

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

CULTIVO *IN VITRO* DE CEPAS GUATEMALTECAS DE *Laccaria* spp.

**KATHERIN CELESTE MORATAYA MUÑOZ
STEFANY EUNICE VILLACINDA CÁRCAMO**

QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, ENERO 2021

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

CULTIVO *IN VITRO* DE CEPAS GUATEMALTECAS DE *Laccaria* spp.

Seminario de Investigación

Presentado por

**KATHERIN CELESTE MORATAYA MUÑOZ
STEFANY EUNICE VILLACINDA CÁRCAMO**

Para optar el título de
QUÍMICAS BIÓLOGAS

GUATEMALA, ENERO 2021

JUNTA DIRECTIVA

M. A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Lic. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovanni Rafael Funes Tovar	Vocal IV
Br. Carol Merari Caceros Castañeda	Vocal V

DEDICATORIA

A DIOS

Por todas tus bendiciones, ser la fortaleza y guía para culminar esta importante etapa de nuestras vidas.

A NUESTROS PADRES

Julio Villacinda y Blanca de Villacinda; Natanael Morataya y Rosa Muñoz.

Gracias por su amor y el apoyo incondicional por brindarnos la oportunidad de cumplir nuestros sueños.

A NUESTROS ABUELOS

En especial a Esperanza de Villacinda por todo su amor.

A NUESTROS HERMANOS

Por compartir todos los momentos importantes de nuestras vidas.

A NUESTRA FAMILIA

Especialmente a Luis Emilio Escobar, Astrid Villacinda de Escobar; Familia Obregón López.

Gracias por su cariño y ser incondicionales en cada etapa.

A NUESTROS AMIGOS

En especial a Mishell Burgos, Andrea Osorio, Maria José Pérez, Jenifer Guerra, Cintya Sánchez, Hans Roche; Carla Castillo, Carolina Richter, Isela Pérez, Denis Arias, amigos y compañeros de Biolab, S.A.

Por formar parte de nuestras vidas y hacer cada momento inolvidable.

AGRADECIMIENTOS

A nuestra *Alma mater*, la Tricentenaria Universidad de San Carlos de Guatemala, por brindarnos la oportunidad de formarnos en esta casa de estudios. Es un orgullo ser llamadas sancarlistas.

A nuestros asesores MSc. Osberth Morales y Licda. María del Carmen Bran, por ser nuestros mentores y proporcionarnos las herramientas necesarias para la realización de este proyecto.

A nuestro revisor Dr. Roberto Flores, por su valioso apoyo y orientación en la revisión de este trabajo, estaremos siempre agradecidas.

A todo el equipo del departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica, por abrirnos las puertas y albergarnos durante el desarrollo de esta investigación.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. AMBITO DE LA INVESTIGACIÓN	3
III. ANTECEDENTES	4
A. Asociaciones simbióticas y coevolución	4
B. Tipo de Simbiosis	5
C. Hongos simbióticos	5
1. Hongos comensales	6
2. Hongos mutualistas	6
a. Hongos mutualistas con animales.....	6
b. Líquenes.....	7
c. Endófitos.....	7
d. Micorrizas	8
D. Ectomicorrizas	9
1. Estructura de la ectomicorriza.....	9
2. Filogenia y evolución de las ectomicorrizas	11
3. Genética de las ectomicorrizas	12
E. Género <i>Laccaria</i>	14
1. Historia taxonómica y nomenclatura.....	14
2. Taxonomía.....	15
3. Especies del género en Norteamérica y el mundo.....	15
a. Especies de <i>Laccaria</i> en Guatemala	15
4. Macromorfología del basidioma.....	16
5. Micromorfología del basidioma	17
F. Formación de ectomicorrizas	18
1. Especificidad hongo-hospedero.....	18
2. Aspectos genéticos en la formación de la ectomicorriza.....	19
3. Desarrollo de la ectomicorriza.....	20
G. Asociaciones ectomicorrícicas y distribución	21
H. Aislamiento de hongos ectomicorrícicos en medios de cultivo	22
1. Requerimientos nutricionales para cultivo <i>in vitro</i>	22

I. Características de <i>Laccaria</i> en medio de cultivo.....	24
J. Estudios realizados con <i>Laccaria</i>	25
IV. JUSTIFICACIÓN.....	28
V. OBJETIVOS.....	29
A. Objetivo General	29
B. Objetivos específicos	29
VI. HIPOTESIS.....	30
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
A. Universo	31
B. Muestra.....	31
C. Recursos	31
D. Diseño de Investigación	34
E. Metodología.....	34
1. Preparación de medios de cultivo.....	34
2. Revitalización de las cepas.....	35
3. Determinación de diámetro de crecimiento de las colonias de colonias de las cepas en los diferentes medios de cultivo	36
4. Determinación de características macro y microscópicas en medio de cultivo	36
F. Análisis de resultados	37
VIII. RESULTADOS	38
IX. DISCUSIÓN.....	50
X. CONCLUSIONES	54
XI. RECOMENDACIONES	55
XII. REFERENCIAS	56
XIII. ANEXOS.....	63

I. RESUMEN

El género *Laccaria* forma parte del grupo de macrohongos de los ecosistemas boscosos del altiplano de Guatemala, constituidos principalmente por árboles de pino-encino, los cuales están disminuyendo por deforestación y cambio en el uso de la tierra. *Laccaria* es de mucha importancia en la formación de ectomicorrizas con numerosas especies de árboles a los que beneficia con incremento de la superficie de absorción de agua y nutrientes de su sistema radicular, razón por la cual se sigue utilizando como inóculo en estudios y proyectos de reforestación.

Debido a su importancia, se evaluó el crecimiento *in vitro* de cinco cepas guatemaltecas de *Laccaria* en cuatro medios de cultivo con el fin de identificar el mejor medio de cultivo para cepas locales, de modo que los resultados puedan utilizarse en procesos de micorrización que garanticen el éxito de programas de reforestación con especies de plantas y hongos nativos.

En este sentido, se evaluó el crecimiento miceliar de las cepas en los medios de cultivo Melin-Norkrans modificado (MMN), Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Hagem (AHM) y Biotina-Aneurina-Ácido fólico (BAF). Los resultados se analizaron por medio de un análisis de varianza de una vía, con una prueba de comparaciones múltiples de Tuckey ($\alpha=0.05$) a un intervalo de confianza del 95%. Por otra parte las características micro y macroscópicas de cada cepa observadas en los medios de cultivo, se agruparon a través de análisis de conglomerados.

Se determinó que el mayor diámetro de crecimiento miceliar de las cepas de *Laccaria* se obtuvo en los medios MEA y BAF, los cuales fueron estadísticamente diferentes respecto a AHM.

En cuanto a las características macroscópicas, las cepas produjeron colonias de color lila a violeta al inicio del periodo de incubación, con excepción de MEA, donde se produjeron colonias con tonos naranja-café. Al final del período de cultivo todas las colonias tomaron una textura aterciopelada y blanquecina. Las cinco cepas de *Laccaria* evaluadas presentaron microscópicamente hifas con un diámetro de 1-3 μm , nódulos de pared gruesa localizados a lo

largo de las hifas en posiciones terminales o intermedias y eventualmente presencia de fíbulas en las cepas MICG-1812 y MICG-1813.

II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La mayoría de las plantas existentes en el mundo forman asociaciones simbióticas mutualistas entre raíces y hongos las cuales se denominan micorrizas. Estas juegan un papel importante en la absorción de agua y nutrientes del suelo, intervienen en el control biológico de patógenos de raíz, aportan sustancias reguladoras del crecimiento vegetal y de esta forma cooperan con el ecosistema forestal (Pera y Parladé, 2005; Peterson, Massicotte & Melville, 2004). El tipo de micorriza de mayor importancia para las especies arbóreas de interés forestal es la ectomicorriza, ya que favorece en la calidad del sistema radicular del árbol y la captación de agua y nutrientes. Las especies fúngicas del género *Laccaria* (Basidiomycota) son de suma importancia en la naturaleza ya que puede formar ectomicorrizas, razón por las que son muy utilizadas en estudios de micorrización *in vitro* de plantas destinadas a la reforestación (Pera y Parladé, 2005). Para una restauración eficiente de los recursos forestales de Guatemala, es necesario encontrar soluciones y estrategias que garanticen la sobrevivencia de árboles utilizados en programas de reforestación, así como la conservación de bosques en zonas de gran altitud y alto endemismo biológico.

Debido a la importancia de las ectomicorrizas las cuales podrían ser utilizadas en programas de reforestación en Guatemala, este estudio propuso evaluar el crecimiento en cultivo *in vitro* de cinco cepas de *Laccaria* aisladas en el país, su caracterización macroscópica y microscópica empleando cuatro medios de cultivo específicos. Con ello se pretendió determinar el medio de cultivo más adecuado para el crecimiento de las cepas nativas evaluadas, y su futuro uso en investigaciones sobre procesos de producción de inoculo y de micorrización.

Finalmente, este seminario forma parte del proyecto macro “Diversidad de macrohongos y microhongos de Guatemala”, ejecutado en la Unidad de Biodiversidad, Tecnología y Aprovechamiento de Hongos –UBIOTAH-, del Departamento de Microbiología de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

III. ANTECEDENTES

A. Asociaciones simbióticas y coevolución

La simbiosis es una asociación entre dos o más organismos de diferentes especies, la cual puede ser permanente o de larga duración. Esta definición excluye poblaciones en las que se dan asociaciones entre individuos de la misma especie (Paracer & Ahmadjian, 2000). Los organismos involucrados en una simbiosis pueden beneficiarse, ser perjudicados o no verse afectados por la asociación (Das & Varma, 2009).

Las asociaciones simbióticas son comunes en la naturaleza. Incluyen bacterias y hongos que forman alianzas cercanas con raíces de plantas terrestres, hasta las existentes entre gusanos tubulares gigantes y bacterias sulfuroxidantes de profundidades de los océanos. Ninguno de los organismos participantes es individual en sí mismo, cada uno tiene una relación con otros, directa o indirectamente (Paracer & Ahmadjian, 2000).

Los conceptos de evolución moderna están profundamente enmarcados en la selección de grupo, parentesco genético, aptitud inclusiva y equilibrio gradual contra equilibrio puntual. La mayoría de biólogos ha aceptado el concepto de un origen de endosimbiosis en serie en los eucariotas. El impacto evolutivo de las interacciones biológicas sólo comienza a ser apreciado en términos de su influencia sobre la especiación y la biodiversidad, la patogénesis microbiana y la carrera evolutiva entre un huésped y su simbiote (Paracer & Ahmadjian, 2000).

Varios estudios paleobotánicos, morfoanatómicos y filogenéticos basados en técnicas moleculares evidencian que la coevolución mantenida entre hongos micorrícicos y raíces de plantas se remonta al Paleozoico, hace más de 400 millones de años, con el origen de las primeras plantas terrestres. De hecho, los ancestros de los actuales helechos y plantas terrestres no vasculares ya presentaban asociaciones similares a las ahora conocidas micorrizas arbusculares.

Por tanto, los diferentes tipos de micorrizas que hoy observamos y clasificamos es el resultado de esta cercana interacción y la subsiguiente modificación y especialización de determinadas

estructuras (hifas y raíces principalmente) en ambos grupos de organismos a través del tiempo (Honrubia, 2009).

B. Tipo de simbiosis

El comensalismo es el término que se utiliza cuando existe un beneficio para uno de los simbioses ya sea de tipo nutricional o protector, sin dañar al otro organismo. Tal es el caso entre *Lepisma saccharina*, un insecto tisanuro conocido como pececillo de plata y las hormigas guerreras. *L. saccharina* vive con las hormigas y participa en sus incursiones y comparte sus presas (Paracer & Ahmadjian, 2000).

El mutualismo es la asociación simbiótica en la que los organismos asociados obtienen beneficios. Un ejemplo son los líquenes, asociación estrecha entre hongos-alga, en la que el alga obtiene protección por parte de los hongos contra la desecación, esta le proporciona nutrientes derivados de los procesos fotosintéticos. Otros casos son las micorrizas entre hongos y raíces de plantas superiores que ayudan en la absorción de nutrientes entre otros (López et al., 2006).

El parasitismo es el tipo de simbiosis en la que uno de los simbioses se beneficia a expensas del otro causándole algún daño aunque no necesariamente la muerte. El factor primario en el parasitismo es la nutrición: el parásito obtiene su alimento del hospedero. Las simbiosis parasitarias afectan al huésped de diferentes maneras, algunos parásitos son tan patógenos produciendo enfermedad en el huésped y en otras asociaciones los simbioses han coevolucionado en un parasitismo controlado, donde la muerte de las células hospederas está altamente regulada (Paracer & Ahmadjian, 2000).

C. Hongos simbióticos

Los hongos simbióticos se asocian con otros organismos, relación con la cual pueden beneficiarse, perjudicarse, o no verse afectados (Das & Varma, 2009).

1. Hongos comensales

Hay de dos tipos: a) los que se encuentran adheridos a la superficie externa del hospedero o ectocomensales y 2) los hongos endocomensales son los que se encuentran en el interior. Ejemplo de hongos endocomensales son los del género *Harpella*, que se desarrollan en el intestino de varios artrópodos y *Smittium culisetae* que crece en intestino de larvas de dípteros. Por otra parte, las levaduras del género *Malassezia* son ectocomensales de la piel en zonas ricas de glándulas sebáceas del hombre y algunos animales de sangre caliente. De igual forma, *Candida albicans* es endocomensal de mucosas. Bajo ciertas condiciones, ambos hongos pueden volverse patógenos produciendo diferentes tipos de lesión (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas y Vargas, 2012).

2. Hongos mutualistas

a. Hongos mutualistas con animales

Algunas especies de termitas y hormigas usan los hongos como una fuente suplementaria de vitaminas, mientras que las hormigas dependen completamente de los hongos para obtener nutrientes. En el caso de las termitas, los hongos ingeridos también proporcionan enzimas que ayudan al insecto a digerir celulosa y otros polisacáridos. Los escarabajos de las familias *Scolytidae*, *Platypodidae* y *Lymexilidae*, perforadores de túneles en los troncos de árboles, también entablan una relación especial con algunos hongos. Estos insectos poseen estructuras especializadas llamadas micangios, en las cuales transportan hongos cuando viajan de un árbol a otro. Los hongos son introducidos a los árboles en los túneles de escarabajos, degradan la madera, crecen y esporulan y sirven de alimento a las larvas las cuales no pueden digerir la madera. Los hongos aislados de estos túneles pertenecen a levaduras de los géneros *Endomyces* y *Saccharomyces*, mohos de los géneros *Ambrosiella*, *Acremonium*, *Diplodia* y *Scopulariopsis*, así como algunas formas conidiales del *Phyllum* Basidiomycota (Cepero et al., 2012)

Las hormigas micófagas cortadoras de hojas de los géneros *Atta* y *Acromyrmex*, cultivan en sus nidos al hongo *Leucoagaricus gongylophorus*, al que alimentan con las hojas que cortan y transportan y que son degradadas por las celulasas producidas por el hongo (Paracer & Ahmadjian, 2000). Los miembros del *Phylum Neocallimastigomycota*, son anaerobios estrictos

que *viven* dentro del intestino de vertebrados herbívoros, donde son esenciales para la digestión de la celulosa y hemicelulosa, ya que por sí mismos no son capaces de digerir estos carbohidratos (Blackwell, 2011).

b. Líquenes

Los líquenes han sido considerados como una simbiosis entre un solo hongo, generalmente un ascomiceto y un compañero de fotosíntesis. Recientemente se ha demostrado que los líquenes están compuestos por un ascomiceto, el compañero de fotosíntesis e inesperadamente por levaduras de basidiomicetos específicos. Estas levaduras están incrustadas en la corteza y su abundancia se correlaciona con variaciones de fenotipo. Los linajes de levaduras mantienen estrechas asociaciones con especies de líquenes a grandes distancias geográficas y se han encontrado en seis continentes (Spribille et al., 2016).

Estas levaduras incrustadas pertenecen al género *Cyphobasidium* y se descubrieron en el macroliquen *Bryoria*. La capa de corteza del liquen se ha considerado como clave para su estabilización estructural así como para la transferencia de agua y nutrientes al interior del talo. La mayoría de líquenes poseen un esquema básico de corteza de dos capas que consiste en hifas internas conglutinadas y una capa periférica rica en polisacáridos. Sin embargo, la estructura celular interna no es uniforme en todos los líquenes, y la composición de polisacáridos extracelulares se conoce poco. El descubrimiento de las levaduras ubicuas incrustadas en la corteza plantea la posibilidad de que más de un hongo pueda estar involucrado en su construcción y podría explicar por qué los líquenes sintetizados *in vitro* de ascomicetos y cultivos de algas desarrollados axénicamente, desarrollan sólo capas cortas rudimentarias (Spribille et al., 2016).

c. Endófitos

En la década de 1970 se descubrió un nuevo tipo de asociación entre plantas y hongos, los endófitos. Estos constituyen un tipo de relación mutualista entre hongos que habitan dentro de hojas o tallos de plantas sin ocasionar enfermedad ni síntomas en ellas. Los hongos que forman este tipo de relaciones pertenecen al *Phyllum* Ascomycota en sus formas asexuales, e incluyen los géneros *Balansia*, *Epichloe*, *Myriogenospora* y *Neotyphodium*. Desde entonces se ha encontrado que estas simbiosis endófitas están muy extendidas, se estima que el 20-30% de todas las

especies de gramíneas albergan dichos hongos. Los endófitos pueden proteger a sus anfitriones de una variedad de perturbaciones bióticas y abióticas, en particular de daño por herbívoros. Estos beneficios surgen en parte de la producción de micotoxinas, específicamente varias clases de alcaloides. A cambio, los hongos simbiotes adquieren nutrientes de sus plantas hospederas (Cepero et al., 2012).

d. Micorrizas

Las micorrizas son asociaciones simbióticas que se forman entre las raíces de la mayoría de las especies de plantas superiores y hongos (Smith & Read, 2008). El principal beneficio para la planta hospedera es la mayor absorción de nutrientes inmóviles del suelo, en particular el fósforo. Las asociaciones micorrícicas aumentan la acumulación de nitrógeno en los tejidos vegetales como resultado de la absorción de nitrógeno mineralizado por las hifas. Además, estos hongos interactúan con otros organismos del suelo involucrados en importantes ciclos de nutrientes. Tales papeles ecológicos son de especial importancia en los sistemas de manejo agrícola los cuales dependen de ciclos naturales de nutrientes. Por lo tanto, los hongos micorrícicos constituyen un componente integral e importante de los ecosistemas y pueden tener aplicaciones significativas en sistemas agrícolas sostenibles (Mohammadi, Rezaee, Prasad & Varma, 2008).

