	0.99 2359		1.00 0000	0.04 1793	0.12 4338	0.11 9266	0.00 0182	0.00 0182	0.00 0184	0.00 4071	0.62 7247	0.00 6829
25 °C	BAF	pH 6.5	18	1.00 0000	0.03 4770	0.00 5170	0.00 0235	0.01 3971	0.02 8610	0.95 5208	0.88 5013	0.99 0442	0.00 7403	0.03 4276	0.00 0444	0.00 0256	0.00 0218	0.18 8972	0.99 9983	1.00 0000		0.18 3951	0.40 6083	0.39 4846	0.00 0182	0.00 0182	0.00 0212	0.02 6399	0.93 4838	0.04 1502
28 °C	PDA	pH 4.5	19	0.26 3394	1.00 0000	0.99 9991	0.88 0889	1.00 0000	0.99 9932	0.99 9998	0.99 8722	0.99 9998	1.00 0000	0.97 8516	0.90 3374	0.83 8582	1.00 0000	0.92 9043	0.04 1793	0.18 3951		1.00 0000	1.00 0000	0.09 6948	0.00 5000	0.81 6713	1.00 0000	0.99 9977	1.00 0000	
28 °C	PDA	pH 5.5	20	0.52 4363	1.00 0000	0.99 8662	0.63 9301	0.99 9957	0.99 9999	1.00 0000	0.99 9992	0.99 9544	1.00 0000	0.86 2381	0.67 8317	0.57 5028	1.00 0000	0.99 3127	0.12 4338	0.40 6083	1.00 0000		1.00 0000	0.03 1219	0.00 1272	0.54 5293	0.99 9998	1.00 0000	1.00 0000	
28 °C	PDA	pH 6.5	21	0.51 2204	1.00 0000	0.99 8869	0.65 1281	0.99 9966	0.99 9999	1.00 0000	1.00 0000	0.99 9989	0.99 9621	1.00 0000	0.87 0196	0.68 9963	0.58 7265	1.00 0000	0.99 2225	0.11 9266	0.39 4846	1.00 0000	1.00 0000		0.03 2833	0.00 1343	0.55 7536	0.99 9999	1.00 0000	1.00 0000
28 °C	MMN	pH 4.5	22	0.00 0182	0.38 2176	0.79 0590	0.99 9891	0.58 9011	0.42 5767	0.00 1312	0.00 2740	0.00 0581	0.72 4094	0.38 5326	0.99 9787	0.99 9967	0.09 3977	0.00 0211	0.00 0182	0.00 0182	0.09 6948	0.03 1219	0.03 2833		1.00 0000	0.99 9982	0.44 3990	0.00 1706	0.34 3857	

				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
28 °C	MMN	pH 5.5	23	0.00	0.03	0.18	0.87	0.08	0.04	0.00	0.00	0.00	0.14	0.03	0.65	0.84	0.91	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00		0.92	0.04	0.00	0.03
				0182	8136	0005	4540	6602	6075	0200	0230	0187	0602	8682	8089	8354	0502	4799	0182	0182	0182	5000	1272	1343	0000			4486	9704	0207	1902
28 °C	MMN	pH 6.5	24	0.00	0.99	0.99	1.00	0.99	0.99	0.07	0.13	0.03	0.99	0.99	1.00	1.00	1.00	0.81	0.00	0.00	0.00	0.81	0.54	0.55	0.99	0.92			0.99	0.09	0.98
				0252	1376	9984	0000	9333	4674	5714	2654	6289	9930	1667	0000	0000	0000	0005	5255	0184	0212	6713	5293	7536	9982	4486			5683	3392	6945
28 °C	BAF	pH 4.5	25	0.04	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.96	0.99	0.88	1.00	1.00	0.99	0.99	0.99	1.00	0.50	0.00	0.02	1.00	0.99	0.99	0.44	0.04	0.99			0.97	1.00
				3585	0000	0000	8631	0000	0000	3200	0280	3991	0000	0000	9982	9208	6929	0000	1822	4071	6399	0000	9998	9999	3990	9704	5683			6280	0000
28 °C	BAF	pH 5.5	26	0.97	0.98	0.80	0.12	0.93	0.97	1.00	1.00	1.00	0.85	0.98	0.28	0.14	0.10	0.99	1.00	0.62	0.93	0.99	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.97			0.99
				2015	6526	3177	9581	3414	9721	0000	0000	0000	8950	6096	8425	8056	3758	9981	0000	7247	4838	9977	0000	0000	1706	0207	3392	6280			1072
28 °C	BAF	pH 6.5	27	0.06	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.98	0.99	0.93	1.00	1.00	0.99	0.99	0.99	1.00	0.61	0.00	0.04	1.00	1.00	1.00	0.34	0.03	0.98	1.00	0.99		
				6839	0000	0000	4869	0000	0000	4740	6991	7599	0000	0000	9862	6738	0116	0000	1655	6829	1502	0000	0000	0000	3857	1902	6945	0000	1072		

Cuadro 27. Prueba Tukey, grupos homogéneos para pesos secos de cada tratamiento.

Tratamiento	Medias	a	b	c	d	e	f	g	h
23 28 °C MMN pH 5.5	0.006400	****							
22 28 °C MMN pH 4.5	0.014460	****	****						
24 28 °C MMN pH 6.5	0.025020	****	****	****					
14 25 °C MMN pH 5.5	0.025360	****	****	****					
4 23 °C MMN pH 4.5	0.026100	****	****	****	****				
13 25 °C MMN pH 4.5	0.026560	****	****	****	****				
12 25 °C PDA pH 6.5	0.029120	****	****	****	****				
3 23 °C PDA pH 6.5	0.035500	****	****	****	****	****			
10 25 °C PDA pH 4.5	0.036380	****	****	****	****	****			
5 23 °C MMN pH 5.5	0.037980	****	****	****	****	****			
25 28 °C BAF pH 4.5	0.039660		****	****	****	****			
6 23 °C MMN pH 6.5	0.039880		****	****	****	****			
11 25 °C PDA pH 5.5	0.040380		****	****	****	****	****		
2 23 °C PDA pH 5.5	0.040420		****	****	****	****	****	****	
27 28 °C BAF pH 6.5	0.040920		****	****	****	****	****	****	
19 28 °C PDA pH 4.5	0.045680		****	****	****	****	****	****	****
15 25 °C MMN pH 6.5	0.045780		****	****	****	****	****	****	****
21 28 °C PDA pH 6.5	0.048900			****	****	****	****	****	****
20 28 °C PDA pH 5.5	0.049040			****	****	****	****	****	****
8 23 °C BAF pH 5.5	0.055200			****	****	****	****	****	****
26 28 °C BAF pH 5.5	0.056360			****	****	****	****	****	****
7 23 °C BAF pH 4.5	0.057020			****	****	****	****	****	****
9 23 °C BAF pH 6.5	0.059180				****	****	****	****	****
16 25 °C BAF pH 4.5	0.064180					****	****	****	****
1 23 °C PDA pH 4.5	0.073300						****	****	****
18 25 °C BAF pH 6.5	0.074700							****	****
17 25 °C BAF pH 5.5	0.079440								****

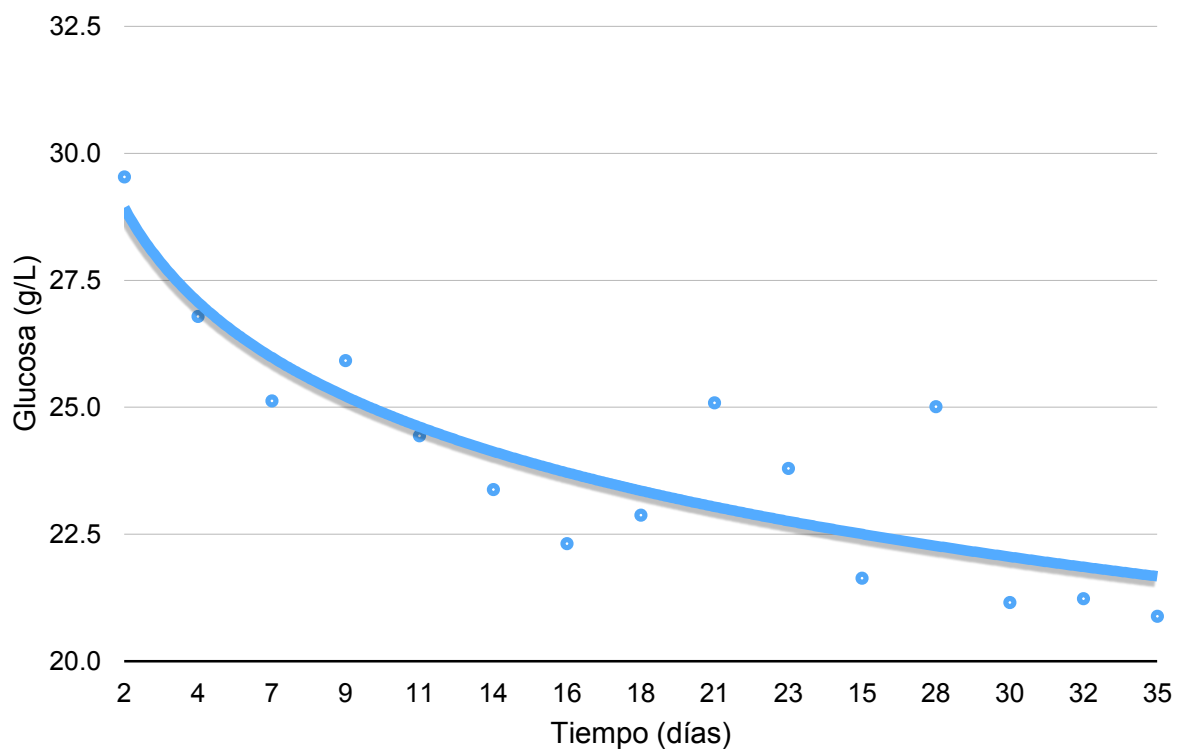
En este trabajo se reportan por primera vez las características morfológicas de las colonias de *Laccaria trichodermophora*, así como su desempeño en crecimiento en medio nutritivo. No obstante, los resultados son muy similares a los reportados previamente para *L. bicolor* aislada de La Malinche, Tlaxcala, en PDA y MMN (Santiago-Martínez *et al.* 2003).