Las asociaciones de hongos micorrícicos simbiotes varían ampliamente en estructura y funciones. Sin embargo, hay un movimiento bidireccional de nutrientes, el carbono fluye hacia el hongo y los nutrientes inorgánicos se mueven a la planta, proporcionando un vínculo crítico entre la raíz de la planta y el suelo. En suelos infértiles los nutrientes absorbidos por hongos micorrícicos pueden mejorar el crecimiento y reproducción de las plantas. Como resultado, las plantas micorrizadas son a menudo más competitivas y toleran mejor el estrés ambiental que las plantas que no forman micorrizas (Mohammadi et al., 2008).

En cuanto a la clasificación de micorrizas, se ha indicado que hay siete tipos basándose en la morfología anatómica y la taxonomía de la planta hospedante o fúngica: ectomicorrizas, endomicorrizas o micorrizas arbusculares, micorrizas ericoides, micorrizas arbutoides, micorrizas monotropoides, ectoendomicorrizas y micorrizas orquidoides (Mohammadi et al., 2008).

D. Ectomicorrizas

La ectomicorriza es la simbiosis que se forma típicamente entre las raíces terminales de las especies de plantas generalmente leñosas perennes y una variedad de hongos (Taylor & Alexander, 2005). Las forman aproximadamente unos 5000 a 6000 especies de hongos en todo el mundo, en comparación con alrededor de 150 especies de hongos que forman micorrizas arbusculares. El alto grado de diversidad fúngica sugiere que hay efectos potenciales significativos a nivel de comunidades de estos hongos asociados a la planta hospedera, como en el rendimiento y potencialmente en la estructura de las comunidades de plantas y funcionamiento de los ecosistemas (Smith & Read, 2008).

La notable alta diversidad de hongos ectomicorrícicos corresponde igualmente a una amplia gama de funcionamiento fisiológico de hongos. Una función clave de los hongos ectomicorrícicos está en su capacidad de aumentar la disponibilidad de recursos a las plantas (Dighton, White & Oudemans, 2005). La mayoría de especies de hongos que participan en la simbiosis pertenecen al *Phyllum* Basidiomycota, pero también hay de los *Phyllum* Ascomycota y Zigomycota (Smith & Read, 2008).

1. Estructura de la ectomicorriza

La ectomicorriza se caracteriza por la presencia de tres componentes estructurales: una vaina o manto de tejido fúngico que encierra la raíz, red de Hartig y un sistema de elementos hifales que crecen hacia afuera (micelio extrarradical o externo), que forman conexiones esenciales tanto con el suelo como con los basidiomas de los hongos que forman las ectomicorrizas (Smith & Read, 2008).

a. Manto

Está formado por hifas que rodean la raíz del hospedero formando una cubierta o manto. Este manto cubre la raíz y conduce cambios en su color y morfología (Varma, Prasad & Tuteja, 2017). El manto ocupa una posición única ya que interactúa con la raíz (manto interior) y el suelo (manto exterior). Para la formación del manto, las hifas fúngicas entran en contacto con la superficie de las raíces laterales y pueden interactuar con los pelos radiculares o la superficie de

las células epidérmicas. En algunos casos, los pelos radiculares responden desarrollando paredes espesas de células. En otros, las hifas se encuentran en primer contacto con la raíz o células epidérmicas. Una vez que se hace el contacto la morfología de las hifas cambia y producen ramificaciones, así como un aumento en el diámetro de las hifas. Con el crecimiento continuo de las hifas, los pelos radiculares y las células capilares de la raíz se incorporan en el manto en desarrollo y la superficie de la raíz puede estar envuelta por hifas organizadas de forma holgada o compacta. En este último caso, los depósitos de polisacáridos y materiales fenólicos están a menudo presentes entre las hifas. Las hifas del manto interno con frecuencia se ramifican repetidamente, con lo cual aumentan la superficie para el intercambio de nutrientes. Aunque el intercambio de nutrientes en la mayoría de ectomicorrizas ocurre en la red de Hartig, la ramificación de las hifas del manto interior sugiere que estas también pueden participar en el movimiento bidireccional de nutrientes. El hongo es capaz de absorber glucosa y/o fructosa de las células de la raíz y convertirlo en carbohidratos solubles o insolubles como el glucógeno. Estos compuestos pueden ser almacenados temporalmente en el manto. Además, en las hifas del manto pueden acumularse otros compuestos que incluyen lípidos, proteínas, compuestos fenólicos y polifosfatos, metales nocivos que pueden estar unidos a polifosfatos y otros depósitos vacuolares que impiden la absorción de nutrientes en las raíces (Peterson et al., 2004).

b. Red de Hartig

La red de Hartig está formada por hifas originadas en el manto interno. Se desarrolla entre las células de las raíces y forma una interfaz compleja de intercambio de nutrientes sobre la superficie de estas células. A través de las hifas la mayoría de los carbohidratos son absorbidos por el hongo, donde los nutrientes minerales y el agua son transportados a las células de las raíces. Las hifas de la red de Hartig también pueden funcionar como un depósito para los hidratos de carbono solubles e insolubles, lípidos, compuestos fenólicos y polifosfatos. En la mayoría de las especies de angiospermas, la red de Hartig se desarrolla sólo alrededor de las células epidérmicas. En las coníferas, la red de Hartig se desarrolla alrededor de las células epidérmicas y corticales y frecuentemente ocupa la mayor parte del volumen de la corteza (Peterson et al., 2004).

c. Micelio extraradical

Las hifas que se desarrollan desde el manto externo hasta el suelo circundante se denominan en conjunto “micelio extra radical”; este puede ser una extensa red compuesta de hifas que permanecen en el suelo y que pueden interconectar raíces de la misma planta a las de otras adyacentes. El micelio extraradical tiene un papel importante en el funcionamiento de la ectomicorriza ya que su función es la movilización, absorción y translocación de nutrientes minerales y agua del sustrato del suelo a las raíces de las plantas. Muchas especies de hongos ectomicorrícicos forman complejos de hifas extra radicales que pueden variar considerable en su morfología, color y estructura interna, por ejemplo, pueden formar rizomorfos los cuales consisten en un número variable de hifas interconectadas entre sí por diferentes mecanismos. En el rizomorfo una o más hifas (hifas vasculares) se agrandan y estos pueden tener septos modificados que permiten movimiento rápido de agua y nutrientes minerales. Las hifas periféricas de los rizomorfos pueden tener paredes espesas y pigmentadas que pueden estar involucrados en el apoyo estructural o proporcionar resistencia a la pérdida de agua lateralmente (Peterson et al., 2004).

Pocas especies de hongos ectomicorrícicos forman esclerocios en el micelio extra radical. Un esclerocio es una masa compacta de micelio endurecido que usualmente desarrolla un revestimiento exterior melanizado, rodeando una corteza (zona central) de hifas compactas y una médula de hifas poco organizadas. La región cortical almacena proteínas, lípidos, polisacáridos y polifosfatos. La formación de cuerpos reproductivos, tanto basidiomas como ascomas, implica la ramificación localizada de hifas extra radicales. En la madurez se forma una estructura reproductiva típica de las especies fúngicas (Peterson et al., 2004; Webster & Weber, 2007).

2. Filogenia y evolución de las ectomicorrizas

Se estima que del 2-3% de las plantas vasculares (unas 6,000-10,000 especies) forman ectomicorrizas. Así mismo, se enfatiza que la mayoría de plantas que forman ectomicorrizas pertenecen a las familias *Pinaceae*, *Fagaceae* y *Betulaceae* en el hemisferio norte, así como en las familias *Nothofagaceae*, *Myrtaceae*, *Dipterocarpaceae* y varios géneros en *Fabaceae* en áreas templadas, subtropicales y tropicales del hemisferio sur. En una publicación sobre la diversidad de micorrizas vegetales a escala global, Brundrett (2009) enumeró 26 familias de

plantas angiospermas y gimnospermas, con 145 géneros en total. Es probable que estas cifras se incrementen en el futuro, con nuevas plantas ectomicorrícicas, identificadas particularmente en los trópicos (Comandini, Rinaldi & Kuyper, 2012).

Se cree que los hongos ectomicorrícicos han evolucionado 66 veces independientemente de sus antepasados no ectomicorrícicos, 27 linajes pertenecen al *Phyllum* Ascomycota, 37 al *Phyllum* Basidiomycota y dos al *Phyllum* Zygomycota. Los taxones de hongos ectomicorrícicos pertenecen a cinco órdenes del Ascomycota y diez al Basidiomycota (Tedersoo, May & Smith, 2010).

Los linajes ectomicorrícicos evolucionaron principalmente de hongos saprobios (94.7% de los casos resueltos). De los anteriores, predominan los hongos del humus (61.1%), seguidos por los degradadores de madera (30.6%) y saprobios pirófilos (8.3%). Diversos análisis filogenéticos sugieren que los linajes ectomicorrícicos no evolucionaron de hongos que descomponen la hojarasca (Tedersoo et al., 2010).

3. Genética de las ectomicorrizas

Como se mencionó con anterioridad, los hongos pertenecen a una amplia gama de linajes del *Phyllum* Basidiomycota y algunos del *Phyllum* Ascomycota, los cuales producen estructuras simbióticas similares (es decir, manto y red Hartig), lo que sugiere que las ectomicorrizas probablemente evolucionaron reclutando algunas características comunes. Esta última hipótesis es apoyada por varios estudios genéticos y moleculares (Howard & Gow, 2007).

La mayoría de basidiomicetos son heterotálicos, con un control genético de apareamiento muy complejo. Existen varios miles de tipos de apareamientos determinados por loci multialélicos. En estos se produce un micelio sexual monocariótico estéril a partir de la germinación de basidiosporas durante la meiosis. En los basidiomicetos micorrícicos, los monocarióticos son normalmente incapaces de producir ectomicorrizas completamente desarrolladas, pero el apareamiento entre micelios monocarióticos permite que el dicarion resultante produzca cuerpos fructíferos y forme ectomicorrizas (Smith & Read, 2008).

Las principales alteraciones en los patrones de expresión génica ocurren durante el desarrollo de la ectomicorriza. Hace algunos años se postuló el mecanismo regulador básico, el cual involucra jerarquías de expresión genética nuclear. En el nivel superior son un conjunto de genes maestros cuya actividad controlan el cambio de desarrollo del patrón de crecimiento apical indeterminado del micelio vegetativo, al patrón altamente organizado de las ectomicorrizas. La actividad de estos genes sería necesaria y suficiente para inducir una cascada reguladora que sea parcialmente responsable de la ontogenia de ectomicorriza. Estos genes responderían a las señales rizosféricas y apoplásicas emitidas por moléculas sensoriales y señales nutricionales (por ejemplo, concentración de metabolitos nitrógeno y carbono) (Howard & Gow, 2007).

Estos genes activarían el desarrollo de micorrizas y la ontogenia de la ectomicorriza. A niveles inferiores en la jerarquía de la regulación estarían los genes (por ejemplo de hidrofobinas) que regulan los detalles del desarrollo de la simbiosis (por ejemplo, la agregación de hifas), que es probable que difieren entre las especies de hongos micorrícicos y los árboles hospederos. Hasta la fecha, cientos de genes preferentemente expresados en tejidos simbióticos han sido identificados por el perfil de transcripción, pero los genes maestros que intervienen en el desarrollo de la simbiosis aún no se han identificado. Mientras que los genes reguladores dominantes que controlan el desarrollo de ectomicorrizas esperan su identificación, los mutantes de leguminosas han sido herramientas clave para la disección genética del desarrollo de micorrizas arbusculares. Los genes se denominan colectivamente como genes “comunes”, los cuales definen una superposición entre los programas genéticos para la endosimbiosis y la simbiosis del nódulo de raíz fijadora de nitrógeno. La implicación evolutiva es que la simbiosis bacteriana más joven ha reclutado funciones de la antigua micorriza arbuscular. Es tentador especular que las recientes simbiosis ectomicorrícicas (que datan de hace 180 millones de años) también han reclutado los genes SYM de la micorriza arbuscular, es decir la quinasa receptora SYMRK / NORK / DMI2, el canal iónico DMI1 y la quinasa DMI3, calcio y calmodulina. La búsqueda de estos y otros factores de simbiosis se lleva a cabo actualmente utilizando una serie de enfoques complementarios, incluyendo genómica comparativa, transcriptómica, metabolómica, proteómica y genética inversa (Howard & Gow, 2007).

E. Género *Laccaria*

Laccaria es un género cosmopolita de hongos. Ha sido reportado en comunidades de plantas ectotróficas en todos los continentes excepto en Antártida- Sin embargo, no se tiene información del mismo en bosques nativos de la Amazonía en América del Sur o en el Sahara hasta el sur de África. Se ha reportado que las especies de este género forman asociaciones ectomicorrícicas con numerosas especies arbóreas que incluyen muchas de gran importancia económica, con frecuencia pinos y eucaliptos en todo el mundo. La sistemática y la biogeografía de las especies de *Laccaria* han sido bien estudiadas particularmente en Norteamérica (Mueller, 1992). Algunas especies son fácilmente manipulables bajo condiciones experimentales debido a que se asocian a una amplia gama de hospederos, son antagonistas de patógenos de raíz que habitan en el suelo y pueden sobrevivir en lugares talados, por lo que se han utilizado ampliamente en investigaciones básicas y aplicadas sobre asociaciones ectomicorrícicas (Kropp & Mueller, 1999).

1. Historia taxonómica y nomenclatura

El nombre de *Laccaria* fue propuesto por primera vez por Berkeley y Broome en 1883, para incluir a las especies de *Agaricus* subgénero *Clitocybe* que producían basidiosporas globosas y que a menudo formaban una esporada blanca sobre las láminas adheridas. Posteriormente Scopoli en 1772 fue el primero en utilizar el binomio *A. laccatus* para un miembro del eventual género *Laccaria*, cuando describió los hongos de Tirol, al sur de Austria. Dos especies más, *A. amethystinus* y *A. farinaceus* fueron descritas en 1778 en los alrededores de Londres. *Agaricus tortilis* fue descrito de Halifax (Inglaterra) en 1788 y finalmente, en 1801 se nombraron *A. bellus* a dos variedades de *A. farinaceus*: var. *rosellus* y var. *tortilis*. En 1821 se clasificó a los anteriores en el subgénero *Clitocybe* y entre 1821 y 1884, se describieron otras especies del género *Laccaria* (Mueller, 1992).

El género *Laccaria* fue reconocido por Fayod en 1889 y Patouillard en 1900. En 1912, Peck fue el primero en Estados Unidos en reconocer al género y uno de los primeros en el mundo en publicar un artículo exclusivamente sobre el grupo. Sin embargo, Singer fue quien organizó y formuló una clasificación coherente para *Laccaria*, y sus investigaciones han sido el punto de partida de otras investigaciones sistemáticas del género desde la década de 1940 (Mueller, 1992).

2. Taxonomía

El género *Laccaria* está ubicado dentro de la familia *Tricholomataceae* (orden Agaricales) y es considerado actualmente un género autónomo separado de otros miembros de esa familia por la mayoría de los taxónomos. También se ha encontrado que los géneros *Hydnangium* y *Podohydangium* están estrechamente relacionados con *Laccaria* debido a la ornamentación equinulada de las basidisporas, lo que indica una estrecha relación filogenética entre ellos. Un análisis cladístico preliminar de la ITS (región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal), apoya la hipótesis de que los tres géneros forman un grupo monofilético (Kropp & Mueller, 1999).

Debido a que muchos taxones de *Laccaria* parecen similares superficialmente, la delimitación dentro del género es difícil. Mueller (1992) reconoció 40 especies para el género en todo el mundo, pero en la actualidad se ha reportado que *Laccaria* comprende al menos 75 especies alrededor del mundo (Kirk, Cannon, Minter & Stalpers, 2008). Adicionalmente, estudios recientes de diversificación y evolución del género han identificado 116 especies filogenéticas para *Laccaria*, cerca de un 50% más de la diversidad conocida (Wilson, Hosaka & Mueller, 2017).

3. Especies del género en Norteamérica y el mundo

De conformidad con Wilson y colaboradores (2017), se han identificado 116 taxones de *Laccaria* distribuidos alrededor del mundo (Anexo 1). Para la región de Norteamérica, Muller (1992) reconoció la presencia de: *L. amethystina*, *L. amethysteo-occidentalis*, *L. bicolor*, *L. fraterna*, *L. laccata* var. *laccata*, *L. laccata* var. *pallidifolia*, *L. longipes*, *L. marítima*, *L. montana*, *L. nobilis*, *L. oblongospora*, *L. ochropurpurea*, *L. ohiensis*, *L. próxima*, *L. pumila*, *L. striatula*, *L. trichodermophora*, *L. tortilis*, *L. trullissata* y *L. vinaceobrunnea*.

a. Especies de *Laccaria* en Guatemala

En Guatemala han sido reportadas nueve especies: *L. amethystina*, *L. bicolor*, *L. gomezii*, *L. laccata*, *L. major*, *L. nobilis*, *L. ohiensis*, *L. próxima* y *L. trichodermophora* (Morales, Bran, Cáceres y Flores, 2003).