8.4 Experimento 2: Cinética en medio líquido en matraz

Esta cinética se diseñó para abordar el objetivo 2 (determinar las mejores condiciones de crecimiento, en cuanto a pH medio nutritivo, temperatura, agitación y porcentaje de inóculo iniciador del cultivo, que generan alta producción de biomasa de la cepa EF32 de *L. trichodermyces*), pero particularmente para evaluar la capacidad de reactivación de EF36 posterior a la congelación con glicerol 10%. La cinética tuvo una duración de 35 días, durante los cuales la cepa creció en las condiciones resultantes de la cinética anterior, con un volumen de inoculación de 6.7% a 100 rpm de agitación orbital en matraz *bafleado*.

De los tratamientos con glicerol 10% ninguno presentó recuperación, mientras que el tratamiento testigo (resiembras periódicas y almacenado a 25° C) fue el único que presentó crecimiento.

Figura 20. Cinética del consumo de sustrato en el cultivo de EF36 en matraz.



El glicerol es un componente no tóxico, presente en el metabolismo celular de los lípidos y en la fermentación alcohólica. Posiblemente, la causa de la inhibición del crecimiento de la cepa fue el aumento en la presión osmótica.

La cinética del consumo de sustrato de este experimento se presenta en la figura 19. Se obtuvo una $Y_{X/S} = 0.253 \text{ g}_B/\text{g}_S$. Este rendimiento indica que el consumo del sustrato es proporcionalmente el doble que la producción de biomasa. Kuek (1996) reportó $Y_{X/S} = 0.63$ y $0.74 \text{ g}_B/\text{g}_S$ para la cepa E439 *L. laccata*. Él usó como medio base (g/L), peptona 10.0, extracto de levadura 2.0, NH_4NO_3 3.0, KH_2PO_4 2.38, K_2HPO_4 5.65, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0064, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0011, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0019, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0015. Al comparar la composición de los medios usados por Kuek (1996), y los usados en este trabajo, se identifican varias diferencias importantes. En primera instancia los contenidos de peptona de Kuek (1996) superan a los del BAF (10 vs 2 g/L, respectivamente), lo mismo ocurre con el extracto de levadura (2 vs 0.2 g/L, respectivamente). Otras diferencias son que el medio usado por Kuek (1996) contiene K_2HPO_4 , NH_4NO_3 , FeSO_4 , MnCl_2 y CuSO_4 , mientras que carece de CaCl_2 , FeCl_3 , MnSO_4 , tiamina, biotina, ácido fólico e inositol. Esto pone en evidencia que para BAF no hay una fuente de N específica, es decir, todo el N proviene de la peptona y del extracto de levadura. Además de las importantes diferencias en las concentraciones de peptona y extracto de levadura, Kuek (1996) detecta dos comportamientos de su cepa en cultivo, que podrían explicar los bajos rendimientos alcanzados en los experimentos 2, 3 y 4. Uno de ellos, tal vez el más importante es la concentración de glucosa. BAF contiene 30 g/L, mientras que Kuek (1996) probó concentraciones de 10 y 20 g/L, detectando que la $Y_{X/S}$ aumentó en relación al decremento del sustrato. En el presente trabajo no se alcanzó un consumo total del sustrato, lo que indica que este elemento se encontró en cantidades excesivas. Aunado a esto Kusuda *et al.* (2007) reportan que el estrés osmótico generado por altas concentraciones de glucosa inhiben el crecimiento micelial de *T. matsutake*, un pariente cercano de *Laccaria*.

El otro factor fue la presencia de sales fosfatadas. Para Kuek (1996) 2.38 de KH_2PO_4 mas 5.65 de K_2HPO_4 contra 0.5 de KH_2PO_4 para BAF (g/L), es decir BAF contiene concentraciones un orden de magnitud debajo. No obstante, Kuek (1996) reporta que la disminución de la concentración de fosfato en las cinéticas con E439 de *L. laccata* generan un incremento en el 10% del rendimiento. Estas concentraciones son sin considerar los aportes en cuanto a P que hacen el extracto de levadura y la peptona.

También se debe destacar que el volumen de llenado de los matraces (300 ml en matraces de 500 ml) pudo propiciar una deficiente transferencia de O₂, ya que la relación área volumen fue muy baja, y a su vez la turbulencia generada por los *baffles* pudo no ser suficiente.

En el presente trabajo la duración de la fermentación fue de 35 días, aunque se detectó que el tiempo de un consumo rápido del sustrato se encuentra a las dos semanas. Al ajustar los datos a la ecuación de la curva exponencial no se detecta un momento de consumo de sustrato tipo exponencial, o el valor indica que el comportamiento exponencial aparecerá en cultivos de varios meses de duración, lo cual no es operativamente posible ni rentable.

8.5 Experimento 3: Cinética en medio líquido en tubos falcon

Esta cinética se diseñó para abordar el objetivo 2 (determinar las mejores condiciones de crecimiento, en cuanto a pH medio nutritivo, temperatura, agitación y porcentaje de inóculo iniciador del cultivo, que generan alta producción de biomasa de la cepa EF32 de *L. trichoderophora*), pero particularmente se usó para conocer la respuesta de EF36 al porcentaje de inoculación con el que se inició la fermentación.

En las figuras 20 y 21 se presentan las cinéticas de consumo de sustrato y de acumulación de biomasa. A diferencia de la cinética 2, en la que únicamente se tomaron datos sobre el consumo de sustrato, en esta ocasión, y dada la naturaleza destructiva del diseño experimental, se tomaron datos longitudinales tanto de consumo de sustrato como de biomasa producida (Figuras 20 y 21).

Figura 21. Experimento 3. Cinética de acumulación de biomasa en el cultivo de EF36 en tubos.

2% $Y = 2.8932 \cdot 0.0176^x$, $R^2 = 0.3211$, 20% $y = 3.2486 \cdot 0.0144^x$ $R^2 = 0.2086$.

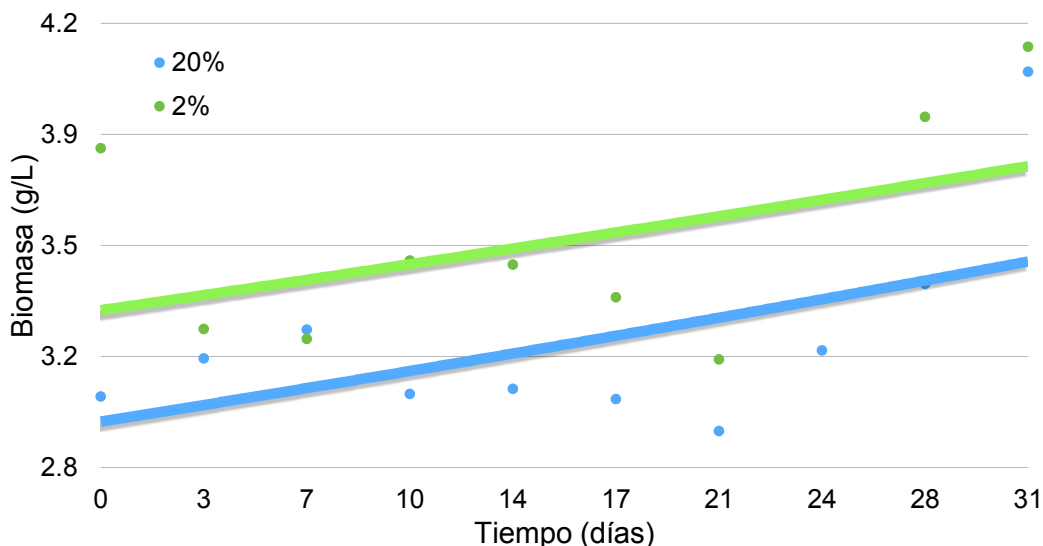
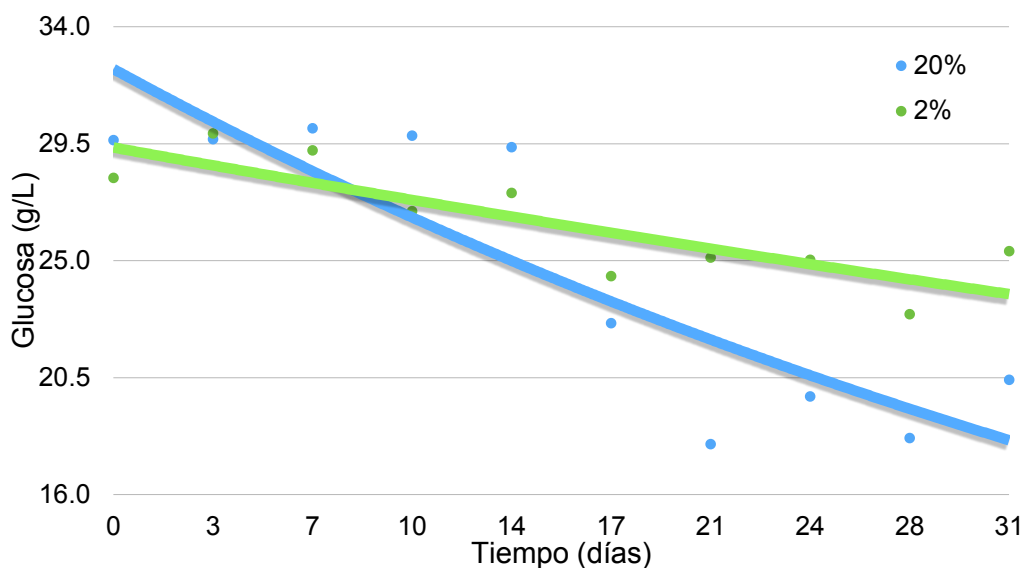


Figura 22. Experimento 3. Cinética del consumo de sustrato en el cultivo de EF36 en tubos.

2% $y = 34.535^{-0.0646x}$, $R^2 = 0.7549$, 20% $y = 30.056^{-0.0237x}$, $R^2 = 0.7075$.



En este experimento se obtuvieron $Y_{X/S} = 0.119$ y 0.289 g_B/g_S (20 y 2 % de inóculo iniciador, respectivamente). Es decir el mejor rendimiento en este caso se obtuvo con 2% de inoculación. Kuek (1996) reportó mejores rendimientos a 4% de inoculación contra 10%, no obstante, encuentra que la fermentación de 10% consume la totalidad del sustrato, antes que la de 4%, pero la de 4% genera mayor biomasa y entra en fase exponencial antes. Estos resultados se asemejan a los obtenidos en este trabajo, donde a pesar de no encontrar un consumo total del sustrato, ni una fase exponencial definida, el tratamiento de 2% produjo 1.618 g/L de biomasa, mientras que el de 20% produjo 0.356 g/L.

Los valores de $Y_{X/S}$ menores a los obtenidos en el experimento 2 pudieron deberse al tipo de recipiente en el que se desempeñó el cultivo; en el caso anterior se usaron matraces en los que el volumen del caldo dejó suficiente espacio para aire en el interior del matraz, mientras que en este caso los tubos falcon contenían menos aire proporcionalmente. Además los baffles en el fondo del matraz propician turbulencia, lo que da una mejor mezcla que los tubos lisos.

8.6 Experimento 4: Cinética en biorreactor

Para abordar el objetivo 3 (evaluar el crecimiento de la cepa EF32 de *L. trichodermophora* en un biorreactor agitado mecánicamente).

La duración de la fermentación, la composición del medio y las condiciones de cultivo se decidieron con base en los experimentos anteriores. En las figuras 22 y 23 se presentan las cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato de EF36 en biorreactor.

Figura 23. Experimento 4. Cinética de acumulación de biomasa en el cultivo de EF36 en biorreactor. $R^2 = 0.975$, $y = 2.5095^{0.0932x}$.

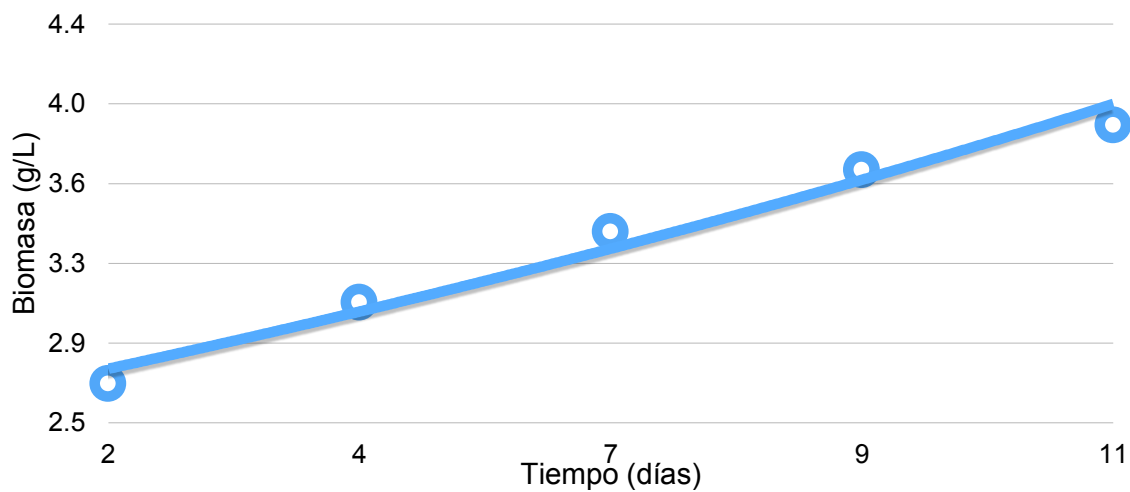
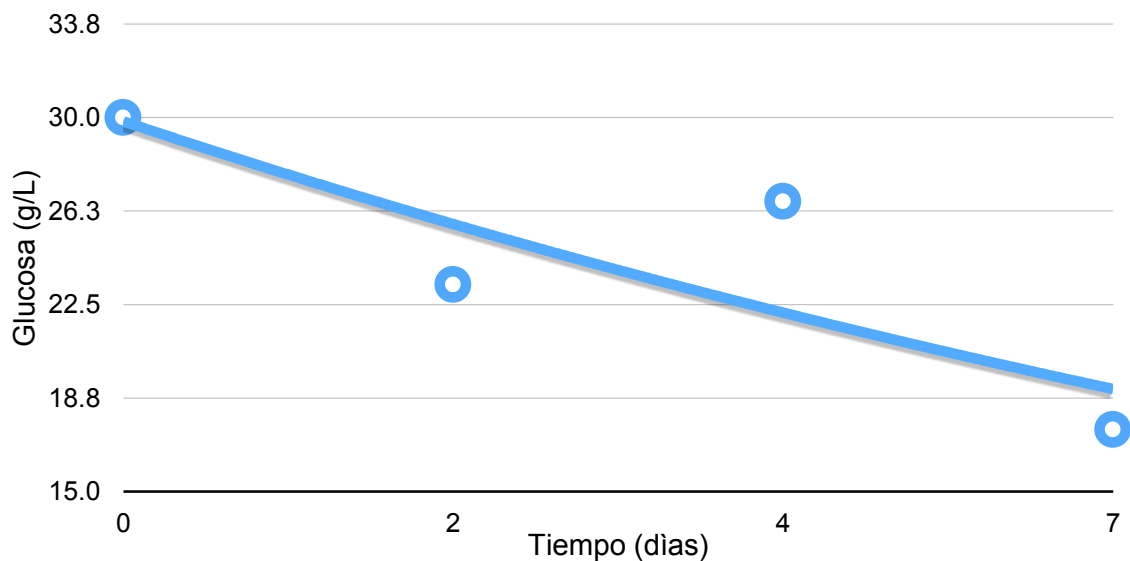


Figura 24. Experimento 4. Cinética del consumo de sustrato en el cultivo de EF36 en biorreactor. $R^2 = 0.6824$, $y = 34.632^{-0.1486x}$.



La cepa presentó un incremento en biomasa de 0.1948 g/L y un consumo de sustrato de 12.5184 g/L, lo que representa una tasa de rendimiento de $Y_{X/S} = 0.073 \text{ g}_B/\text{g}_S$. Este es el peor desempeño de los tres experimentos en medio líquido. Además de la inyección de aire el nuevo factor que se incluyó en esta cinética fue el tipo de agitación.

Del mismo modo que para la cinética en matraz, el volumen de llenado del reactor (1.5l en un reactor con capacidad de 4l) pudo propiciar una deficiente transferencia de O_2 .

Las mediciones de alta concentración de sustrato por unidad de volumen pudieron deberse no solo a un bajo consumo del mismo, también a que el micelio aéreo que creció asociado a los aparos consumió agua del medio de cultivo propiciando que este se concentrara.