4. Macromorfología del basidioma

a. Color

Todos los miembros del género se tornan traslúcidos en la humedad, especialmente los taxones con basidiomas de color violeta a púrpura. La mayoría de basidiomas de *Laccaria* varían en tonos color naranja-marrón a color carne. Es importante observar el color del píleo cuando aún está fresco y en todas las etapas de crecimiento, ya que existen variaciones en la coloración con la edad. El color del micelio en la base del estipe también es sistemáticamente importante en el género y puede ser de violáceo a blanco. Todos los taxones con láminas violetas tienen consistentemente un micelio basal violeta, sin embargo, con la edad el color ocasionalmente se desvanece tornándose blanquecino. El color del basidioma es raramente utilizado para delimitar especies (Mueller, 1992).

b. Tamaño

La mayoría de los taxones tienen basidiomas maduros de tamaño moderado, con píleos de 20-50 mm de ancho y estípites que pueden medir hasta 60 mm de largo. *L. montana*, *L. ohiensis*, *L. pumila* y *L. tortilis* se caracterizan por ser pequeñas con píleos hasta los 30 mm de ancho, mientras que *L. amethysteo-occidentalis*, *L. nobilis*, *L. ochropurpurea* y *L. trullissata* poseen píleos mayores a los de 60 mm de ancho. La altura del basidioma también puede ser sistemáticamente importante, como en *L. próxima*, *L. ochropurpurea* y *L. trullissata* que suelen ser robustas (Mueller, 1992).

c. Ornamentación

Las características de ornamentación de los estípites y píleos están frecuentemente asociadas con el tamaño del basidioma. Aunque la mayoría de los taxones pequeños aparecen finamente fibrilosos cuando están frescos, los taxones con grandes basidiomas como *L. nobilis* tienen a menudo un píleo que se vuelve escamoso a escuamuloso debido a la difracción cuticular. Además, los basidiomas grandes pueden llegar a formar reticulaciones o ser escamosos cerca del ápice del estípite (Mueller, 1992).

d. Color de la esporada y características morfológicas adicionales

Con excepción de *L. amethystina* y *L. ochropurpurea* que pueden tener esporadas con tonos blanquecinos o violeta claro, todos los taxones reportados en Norteamérica tienen esporadas blancas. El color de las mismas se torna amarillento con el paso de la edad. Finalmente, las características como tipo y grado de estriaciones de píleo, la forma del píleo, la unión laminar y el grosor así como el contexto de los píleos y estípite, conjuntamente con el olor y el gusto no son sistemáticamente significativos dentro del género (Mueller, 1992).

5. Micromorfología del basidioma

a. Basidios y esterigmas

El número de basidiosporas por basidio es significativo en *Laccaria*. Muchas especies de Agaricales tienen un número variable de esterigmas por basidioma; sin embargo, el carácter es consistente en *Laccaria* ya que los basidios tienen el mismo número de esterigmas. Los basidios de *L. fraterna*, *L. pumila*, y *L. tortilis* tienen de dos a tres basidiosporas por basidio, mientras que los taxones norteamericanos tienen cuatro (Mueller, 1992).

b. Basidiosporas

La forma de la basidiosporas es de importancia crítica para designar especies. Las basidiosporas según términos de la relación longitud-ancho (índice Q) son: globosas= 1.0-1.05, subglobosas= 1.06-1.15, ampliamente elipsoides= 1.16-1.23, elipsoides o amígdaliforme= 1.24-1.6, oblongas= 1.65-2.0 y cilíndricas o subfusiformes mayor a 2.0. Los especímenes de la mayoría de los taxones norteamericanos tienen basidiosporas que son subglobosas a ampliamente elipsoides (Mueller, 1992).

En algunos casos el tamaño de la basidiosporas es también un criterio importante para la caracterización sistemática. Los especímenes de la mayoría de los taxones tienen longitudes promedio de 8-9 μm . Con excepción de *L. trullissata*, que tiene esporas finamente rugosas, todas las especies de *Laccaria* tienen esporas equinuladas, con prominencias cerca del apéndice hilar. Las basidiosporas también son inamiloides y acianófilas. La microscopía electrónica de transmisión y la microscopía de barrido han descrito que las basidiosporas de *Laccaria* están

compuestas de microtúbulos perpendiculares a la epispora, característica muy propia del género (Mueller, 1992).

c. Cutícula

El género presenta tres tipos de arreglos hifales: tricodérmico, entrelazado o entretejido con fascículos dispersos casi perpendiculares a las hifas. Las hifas de la cutícula a menudo están incrustadas con un pigmento marrón-amarillento de ligero a moderado (Mueller, 1992).

d. Cistidios y características micromorfológicas adicionales

Los queilocistidios están presentes en la mayoría de las especies *Laccaria*, con morfología parecida a hifas alargadas y filamentosas que se extienden más allá de los basidios. En muchas especies estos forman una capa casi estéril. Las especies de Norteamérica no presentan pleurocistidios y los caulocistidios son morfológicamente indiferenciados en algunos taxones (Mueller, 1992).

La aparición constante de fíbulas en los septos y la trama laminar paralela o subparalela son características genéricas importantes de *Laccaria*. Además, todas las hifas son no amiloides y además hialinas en KOH. Las hifas que comprenden el micelio basal están estrechamente entretejidas y morfológicamente indiferenciadas o en forma de barril, con diámetro variable entre taxones (Mueller, 1992).

F. Formación de ectomicorrizas

1. Especificidad hongo-hospedero

El género *Laccaria* forma ectomicorrizas con un amplio número de hospederos de las familias *Pinaceae* y con los géneros *Larix*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Dipterocarpaceae*, *Dipterocarpus*, *Fagaceae*, *Betula*, *Myrtaceae*, *Eucalyptus*, *Leptospermum*, *Picea*, *Tsuga*, *Abies*, *Fagus*, *Nothofagus*, *Quercus*, *Tiliceae*, *Tilia*, *Salicaceae*, y *Salix*. Estas asociaciones contribuyen con la biodiversidad de suelos y al funcionamiento del ecosistema ya que regulan la productividad de los bosques (Carrasco et al., 2010).

La ectomicorriza formada por las diferentes especies del género con las especies arbóreas, varían en su macromorfología (por ejemplo, el grado de ramificación), pero son similares en la micromorfología. Las ectomicorrizas exhiben un manto bien definido de 15-60 μm de espesor con hifas morfológicamente indiferenciadas y estrechamente entrelazadas, con una red de Hartig consistentemente bien desarrollada y extendida a través del 70-100% de la corteza (Mueller, 1992).

2. Aspectos genéticos en la formación de la ectomicorriza

La evidencia actualmente disponible indica que la capacidad de la formación de ectomicorrizas por las especies de *Laccaria* está controlada poligénicamente. Esta evidencia proviene de un estudio que utilizó cruces compatibles de progenie haploide y dicariótica. Aunque una porción relativamente pequeña de la variación en la colonización de la ectomicorriza estaba bajo control genético, la formación de la micorriza para la progenie tanto dicariótica como monocariótica se distribuyó continuamente, lo cual indica que la colonización está bajo control poligénico (Kropp & Muller, 1999).

La colonización modulada poligénicamente es lógica, porque una colonización muy intensa desvía demasiados carbohidratos al hongo, lo que se demuestra en una disminución del tamaño de la planta. En este caso el hongo podría actuar más como un parásito que un simbiote. Por otra parte, la colonización pobre proporcionaría poco beneficio al hospedero. Por lo tanto, la selección estabilizadora puede mantener la relación equilibrada en un nivel óptimo que proporcionaría beneficios a ambos, pero evitaría que el hongo drenara los carbohidratos del hospedero. También se ha demostrado que una serie de factores adicionales importantes para el funcionamiento de la ectomicorriza están bajo control poligénico, como la producción de ácido 19róxi-3-acético, glutamato deshidrogenasa y la actividad de la fosfatasa ácida en algunas especies (Kropp & Muller, 1999).

No se ha publicado todavía ninguna investigación sobre la expresión génica durante la formación de ectomicorrizas por especies de *Laccaria*. Sin embargo, se han realizado investigaciones sobre los cambios en la síntesis de proteínas que se producen durante la formación de ectomicorrizas por otras especies de hongos. La evidencia indica que en al menos

algunas combinaciones hongo-hospedero se producen enormes alteraciones en los patrones de síntesis de proteínas cuando esta se forma. Lo anterior demuestra que existen proteínas relacionadas con la simbiosis (Kropp & Muller, 1999).

3. Desarrollo de la ectomicorriza

El estudio de micorrizas con otros hongos ha sugerido que las especies de hongos ectomicorrícicos comienzan la colonización en la superficie de la raíz. Se han observado que las hifas de *L. bicolor* inicialmente se incrustan en el mucílago de las raíces, sin degradarla. Las lectinas pueden ayudar en el proceso de unión ya que reconocen residuos de azúcares extracelulares en polisacáridos o glicoproteínas (Kropp & Muller, 1999).

Lei, Wong & Piché (1991) encontraron que los sitios de unión de concaivalina A, eran abundantes en los materiales extracelulares en la interfaz hifa-raíz formada por una cepa ectomicorrícica agresiva de *L. bicolor*, pero que el marcaje era débil en el caso de una cepa débil. El material extracelular es fibrilar en algunos casos, pero esto parece ser variable ya que las fibrillas no fueron observadas o raramente observadas (Kropp & Muller, 1992).

Un estudio sobre la colonización ectomicorrícica por *L. amethystea* mostró que la fijación de hifas no es específica. Las hifas se unen a los vellos radiculares, a las células corticales y cápside de la raíz, formando almohadillas adhesivas en las puntas de las hifas en contacto con la superficie de la raíz, seguido por la digestión enzimática de la cutícula en la zona de contacto, posterior penetración y ramificación de las hifas para crecer entre las células corticales y formar la red de Hartig típica. Se conoce relativamente poco acerca de los procesos de señalización inicial o de los eventos moleculares implicados en la formación de la ectomicorriza por las especies de *Laccaria*. Sin embargo, se ha reportado el incremento en los niveles de ciertas proteínas relacionadas con la simbiosis, tal como las hidrofobinas durante la formación de la ectomicorriza, lo que puede indicar que están involucradas tanto en la adhesión del hongo a las superficies de las raíces como en la posterior colonización de las raíces (Kropp & Muller, 1999).

G. Asociaciones ectomicorrícicas y distribución

Hasta mediados de los años 80 la mayoría de las especies de *Laccaria* eran consideradas cosmopolitas. Sin embargo, el estudio comparativo detallado de la macro y micromorfología junto con las pruebas de interfertilidad y el análisis de la divergencia genética indicaron que las especies de *Laccaria* a menudo muestran rangos geográficos limitados. Pocas especies y las introducidas con especies exóticas de *Pinus* y *Eucalyptus*, pueden encontrarse en más de uno o dos continentes y muchos tienen rangos de distribución mucho más restringidos (Mueller, 1992). Algunas especies han sido observadas como colonizadoras tempranas en las raíces de los árboles jóvenes y frecuentemente se encuentran también en bosques maduros, además no existe evidencia de alguna especie de vida libre en la naturaleza (Wilson et al., 2016).

En el caso de Norteamérica, el género *Laccaria* ha demostrado especificidad hacia algunos hospederos, por ejemplo *L. amethystina* y *L. ochropurpurea* parecen estar asociadas únicamente a árboles con maderas duras, especialmente con *Quercus* y *Fagus grandifolia*, mientras que *L. vinaceobrunnea* sólo se ha encontrado con *Quercus virginiana*, en el sureste de Norteamérica. *L. ohiensis* se encuentra asociado con *Quercus* en zonas templadas y tropicales y con *Nothofagus* en regiones templadas del sur. Hay una serie de especies de *Laccaria* que están restringidas a *Eucalyptus* o *Nothofagus* en Australasia, y dos de las cuatro especies reportadas en Chile y Argentina están asociadas sólo con este último. Muchas otras especies de *Laccaria* muestran niveles similares de especificidad (Kropp & Mueller, 1999).

Los miembros del complejo *L. bicolor* (*L. bicolor*, *L. nobilis* y *L. trichodermophora*) se encuentran asociadas a la familia *Pinaceae* en Norteamérica y el norte de México. *L. amethysteo-occidentalis* se encuentra más en bosques de coníferas, especialmente de *Pseudotsuga*, aunque en California se ha encontrado asociada con *Quercus*. Además, *L. trichodermophora* está asociada a *Quercus* en Estados Unidos, Costa Rica y Colombia (Kropp & Mueller, 1999).

L. montana y *L. pumila* se encuentran en hábitats árticos y alpinos, en donde se asocian con la familia *Pinaceae* (especialmente *Pinus*), *Salix* y *Betula*. Muchas especies se pueden encontrar también entre los musgos, pero sólo *L. longipes*, *L. bicolor* y *L. próxima* se presentan en turberas

de *Sphagnum*. *L. marítima* y *L. trullissata* se pueden encontrar en áreas arenosas y se asocian con especies de *Pinus* (Mueller, 1992).

En Guatemala, las especies del género están asociadas con árboles de las familias *Fagaceae* y *Pinaceae*. Sus hábitats se encuentran en bosques de *Quercus-Pinus*, de 1600 a 2400 msnm, bosques de *Pinus*, de 2500 a 3000 msnm y bosque de *Pinus-Abies*, a más de 3000 msnm. Los bosques mixtos de *Quercus-Pinus* son los más ricos en especies. También se han encontrado basidiomas en pequeñas plantaciones de eucalipto (Morales et al., 2003).

H. Aislamiento de hongos ectomicorrícicos en medio de cultivo

Los hongos ectomicorrícicos se pueden aislar del tejido del basidioma así como de micorrizas esterilizadas superficialmente, esclerocios, rizomorfos y en algunos casos de basidiosporas. Sin embargo, se prefiere generalmente el aislamiento a partir del basidioma ya que las especies pueden ser identificadas y el material fúngico requiere poco pre-tratamiento. La facilidad de aislamiento de los hongos ectomicorrícicos y del crecimiento en cultivo puede diferir en ciertos grupos taxonómicos. Por otra parte, el fracaso en el aislamiento de algunas especies de estos hongos ectomicorrícicos es debido a la falta de información sobre las necesidades nutricionales específicas (Molina & Palmer, 1982).

1. Requerimientos nutricionales para el cultivo *in vitro*

a. Nutrientes

Casi todos los hongos ectomicorrícicos utilizan las hexosas y D-glucosa, por lo que estos azúcares deben ser la fuente principal de carbono. El cloruro de amonio y el nitrato de amonio deben ser utilizados como fuentes suplementarias de nitrógeno en una solución nutritiva semisintética. El tartrato de amonio es el más utilizado en las fórmulas sintéticas (Molina & Palmer, 1982).

Otros macronutrientes y micronutrientes distintos al nitrógeno y carbono no han sido investigados para determinar las cantidades exactas o esenciales que requieren. Las experiencias indican que para el crecimiento de casi todos estos hongos se necesita fósforo, potasio, azufre y

magnesio, así como pequeñas cantidades de cobre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc. Cada uno de los macro y micronutrientes se añaden a ambas fórmulas semisintéticas y sintéticas (Molina & Palmer, 1982).

En cuanto a las vitaminas y los reguladores del crecimiento, los hongos ectomicorrícicos son heterótrofos para la tiamina y algunos para la biotina. Las vitaminas no se añaden regularmente a los medios semisintéticos. La tiamina así como la biotina se utilizan en medios sintéticos, pero ambas se agregan en solución después de la esterilización (Molina & Palmer, 1982).

b. Otras condiciones ambientales

En cultivo axénico, varias especies ectomicorrícicas pueden ser acidófilas, aeróbicas, mesotérmicas o fotoinactivas. Sin embargo en cultivos convencionales no es posible mantener la humedad relativa establemente. La presión osmótica está inicialmente en función de los compuestos solubles e ionizados, pero posteriormente varía con la absorción, la secreción y la lisis del micelio. Además del pH, las condiciones ambientales estándar afectan indirectamente las condiciones de cultivo (Molina & Palmer, 1982).

c. Medios

Los medios de cultivo con fórmulas semisintéticas son los que se utilizan para la propagación, preparación del inóculo, almacenamiento y otros procedimientos experimentales. El medio más usado ha sido la modificación del medio de Hagem (AHM) original (Tabla 2) o una variante de esta fórmula. El Laboratorio de Ciencias Forestales de Corvallis (Estados Unidos), sugirió el agar nutritivo Melin-Norkrans modificado (MMN) como medio rutinario para el aislamiento de especies ectomicorrícicas (Anexo 2) (Molina & Palmer, 1982).

Las fórmulas con nutrientes sintéticos se utilizan para la evaluación de la nutrición y la regulación del crecimiento micelial de los hongos ectomicorrícicos. Existen numerosas formulaciones, ejemplo de ello son las de los medios Melin & Rama Das, Palmer & Hacskaylo y biotina-aneurina-ácido fólico (BAF) (Anexo 2). Los medios de cultivo con formulaciones naturales o de enriquecimiento como el agar papa dextrosa (PDA), agar extracto de malta (MEA) y agar Sabouraud (SAB) no son de uso frecuente debido su bajo contenido de nutrientes

específicos para el crecimiento de estos hongos; sin embargo, se ha demostrado que varias especies de hongos crecen en los mismos (Molina & Palmer, 1982; Mueller, 1992; Santiago, Estrada, Varela y Herrera, 2003).

I. Características de *Laccaria* en medio de cultivo

A continuación se presenta la caracterización morfológica en medios de cultivo (MMN, MEA y PDA) para las especies norteamericanas del género *Laccaria* descritas por Mueller (1992).

1. Macromorfología

Las colonias de *L. fraterna*, *L. laccata*, *L. longipes*, *L. montana*, *L. ohiensis*, *L. próxima*, *L. pumila*, y *L. striatula*, presentan coloración blanquecina en MMN, MEA y PDA. Las colonias de *L. laccata* var. *pallidifolia*, *L. trichodermophora*, *L. bicolor*, *L. nobilis*, *L. trullissata*, *L. oblongospora*, *L. ochropurpurea*, *L. amethysteo-occidentalis*, *L. amethystina* y *L. vinaceobrunnea* presentan coloraciones de violeta a morado en MMN y PDA. Con el paso del tiempo los aislamientos no presentan exudado, sin embargo, el color al reverso de las colonias se torna ligeramente blanquecino. Las colonias de *Laccaria* presentan cierta transparencia debido a que el micelio crece sumamente adherido a la superficie del agar (Mueller, 1992).

Según Mueller (1992), las especies de *Laccaria* crecen a un ritmo moderado en los tres medios de cultivo: 20-50 mm en PDA, 30-70 mm de MMN, y 40-70 mm en MEA a la sexta semana de incubación respectivamente. Sin embargo, el crecimiento de *L. amethysteo-occidentalis*, *L. montana* y *L. ohiensis* es más lento (de 10-15 mm después de 6 semanas). Las colonias producen micelio denso sobre todo en PDA. La textura de las colonias es aterciopelada en PDA y varía de sedosa a aterciopelada en MMN y MEA. La zona del margen es generalmente más delgada que el resto de la colonia y todos los aislamientos presentan olor a humedad.