No se tiene conocimiento sobre trabajos en los que se cultiven especies de *Laccaria* en biorreactores de ningún tipo, pero hay algunos trabajos sobre el cultivo de otras especies de HEM como *Lactarius deliciosus* (Carrillo *et al.* 2004), *Rhizopogon nigrescens* (de Oliveira *et al.* 2006), *Pisolithus microcarpus* (Rossi *et al.* 2002), *Suillus mediterraneensis* (Carrillo *et al.* 2004) y *T. matsutake* (Kawagoe *et al.* 1999).

Filogenéticamente, (de entre los HEM cultivados) la especie más cercana a *Laccaria* es *T. matsutake* (Matheny *et al.* 2006), cultivado por Kawagoe *et al.* (1999). Ellos usaron un medio de la siguiente composición: (g/L) glucosa 20, extracto de levadura 2, peptona 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 y KH_2PO_4 0.5. Es decir, una formulación muy similar a la del BAF, aunque con menor concentración de glucosa, mayor de extracto de levadura, sin $FeCl_3$, $ZnSO_4$ ni $MnSO_4$, y sin ninguna vitamina adicional. Compararon el desempeño del cultivo en reactores de columna de burbujas y airlift. Obtuvieron $Y_{X/S}$ que variaron entre 0.23 y 1.15 g_B/g_S (Kawagoe *et al.* 1999). Conforme la tasa de aireación aumentó, la morfología de los *pellets* de *T. matsutake* cambió de pequeños y esféricos a filamentosos en ambos tipos de biorreactor, pero en el de columna de burbujas, al incrementar aún más la aireación, la morfología pasó a *pellets* esféricos nuevamente. En el presente trabajo la difusión de oxígeno dependió de dos factores, la aireación generada por la inyección aséptica de aire no enriquecido, sumada a la agitación, la cual fue mecánica por turbina Rushton. La morfología generada por la cepa EF36 también fue de *pellets* filamentosos grandes (3mm) y chicos (< 1mm), pero nunca se presentaron *pellets* esféricos o lisos.

En los ensayos de menor agitación (0.34 cm/s), *T. matsutake* presentó una disminución en la fase lag, lo que se debe a un menor estrés mecánico sobre el micelio (Kawagoe *et al.*

1999). En este trabajo, el lento crecimiento pudo deberse al estrés mecánico que el micelio recibió por la turbina de agitación.

Rossi *et al.* (2002) cultivaron *Pisolithus microcarpus* en un biorreactor airlift de columna exterior obteniendo una producción de biomasa de 5 g/L con $Y_{X/S}$ 0.418 g_B/g_S. Usaron el medio de cultivo propuesto por Kuek (1996). *P. microcarpus* formó *pellets* de alrededor de 2 mm de diámetro y de bordes lisos. La duración de la fermentación fue de 10 días, un tiempo menor al usado para EF36. Aun así la biomasa acumulada por *P. microcarpus* en airlift fue muy superior al de *L. trichodermophora* agitado por Rushton, incluso duplica lo obtenido en matraz agitado ($Y_{X/S}$ = 0.253 g_B/g_S, el mayor rendimiento obtenido en este trabajo).

Tanto *T. matsutake*, como *P. microcarpus* alcanzaron un crecimiento exponencial (Kawagoe *et al.* 1999; Rossi *et al.* 2002), lo mismo ocurrió en el cultivo de *L. deliciosus* y *S. mediterraneensis* (Carrillo *et al.* 2004).

Carrillo *et al.* (2004) usaron un biorreactor agitado por turbina a 100 rpm (igual que en este trabajo), con MMN y BAF como medios de cultivo. Es interesante destacar que la fermentaciones realizadas por Carrillo *et al.* (2004) tuvieron duraciones de un mes, en contraste con las menos de 2 semanas desarrolladas en los reactores de agitación hidráulica (Kawagoe *et al.* 1999; Rossi *et al.* 2002). Ya que el objetivo del trabajo de Carrillo *et al.* (2004) fue poner en evidencia la efectividad de la técnica de medición de biomasa a partir de la cuantificación de ergosterol, no discuten las implicaciones que el tipo de agitación tiene sobre el desempeño de los HEM en cultivos líquidos. Además, aun que se menciona un crecimiento exponencial del micelio entre los días 7 y 11 para *L. deliciosus* y *S. mediterraneensis* (Carrillo *et al.* 2004), el aumento en biomasa no es tan evidente como el que presentan *T. matsutake* o *P. microcarpus* al ser fermentados en reactores hidráulicos (Kawagoe *et al.* 1999; Rossi *et al.* 2002).

9 Conclusiones

Se aislaron 15 cepas de HEM pertenecientes a los géneros *Amanita*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Morchella*, *Tylopilus* y *Suillus* (Cuadro 2), así como 36 cepas de hongos no ectomicorrízicos (Cuadro 3). Las secuencias de todas las cepas se han puesto a disposición en la plataforma de GenBank de NCBI.

De entre las cepas de HEM aisladas, se seleccionó a EF36 de *L. trichodermophora* para ser estudiada en cuanto a su cinética de crecimiento en cultivo. Esto debido a que sobrevivió a las resiembras y a que presentó crecimiento apreciable en medio puro, y a que es un hongo con potencial ecológico para su uso como inóculo para planta, además de que se cuenta con referencias en la literatura sobre este género. En este trabajo se reporta por primera vez el cultivo de *L. trichodermophora*, así como su desempeño cinético en PDA, MMN y BAF en placa Petri y en BAF en medio líquido y en biorreactor.

Al evaluar el efecto de los medios de cultivo PDA, MMN y BAF, así como un intervalo de pH de 4.5 a 6.5 y un intervalo de temperatura de 23° a 28° C, se encontró una mayor acumulación de biomasa en BAF a 25° C y 5.5 pH.

Al evaluar la capacidad de reactivación del crecimiento micelial de EF36 posterior a su congelación con glicerol 10%, se encontró que no presentó crecimiento al ser tratada con este crioprotectante.

En matraz *bafleado* la cepa EF36 alcanzó un rendimiento de biomasa sobre sustrato de 0.253 g/L en agitación orbital de 100 rpm.

Al evaluar el efecto del porcentaje de inóculo semilla usado para iniciar la fermentación, en el experimento en tubos falcon, se detectó que EF36 alcanzó rendimientos de $Y_{X/S} = 0.119$ y 0.289 g_B/g_S (20 y 2 % de inóculo iniciador, respectivamente), es decir, mayor en el tratamiento de menor porcentaje de inoculación lo cual coincide con lo reportado por Kuek (1986) para *L. laccata*.

Finalmente, la cepa EF36 fue crecida en un biorreactor con agitación por turbina Rushton, alcanzando una $Y_{X/S} = 0.0727$ g_B/g_S, es decir, el menor de todas las fermentaciones ensayadas. Por lo que se considera que la agitación mecánica fue un factor de estrés que propició un bajo rendimiento en la producción de biomasa.

Con el mayor rendimiento alcanzado en este trabajo ($Y_{X/S} = 0.253$ g_B/g_S en matraz agitado), y atendiendo a las estimaciones realizadas por Rossi *et al.* (2011), se cuenta con la

capacidad de inocular 7,000 plantas/L en fermentaciones de 4 semanas. No obstante, se esperan obtener mejores rendimientos al usar biorreactores de agitación hidráulica, debido al poco estrés mecánico que ocasionan al micelio. Experimentación sobre la composición del medio también ofrece la posibilidad de aumentar los rendimientos, así como el uso de fermentaciones líquidas con soporte.

10 Referencias

- Abello JF, S Kelemu. 2006. Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Revista Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 7:55-57.
- Agerer R. 1987-2008. *Colour Atlas of Ectomycorrhizae*. Universidad de Munich. Einhorn-Verlag.
- Agrawal S. 2008. *Techniques in Molecular Biology*. International Book Distributing Co. Delhi, India, 329 p.
- Akata I, F Kalyoncu, MH Solak, E Kalmıs. 2012. Growth of mycelium of three ectomycorrhizal macrofungi, *Infundibulicybe geotropa*, *Tricholoma anatolicum* and *Lactarius deliciosus* in culture media containing various carbon sources. *African Journal of Microbiology Research* 6:3042-3046.
- Amend AS, KA Seifert, R Samson, TD Bruns. 2010. Indoor fungal composition is geographically patterned and more diverse in temperate zones than in the tropics. *PNAS* 107:13748-13753.
- Anderson J, WG Cairney. 2007. Ectomycorrhizal fungi: exploring the mycelial frontier. *FEMS Microbiology* 31:388-406.
- Antheunisse J. 1973. Viability of lyophilized microorganisms after storage. *Antonie Leeuwenhoek* 39:243-248.
- Aspray TJ, P Frey-Klett, JE Jones, JM Whipps, J Garbaye, GD Bending. 2006. Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza* 16:533-541.
- Balogh-Brunstad Z, CK Keller, JT Dickinson, F Stevens, CY Li, BT Bormann. 2008. Biotite Weathering and nutrient uptake by ectomycorrhizal fungus, *Suillus tomentosus*, in liquid-culture experiments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72:2601-2618.
- Bending GD, EJ Poole, JM Whipps, DJ Read. 2002. Characterisation of bacteria from *Pinus sylvestris*-*Suillus luteus* mycorrhizas and their effects on root-fungus interactions and plant growth. *FEMS Microbiology Ecology* 39:219-227.
- Bessette AE, WC Roody, AR Bessette. 2000. *North American Boletes color guide of the fleshy pored mushrooms*. Syracuse University Press. China, 396 pp.
- Braun S, S Vecht-Lifshitz. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology* 9:63-68.
- Bréda N, P Maillard, P Montpied, C Bréchet, J Garbaye, P Courty. 2013. Isotopic evidence in adult oak trees of a mixotrophic lifestyle during spring reactivation. *Soil Biology and Biochemistry* 58:136-139.
- Brun A, M Chalot, R Duponnois, B Botton, J. Dexheimer. 1994. Immunogold localization of glutamine synthetase and NADP-glutamate dehydrogenase of *Laccaria laccata* in Douglas fir ectomycorrhizas. *Mycorrhiza* 5:139-144.
- Brundrett MG. 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320:37-77.

- Caldwell IY, APJ Trinci. 1973. The growth unit of the mould *Geotrichum candidum*. Archives of Microbiology 88:1-10.
- Carrasco-Hernández V, J Pérez-Moreno, V Espinosa-Hernández, JJ Almaraz-Suárez, R Quintero-Lizaola, M Torres-Aquino. 2010. Caracterización de micorrizas establecidas entre dos hongos comestibles silvestres y pinos nativos de México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 1:567-577.
- Carrillo C, G Díaz, M Honrubia. 2004. Improving the production of ectomycorrhizal fungus mycelium in a biorreactor by measuring the ergosterol content. Engineering in Life Sciences 4:43-45.
- Castillo-Guevara C, C Lara, G Pérez. 2012. Micofagia por roedores en un bosque templado del centro de México. Revista Mexicana de Biodiversidad 83:772-777.
- Cline ML, CPP Reid. 1982. Seed source and mycorrhizal fungus effects on growth of containerized *Pinus contorta* and *Pinus ponderosa* seedlings. Forest Science 28:237-250.
- Colpaert JV, P Vandenkoornhuyse, K Adriaensen, J Vangronsveld. 2000. Genetic variation and heavy metal tolerance in the ectomycorrhizal basidiomycete *Suillus luteus*. New Phytologist 147:367-379.
- Cossart P, P Boquet, S Normark, R Rappuoli. 2004. Cellular microbiology, American Society Microbiology, EEUU. 362 p.
- Courty PE, J Labbe, A Kohler, B Marcxais, C Bastien, JL Churin, J Garbaye, F le Tacon. 2011. Effect of poplar genotypes on mycorrhizal infection and secreted enzyme activities in mycorrhizal and non-mycorrhizal roots. Journal of Experimental Botany 62:249-260.
- Cox PW, GC Paul, CR Thomas. 1998. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. Microbiology 144:817-827.
- Crahay C, J Wevers, F Munaut, JV Colpaert, S Declerck. 2013 b. Cryopreservation of ectomycorrhizal fungi has minor effects on root colonization of *Pinus sylvestris* plantlets and their subsequent nutrient uptake capacity. Mycorrhiza 23:463-471.
- Crahay C, S Declerck, JV Colpaert, M Pigeon, F Munaut. 2013 a. Viability of ectomycorrhizal fungi following cryopreservation. Fungal Biology 117:103-111.
- Charles M. 1978. Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 8:1-62.
- Charlotte C, J Wevers, F Munaut, JV Colpaert, S Declerck. 2013. Cryopreservation of ectomycorrhizal fungi has minor effects on root colonization of *Pinus sylvestris* plantlets and their subsequent nutrient uptake capacity. Mycorrhiza 23:463-71.
- Cho YJ, JP Park, HJ Hwang, SW Kim, JW Choi, JW Yun. 2002. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. Letters in Applied Microbiology 35:195-202.
- Dahlberg A, J Stenlid. 1995. Spatiotemporal patterns in ectomycorrhizal populations. Canadian Journal of Botany 73:1222-1230.
- Dahlstrom JL, JE Smit, NS Weber. 2000. Mycorrhiza-like interaction by *Morchella* with species of the Pinaceae in pure culture synthesis. Mycorrhiza 9:279-285.

- De Oliveira LP, MJ Rossi, A Furigo, GN Silva, VL de Oliveira. 2006. Viability and infectivity of an ectomycorrhizal inoculum produced in an *airlift* bioreactor and inmovilized in calcium alginate. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:251-255.
- Delgado-Fuentes A, M Villegas-Rios, J Cifuentes-Blanco. 2005. Glosario ilustrado de los caracteres macroscopicos de los basidiomycetes con himenio laminar. Facultad de Ciencias UNAM. México DF. 84 pp.
- Deveau A, A Kohler, P Frey-Klett, F Martin. 2008. The major pathways of carbohydrate metabolism in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* S238N. *New Phytologist* 180:379-390.
- Deveau A, C Brulé, B Palin, D Champmartin, P Rubini, J Garbaye, A Sarniguet, P Frey-Klett. 2010. Role of fungal trehalose and bacterial thiamine in the improved survival and growth of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and the helper bacterium *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8. *Environmental Microbiology Reports* 2:560-568.
- Deveau A, M Barret, AG Diedhiou, J Leveau, W de Boer, F Martin, A Sarniguet, P Frey-Klett. 2014. Pairwise transcriptomic analysis of the interactions between the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N and three beneficial, neutral and antagonistic soil bacteria. *Microbial Ecology* 69:146-59.
- Di Battista C, MA selosse, D Bouchard, E Stenstrom, F le Tacon. 1996. Variation in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* S 238. *Mycological Research* 100:1315-1324.
- Dion WM, A Carilli, G Sermonti, EB Chain. 1954. The effect of mechanical agitation on the morphology of *Penicillium chrysogenum* Thom in stirred fermenters. *Rendiconti 1st Superiore de Sanita Pubblica* 17:187-205.
- Dorán P. 1995. Principios de Ingenia de los Bioprocesos. Academic Press Limited. Londres, Inglaterra. 468 pp.
- Duponnois R, J Garbaye. 1991. Techniques for controlled synthesis of Douglas-fir–*Laccaria laccata* ectomycorrhizal symbiosis. *Annals of Forest Science* 48:641-650.
- Edwards AG, CS Ho. 1988. Effects of carbon dioxide on *Penicillium chrysogenum*: an autoradiographic study. *Biotechnology and Bioengineering* 32:1-7.
- El-Enshasy H. 2007. Filamentous fungal cultures – Proseses, characteristics, products and applications. En: Yang ST (ed.). *Bioprocessing for value-added products renewable resources new technologies and applications*. Elsevier Países Bajos.
- El-Enshasy H, J Kleine, U Rinas. 2001. Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry* 41:2103-2112.
- Finaly RD, A Frostegard, AM Sonnerfeldt. 1992. Utilization of organic and inorganic nitrogen sources by ectomycorrhizal fungi in pure culture and in symbiosis with *Pinus contorta* Dougl. ex Loud. *New Phytologist* 120:105-11.

- Flores R, M Honrubia, G Diaz. 2008. Caracterización de cepas de *Lactarius* sección *Deliciosi* de Guatemala y su comparación con cepas europeas de *L. deliciosus*. *Revista Mexicana de Micología* 26:51-55.
- Flores-Monterroso A, J Canales, F de la Torre, C Ávila, FM Cánovas. 2013. Identification of genes differentially expressed in ectomycorrhizal roots during the *Pinus pinaster*–*Laccaria bicolor* interaction. *Planta* 237:1637-1650.
- Franco AR, NR Sousa, MA Ramos, RS Oliveira, PML Castro. 2014. Diversity and persistence of ectomycorrhizal fungi and their effect on nursery-inoculated *Pinus pinaster* in a post-fire plantation in northern Portugal. *Microbial Ecology* 68:761-772.
- Frank AG. 1960. The submerged culture of *Morchella*. *Mycologia* 52:201-209.
- Frankland JC. 1998. Fungal succession-unraveling the unpredictable. *Mycological Research* 102:1-15.
- Fries N, K Serck-Hanssen, LH Dimberg, O Theander. 1987. Abietic acid, an activator of basidiospore germination in ectomycorrhizal species of the genus *Suillus* (Boletaceae). *Experimental Mycology* 11:360-363.
- Fries N. 1989. The influence of tree roots on spore germination of ectomycorrhizal fungi. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 28:139-144.
- Gagné A, JL Jany, J Bousquet, DP Khasa. 2006. Ectomycorrhizal fungal communities of nursery-inoculated seedlings outplanted on clear-cut sites in northern Alberta. *Canadian Journal of Forest Research* 36:1684-1694.
- Gagnon J, CG Langlois, J Garbaye. 1991 Growth and ectomycorrhiza formation of container-grown red oak seedlings as a function of nitrogen and inoculum type of *Laccaria bicolor*. *Canadian Journal of Forest Research* 21:966-973.
- Garbaye J, 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologists* 128:197-210.
- Harris Gardes M, T Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2:113-118.
- Gardes M, TD. Bruns. 1996. Community structure of ectomycorrhizal fungi in a *Pinus muricata* forest: above and below-ground views. *Canadian Journal of Botany*, 74:1572-1583.
- Garibay- Origel R, F Ruan-Soto. 2014. Listado de los hongos silvestres consumidos como alimento tradicional en México. en: Moreno-Fuentes A, R Garibay-Origel (eds) *La etnomicología en México, Estado del Arte*. Red de Etnoecología y Patrimonio Biocultural (CONACyT)-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo-Instituto de Biología (UNAM)-Sociedad Mexicana de Micología-Asociación Etnobiológica Mexicana, A.C-Grupo Interdisciplinario para el Desarrollo de la Etnomicología en México-Sociedad Latinoamericana de Etnobiología. México, D.F. pp. 243.
- Garibay-Orijel R, M Martínez-Ramos, J Cifuentes. 2009. Disponibilidad de esporas de hongos comestibles en los bosques de pino-encino de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80:521-534.