2. Micromorfología

Laccaria presentó poca diferenciación dentro de las hifas observadas en cada aislamiento, sin formación de esporas en el cultivo. En todos los aislamientos la gran mayoría de las hifas fueron morfológicamente indiferenciadas con fíbulas en casi todos los septos. Las hifas se encontraron

rara vez ramificadas, y variaron de subcoraloides a coraloides y/o irregularmente hinchadas. Todas las hifas fueron hialinas en KOH (con algunas excepciones). En ocasiones se encontraron nódulos (inflaciones) de pared gruesa, localizados a lo largo de la hifa en posiciones terminales o intercalados, y ocasionalmente en cadenas de tres a cuatro nódulos. La explicación más probable para la formación de estas estructuras es la respuesta al estrés hídrico, mientras el agar pierda humedad, se encontrarán en abundancia (Mueller, 1992).

J. Estudios realizados con *Laccaria*

1. Estudios realizados alrededor del mundo

En el año de 1984, Castro y Freire realizaron las descripciones comparativas del género *Laccaria* en Galicia, España. Se evaluaron 6 especies distintas: *L. amethystina*, *L. bicolor*, *L. laccata*, *L. próxima*, *L. ohiensis* y *L. altaica* y se documentaron caracteres macro y microscópicos diferenciales para cada especie e indicaron el hábitat de cada una de ellas, así como la distribución a lo largo del año.

Mueller (1992) describió la distribución, hospederos, biología y datos para determinar las especies norteamericanas de *Laccaria*, donde reconoció 19 especies para el área. Realizó reacciones de apareamiento entre aislamientos y se determinó los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de ADNm y ADNr. También obtuvo datos citológicos y datos de síntesis ectomicorrícicas *in vitro* para caracterizar el género. Además, propuso una clave taxonómica tentativa para la especie de *Laccaria* en el mundo.

En México se reportó un nuevo registro de *Laccaria* en bosques de *Fagus grandifolia* var. *mexicana*, con base en características macro, micromorfológicas y por biología molecular (Montoya, Bandala, Baroni & Horton, 2015). De forma similar, Popa y colaboradores (2016) describieron tres nuevas especies de *Laccaria* del sudeste de China; *L. fulvogrisea*, *L. aurantia*, *Laccaria yunnanensis* y en Panamá se describió otra nueva especie: *L. stellata* (Popa, Rexer, Donges, Yang & Kost, 2014).

También se han realizado estudios sistemáticos y evolutivos ecológicos del modelo ectomicorrícico de *Laccaria* utilizando cepas de más de 30 países alrededor del mundo. Se

analizaron filogenéticamente un conjunto de datos de secuencias de nucleótidos de cuatro genes (nrITS, 28S, RPB2, EF1 α) y el conjunto global de datos del género, para la datación molecular y la estimación de las tasas de diversificación del mismo. El estudio identificó 116 especies filogenéticas para *Laccaria* y sugirió que la evolución de la ecología ectomicorrícica fue una innovación clave en la evolución de *Laccaria* (Wilson et al., 2016).

Vincenot y colaboradores (2012), con el fin de comprender la estructura espacial en poblaciones de hongos a escala continental, utilizaron marcadores de microsatélites y filogenias multilocus para caracterizar el flujo de genes entre 16 poblaciones de *L. amethystina* en Europa y dos poblaciones japonesas. Las poblaciones europeas de *L. amethystina* mostraron una diferenciación limitada entre ellas. Encontraron que las especies europeas y japonesas estaban estrechamente relacionadas pero agrupadas geográficamente, además que las especies japonesas estaban fuertemente diferenciadas de las europeas, separándolas en dos grupos.

Con el propósito de establecer las condiciones adecuadas de cultivo de una cepa mexicana de *L. bicolor* se evaluó el crecimiento en siete medios de cultivo diferentes. En este estudio se concluyó que para dicha cepa es recomendable utilizar los medios BAF y SAB para una mayor obtención de biomasa y el medio MEA para el rápido crecimiento colonial (Santiago et al., 2003).

En México, Carrasco y colaboradores (2010), lograron con éxito la micorrización de *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* con *L. bicolor* y *L. próxima* mediante la inoculación de esporas. Observaron diferencias en la micromorfología de las ectomicorrizas de ambas especies fúngicas (longitud, diámetro, color, tipo de ramificación, forma de las puntas no ramificadas, textura y anatomía externa del manto de las micorrizas). Así mismo, en este país Galindo, Castillo, Campos y Lara (2015) caracterizaron por primera vez morfológica y microscópicamente la ectomicorriza formada por *L. trichodermophora* en *P. montezumae*, debido a la dependencia de los pinos a la asociación micorrícica. Se encontró que la mayoría de características descritas concordaban con las publicadas para el género, lo cual es importante para poder hacer una mejor detección en estudios de la micorriza, y para la producción de inoculantes para la conservación de sistemas forestales.

2. Estudios realizados en Guatemala

Morales y colaboradores (2003), describieron por primera vez especies del género *Laccaria* en Guatemala. Reportaron cuatro nuevos registros para el país, y proporcionaron datos sobre la ecología, distribución de las especies. Adicionalmente realizaron una recopilación etnomicológica tradicional de las mismas.

El uso de *Laccaria* como hongo comestible se ha documentado en distintas localidades del país. Mazariegos, Lara y Lara (2014) reportaron la comercialización de *L. amethystina*, *L. bicolor* y *L. laccata* en los mercados en el departamento de Chimaltenango. El estudio etnomicológico efectuado en el municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala, mostró que se consumen más de 40 especies de hongos en la región, entre ellas, *Laccaria aff laccata* y *L. amethystina* (Mérida y Hernández, 2017).

También se han realizado estudios sobre la caracterización de la ectomicorriza de cepas nativas de *Laccaria* en distintos hospederos. Berdúo (2000) evaluó la eficiencia micorrícica de cepas guatemaltecas de *L. bicolor* y *S. brevipes* en plantas de *P. ayacahuite*, *P. rudis* y *P. hartweii* y concluyó que las cepas son efectivas en la producción de micorrizas, aunque *L. bicolor* fue superior en efectividad. Flores, Díaz & Honrubia (2008) reportaron el éxito de la síntesis de micorrizas de *L. bicolor* con *A. guatemalensis*, *Pinus hariwegii* y *P. ayacahuite*.

También se han realizado investigaciones sobre la caracterización del cultivo miceliar de *L. bicolor* en el medio MMN a diferentes pH, con el fin de informar acerca de los requerimientos de cultivo *in vitro* específicos para esta especie. Encontraron que a un pH de 7.0 se obtuvo el mayor diámetro de crecimiento colonial. La morfología de las colonias varió respecto al tratamiento a distintos pH produciendo acúmulos hifales a 4.5 y 5.5 (Gurriarán, Cáceres, Bran, Morales y Flores, 2010).

IV. JUSTIFICACIÓN

El Sistema de Información Forestal de Guatemala reportó en un estudio que la tasa neta de deforestación anual promedio de la República de Guatemala era del 1.0%, con una deforestación bruta de 132,137 hectáreas anuales (Regalado, Villagrán, Castellanos, Incer y Martínez, 2012). Contradictoriamente, el Artículo 126 de la Constitución Política de la República de Guatemala declara de urgencia nacional la reforestación del país y la conservación de los bosques (Corte de Constitucionalidad, 2002); sin embargo, no existen programas de reforestación con políticas estatales claras que apoye lo anterior.

Un factor determinante en el éxito de la reforestación y restauración forestal es el aumento y la utilización de la microbiota del suelo, en especial hongos formadores de micorrizas (Gómez, Villegas, Sáen & Linding, 2013). *Laccaria* es un género de macrohongos cosmopolita que forman ectomicorrizas con numerosas especies de árboles, incluyendo muchos que son de gran importancia económica particularmente en pinos y encinos (Cairney & Chambers, 1999). Esta simbiosis proporciona beneficios a la planta incrementando la superficie de absorción de agua y nutrientes del sistema radicular, particularmente en zonas afectadas por estrés hídrico y el cambio climático (Smith & Read, 2008). En Guatemala la mayor parte de los bosques del altiplano, desde los 800 mts-3000 mts están formados por masas de pino y pino-encino, que han disminuido por la deforestación y el uso intenso de leña. El género *Laccaria* presente en el país, es un constituyente natural de estos bosques (Regalado et al., 2012).

Debido a la importancia de caracterizar el crecimiento *in vitro* de cepas guatemaltecas de *Laccaria* spp., esta investigación propone evaluar las características de cultivo *in vitro* de cepas de *Laccaria* aisladas en el país para posteriormente realizar investigaciones sobre procesos de micorrización. Lo anterior con el fin de beneficiar y garantizar el éxito de programas de reforestación en nuestro país con especies de plantas y hongos nativos.

V. OBJETIVOS

A. General

Caracterizar el crecimiento miceliar de cultivo *in vitro* de cinco cepas guatemaltecas de *Laccaria*.

B. Específicos

1. Describir características macroscópicas y microscópicas de cultivos *in vitro* de cinco cepas guatemaltecas de *Laccaria* spp., en cuatro medios de cultivo Melin-Norkrans modificado (MMN), agar extracto de malta (MEA), agar Hagem (AHM) y agar biotina-aneurina-ácido fólico (BAF).
2. Determinar el mejor medio de cultivo para el crecimiento de las cinco cepas de *Laccaria* spp., a través del crecimiento miceliar en los medios de cultivo MMN, MEA, AHM y BAF.

VI. HIPÓTESIS

Por ser un estudio descriptivo no se plantea hipótesis.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo

Cepas de *Laccaria* spp. aisladas y recolectadas en Guatemala.

B. Muestra

Cinco cepas nativas de *Laccaria* spp. depositadas en el Cepario de Hongos Saprobios y Micorrícicos del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala: 1) *Laccaria* sp. (MICG-1812), 2) *Laccaria* sp. (MICG-1813), 3) *Laccaria* sp. (MICG-1814), 4) *Laccaria* sp. (MICG-6702), 5) *Laccaria* sp. (MICG-6703).

C. Recursos

1. Humanos

Estudiante: Katherin Celeste Morataya Muñoz

Estudiante: Stefany Eunice Villacinda Cárcamo

Asesor: Licda. María del Carmen Bran González

Asesor: Lic. Osberth Isaac Morales Esquivel

2. Institucionales

a. Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala.

b. Micoteca de Macrohongos “Lic. Rubén Mayorga” –MICG–, del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

3. Medios de cultivo

- Agar Melin-Norkrans modificado (MMN)
- Agar extracto de malta (MEA)

- Agar Hagem modificado (AHM)
- Agar biotina-aneurina- ácido fólico (BAF)

4. Equipo

- Adaptador de goma para embudo Büchner
- Asas tipo L y en espátula
- Autoclave
- Balanza analítica Dhaus Discovery®
- Bisturí
- Bomba de extracción al vacío
- Cabina de seguridad biológica tipo II, clase A2
- Cámara fotográfica
- Embudo de Büchner
- Estufa con agitador magnético
- Incubadora a 26° Celsius
- Incinerador
- Macro y micropipetas
- Microscopio óptico ZEISS calibrado en micrómetros
- Microscopio estereoscopio Motic
- Pinzas
- Refrigeradora

5. Reactivos

- Ácido fólico
- Agar Agar
- Agua desmineralizada
- Azul de lactofenol
- Biotina
- CaCl₂

- D-glucosa
- Extracto de levadura
- Extracto de malta
- FeCl_3
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- KH_2PO_4
- MnSO_4
- NaCl
- NH_4Cl
- $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
- $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- Peptona
- Tiamina HCl
- ZnSO_4
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

6. Cristalería

- Beakers de 25 ml a 1 litro
- Cajas de Petri desechables estériles
- Erlenmeyers de 100 ml a 2 litros
- Frascos con rosca de 100 ml
- Kitasato
- Láminas cubreobjetos de 22x22 mm
- Láminas portaobjetos
- Pipetas Pasteur de vástago largo
- Pipetas serológicas de 1 a 10 ml
- Tubos de ensayo con rosca de 16 x 150 mm
- Agitadores de vidrio

7. Otros

- Alcohol al 70%
- Algodón
- Filtros millipore en membrana, poro de 0.45 μm
- Jeringas estériles desechables
- Papel aluminio
- Papel Kraft
- Papel Parafilm

D. Diseño de Investigación

1. Tipo de Estudio

- a. Experimental: Estudio factorial (5 cepas x 4 medios de cultivo x 15 repeticiones), para 60 unidades muestrales por cepa (300 en total).
- b. Descriptivo: Documentación de las características macro y microscópicas de las cepas.

E. Metodología

1. Preparación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo se formularon con base en la guía de formulación recomendada por Molina & Palmer (1982) para la elaboración de los medios MMN y AHM, así como lo recomendado por Moser (1960) para la elaboración del medio de cultivo BAF. El medio de cultivo MEA se preparó a partir de las recomendaciones dadas por el fabricante (Merck®).

a. Agar Melin-Norkrans Modificado, Hagem Modificado y Biotina-Aneurina-Ácido fólico

- Se utilizaron las fórmulas recomendadas para la elaboración de un litro de medio de cultivo de agar MMN, AHM y BAF respectivamente (Anexo 2).
- Se agregaron los ingredientes estrictamente en el orden presentado, exceptuando la tiamina HCl para el agar MMN, igualmente la biotina, tiamina HCl, ácido fólico y extracto de levadura para el agar BAF.

- Se disolvió cada uno de los ingredientes previo a la adición del siguiente, de lo contrario los ingredientes precipitarían.
- Se llevaron hasta ebullición con agitación constante.
- Los medios se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb/p².
- Se prepararon soluciones de tiamina HCl, biotina, ácido fólico y extracto de levadura respectivamente y se esterilizaron por filtración (Millipore).
- Posterior a la esterilización de los medios de cultivo, se enfriaron hasta 45 °C (se observó ausencia de precipitado) y se adicionó las soluciones previamente esterilizadas por filtración respectivamente para el medio de cultivo que lo requiriera según formulación (Tabla 2).
- Se sirvieron 20 mL del medio en cajas de Petri desechables estériles en cabina de bioseguridad biológica.
- Se almacenaron las cajas preparadas en refrigeración a 8-10 ° C.

b. Agar Extracto de Malta

- Se elaboró el extracto de malta de conformidad con las instrucciones dadas por el fabricante (Merck[®]).
- Se disolvió el MEA en agua destilada.
- Se llevó la solución hasta la ebullición con agitación constante.
- Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C y 15 lb/p².
- Se enfrió el medio de cultivo hasta los 45 °C y se sirvió 20 mL del medio en cajas de Petri desechables estériles en cabina de bioseguridad biológica.
- Se almacenaron las cajas preparadas en refrigeración a 8-10 °C.

2. Revitalización de las cepas

Se revitalizaron las cinco cepas de *Laccaria* spp pertenecientes al cepario de hongos saprobios y micorrícicos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, de acuerdo con lo recomendado por Mueller (1992). Se inocularon fragmentos del hongo en cajas de Petri con Agar MMN en cabina de seguridad biológica a efecto

de incrementar la biomasa. Los cultivos se incubaron a 26° C hasta que se evidenció el crecimiento puro y abundante de las colonias.

3. Determinación del diámetro de crecimiento de las colonias de las cepas en los diferentes medios de cultivo.

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mier (2002).

- A partir de cada una de las cepas revitalizadas se tomaron porciones de micelio con agar en forma de disco de 5 mm de diámetro aproximadamente.
- Se inocularon fragmentos del hongo seleccionado en el centro de las cajas de Petri conteniendo cada uno de los medios de cultivo (MMN, EMA, AHM y BAF).
- Se identificaron las cajas de Petri con el nombre de la cepa, fecha de inoculación, medio de cultivo y número de repetición.
- Se sellaron las cajas inoculadas con papel Parafilm[®], para evitar que se deshidrataran.
- Se incubaron a una temperatura de 26° C.
- Se midió el crecimiento en función del diámetro de la colonia en dos planos que se cruzaran perpendicularmente (eje *x* y eje *y*), luego se sumó y dividieron los valores para calcular el promedio (cm).
- El diámetro se midió cada tercer día hasta concluir el período de incubación por 36 días.
- Con los datos obtenidos se elaboró una base de datos en el programa Excel[®].

4. Determinación de las características macroscópicas y microscópicas en medio de cultivo

El procedimiento se realizó de acuerdo con lo recomendado por Mueller (1992) y Nobles (1965).

a. Características macromorfológicas

- La caracterización macromorfológicas de las colonias se realizó con ayuda de un estereoscopio.
- Se describió el color del anverso y reverso de la colonia, aspecto, forma y crecimiento miceliar, textura y presencia o ausencia de exudados.

- Se registraron las características de las colonias a través de fotografías al finalizar el periodo de incubación.

b. Características micromorfológicas

- Se realizó la descripción del micelio mediante montajes con azul de lactofenol en portaobjetos bajo microscopio óptico.
- Se tomaron porciones de micelio del centro, medio y borde del cultivo por duplicado, donde se observaron y midieron las características hifales en aumento de 100X.
- Se analizó la presencia o ausencia de modificaciones en las hifas, nódulos, clamidiosporas y fíbulas.
- Se midió el tamaño de las hifas (μm) y cada una de las estructuras encontradas, realizando 20 repeticiones de las mediciones por montaje respectivamente. Se calculó el tamaño promedio para cada estructura.
- Con los datos obtenidos se elaboró una base de datos en el programa Excel[®].

F. Análisis de resultados

El análisis del crecimiento miceliar de las cepas en los cuatro medios de cultivo (MMN, MEA, AHM y BAF) se realizó por medio de un análisis de varianza de una vía, con una prueba de comparaciones múltiples de Tuckey ($\alpha=0.05$) a un intervalo de confianza del 95% en el programa SPSS[®].

La evaluación de las características micro y macroscópicas en medio de cultivo se realizó a través de un análisis de conglomerados con el programa estadístico PAST[®].

VIII. RESULTADOS

A. Crecimiento miceliar en los diferentes medios de cultivo evaluados

Los cultivos miceliar de las cinco cepas de *Laccaria* mostraron diferencias en crecimiento en relación al medio de cultivo. El mejor medio de cultivo fue MEA con promedios de crecimiento miceliar de 18-26 mm/día según la cepa, seguido de BAF y MMN. El medio AHM produjo los menores crecimientos miceliar con las cinco cepas mostrando diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). En la tabla 1 se pueden observar las diferencias de crecimiento de las cepas/colonias según el medio de cultivo y sus diferencias estadísticas.