- Gibbs PA, RJ Seviour, F Schmid. 2000. Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology* 20:17-48.
- Gerlach SR, D Siedenberg, D Gerlach, K Schügerl, MLF Giuseppin, J Hunik. 1998. Influence of reactor systems on the morphology of *Aspergillus awamori*. Application of neural network and cluster analysis for characterization of fungal morphology. *Process Biochemistry* 33:601-615.
- Guerin-Laguette V, N Matsudhita, K Shindo, K Susuki, FC Lapeyerie. 2003. Growth stimulation of a Shiro-like, mycorrhiza forming, mycelium of on solid substrates by non-ionic surfactants or vegetable oil. *Mycological Progress* 2:37-44.
- Gusakov AV, EG Kondratyeva, AP Sinitsyn. 2011. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *International Journal of Analytical Chemistry*. DOI:10.1155/2011/283658.
- Hall RI, W Yun, A Amicucci. 2003. Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *TRENDS in Biotechnology* 21:433-438.
- Hatakeyama T, M Ohmasa. 2004. Mycelial growth characteristics in a split-plate culture of four strains of the genus *Suillus*. *Mycoscience* 45:188-199.
- Hibbet DS, M Binder, JF Bischoff, M Blackwell, PF Cannon, OE Eriksson *et al.* 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111:509-547.
- Hobbie EA, AP Ouimette, EAG Schuur, D Kierstead, JM Trappe, K Bendiksen, E Ohenoja. 2013. Radiocarbon evidence for the mining of organic nitrogen from soil by mycorrhizal fungi. *Biogeochemistry* 114:381-389.
- Hobbie EA, NS Weber, JM Trappe. 2001. Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. *New Phytologist* 150:601-610.
- Hobbie EA, P Högberg. 2012. Nitrogen isotopes link mycorrhizal fungi and plants to nitrogen dynamics. *New Phytologist* 196:367-382.
- Hobbie EA, RA Werner. 2004. Intramolecular, compound-specific, and bulk carbon isotope patterns in C₃ and C₄ plants: a review and synthesis. *New Phytologist* 161:371-385.
- Hobbie EA. 2006. Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. *Ecology* 87:563-569.
- Hogg S. 2005. *Essential microbiology*. John Wiley & Sons Ltd. England. 468 p.
- Homolka L. 2013. Methods of Cryopreservation in Fungi. en: Gupta VK, *et al.* (eds.) *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology*. Fungal Biology, doi: 10.1007/978-1-4614-2356-0_2.
- Hryniewicz K, C Baum, J Niedojado, H Dahm. 2009. Promotion of mycorrhiza formation and growth of willows by the bacterial strain *Sphingomonas* sp. 23L on fly ash. *Biology and Fertility of Soils* 45:385-394.
- Hung LL, JM Trape. 1983. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH in vitro. *Mycologia* 75:234-241.

- Hutchison LJ. 1989. The absence of conidia as a morphological character in ectomycorrhizal fungi. *Mycologia* 81:587-594.
- Hutchison LJ. 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi in north america. *Mycotaxon* 42:387-504.
- Hwang SW, WF Kwolek, WC Haynes. 1976. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. III. Viability and growth rate of mycelial cultures following cryogenic storage. *Mycologia* 68:377-387.
- Iotti M, A Amicucci, V Stocchi, A Zambonelli. 2002. Morphological and molecular characterization of mycelia of some *Tuber* species in pure culture. *New Phytologist* 155:499-505.
- Jin B, JH van Leeuwen, B Patel. 1999. Mycelial morphology and fungal protein production from starch processing wastewater in submerged cultures of *Aspergillus oryzae*. *Process Biochemistry* 34:335-340.
- Kawagishi H, K Hamajim, R Takanomi, T Nakamura, Y Sato, Y Akiyama, M Sano, O Tanaka. 2004. Groth promotion of mycelia of the matsutake mushroom *Tricholoma matsutake* by D-isoleusine. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 68:2405-2407.
- Kawagoe M, K Kawakami, Y Nakamura, K Naoe, K Miki, H Noda. 1999. Submerged culture of *Tricholoma matsutake* mycelium in bubble column fermenters. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87:116-118.
- Kemppainen MA, A Circosta, D Tagu, F Martin, AG Pardo. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal symbiont *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza* 16:19-22.
- Kemppainen MA, A Pardo. 2011. Transformation of the mycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* by using *Agrobacterium tumefaciens*. *Bioengineered Bugs* 2:38-44.
- Kemppainen MA, MC Alvarez-Crespo, AG Pardo. 2010. fHANT-AC genes of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* are not repressed by L-glutamine allowing simultaneous utilization of nitrate and organic nitrogen sources. *Environmental Microbiology Reports* 2:541-553.
- Kikuchi K, N Matsushita, K Suzuki. 2009. Fruit body formation of *Tylopilus castaneiceps* in pure culture. *Mycoscience* 50:313-316.
- Kim SS, JS Lee, JY Cho, YE Kim, EK Hong. 2010. Effects of C/N ratio trace elements on mycelial growth and exopolysaccharide production of *Tricholoma matsutake*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15:293-298.
- Kipfer T, T Wohlgemuth, MGA van der Heijden, J Ghazoul, S Egli. 2012. Growth response of drought-stressed *Pinus sylvestris* seedlings to single- and multi-species inoculation with ectomycorrhizal fungi. *PLoS ONE* 7:e35275. doi:10.1371/journal.pone.0035275
- Kitamoto Y, A Suzuki, S Shimada, K Yamanaka. 2002. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience* 43:143-149.
- Kobayashi H, H Suzuki. 1972. Studies on the decomposition of raffinose by alpha-galactosidase of mold (II). Formation of mold pellet and its enzyme activity. *Journal of Fermentation Technology* 50:625-629.
- Kohler A, A Kuo, LG Nagy, EM Morin *et al.* 2015. Convergent losses of decay mechanisms and rapid turnover of symbiosis genes in mycorrhizal mutualists. *Nature* doi:10.1038/ng.3223.

- König B, K Schügerl. 1982. Strategies for penicillin fermentation in tower loop reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 24:259-280.
- Kraigher H, A Grayling, TL Wang, DE Hanke. 1991. Cytokinin production by two ectomycorrhizal fungi in liquid culture. *Phytochem* 30:2249-2254.
- Kuek C, IC Tommerup, DN Mlajczuk. 1992. Hydrogel bead inocula for the production of ectomycorrhizal eucalypts for plantations. *Mycological Research* 96:273-277.
- Kuek C. 1996. Shake-flask culture of *Laccaria laccata*, an ectomycorrhizal basidiomycete. *Appl Microbiol Biotechnol* 45:319-326.
- Kurakov AV, MA Davydova, BA Byzov. 2006. Microarthropods as regulators of the communities of microscopic fungi and biological activity in the litter of a mixed forest. *Eurasian Soil Sciences* 8:838-847.
- Kusuda M, M Ueda, Y Konishi, K Yamanaka, T Terashita, K Miyatake. 2007. Effects of carbohydrate substrate on the vegetative mycelial growth of an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake*, isolated from *Quercus*. *Mycoscience* 48:358-364.
- Larsen PE, A Sreedasyam, G Trivedi, GK Podila, LJ Cseke, R Collart. 2011. Using next generation transcriptome sequencing to predict an ectomycorrhizal metabolome. *BMC Systems Biology* 5:70.
- Leake JR, DP Donnelly, EM Saunders, L Boddy, DJ Read. 2001. Rates and quantities of carbon flux to ectomycorrhizal mycelium following ¹⁴C pulse labeling of *Pinus sylvestris* seedlings: effects of litter patches and interaction with a wood-decomposer fungus. *Tree Physiology* 21:71-82.
- Li S, Y Sang, D Zhu, Y Yang, Z Lei, Z Zhang. 2013. Optimization of fermentation conditions for crude polysaccharides by *Morchella esculenta* using soybean curd residue. *Industrial Crops and Products* 50:666-672.
- Lindahl B, A Tunlid. 2015. Ectomycorrhizal fungi – potential matter decomposers, yet not saprotrophs. *New Phytologist* 205:1443-1447.
- Lu Y, C Chen, H Chen, J Zhang, W Chen. 2012. Isolation and identification of endophytic fungi from *Actinidia macrosperma* and investigation of their bioactivities. Hindawi Publishing Corporation. doi:10.1155/2012/382744.
- Madigan MT, JM Martinko, J Parker. 2004. *Broock Biología de los Microorganismos*. 10° edición Pearson-Prentice Hall, Madrid, España. 1089 p.
- Mansouri-Bauly H, J Kruse, Z Sýkorová, U Scheerer, S Kopriva. 2006. Sulfur uptake in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Mycorrhiza* 16:421-427.
- Martin F, A Aerts, D Ahren, A Brun, EGJ Danchin, F Duchaussoy, *et al.* 2008. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature* 452 |doi:10.1038/nature06556.
- Martínez-Carrera D, N Curveto, M Sobal, P Morales, VM Mora. 2010. Hacia un Desarrollo Sustentable del Sistema de Producción-Consumo de Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales. COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP-,Puebla, México. 648 p.

- Marx DH. 1969 The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic fungi and soil bacteria. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- Maser C, AW Claridge, JM Trappe. 2008. *Trees, Truffles, and Beasts: How Forests Function*. Rutgers University Press New Brunswick, New Jersey, and London. 301 p.
- Matheny PB, V Hofstetter, MC Aime, *et al.* 2006. Major clades of Agaricales: a multilocus phylogenetic overview. *Mycologia* 98:982-995.
- Matsuda Y, F Sugiyana, K Nakanishi. 2006. Effects of sodium chloride on growth of ectomycorrhizal fungal isolates in culture. *Mycoscience* 47:212-217.
- McNeill J, NJ. Turland. 2011. Major changes to the Code of Nomenclature—Melbourne, July 2011. XVIII International Botanical Congress. 3 p.
- McNeil B, B Kristiansen, RJ Seviour. 1989. Polysaccharide production and morphology of *Aureobasidium pullulans* in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering* 33:1210-1212.
- Meng F, X Liu, L Jia, Z Song, P Deng, K Fan. 2010. Optimization for the production of exopolysaccharides from *Morchella esculenta* SO-02 in submerged culture and its antioxidant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers* 79:700-704.
- Menkis M, R Vasiliauskas, AFS Taylor, J Stenlid, R Finlay. 2005. Fungal communities in mycorrhizal roots of conifer seedlings in forest nurseries under different cultivation systems, assessed by morphotyping, direct sequencing and mycelial isolation. *Mycorrhiza* 16:33-41.
- Metz B, NWF Kossen. 1977. The growth of molds in the form of pellets. A literature review. *Biotechnology and Bioengineering* 19:781-799.
- Molina R, JG Palmer. 1982. Isolation, maintenance and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. in: Schenck NC (ed.) *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. American Phytopathological Society. USA. 244 p.
- Molnár Z, E Mészáros, Z Szilágyi, S Rosén, T Emri, I Pócsi. 2004. Influence of fadAG203R and deltaflbA mutations on morphology and physiology of submerged *Aspergillus nidulans* cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118:349-360.
- Montoya A, A Kong, A Estrada-Torres, J Cifuentes, J Caballero. 2004. Useful wild fungi of La Malinche National Park, Mexico. *Fungal Diversity* 17:115-143.
- Morozova EV, MV Baranova, VP Kozlov, VM Tereshina, AS Memorskaya, EP Feofilova. 2001. Peculiarities of exogenous dormancy of *Aspergillus niger* conidia. *Mikrobiologiya* 70:527-534.
- Mucha J. 2011. Changes in hyphal morphology and activity of phenoloxidases during interactions between selected ectomycorrhizal fungi and two species of *Trichoderma*. *Antonie van Leeuwenhoek* 100:155-160.
- Mueller GM, Strack BA. 1992. Evidence for a mycorrhizal host shift during migration of *Laccaria trichodermophora* and other agarics into neotropical oak forests. *Mycotaxon* 65:249-256.

- Mueller GM. 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the Continental United States and Canada, with Discussions on Extralimital Taxa and Descriptions of Extant Types. Fieldiana, Botany 30. Field Museum of Natural History. Chicago USA. 160 pps.
- Nielsen J. 1996. Modelling the morphology of filamentous microorganisms. Trends Biotechnol. 14:438-443.
- Ohta, A., N. Fujiwara. 2003. Fruit-body production of an ectomycorrhizal fungus in genus *Boletus* in pure culture. Mycoscience 44:295-300.
- Ohta A. 1994. Production of fruit-bodies of a mycorrhizal fungus, *Lyophyllum shimeji*, in pure culture. Mycoscience 35:147-151.
- Oolman T, HW Blanch. 1986. Non-Newtonian fermentation systems. Critical Reviews in Biotechnology 4:133-184.
- Osmundson TW, CL Cripps, GM Mueller. 2005. Morphological and molecular systematics of Rocky Mountain alpine *Laccaria*. Mycologia 97:949-972.
- Parladé J, IF Alvarez, J Pera. 1999. Coinoculation of containerized Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings with the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* and *Rhizopogon* spp. Mycorrhiza 8:189-195.
- Parladé J. 1992. Técnicas de inoculación de abeto de douglas (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) con hongos ectomicorrícicos y su aplicación en reforestación. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona.
- Paul GC, CR Thomas. 1998. Characterisation of mycelial morphology using image analysis. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. 60:1-59.
- Peberdy JF. 1994. Protein secretion in filamentous fungi-trying to understand a highly productive black box. Trends in Biotechnology 12:50-57.
- Pera J, IF Álvarez, A Rincón, J Parladé. 1999. Field performance in northern Spain of Douglas-fir seedlings Inoculated with ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 9:77-84.
- Pera J, J Parladé. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. Investigación Agraria Sistemas y Recursos Forestales 14:419-433.
- Pera J. 1992. Selección de hongos ectomicorrícicos de *Pinus pinaster* Ait. para su aplicación en reforestación. Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona
- Pereira GC, JS Herrera, AH Machuca, MO Sánchez. 2007. Efecto del pH sobre el crecimiento in vitro de hongos ectomicorrícicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. Bosque 28 (3): 215-219.
- Perez-Moreno J, M Martínez-Reyes, A Lorenzana Fernandez A, V Carrasco Hernandez, M Mendez-Neri. 2009. Social and biotechnological studies of wild edible mushrooms in Mexico, with emphasis in the Izta-Popo and Zoquiapan national parks. Acta Botanica Yunnanica 15:55-61.
- Perotto S, P Bonfante. 1997. Bacterial associations with mycorrhizal fungi: close and distant friends in the rhizosphere. Trends in Microbiology 5:496:501.

- Peterson RL, HB. Massicotte, LM Melville. 2004. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. NRC-CNRC Research Press. Canada. 182 p.
- Peterson RL, P Chakravarty. 1991. Techniques in Synthesizing Ectomycorrhiza. en Reed DJ, JR Norris, AK Varam, DJ Read. Techniques for the Study of Mycorrhiza. Methods in Microbiology 23 Elsevier Ltd. 512 pps.
- Pitt DE, AT Bull. 1982. Use of autoradiography to quantify aspects of fungal growth and starvation in submerged liquid culture. Transactions of the British Mycological Society. 78:97-104.
- Plett JM, M Kemppainen, SD Kale, A Kohler, V Legue, A Brun, BM Tyler, AG. Pardo, F Martin. 2011. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. Current Biology 21:1197-1203.
- Plett JM, Y Daguerre, S Wittulsky, A Vayssières, A Deveau, SJ. Melton, A Kohler, JL. Morrell-Falvey, A Brun, C Veneault-Fourrey, F Martin. 2014. Effector MiSSP7 of the mutualistic fungus *Laccaria bicolor* stabilizes the *Populus* JAZ6 protein and represses jasmonic acid (JA) responsive genes. PNAS 111:8299-8304.
- Plett JM, E Tisserant, A Brun, E Morin, IV Grigoriev, A Kuo, F Martin, A Kohler. 2015. The mutualist *Laccaria bicolor* expresses a core gene regulon during the colonization of diverse host plants and a variable regulon to counteract host-specific defenses. Molecular Plant-Microbe Interactions 28:261-273.
- Prosser JI, AJ Tough. 1991. Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. Critical Reviews in Biotechnology 10:253-74.
- Quoreshi AM, VR Timmer. 2000. Early outplanting performance of nutrient-loaded containerized black spruce seedlings inoculated with *Laccaria bicolor*: a bioassay study. Canadian Journal of Forest Research 30:44-752.
- Raper KB, DF. Alexander. 1945. Preservation of molds by lyophil process. Mycologia 37:499-525.
- Regvar M, N Gogala, N Znidarsic. 1997. Jasmonic acid affects mycorrhization of spruce seedlings with *Laccaria laccata*. Trees 11:511-514.
- Reininger V, NT Siber. 2012. Mycorrhiza reduces adverse effects of dark septate endophytes (DSE) on growth of conifers. PLOS ONE 7:e42865.
- Repák I. 2011. Ectomycorrhizal inoculum and inoculation techniques. en: Rai M, A Varma (eds.), Diversity and Biotechnology of Ectomycorrhizae, 43 Soil Biology 25, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Reverchón F, MP Ortega-Larrocea, J Pérez-Moreno, VM Peña-Ramírez, C Siebe. 2010. Changes in community structure of ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus montezumae* across a volcanic soil chronosequence at Sierra Chichinautzin, Mexico. Canadian Journal of Forest Research 40:1165-1174.
- Rillig MC, DL Mummey. 2006. Mycorrhizas and soil structure. New Phytologist 171:41-53.
- Rincón A, IF Alvarez, J Pera. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. Mycorrhiza 11:265-271.
- Robson GD, E Prebble, A Rickers, S Hosking, DW Denning, APJ Trinci, W Robertson. 1996. Polarized growth of fungal hyphae is defined by an alkaline pH gradient. Fungal Genetics and Biology 20:289-298.