Tabla 1. Crecimiento miceliar de cepas de *Laccaria* en diferentes medios de cultivo

Especie	Cepa	Medio ¹	Diámetro (cm) ²		Velocidad (cm/día)
<i>L. trichodermophora</i>	MICG -1814	MEA	7.34 ± 0.05	a ³	0.24
		BAF	7.41 ± 0.19	a	0.21
		MMN	6.69 ± 0.66	c	0.22
		AHM	2.81 ± 0.10	h,i	0.14
<i>L. bicolor</i>	MICG-1812	MEA	7.39 ± 0.73	a	0.23
		BAF	7.40 ± 0.12	a	0.17
		MMN	7.16 ± 0.23	a,b	0.20
		AHM	2.62 ± 0.15	i	0.12
<i>L. bicolor</i>	MICG-1813	MEA	7.25 ± 0.08	a	0.26
		BAF	6.79 ± 0.24	b,c	0.23
		MMN	6.80 ± 0.38	b,c	0.19
		AHM	2.67 ± 0.08	i	0.13
<i>Laccaria</i> sp.	MICG-6702	MEA	7.21 ± 0.05	a	0.22
		BAF	6.60 ± 0.28	c	0.16
		MMN	5.67 ± 0.36	f	0.15
		AHM	3.17 ± 0.16	h	0.12
<i>Laccaria</i> sp.	MICG-6703	MEA	6.51 ± 0.12	c,d	0.18
		BAF	6.13 ± 0.19	d,e	0.15
		MMN	5.81 ± 0.20	e,f	0.15
		AHM	4.28 ± 0.15	g	0.11

¹MEA (Agar extracto de malta), BAF (Agar Biotina-Aneurina- Ácido fólico), MMN (Agar Melin-Norkrans modificado), AHM (Agar Hagem modificado). ²Media ± la desviación estándar. ³Letras distintas en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa, de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha = 0.05$).

En la figura 1 se muestran las diferencias de crecimiento por cepa y por medio de cultivo utilizado, así como las diferencias estadísticas entre cada una de ellas.

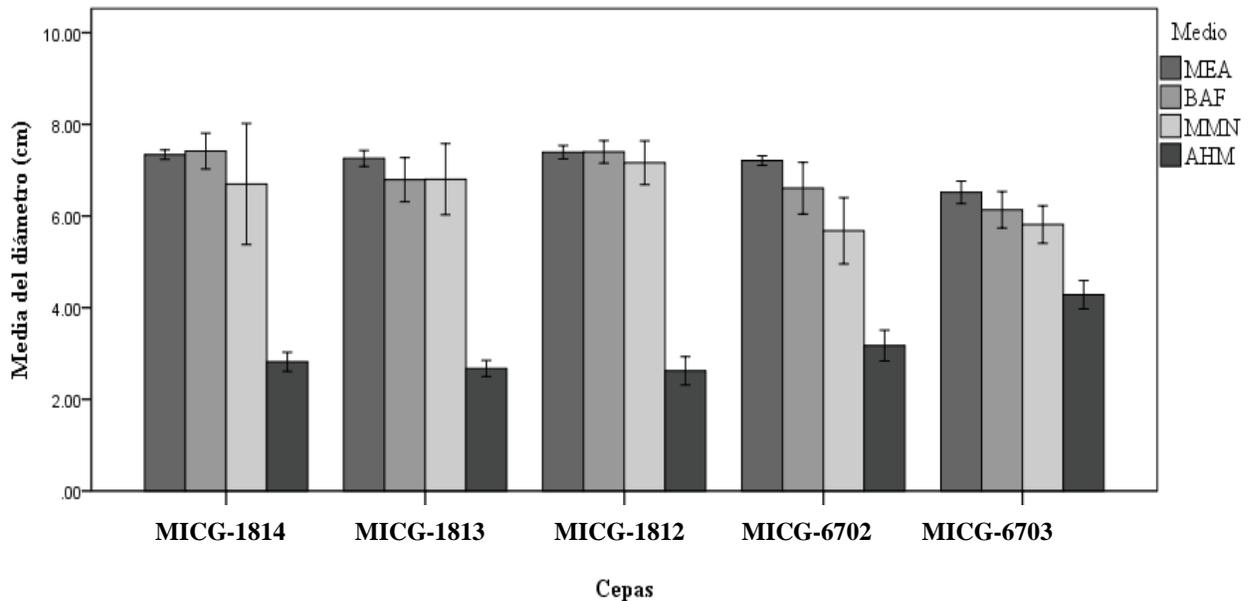


Figura 1. Comparación del crecimiento micelial entre cepas de *Laccaria*, después de 36 días de incubación en los medios de cultivo evaluados. Las barras indican la media del crecimiento micelial. Las barras de error corresponden a \pm la desviación estándar.

Al comparar los diámetros del crecimiento micelial de las cepas se determinó que los obtenidos en MEA y BAF fueron significativamente mayores a los demás ($p < 0.05$), que el diámetro del crecimiento de las cepas en MMN fue estadísticamente diferente respecto a AHM ($p < 0.05$) y que en este último el crecimiento de todas las colonias fue menor (Figura 2). No se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre cepas al comparar el crecimiento general en todos los medios de cultivo (figura 3).

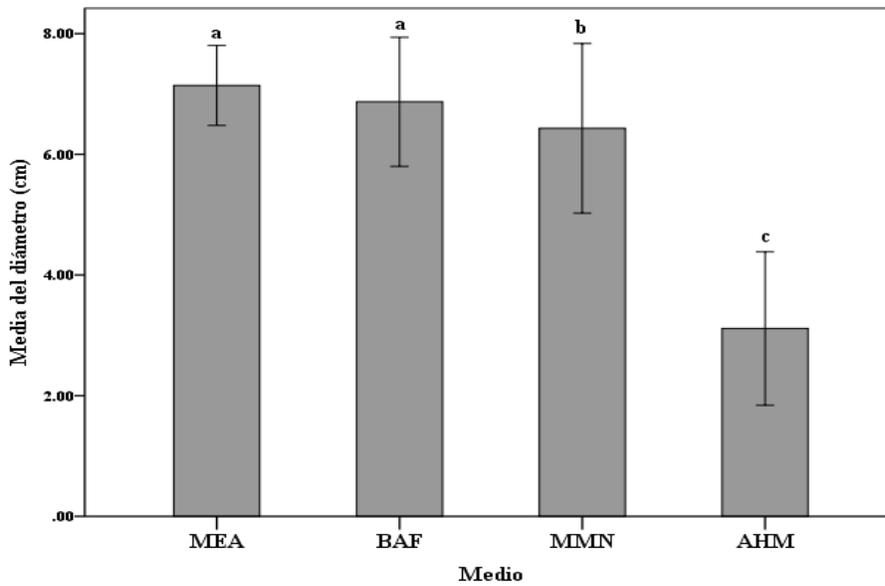


Figura 2. Comparación del diámetro obtenido de las cepas de *Laccaria* evaluadas sin importar el medio de cultivo. Las barras indican la media del crecimiento miceliar. Las barras de error indican \pm la desviación estándar.

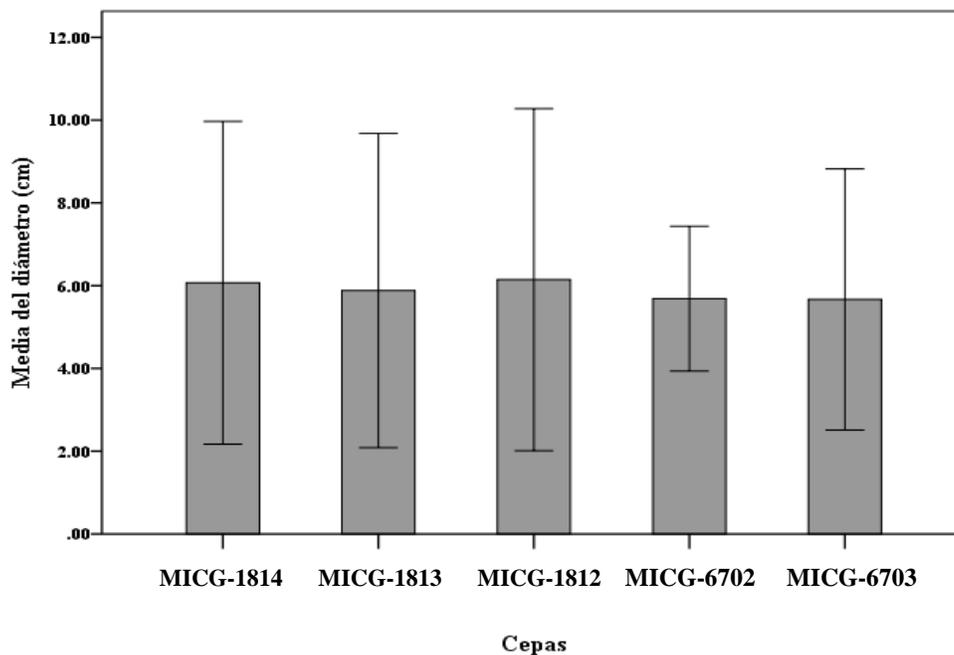


Figura 2. Efecto de los medios de cultivo sobre el diámetro en diferentes cepas de *Laccaria*. Las barras indican la media del crecimiento miceliar. Las barras de error indican \pm la desviación estándar. Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0.05$), de acuerdo con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($\alpha = 0.05$).

B. Características macroscópicas de las cepas de *Laccaria* en los diferentes medios de cultivo.

En medio MMN, a los 10 días de incubación, presentaron colonias con coloración violeta, textura algodonosa, micelio aéreo blanquecino, reverso violeta en el centro pero blanquecino con tonos café en el margen. A los 36 días, las colonias adquirieron una textura aterciopelada de color blanco-rosáceo en el centro y café-rosado hacia el margen, en tanto que el reverso se observó café en el centro, naranja-café en la parte media y blanco-amarillento en el margen (Figuras 4 a 8).

En medio MEA, a los 10 días de incubación, las colonias presentaban micelio de color café, textura aterciopelada con pigmento blanco en el centro, con reverso color café. Al final del período de incubación (36 días), presentaron textura aterciopelada con pigmento blanco en el centro y margen naranja-café, con reverso de color naranja-café (Figuras 4 a 8).

En medio AHM, a los 10 días de incubación, se produjeron colonias de coloración blanco-lila, blanquecino en el centro, textura algodonosa laxa y micelio aéreo hirsuto y corto, con reverso de color lila. Posteriormente, a los 36 de incubación, las colonias fueron tomando una textura aterciopelada densa, color blanco-violeta, margen blanco rosáceo y micelio aéreo hirsuto, con reverso color café y margen blanquecino, en ocasiones con manchas de color lila opaco (Figuras 4 a 8).

En el medio BAF, a los 10 días de incubación, las colonias poseían micelio de color lila con margen blanquecino y tonos violetas, con reverso de color grisáceo y margen blanquecino. A los 36 días de incubación, la textura cambió a aterciopelada, densa, de color lila-grisáceo, con manchas blancas en el centro y con zonas poco definidas de color violeta con margen gris (Figuras 4 a 8).

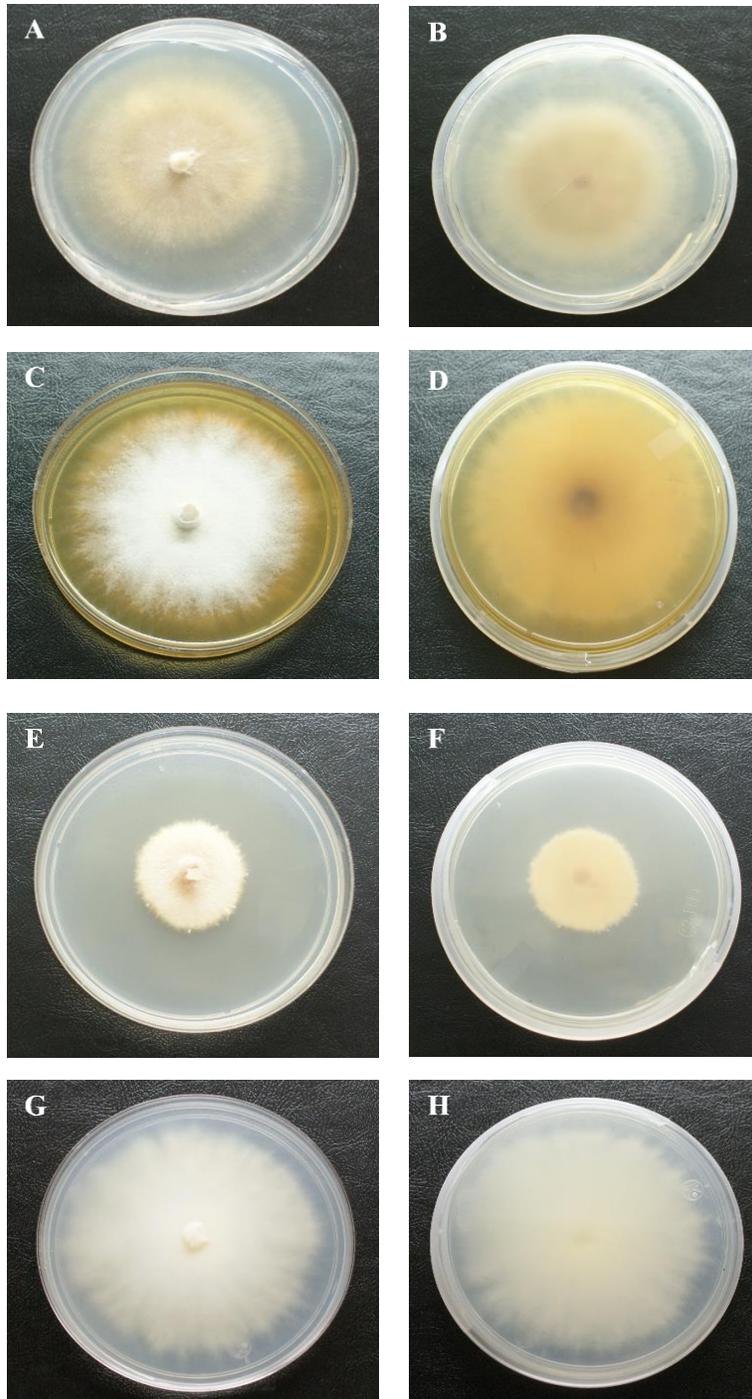


Figura 4. Características macroscópicas de las colonias de la cepa MICG-1814 al final del período de incubación (36 días) en los medios de cultivo. A. Anverso de la colonia en MMN. B. Reverso de la colonia en MMN. C. Anverso de la colonia en MEA. D. Reverso de la colonia en MEA. E. Anverso de la colonia en AHM. F. Reverso de la colonia en AHM. G. Anverso de la colonia en BAF. H. Reverso de la colonia en BAF.

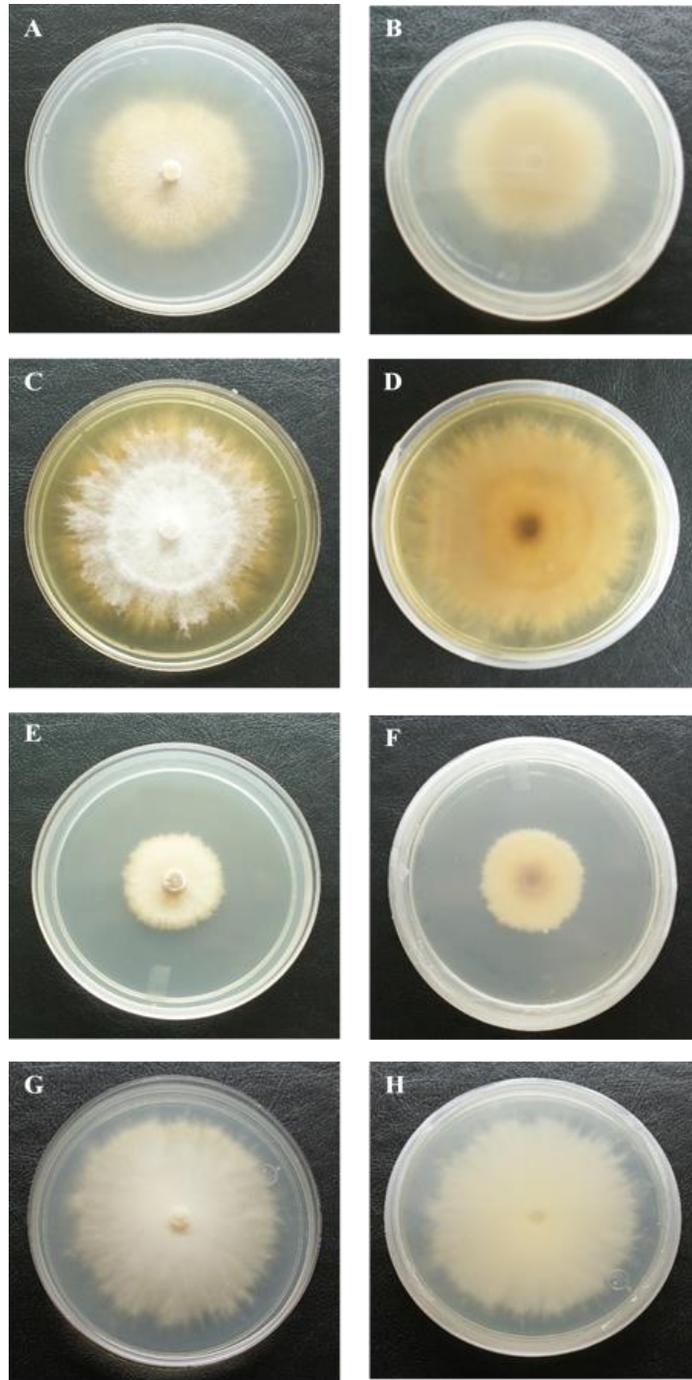


Figura 5. Características macroscópicas de las colonias de la cepa MICG-1813 al final del período de incubación (36 días) en los medios de cultivo. A. Anverso de la colonia en MMN. B. Reverso de la colonia en MMN. C. Anverso de la colonia en MEA. D. Reverso de la colonia en MEA. E. Anverso de la colonia en AHM. F. Reverso de la colonia en AHM. G. Anverso de la colonia en BAF. H. Reverso de la colonia en BAF.