- Rossi MJ, A Furigo, V Oliveira. 2007. Inoculant Production of ectomycorrhizal fungi by solid and submerged fermentations. *Food Technology and Biotechnology* 45:277-286.
- Rossi MJ, VL. Oliveira. 2011. Growth of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in different nutritional conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42:624-632.
- Rossi MJ, JAR Souza, VL de Oliveira. 2002. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an airlift bioreactor. *Applied Microbiology Biotechnology* 59:175-181.
- Sánchez F, M Honrubia, P Torres. 2000. Características culturales de algunos hongos ectomicorrízicos en cultivo puro. *Revista Iberoamericana de Micología* 17:127-134.
- Sánchez JE, G Mata. 2012. Hongos Comestibles y Medicinales en Iberoamérica. ECOSUR-INECOL México. 398 pps.
- Sanmee R, P Lumyong, B Dell, S Lumyong. 2010. In vitro cultivation and fruit body formation of the black bolete, *Phlebopus portentosus*, a popular edible ectomycorrhizal fungus in Thailand. *Mycoscience* 51:15-22.
- Santelices R, S Espinoza, N Brunel, G Palfner. 2012. Effect of the geographical origin, culture media, and pH on the growth dynamic of the edible ectomycorrhizal mushroom *Suillus luteus*. *Ciencia e Investigación Agraria* 39:369-376.
- Santiago-Martínez G, A Estrada-Torres, L Varela, T Herrera. 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia* 37:575-584.
- Sasek V, V Musilek. 1967. Cultivation and antibiotic activity of mycorrhizal basidiomycetes. *Folia Microbiologica* 12:515-523.
- Savoie JM, ML Largeau. 2011. Production of edible mushrooms in forests: trends in development of a mycosilviculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:971-979.
- vfoSchlegel HG. 1993 .General Microbiology. 7th ed. Cambridge University Press.
- Schrey SD, E Erkenbrack, E Früh, S Fengler, K Hommel, N Horlacher, D Schulz, M Ecke, A Kulik, HP Fiedler, R Hampp, MT Tarkka. 2012. Production of fungal and bacterial growth modulating secondary metabolites is widespread among mycorrhiza-associated streptomycetes. *BMC Microbiology* 12:1-14.
- Shimomura M, M Matsuda, K Ariyoshi, T Aimi. 2012. Development of mycelial slurries containing surfactant for cultivation of the edible ectomycorrhizal mushroom *Rhizopogon roseolus* (syn. *Rhizopogon rubescens*). *Botany* 90:839-844.
- Simard SW, DM Durall. 2004. Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany* 82:1140-1165.
- Smith SE, D Read. 2008. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Inglaterra, 787 pps.
- Soddell JA, RJ Seviour. 1994. A comparison of methods for determining the fractal dimensions of colonies of filamentous bacteria. *Binary* 6:21-31.
- Straatsma G, LJLD van Griensven, J Bruinsma. 1986. Root influence on in vitro growth of hyphae of the mycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius* replaced by carbon dioxid. *Physiologia Plantarum* 67:521-528.

- Sudhakara MR, K Natarajan. 1997. Coinoculation efficacy of ectomycorrhizal fungi on *Pinus patula* seedlings in a nursery. *Mycorrhiza* 7:133-138.
- Tang YJ, LW Zhu, HM Li, DS Li. 2007. Submerged culture of mushrooms in bioreactors. Challenges, current state of the art and future prospects. *Food Technology and Biotechnology* 45:221-229.
- Tarkka MT, S Herrmann, T Wubet, L Feldhahn, S Recht, F Kurth, *et al.* 2013. OakContigDF159.1, a reference library for studying differential gene expression in *Quercus robur* during controlled biotic interactions: use for quantitative transcriptomic profiling of oak roots in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* doi:10.1111/nph.12317.
- Trappe M, F Evans, J Trappe. 2007. North American Truffles. Ten Speed Press. Berkeley California. 136 pp.
- Tschaplinski TJ, JM Plett, NL Engle, A Deveau, KC Cushman, MZ Martin, MJ Doktycz, GA Tuskan, A Brun, A Kohler, F Martin. 2014. *Populus trichocarpa* and *Populus deltoides* exhibit different metabolomic responses to colonization by the symbiotic fungus *Laccaria bicolor*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27:546-556.
- Tylutki EE. 1993. Mushrooms of Idaho and the Pacific Northwest Vol. 1 Discomycetes. University of Idaho Press, Moscow, Idaho. 133 pp.
- Utkhede RS, JE Rahe. 1978. Wet-sieving floatation technique for isolation of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* from muck soil. *The American Phytopathological Society* 69:295-297.
- Vaario LM, A Guerin-Laguette, N, Matsushita, K, Suzuki, F, Lapeyrie. 2002. Saprobiotic potential of *Tricholoma matsutake*: growth over pine bark treated with surfactants. *Mycorrhiza* 12:1-5.
- Vaario LM, K Suzuk. 2004. Ectomycorrhizal synthesis between *Abies firma* roots/callus and *Laccaria bicolor* Strain. *Acta Botanica Sinica* 46:63-68.
- Van der Heijden MGA, IR Sanders. 2003. Mycorrhizal Ecology. *Ecological Studies* 157. Springer. Nueva York, EEUU. 469p.
- Van Elsas JD, FGH Boersma. 2011. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. *European Journal of Soil Biology* 47:77-87.
- Vardar F. 1983. Problems of mass and momentum transfer in large fermenters. *Process Biochemistry* 8:21-23.
- Vázquez-García A, G Santiago-Martínez, A Estrada Torres. 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorizógenos. *Anales del Instituto de Biología, Botánica* 73:1-15.
- Veneault-Fourrey C, C Commun, A Kohler, E Morin, R Balestrini, J Plett, E Danchin, P Coutinho, A Wiebenga, RP de Vries, B Henrissat, F Martin. 2014. Genomic and transcriptomic analysis of *Laccaria bicolor* CAZome reveals insights into polysaccharides remodelling during symbiosis establishment. *Fungal Genetics and Biology* 72:168-181.
- Villeneuve N, F le Tacon, D Bouchard. 1991. Survival of inoculated *Laccaria bicolor* in competition with native ectomycorrhizal fungi and effects on the growth of outplanted Douglas-fir seedlings. *Plant and Soil* 135: 95-107.
- Winder RS. 2006. Cultural studies of *Morchella elata*. *Mycological Research* 110:612-623.

- Wolfe BE, RE Tulloss, A Pringle. 2012. The irreversible loss of a decomposition pathway marks the single origin of an ectomycorrhizal symbiosis. PLoS ONE 7:e39597.
- Yamada A, T Ogura, M Ohmasa. 2001 a. Cultivation of mushrooms of edible ectomycorrhizal fungi associated with *Pinus densiflora* by in vitro mycorrhizal synthesis I. Primordium and basidiocarp formation in open-pot culture. Mycorrhiza 11:59-66.
- Yamada A, T Ogura, Y Degawa, M Ohmasa. 2001 b. Isolation of *Tricholoma matsutake* and *T. bakamatsutake* cultures from field-collected ectomycorrhizas. Mycoscience 42:43-50.
- Yamanaka T. 1994. Fruiting of *Lyophyllum tylicolor* in plate culture on Soytone- glucose agar and urea-treated soil extract agar. Mycoscience 35:187-189.
- Yin PM, K Yahiro, T Ishigaki, Y Park, ML Okabe. 1998. Lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in air-lift bioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering 85:96-100.
- Zambonelli R, GM Bonito. 2012. Edible Ectomycorrhizal Mushrooms. Soil Biology 34 Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 409 pps.
- Zar JH. 2010. Biostatistical Analysis. 5^a ed. Pearson. United States of America. 944 p.
- Zhang H, M Tang, H Chen. 2010. Growth promotion of *Suillus luteus* by adenosine in vitro. Mycoscience 51:139-143.