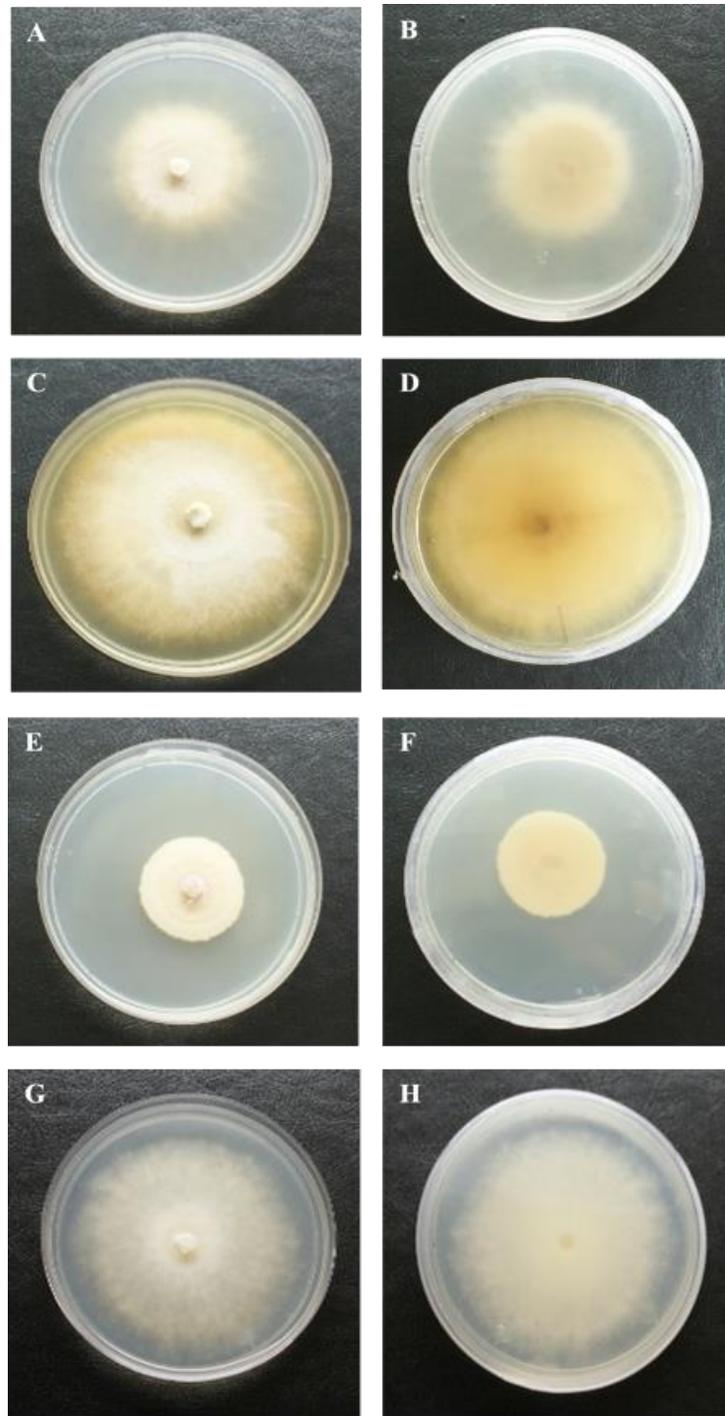


Figura 6. Características macroscópicas de las colonias de la cepa MICG-1812 al final del período de incubación (36 días) en los medios de cultivo. A. Anverso de la colonia en MMN. B. Reverso de la colonia en MMN. C. Anverso de la colonia en MEA. D. Reverso de la colonia en MEA. E. Anverso de la colonia en AHM. F. Reverso de la colonia en AHM. G. Anverso de la colonia en BAF. H. Reverso de la colonia en BAF.

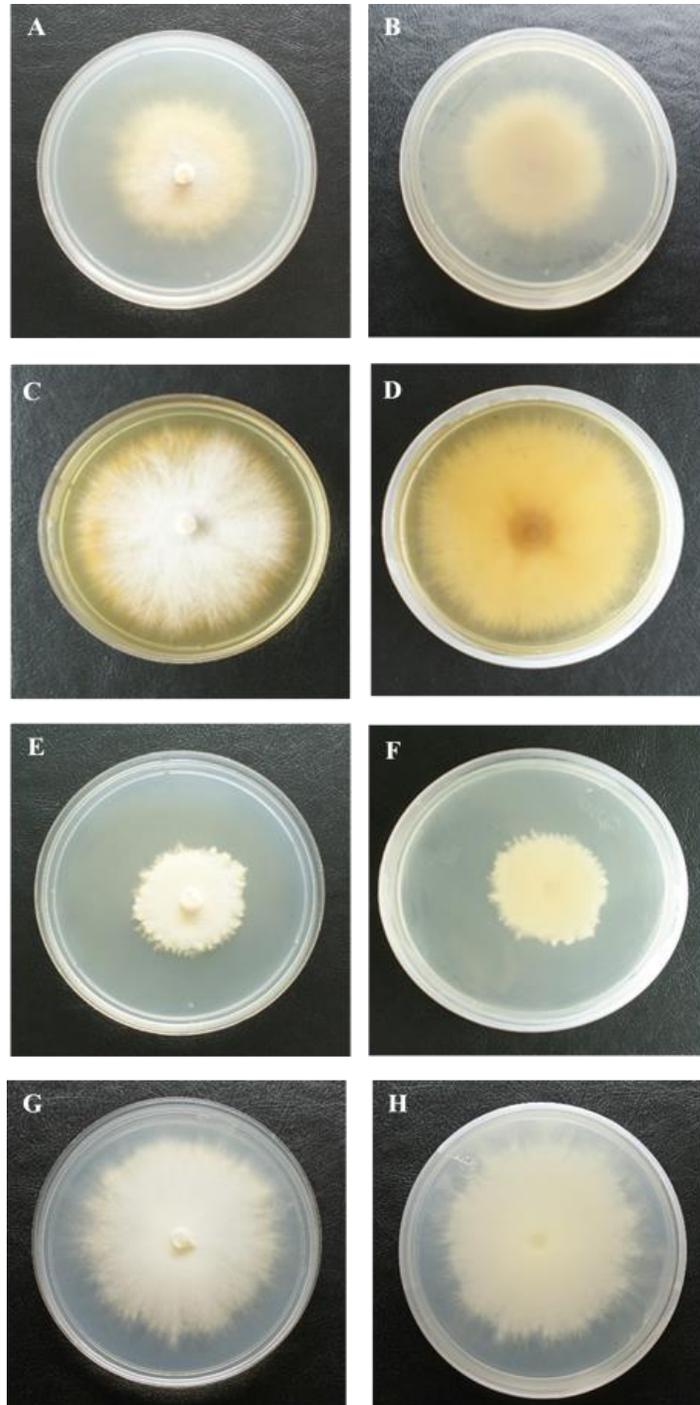


Figura 7. Características macroscópicas de las colonias de la cepa MICG-6702 al final del período de incubación (36 días) en los medios de cultivo. A. Anverso de la colonia en MMN. B. Reverso de la colonia en MMN. C. Anverso de la colonia en MEA. D. Reverso de la colonia en MEA. E. Anverso de la colonia en AHM. F. Reverso de la colonia en AHM. G. Anverso de la colonia en BAF. H. Reverso de la colonia en BAF.

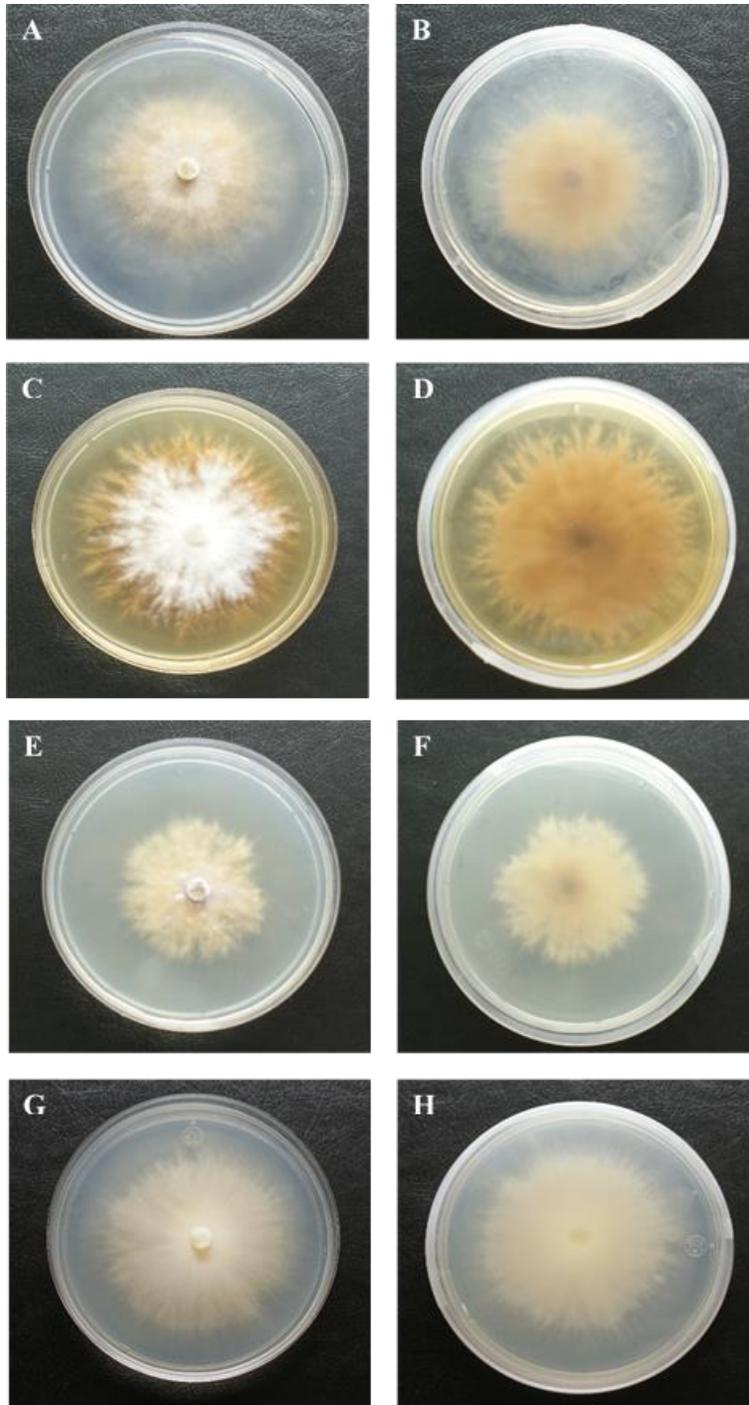


Figura 8. Características macroscópicas de las colonias de la cepa MICG-6703 al final del período de incubación (36 días) en los medios de cultivo. A. Anverso de la colonia en MMN. B. Reverso de la colonia en MMN. C. Anverso de la colonia en MEA. D. Reverso de la colonia en MEA. E. Anverso de la colonia en AHM. F. Reverso de la colonia en AHM. G. Anverso de la colonia en BAF. H. Reverso de la colonia en BAF.

C. Características microscópicas de las cepas de *Laccaria* en los diferentes medios de cultivo.

En todos los cultivos, sin importar el medio, se encontraron hifas de 1-3 μm de diámetro, morfológicamente indiferenciadas y rara vez con ramificaciones. Las cepas presentaron, en la mayoría de medios de cultivo, nódulos (inflaciones) de pared gruesa a lo largo de las hifas, en posiciones terminales o intermedias, y ocasionalmente en cadenas de dos a tres nódulos. Las cepas MICG-6702 y MICG-6703 presentaron fíbulas en todos los medios de cultivo, mientras que la cepa MICG-1812 sólo eventuales en medio MMN (Figura 9 y Tabla 1).

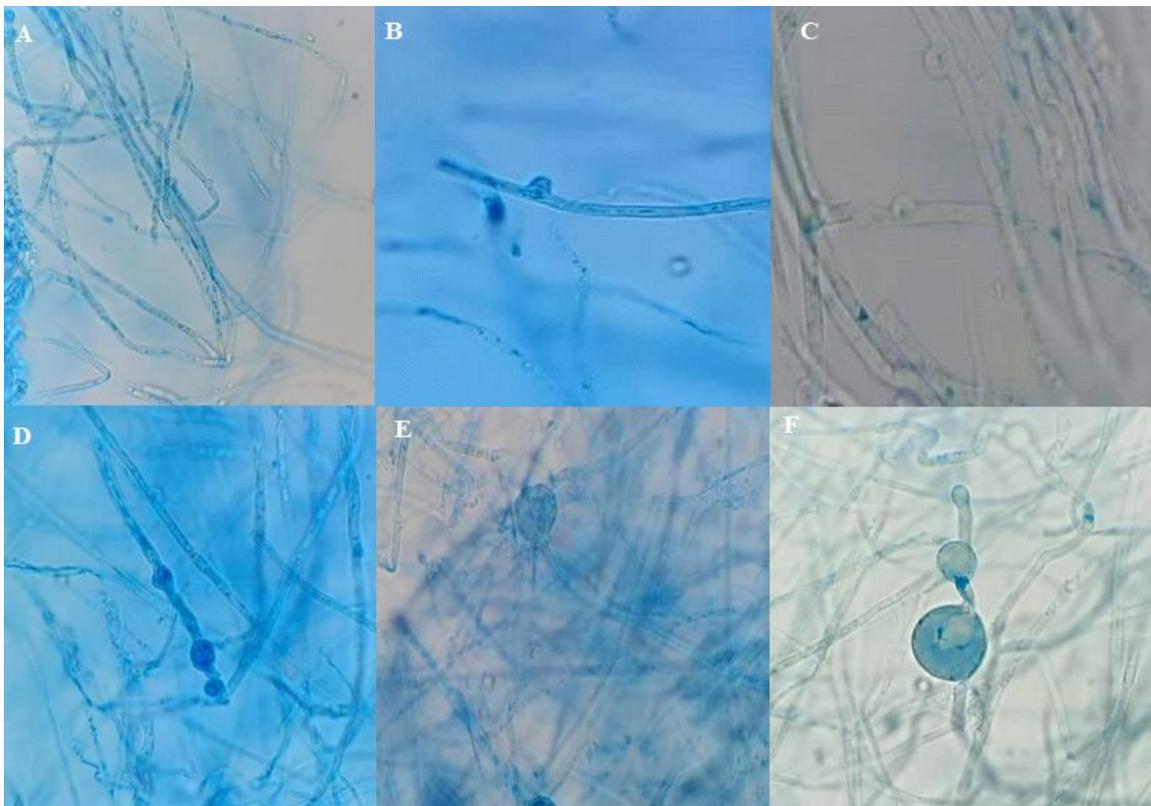


Figura 9. C. Características microscópicas de las cepas de *Laccaria* en los diferentes medios de cultivo en azul de lactofenol. A. hifas indiferenciadas (1000x). B. Fíbula en cultivo de la cepa MICG-1812 en MMN (1000x). C. Fíbulas de la cepa MICG-6702 en MEA (1000x). D. Nódulos intermedios (1000x). E. Nódulo terminal (1000x). F. Nódulos intermedios en cadena (1000x).

Tabla 2. Características microscópicas de cepas de *Laccaria* en diferentes medios de cultivo

Especie	Cepa	Medio	Diámetro de Hifas (1-3 μm)	Fíbulas	Nódulos Terminales	Nódulos intermedios
<i>L. trichodermophora</i>	MICG -1814	MEA	1-3	Ausentes	Ausentes	Ausentes
		BAF	1-3	Ausentes	Presentes	Presentes
		MMN	1-3	Ausentes	Presentes	Presentes
		AHM	1-3	Ausentes	Presentes	Presentes
<i>L. bicolor</i>	MICG-1812	MEA	1-3	Ausentes	Ausentes	Presentes
		BAF	1-3	Ausentes	Presentes	Presentes
		MMN	1-3	Eventuales	Presentes	Presentes
		AHM	1-3	Ausentes	Presentes	Presentes
<i>L. bicolor</i>	MICG-1813	MEA	1-3	Ausentes	Ausentes	Presentes
		BAF	1-3	Ausentes	Presentes	Presentes
		MMN	1-3	Ausentes	Presentes	Presentes
		AHM	1-3	Ausentes	Presentes	Presentes
<i>Laccaria</i> sp.	MICG-6702	MEA	1-3	Presentes	Eventuales	Presentes
		BAF	1-3	Presentes	Presentes	Presentes
		MMN	1-3	Presentes	Presentes	Presentes
		AHM	1-3	Presentes	Presentes	Presentes
<i>Laccaria</i> sp.	MICG-6703	MEA	1-3	Presentes	Ausentes	Presentes
		BAF	1-3	Presentes	Presentes	Presentes
		MMN	1-3	Presentes	Ausentes	Presentes
		AHM	1-3	Presentes	Presentes	Presentes

μ m=milímetro

El análisis de conglomerados de las características microscópicas de las cepas, en los cuatro medios de cultivo, las distribuyó en dos grupos (Figura 10). El primero incluyó las cepas MICG-1814 y MICG-6702, las cuales presentaron nódulos intermedios y terminales en BAF, MMN, AHM. Los cultivos de la cepa MICG-1814 no produjeron nódulos -terminales ni intermedios- en MEA ni fíbulas en ninguno de los medios de cultivo; sin embargo, la cepa MICG-6703 presentó nódulos intermedios eventuales en MEA y fíbulas en todos los medios de cultivo.

El segundo grupo incluyó las cepas MICG-1812, MICG-1813 y MICG-6703 las cuales no presentaron nódulos terminales en MEA. Este grupo a su vez se dividió en 2 subgrupos. El primero incluyó las cepas MICG-1812 y MICG-1813 por sus nódulos intermedios en todos los medios de cultivo y pero con nódulos terminales en BAF, MMN y AHM. De este grupo, solo la cepa MICG-1812 presentó fíbulas eventuales en MMN.

El segundo subgrupo incluyó las colonias de la cepa MICG-6702, que presentaron fíbulas y nódulos intermedios en todos los medios evaluados. Además, produjeron nódulos terminales en BAF y AHM, pero no en MMN y MEA.

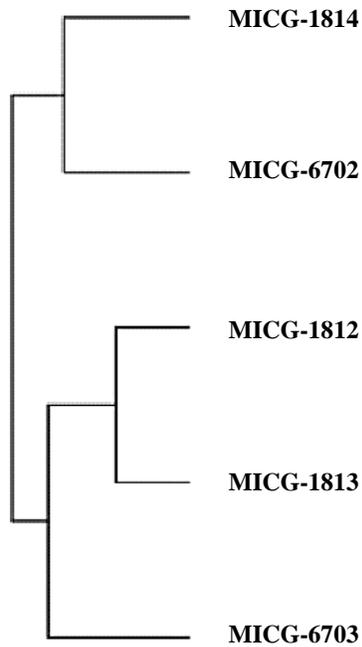


Figura. 10. Análisis de conglomerados de las características microscópicas de cultivo in vitro Laccaria en los medios BAF, MEA, MMN y AHM. El dendrograma muestra las distancias euclidianas calculadas.

IX. DISCUSIÓN

A. Crecimiento miceliar en los diferentes medios de cultivo evaluados

Para el cultivo miceliar de hongos micorrícicos es necesario establecer el medio de cultivo óptimo para optimizar la producción de biomasa. Las cepas de *Laccaria* no crecen o se desarrollan muy poco en los medios de cultivo convencionales (PDA, Sabouraud, etc.) debido a que necesitan nutrientes complejos como biotina, tiamina y minerales. Si bien no requieren al hospedero para su cultivo *in vitro*, su lenta tasa de crecimiento es un obstáculo para producir abundante biomasa/inóculo. La comprensión detallada de los aspectos fisiológicos de la simbiosis, el mecanismo de la absorción de nutrientes, la translocación al hospedero, el movimiento del fotosintato del hospedero al hongo y la elaboración de la sustancia reguladora del crecimiento son básicos para optimizar los parámetros de cultivo de *Laccaria* (Mukerji, Manoharachary & Chamola, 2002).

En este sentido, el crecimiento miceliar de las cinco cepas de *Laccaria* evaluadas evidenció mayor crecimiento en los medios de cultivo MEA y BAF, lo que concuerda con estudios que demuestran que BAF posee los requerimientos nutricionales adecuados para este hongo (Santiago et al., 2003; anexo 2). El medio BAF es uno de los más utilizados para hongos ectomicorrícicos, ya sea para aislamiento (medio sólido) o para producción de inóculo micorrícico (medio líquido) (Murrieta, Noa, Mata, Pineda, Zulueta y Flores, 2014).

En el caso de MEA, este resultó adecuado para el aislamiento y crecimiento de las cepas, por su contenido en carbohidratos, aminoácidos y vitaminas (B6, riboflavina, tiamina, ácido fólico y niacina). Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que MEA es un medio ventajoso para el aislamiento y cultivo de cepas nativas de *Laccaria*, que además resulta más fácil de preparar y con un valor de adquisición menor comparado con BAF (Mukerji et al., 2002).

En los medios enriquecidos se pudo observar que las cepas incrementaron la ramificación de sus hifas y por consiguiente, mayor cantidad de biomasa al incrementar el área de micelio. Por el contrario, en condiciones limitantes de nutrientes, el micelio tiende a ser menos ramificado para maximizar la disponibilidad de estos (Arana, Burrola, Garibay y Franco, 2014).

Los diámetros más pequeños de crecimiento miceliar se observaron en el medio AHM, que resulta insuficiente para el desarrollo de *Laccaria* (Murrieta-Hernández et al., 2014). Es posible que uno de los factores influyentes sea el bajo contenido de glucosa (5g/L), comparado con BAF (30 g/L) e incluso del MMN (10 g/L). Además, la composición de AHM está exenta de nutrientes de vital importancia para *Laccaria* como las vitaminas (tiamina, ácido fólico, etc.) presentes en los otros medios de cultivo (Murrieta-Hernández et al., 2014). Los hongos ectomicorrícicos en general tienen poca habilidad para descomponer carbohidratos muy complejos por lo que solo algunos monosacáridos o disacáridos -como la glucosa- suelen utilizarse para su desarrollo (Kusuda, Ueda, Konishi, Yamanaka, Terashita, y Miyatake, 2007).

Al comparar con otros estudios, se encontró que Santiago y colaboradores (2003) obtuvieron resultados similares al evaluar el crecimiento de una cepa de *L. bicolor* a 25 °C durante 40 días en los medios de cultivo PDA, MEA, SAB, Ingestad (ING), MMN, AHM y BAF. Dicho estudio encontró que los valores más altos de diámetro miceliar se obtuvieron en MEA y BAF y los más bajos en MMN, AHM y ING.

Adicionalmente, el crecimiento de cepas de hongos ectomicorrícicos también es afectado por las condiciones de cultivo, principalmente el pH y la temperatura. En este estudio el pH de los medios de cultivo evaluados pudo haber influido en el diámetro de crecimiento de las cepas evaluadas. Yamanaka (2003) indicó que *Laccaria* es capaz de absorber de mejor manera los nutrientes del medio de cultivo a medida que se incrementa el pH, produciendo mayor desarrollo.

Con respecto a la temperatura, no hay publicaciones que documenten cómo esta puede influir en el cultivo *in vitro* de *Laccaria*. Se ha descrito que los hongos ectomicorrícicos podrían ser muy sensibles a las variaciones de temperatura (Smith & Read, 2008). Si el suelo se enfría dramáticamente, la actividad metabólica de los hongos y de las raíces disminuye con consecuencias negativas para el crecimiento del micelio y la disponibilidad de nutrientes tanto para los hongos como para las plantas asociadas. Incluso los hongos ectomicorrícicos muestran una gran variación en la temperatura entre las cepas de una sola especie, sin embargo, hay que considerar que lo que ocurre a nivel de campo no necesariamente ocurre en el crecimiento *in vitro*. García et al., (2017) señalaron algunos hallazgos del efecto de la temperatura sobre el

crecimiento *in vitro* de los hongos ectomicorrizicos -*R. luteolus granulatus* y *S. luteus*- cuando la temperatura de cultivo se incrementaba, se observó un efecto negativo sobre el crecimiento de estos hongos.

B. Característica macroscópicas y microscópicas de las cepas de *Laccaria* en los diferentes medios de cultivo.

Respecto a las características morfológicas observadas en los medios de cultivo, los resultados de este estudio coinciden con lo informado por Mueller (1992) para el género *Laccaria*. El micelio creció fuertemente adherido a la superficie del agar e incluso con cierta transparencia por la complejidad de la disposición colonial. En todos los medios de cultivo las colonias produjeron micelio denso, de textura aterciopelada, sedosa a aterciopelada, especialmente en MMN y MEA. En la mayoría de los casos, las colonias fueron de espesor uniforme hasta los márgenes, particularmente más densos en la parte central; sin embargo, en ciertas colonias y dependiendo del medio de cultivo empleado, se produjeron zonas más gruesas de micelio o irradiaciones dendríticas radiales. Lo anterior fue notablemente observado en MMM, donde el espesor del micelio fue más denso en el centro y ramificado hacia el margen de las colonias.

En cuanto al color y cambios de pigmentación de las colonias/medios, referidos también por Santiago y colaboradores (2003), se ha descrito que la coloración en el desarrollo del hongo puede indicar la producción de abundantes metabolitos secundarios (no necesarios para el crecimiento miceliar y producción de basidiomas) o alguna anormalidad en el crecimiento, de manera que puede ser una característica no deseable en los cultivos (Stamets, 1993). Sin embargo, el color de todas las colonias se tornó ligeramente blanquecino en el anverso y reverso de las colonias al final de la incubación en todos los medios de cultivo, tal y como reporta Mueller (1992).

Asimismo, la morfología microscópica de las cepas evaluadas coincide con lo reportado para el género por Mueller (1992), ya que se encontraron hifas con diámetros de 1-3 μm morfológicamente indiferenciadas, rara vez ramificadas. La mayoría de cepas en este estudio presentaron nódulos (inflaciones) de pared gruesa en todos los medios de cultivo con excepción

de la cepa MICG-1814. Mueller (1992) señaló al respecto que la formación de estas estructuras es la respuesta al estrés hídrico: a menor humedad, mayor abundancia.

Es importante mencionar que se evidenció la presencia de fíbulas en las cepas MICG-1812, MICG-6702 y MICG-6703, ya que se ha reportado a *Laccaria* como una especie capaz de fructificar en condiciones de invernadero (Urizar, 1999; Gurriarán et al., 2010; Flores et al., 2008). Por tal razón, la presencia de fíbulas es indicativo de que las cepas cultivadas pudieran formar los basidiomas cuando se estudien con fines de producción (Flores et al., 2008). El hecho de que no se hayan encontrado clamidosporas en ninguna cepa evaluada, es un buen indicador en el manejo y condiciones del cultivo de las cepas, debido a que su presencia en los cultivos indica condiciones desfavorables para el desarrollo del micelio y por lo tanto no se considera una característica deseable (Flores et al., 2008).

Finalmente, estudios recientes de Wilson et al (2017) señalan que el género *Laccaria* a pesar de ser uno de los géneros más estudiados, aún quedan muchas preguntas acerca de su verdadera diversidad taxonómica, biogeografía y evolución. Incluso mencionan que el concepto de especie en *Laccaria* no ha sido el más adecuado de acuerdo a los resultados filogenéticos, donde se han encontrado más especies nuevas y sobre todo especies crípticas (especies exclusivas de un área geográfica reducida).

X. CONCLUSIONES

1. Las cepas de *Laccaria* presentaron al inicio del periodo de incubación colonias de color lila a violeta en la mayoría de los medios de cultivo, con excepción de MEA, donde produjeron tonos naranja-café, aunque al final del periodo de cultivo (36 días) todas las colonias adquirieron una textura aterciopelada y color blanquecino.
2. Las cinco cepas de *Laccaria* presentaron hifas con un diámetro de 1-3 μm , nódulos de pared gruesa localizados a lo largo de la hifa en posiciones terminales o intermedias en todos los medios de cultivo; las cepas MICG-6702 y MICG-6703 presentaron fíbulas en todos los medios de cultivo evaluados y solo la cepa MICG-1812 solo eventualmente en MMN.
3. El mejor crecimiento miceliar de las cinco cepas evaluadas de *Laccaria* se observó en los medios de cultivo MEA y BAF.
4. Las características macroscópicas y microscópicas de las cepas y la revisión de boletas de descripción y fotografías indican que las cepas pertenecen a distintas especies del grupo de *Laccaria bicolor sensu lato*.

XI. RECOMENDACIONES

1. Utilizar los medios MEA y BAF para el cultivo *in vitro* de cepas guatemaltecas de *Laccaria*, si se requiere obtener biomasa miceliar con mayor rapidez.
2. Estudiar la viabilidad del micelio de *Laccaria* en los medios de cultivo MEA y BAF.
3. Evaluar el rendimiento de la producción de inóculo de *Laccaria* en los medios de cultivo MEA y BAF, a efecto de encontrar el mejor medio para la producción masiva de biomasa.
4. Determinar la afinidad de las cepas nativas de *Laccaria* con especies arbóreas usadas comúnmente en los programas de reforestación y caracterizar la morfología de su micorriza para reconocerla fácilmente en campo.
5. Continuar buscando y recolectando cepas *Laccaria* en nuestro país para su caracterización taxonómica.
6. Estudiar *in vitro* el pH y temperaturas óptimas de crecimiento en los medios evaluados para las cepas nativas de *Laccaria*.

XII. REFERENCIAS

- Arana, G., Burrola, Y., Garibay, R. y Franco, S. (2014). Obtención de cepas y producción de inóculo de cinco especies de hongos silvestres comestibles de alta montaña en el centro de México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 20(3), 213-226.
- Berduo, E. (2000). *Evaluación de la eficiencia micorrícica de dos cepas de hongos, Laccaria aff bicolor y Suillus aff brevipes, aisladas en Guatemala, sobre plantas de Pinus ayacahuite Ehr, Pinus rudis Endl, y Pinus hartwegii Lindl* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species. *American Journal of Botany*, 98(3), 426-438.
- Brundrett, M. (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 and Soil*, 320(1-2), 37-77.
- Cairney, J. & Chambers, S. (1999). *Ectomycorrhizal fungi: Key genera in profile*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Carrasco, V., Pérez, J., Espinoza, V., Almaraz, J., Quintero, R. & Torres., M. (2010). Characterization of mycorrhizas established between two wild edible mushrooms and native pines of Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1(4), 567-577.
- Castro, M. y Freire, L. (1984). Estudio autoecológico y taxonómico del género *Laccaria* bk. & br. en Galicia. *Anales de Biología*, 1, 11-13.
- Cepero, M., Restrepo, S., Franco, A., Cárdenas, M. y Vargas, N. (2012). *Biología de hongos*. Bogotá, Colombia: Uniandes.

- Comandini, O., Rinaldi, A. & Kuyper, T. (2012). Measuring and estimating ectomycorrhizal fungal diversity: A continuous challenge. In M. Pagano. *Mycorrhiza: occurrence in natural and restored environments* (pp. 164-200). New York, NY: Nova Science Publishers.
- Corte de Constitucionalidad de Guatemala. (2002). *Constitución Política de la República de Guatemala*. Disponible en: <https://www.ine.gob.gt/archivos/.../ConstitucionPoliticaDeLaRepublicaDeGuatemala.pdf>
- Das, A. & Varma, A. (2009). Symbiosis: The art of living. In A. Varma & A. Kharkwal. *Symbiotic fungi: Principles and practice* (pp. 1-28). Berlin, Germany: Springer.
- Dighton, J., White, J. & Oudemans, P. (2005). *The fungal community: Its organization and role in the ecosystem*. (3rd ed.). Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group.
- Flores, R., Díaz, G. & Honrubia, M. (2008). Mycorrhizal synthesis and basidioma primordium formation between *Abies guatemalensis* and *Laccaria bicolor*. *Nova Hedwigia*, 87(1-2), 153-160.
- García, J., Perez, J., Ríos, D, Saez, P., Atala, C., Sánchez, O. y Pereira, C. (2017). Crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrícicos asociados con plantaciones de *Pinus radiata* en Chile. *Fitotec*, 40(4), 415-423.
- Galindo, G., Castillo, C., Campos, A. y Lara, C. (2015). Caracterización de las ectomicorrizas formadas por *Laccaria trichodermophora* y *Suillus tomentosus* en *Pinus montezumae*. *Botanical Sciences*, 93(4), 855-863.
- Gómez, M., Villegas, J., Sáenz, C. y Lindig, R. (2013). Efecto de la micorrización en el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* en cárcavas. *Madera y Bosques*, 19(3), 51-63.

- Gurriarán, N., Cáceres, R., Bran, M., Morales, O. y Flores, R. (2010). Caracterización del cultivo miceliar de *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton (Agaricales) en medio MMN con diferentes pH. *Revista Científica*, 18(1), 89-94.
- Howard, R. & Gow, N. (2007). *The mycota: Biology of the fungal cell*. (2nd ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Honrubia, M. (2009). Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 66(1), 133-144.
- Hung, L. & Molina, R. (1986). Use of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria laccata* in forestry. III. Effects of commercially produced inoculum on container-grown Douglas-fir and ponderosa pine seedlings. *Canadian Journal of Forest Research*, 16(4), 802-806.
- Kirk, P., Cannon, P., Minter, D. & Stalpers, J. (2008). *Dictionary of the fungi*. (10th ed). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Kroop, B. & Mueller, G. (1999). *Laccaria*. In J. Cairney & S. Chambers, *Ectotmycorrhizal fungi key genera in profile* (pp. 65-83). New York, NY: Springer Science & Business Media.
- Kusuda, M., Ueda, M., Konishi, Y., Yamanaka, K., Terashita, T., & Miyatake, K. (2007). Effects of carbohydrate substrate on the vegetative mycelial growth of an ectomycorrhizal mushroom, *Tricholoma matsutake*, isolated from *Quercus*. *Mycoscience*, 48(6), 358-364.
- Largent, D., Thiers, D., Johnson D. & Watling R. (1977). *How to identify mushrooms to genus III: microscopic features*. Arrington, VA: Buteo Books.
- Lei, J., Wong, K., & Piché, Y. (1991). Extracellular concanavalin A-binding sites during early interactions between *Pinus banksiana* and two closely related genotypes of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Mycological Research*, 95(3), 357-363.

- López, I., Chagollan, F., Del Campo, J., García, R., Contreras, I. y García, R. (2006). *Ecología*. Jalisco, México: Editorial Umbral.
- Mazariegos, K., Lara, D. y Lara, A. (2014). *Contribución al conocimiento tradicional de los hongos en los municipios de Chimaltenango, San Martín Jilotepeque y Santo Domingo Xenacoj* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Mérida, J. y Hernández, M. (2017). *Etnomicología del municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala: estudio de la diversidad, comercio, tradiciones y uso de hongos locales* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Mier T., Toriello C. y Ulloa M. (2002). *Hongos microscópicos saprobios y parásitos: métodos de laboratorio*. Ciudad de México, México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Molina, R. & Palmer J. (1982). Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In N. Schenck. (ed.), *Methods and principles of micorrhizal research* (pp. 115-126). Saint Paul, MN: American Phytopathological Society.
- Mohammandi, E., Rezaee, Y., Prasad., R. & Varma, A. (2008). Mycorrhizal fungi: What we know and what should we know? In A. Varma. *Mycorrhiza* (3rd ed., pp. 03-132). Berlin, Germany: Springer.
- Montoya, L., Bandala, V., Baroni, T. & Horton, T. (2015). A new species of *Laccaria* in montane cloud forest from eastern Mexico. *Mycoscience*, 56(6), 597–605.
- Morales, O., Bran, M., Cáceres, R. y Flores, R. (2003). Las especies del género *Laccaria* (Agaricales) en Guatemala. *Revista Científica*, 16(1), 89-94.
- Moser, M. (1960). *Die gattung phlegmacium (schleimköpfe)*. Bad Heilbrunn, Germany: Julius Klinkhardt.

- Mueller, G. (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, 1-25.
- Mukerji, K.G., Manoharachary, C. & Chamola, B.P. (2002). *Techniques in mycorrhizal studies*. Delhi: Springer
- Murrieta, D., Pineda, M., Noa, J., Mata, M., Zulueta, R. & Flores, N. (2014). The structure of *Pinus hartwegii* at the Cofre de Perote, Veracruz, México. *Open Journal of Forestry*, 4(4), 291.
- Nobles, M. (1965). Identification of culture of wood-inhabiting hymenomycetes. *Canadian Journal of Botany*, 43, 1097-1139.
- Paracer, S. & Ahmadjian, V. (2000). *Symbiosis: An introduction to biological associations*. New York, NY: Oxford University Press, Inc.
- Pera, J. y Parladé, J. (2005). Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria, Sistema y Recursos Forestales*, 14(3), 419-433.
- Peterson, R., Massicotte, H. & Melville, L. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and cell biology*. Ottawa, Canada: National Research Council.
- Popa, F., Jiménez, S., Weisenborn, J., Donges, K., Rexer, K. & Piepenbring, M. (2016). A new *Laccaria* species from cloud forest of Fortuna, Panama. *Mycological Progress*, 15(2), 1-8.
- Popa, F., Rexer, K., Donges, K., Yang, Z. & Kost, G. (2014). Three new *Laccaria* species from Southwest China (Yunnan). *Mycological Progress*, 13(4), 998.

- Regalado, O., Villagrán, X., Castellanos, E., Incer, D. y Martínez, G. (2012). *Mapa de cobertura forestal de Guatemala 2010 y cobertura forestal 2006-2010*. Recuperado de <http://www.uvg.edu.gt/investigacion/ceab/cea/doc/informe-cobertura-forestal-2010.pdf>
- Santiago, G., Estrada, A., Varela, L. & Herrera, T. (2003). *Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis in vitro de una cepa de Laccaria bicolor*. *Agrociencia*, 37(6), 575-584.
- Singer, R. (1986). *The Agaricales in modern taxonomy* (4th ed.). Koenigstein, Germany: Koeltz Scientific Books.
- Smith, S. & Read, D. (2008). *Mycorrhizal symbiosis* (3th ed.). New York, NY: Academic Press.
- Spribille, T., Tuovinen, V., Resl, P., Vanderpool, D., Wolinski, H., Aime, M. & Mayrhofer, H. (2016). Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science*, 353(6298), 488-492.
- Stamets, P. (1993). *Growing and medical mushrooms*. Olympia, WA, USA: Ten Speed Press & Mycomedea.
- Taylor, A. & Alexander, I. (2005). The ectomycorrhizal simbiosis: Life in the real world. *Mycologist*, 19(3), 102-112.
- Tedersoo, L., May, T. & Smith, M. (2010). Ectomycorrhizal lifestyle in fungi: Global diversity, distribution, and evolution of phylogenetic lineages. *Mycorrhiza*, 20(4), 217-263.
- Urizar, M. (1999). *Eficiencia en la producción de micorrizas y aumento en la producción de biomasa en plántulas de pino candelillo (Pinus maximinoi) con Laccaria laccata, Pisolithus tinctorius y Scleroderma sp. en contenedor* (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de, Guatemala.
- Varma, A., Prasad, R. & Tuteja, N. (2017). *Mycorrhiza-nutrient uptake, biocontrol, ecorestoration* (4th ed.). Noida, India: Springer International Publishing.

- Villegas, J., Perez, J., Mata, G., Almaraz, J., Ojeda, E. & Espinosa, V. (2017). Type of light and formation of basidiomata of two species of edible ectomycorrhizal mushrooms associated with neo-tropical pines and the description of basidiomata development. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 40(4), 405-413.
- Vincenot, L., Nara, K., Sthultz, C., Labbé, J., Dubois, M., Tedersoo, L., Martin, F.... Selosse, M. (2012). Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria amethystine* complex. *Molecular Ecology*, 21(2), 281-299.
- Webster, J. & Weber, R. (2007). *Introduction to fungi* (3rd ed.). New York, NY: Cambridge University Press.
- Wilson, A., Hosaka, K. & Mueller, G. (2017). Evolution of ectomycorrhizas as a driver of diversification and biogeographic patterns in the model mycorrhizal mushroom genus *Laccaria*. *New Phytologist*, 213(4), 1862-1873.
- Yamanaka, T. (2003). The effect of the pH on the growth of saprotrophic and ectomycorrhizal ammonia fungi in vitro. *Mycologia*, 95(4), 584-589.

XIII. ANEXOS

Anexo 1. Especies de *Laccaria* alrededor del mundo.

Género <i>Laccaria</i>		
<i>L. acanthospora</i>	<i>L. calosperma</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>bicolor</i>
<i>L. affinis</i>	<i>L. calospora</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>carbonicola</i>
<i>L. affinis</i> f. <i>affinis</i> ,	<i>L. canaliculata</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>chilensis</i>
<i>L. affinis</i> f. <i>macrocystidiata</i>	<i>L. chibinensis</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>crispa</i>
<i>L. affinis</i> var. <i>affinis</i>	<i>L. chilensis</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>decurrans</i>
<i>L. affinis</i> var. <i>anglica</i>	<i>L. cyanolamellata</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>gibba</i>
<i>L. affinis</i> var. <i>carbonicola</i>	<i>L. echinospora</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>intermedia</i>
<i>L. affinis</i> var. <i>chilensis</i>	<i>L. edulis</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>laccata</i>
<i>L. affinis</i> var. <i>intermedia</i>	<i>L. farinacea</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>lutea</i>
<i>L. affinis</i> var. <i>ochrosquamulosa</i>	<i>L. fibrillosa</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>minuta</i>
<i>L. affinis</i> var. <i>peladae</i>	<i>L. flavobrunnea</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>moelleri</i>
<i>L. affinis</i> var. <i>sardoa</i>	<i>L. fraterna</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>montana</i>
<i>L. affinis</i> var. <i>scotica</i>	<i>L. fulvogrisea</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>pallidifolia</i>
<i>L. affinis</i> var. <i>subalpine</i>	<i>L. galerinoides</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>peladae</i>
<i>L. affinis</i> var. <i>tatrensis</i>	<i>L. gibba</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>próxima</i>
<i>L. alba</i>	<i>L. glabripes</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>pruinosisipes</i>
<i>L. altaica</i>	<i>L. globosa</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>pseudobicolor</i>
<i>L. amethystea</i>	<i>L. gomezii</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>pumila</i>
<i>L. amethystea</i> var. <i>amethystea</i>	<i>L. goossensiae</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>pusilla</i>
<i>L. amethystea</i> var. <i>vinosostriata</i>	<i>L. gruberi</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>rosella</i>
<i>L. amethysteo-occidentalis</i>	<i>L. halosperma</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>Subalpina</i>
<i>L. amethystine</i>	<i>L. hudsonii</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>tatrensis</i>
<i>L. anglica</i>	<i>L. hudsonii</i> var. <i>hudsonii</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>vulcanica</i>
<i>L. angustilamella</i>	<i>L. hudsonii</i> var. <i>vinosostriata</i>	<i>L. laccatina</i>
<i>L. aurantia</i>	<i>L. impolita</i>	<i>L. lateritia</i>
<i>L. avachaensis</i>	<i>L. impolita</i> var. <i>impolita</i>	<i>L. lilacina</i>
<i>L. bella</i>	<i>L. impolita</i> var. <i>paraphysata</i>	<i>L. lutea</i>
<i>L. bicolor</i>	<i>L. kalosperma</i> <i>L. laccata</i>	<i>L. macrocystidiata</i>
<i>L. bicolor</i> var. <i>bicolor</i>	<i>L. laccata</i> f. <i>bispora</i>	<i>L. macrocystidiata</i> var. <i>longispinosa</i>
<i>L. bicolor</i> var. <i>pseudobicolor</i>	<i>L. laccata</i> f. <i>laccata</i>	<i>L. macrocystidiata</i> var. <i>macrocystidiata</i>
<i>L. bicolor</i> var. <i>subalpina</i>	<i>L. laccata</i> f. <i>macrocystidiata</i>	<i>L. marítima</i>
<i>L. bisporigera</i>	<i>L. laccata</i> f. <i>minuta</i>	<i>L. masoniae</i>
<i>L. bullipellis</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>affinis</i>	<i>L. masoniae</i> var. <i>brevispinosa</i>
<i>L. bullulifera</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>amethystina</i>	<i>L. masoniae</i> var. <i>masoniae</i>
<i>L. caerulacea</i>	<i>L. laccata</i> var. <i>anglica</i>	<i>L. montana</i>

Continúa Anexo 1**Genero *Laccaria***

<i>L. murina</i>	<i>L. rubroalba</i>	<i>L. trullisata f. rugulospora</i>
<i>L. nana</i>	<i>L. salmonicolor</i>	<i>L. trullisata f. trullisata</i>
<i>L. negrimarginata</i>	<i>L. scotica</i>	<i>L. trullisata subsp. Marítima</i>
<i>L. nigra</i>	<i>L. scotica var. Aberrans</i>	<i>L. trullisata subsp. Trullisata</i>
<i>L. nobilis</i>	<i>L. scotica var. Peullensis</i>	<i>L. trullisata var. Rugulospora</i>
<i>L. oblongospora</i>	<i>L. scotica var. Scotica</i>	<i>L. trullisata var. Trullisata</i>
<i>L. ochropurpurea</i>	<i>L. singeri</i>	<i>L. vinaceoavellanea</i>
<i>L. ochrosquamulosa</i>	<i>L. spodophora</i>	<i>L. vinaceobrunnea</i>
<i>L. ohioensis</i>	<i>L. stellata</i>	<i>L. vinaceorosea</i>
<i>L. ohioensis var. ohioensis</i>	<i>L. striatula</i>	<i>L. vinosofusca</i>
<i>L. ohioensis var. paraphysata</i>	<i>L. sublaccata</i>	<i>L. violaceibasis</i>
<i>L. olivaceogrisea</i>	<i>L. tetraspora</i>	<i>L. violaceonigra</i>
<i>L. paraphysata</i>	<i>L. tetraspora f. major</i>	<i>L. vulcanica</i>
<i>L. porphyrodes</i>	<i>L. tetraspora f. tetraspora</i>	<i>L. yunnanensis</i>
<i>L. procera</i>	<i>L. tetraspora var. aberrans</i>	
<i>L. próxima</i>	<i>L. tetraspora var. major</i>	
<i>L. proxima var. Bicolor</i>	<i>L. tetraspora var. peladae</i>	
<i>L. proxima var. Próxima</i>	<i>L. tetraspora var. Peullensis</i>	
<i>L. proximella</i>	<i>L. tetraspora var. Scotica</i>	
<i>L. pruinosisipes</i>	<i>L. tetraspora var. Tetraspora</i>	
<i>L. pseudomontana</i>	<i>L. tetraspora var. Xena</i>	
<i>L. pulchella</i>	<i>L. tortilis</i>	
<i>L. pumila</i>	<i>L. tortilis f. clemenconii</i>	
<i>L. pumila f. filuloides</i>	<i>L. tortilis f. tortilis</i>	
<i>L. pumila f. pumila</i>	<i>L. tortilis var. Gracilis</i>	
<i>L. purpureobadia</i>	<i>L. transilvanica</i>	
<i>L. roseoalbescens</i>	<i>L. trichodermophora</i>	

Fuente: Wilson et al., 2017.

Anexo 2. Fórmulas nutricionales de medios de cultivo semisintéticos y sintéticos para aislamiento de hongos ectomicorrícicos.

NUTRIENTES	Hagem Modificado	Melin-Norkrans Modificado	Agar Biotina-Aneurina-Ác. Fólico	Melin & Ramas Das	Palmer & HacsKaylo
Extracto de malta	5,0 g	3,0 g		20,0 g	5,0 g
D-Glucosa	5,0 g	10,0 g	30,0 g		0,5 g
Peptona			2,0 g		
Extracto de levadura			0,2 g		
NH₄Cl	0,5 g				
(NH₄)₂HPO₄		0,25 g			
(NH₄)₂C₄H₄O₆				0,5 g	
KH₂PO₄	0,5 g	0,5 g	0,5 g	1,0 g	0,5 g
MgSO₄·7H₂O	0,5 g	0,15 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
MnSO₄			5,0 mg		
CaCl₂		0,05 g	100 mg		
FeC₆H₅O₆·3H₂O				0,5 ml (Solución al 1%)	
FeCl₃	10 gotas (Solución al 1%)	1,2 ml (Solución al 1%)			
FeCl₃·6H₂O			10 mg		
NaCl		0,025 g			
ZnSO₄					
ZnSO₄·7H₂O			1,0 g		
Biotina			1,0 µg		5,0 µg
Tiamina				1,0 µg	1,0 mg
Timanina HCl		100 µg	50 µg		
Ácido fólico			100 µg		
Micronutrientes					2, 0 ml de solución ^a
Agua destilada	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml	1,000 ml
pH después de autoclavar	4,6-4,8	5,5-5,7	5,8-6,3		4,5-4,7

^a. Disolver 1,45 mg de Fe(NO₃)₃·9H₂O, 0,88 mg de ZnSO₄·7H₂O y 0,41 mg MnSO₄·H₂O in 700 ml de agua destilada, acidificar con H₂SO₄ hasta obtener una solución clara, y diluir en 1000 ml de agua destilada.

Fuente: Molina & Palmer, 1982; Moser, 1960.

Anexo 3. Características taxonómicas de las especies de *Laccaria* evaluadas.

A continuación, se presenta una descripción detallada de las características macroscópicas de los basidiomas de las cepas de *Laccaria* evaluadas.

A. *Laccaria trichodermophora* G.M. Mueller.

Descripción

Píleo de 28.0 a 56.0 mm de diámetro, plano convexo a plano, disco levemente deprimido, margen recto a levantado, borde ondulado desgarrado. Superficie húmeda, con escamas finas concéntricas, cutícula no desprendible, color café naranja claro 6^{7/c} que se oscurece a 7^{8/E-F} con zonas oscuras higrófonas café rojizas 8^{7/E} y 8^{7/E-F} en adultos. **Sabor** poco apreciable algo farináceo. **Láminas** subadheridas, anchas, separadas, borde entero, liso; lamélulas truncadas a subtruncadas, color 5^{23/A} en jóvenes, el cual cambia a ocre pálido 5^{3/A}, 5^{4/A-B} y 6^{5/B} con puntaciones café violáceas 8^{7/F}. Esporada blanca. **Estípíte** de 35.0 a 60.0 mm de longitud, 4.0-7.0 de diámetro en el ápice y 3.5-9 mm en la base, central, cilíndrico, ensanchado en la base. Superficie fibrosa, higrofana, color café-marrón 7^{6/E} a café rojizo en adultos 9^{7/E-F}. **Micelio basal** color morado violáceo 13^{2/C} y superficie de ese color en la base de algunos ejemplares adultos.

Reacciones químicas: KOH al 3% negativo, Melzer negativo y H₂SO₄ algo amarillo.

Material estudiado: Departamento Huehuetenango, Municipio Todos Santos Cuchumatán, Aldea Chichim, 28 de agosto de 1997. R. Flores Ref.196.1997 (MICG 1814).

Cepa: MICG-1814

B. *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton

Descripción

Píleo plano convexo, centro deprimido margen recto a levantado y /o recurvado en especímenes adultos. Borde estriado translucido húmedo estriado en la superficie total en seco. Color café en húmedo 9^{6-7/E} y se torna beige-naranja suave en seco 5^{2-37/A}. Superficie torrentosa. Cutícula desprendible. **Láminas** separadas gruesas sinuadas, borde crenulado. Textura cerosa macroscópicamente (cristalizadas al estereóscopo). Color salmón oscuro parecido a la especie de café oscuro del píleo y en las esporas cambia a 9^{4/E} con una tonalidad grisácea. **Estípíte** de 65-

100 mm de largo y 3.0- mm de ancho, cilíndrico, fibriloso pero torrentoso en el ápice, sobre todo en los adultos con hifas de color violeta claro, el resto es de color café parecido al ocre y tonos más claros higrofanos $7^{4/E}$. En algunas el estípote está todo cubierto de este micelio (violeta claro $18^{2/A-B}$)

Comestible. **Olor** afrutado pero después algo arrabonado. **Sabor** a hongo. Consistencia fibrosa.

Reacciones químicas: KOH al 3% negativo, Melzer negativo y H_2SO_4 algo amarillo.

Material estudiado: Municipio Coxón, Departamento Quiché, 24 de septiembre de 1997. Ref.141.1997 (MICG 1813).

Cepa: MICG-1813

C. *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton

Descripción

Píleo 30 a 40 de diámetro, convexo a plano convexo, margen incurvado, borde desgarrado en la superficie. Cutícula desprendible con contexto color rosado $3^{7/A}$ bajo ella. Superficie color café-naranja $6^{7/B}$ cuando se expone al sol o deshidratación y en fresco color café $3^{7/A}$. Algunos escumulosos con escamillas de borde café dispuestos radialmente. **Láminas** anchas separadas, color naranja rosáceo $8^{3/B}$, se quiebran con facilidad dando una apariencia irregular. Superficie seca. **Estípote** cilíndrico de 60-90 mm de longitud. Superficie fibrosa con fibras que se desprenden en todo el estípote. Ápice de 4 mm de diámetro y 5 mm de diámetro en la base. Color café-naranja $8^{4/A}$ en el fondo y fibras color café-naranja $8^{7/A}$. Contexto hueco o lleno, color rosáceo $3^{7/A}$. **Olor** afrutado. **Sabor** a hongo afrutado con consistencia carnosa-fibrosa.

Reacciones químicas: KOH al 3% negativo, NaOH negativo, H_2SO_4 negativo, Melzer negativo, $FeCl_3$ negativo, $Fe_2(SO_4)_3$ negativo.

Material estudiado: Departamento Huehuetenango, Puerta del cielo Cuchumatanes. Ref 36.01 (MICG 1812).

Cepa: MICG-1812

Laccaria sp.

Cepa: MICG-6702

Sin descripción y sin basidioma herborizado.

D. Laccaria sp.

Cepa: MICG-6703

Sin descripción y sin basidioma herborizado.

Br. Stefany Eunice Villacinda Cárcamo
Autor

Br. Katherin Celeste Morataya Muñoz
Autor

MSc. Osberth Isaac Morales Esquivel
Asesor

Licda. María del Carmen Bran González
Asesora

Dr. Roberto Enrique Flores Arzú
Revisor

MSc. Osberth Isaac Morales Esquivel
Director
Escuela de Química Biológica

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto
Decano
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia