

## CARACTERIZACIÓN DE MICORRIZAS ESTABLECIDAS ENTRE DOS HONGOS COMESTIBLES SILVESTRES Y PINOS NATIVOS DE MÉXICO\*

### CHARACTERIZATION OF MYCORRHIZAS ESTABLISHED BETWEEN TWO WILD EDIBLE MUSHROOMS AND NATIVE PINES OF MEXICO

Violeta Carrasco-Hernández<sup>1</sup>, Jesús Pérez-Moreno<sup>1§</sup>, Vicente Espinosa-Hernández<sup>1</sup>, Juan José Almaraz-Suárez<sup>1</sup>, Roberto Quintero-Lizaola<sup>1</sup> y Margarita Torres-Aquino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Microbiología. Edafología. *Campus* Montecillo. Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 36.5. Montecillo, Texcoco, Estado de México. C. P. 56230. Tel. 01 595 9520200. Ext. 1280, 1269, 1220 y 1253. (etalovich@yahoo.com.mx), (jalmaraz@colpos.mx), (quintero@colpos.mx), (vespinos@colpos.mx). <sup>2</sup>*Campus* San Luis Potosí. Colegio de Postgraduados. Agustín de Iturbide. Núm. 73. Salinas de Hidalgo, S. L. P., México. C. P. 78600. Tel. 01 496 9630240. Ext. 4029. (maquino@colpos.mx). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: jperez@colpos.mx, jepemo@yahoo.com.mx.

#### RESUMEN

Las especies forestales dependen de la simbiosis que realizan con los hongos ectomicorrízicos, para un crecimiento óptimo. Adicionalmente México es un importante reservorio cultural y biológico de especies de hongos silvestres comestibles a nivel mundial. A pesar de la gran importancia ecológica, antropológica y práctica, existen escasas descripciones de las ectomicorrizas formadas entre hongos ectomicorrízicos comestibles y plantas nativas de México. En el presente trabajo, se realizó la descripción morfológica de las ectomicorrizas de los hongos comestibles *Laccaria bicolor* y *L. proxima* en asociación con *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*. La síntesis de las micorrizas estudiadas se efectuó mediante la inoculación con esporas en un sustrato estéril, bajo condiciones de invernadero. Se describen las ectomicorrizas formadas en plantas 397 días después de la siembra de pinos y de la inoculación con las especies fúngicas. Se observaron diferencias en la micromorfología de las ectomicorrizas de ambas especies fúngicas, siendo los principales caracteres distintivos, la longitud de la ectomicorriza, el tipo de ramificación, la forma de las puntas no ramificadas y el color de los ápices. Ambas especies presentaron el mismo arreglo anatómico de la capa externa del manto. Se adiciona también la descripción de las

#### ABSTRACT

For an optimum growth, forest species depend on the symbiosis with ectomycorrhizal mushrooms. Additionally, Mexico is an important cultural and biological reserve of species of wild edible mushrooms at world level. In spite of huge ecological, anthropological and practical importance, there are scarce descriptions of ectomycorrhizas formed between edible ectomycorrhizal mushrooms and native plants of Mexico. In this work was done the morphological description of ectomycorrhizas of edible mushrooms *Laccaria bicolor* and *L. proxima* in association with *Pinus patula* and *P. pseudostrobus*. The synthesis of the studied mycorrhizas was made by means of the inoculation with spores in a sterile substrate, under greenhouse conditions. The ectomycorrhizas formed in plants 397 days after the planting of pines and of the inoculation with fungal species are described. Differences were observed in the micromorphology of the ectomycorrhizas of both fungal species, being the main distinctive characters, the length of the ectomycorrhiza, the ramification type, the shape of non-ramified tips and the color of the apexes. Both species showed the same anatomical arrangement of the external layer of the mantle. It is also added the description of the sporocarp of *Laccaria bicolor* and *L. proxima*. This study

\* Recibido: marzo de 2010  
Aceptado: noviembre de 2010

esporomas de *Laccaria bicolor* y *L. proxima*. Este estudio se realizó en el laboratorio de micorrizas del Programa de Edafología del Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas (CP) en 2009.

**Palabras clave:** *Laccaria bicolor*, *L. proxima*, *Pinus patula*, *P. pseudostrobus*.

## INTRODUCCIÓN

En la mayoría de bosques templados y boreales las especies de árboles presentes forman asociaciones ectomicorrízicas (Smith y Read, 2008). Estas asociaciones contribuyen a la biodiversidad de suelos y al funcionamiento del ecosistema, siendo reguladores de la productividad de los bosques (Smith y Read, 2008). En general, los hongos micorrízicos y en particular los ectomicorrízicos, realizan diversas aportaciones benéficas a las plantas las cuales incluyen la transferencia de agua y nutrientes hacia los árboles asociados (Pérez-Moreno y Read, 2001a y 2001b; Pérez-Moreno y Read, 2004).

Se estima que existen más de 5 000 especies de hongos (pertenecientes a los basidiomicetes y ascomicetes) y alrededor de 2 000 plantas (tanto angiospermas como gimnospermas) que forman simbiosis ectomicorrízicas (Agarwal y Sah, 2009). Adicionalmente, México es un importante reservorio cultural y biológico de hongos silvestres comestibles a nivel internacional. Un gran porcentaje de las especies de hongos silvestres comestibles en México forman asociaciones ectomicorrízicas (Pérez-Moreno *et al.*, 2008).

Algunas especies de hongos ectomicorrízicos pueden ser cultivados en laboratorio, para su posterior utilización en micorrizaciones controladas de plantas en vivero, siendo necesario determinar las condiciones y técnicas culturales que permitan la optimización de esta simbiosis hongo-planta. Por ello la adecuada selección e identificación de las especies de hongos micorrízicos como simbiosiontes y su posterior manipulación, tanto en laboratorio como en vivero, pueden ser aspectos claves para lograr con éxito el establecimiento de especies vegetales en campo (Honrubia *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 2007).

Dado que existen diferencias morfológicas entre las raíces ectomicorrizadas con diferentes especies de hongos, la caracterización morfológica de las ectomicorrizas es fundamental para un manejo adecuado en vivero de

was carried out in the laboratory of mycorrhizas of the Program of Edaphology of Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas (CP) in 2009.

**Key words:** *Laccaria bicolor*, *L. proxima*, *Pinus patula*, *P. pseudostrobus*.

## INTRODUCTION

In most of temperate and boreal forests the existing species of trees form ectomycorrhizal associations (Smith and Read, 2008). These associations are the main contribution to the biodiversity of soils and the operation of the ecosystem, being regulators of productivity and composition in forests (Smith and Read, 2008). In general, mycorrhizal mushrooms and in particular the ectomycorrhizal, make diverse beneficent contributions to plants which include the transfer of water and nutrients toward the associate trees (Pérez-Moreno and Read, 2001a and 2001b; Pérez-Moreno and Read, 2004).

It is considered that exist more than 5 000 species of mushrooms (belonging to the basidiomicetes and ascomicetes) and around 2 000 plants (as much angiosperms as gymnosperms) that form ectomycorrhizal symbiosis (Agarwal and Sah, 2009). Additionally, Mexico is an important cultural and biological reserve of wild edible mushrooms at international level. A great percentage of the species of wild edible mushrooms in Mexico form ectomycorrhizal associations (Pérez-Moreno *et al.*, 2008).

Some species of ectomycorrhizal mushrooms can be cultivated in laboratory, for their later use in controlled mycorrhization of plants in nursery, being necessary to determine the technical and cultural conditions that allow the optimization of this symbiosis mushroom-plant. For this the appropriate selection and identification of species of mycorrhizal mushrooms as symbionts and their later manipulation, as much in laboratory as in nursery, they can be key aspects to achieve with success the establishment of vegetable species in field (Honrubia *et al.*, 1992; Pereira *et al.*, 2007).

Since morphological differences exist among the ectomycorrhizal roots with different species of mushrooms, the morphological characterization of ectomycorrhizas is fundamental for a proper handling in

inoculaciones controladas. Sin embargo, en México esta caracterización se ha efectuado para muy pocas especies fúngicas y vegetales.

El género *Laccaria* ha sido utilizado ampliamente, por ser un hongo cosmopolita (Cairney y Chambers, 1999). Mueller (1992) reconoció 19 especies para Estado Unidos de América y tentativamente 40 a nivel mundial. Las especies de *Laccaria* forman ectomicorrizas con un amplio rango de hospederos (*Pinaceae*, *Pinus*, *Larix*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Dipterocarpaceae*, *Dipterocarpus*, *Fagaceae*, *Betula*, *Myrtaceae*, *Eucalyptus*, *Leptospermum*, *Picea*, *Tsuga*, *Abies*, *Fagus*, *Nothofagus*, *Quercus*, *Tiliaceae*, *Tilia*, *Salicaceae* y *Salix*). Dentro de esta gran diversidad de especies se encuentran *Laccaria proxima* y *L. bicolor*, las cuales han recibido escasa atención en cuanto a su descripción y síntesis en laboratorio.

Debido al gran potencial de utilización que tienen las especies del género *Laccaria* en México (Pérez-Moreno *et al.*, 2008; Perea-Estrada *et al.*, 2009), en el presente trabajo se efectuó la descripción macro y micromorfológica de ectomicorrizas sintetizadas entre *Laccaria bicolor* y *L. proxima* con *Pinus pseudostrobus* y *P. patula*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *Pinus pseudostrobus* y *P. patula* fueron esterilizadas con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30%. Se utilizaron tubetes de plástico negro de 140 ml los cuales se lavaron y desinfectaron con alcohol previo a su llenado con el sustrato. El sustrato utilizado consistió en una mezcla de arena-corteza-suelo en proporción 2:2:1, el cual fue esterilizado con vapor de agua durante 24 h.

Los tubetes se llenaron con el sustrato, dejando en la parte superior un espacio aproximadamente al 10% del volumen para aplicar el inóculo y posteriormente se llenaron en su totalidad. Se colocó la semilla de cada pino por tubete a una profundidad aproximada de 0.5 cm y se agregó una capa de granos finos de tezontle (<0.5 cm de diámetro) en la superficie para cada tubete.

La germinación ocurrió, tres semanas después de la siembra y se aplicó el fungicida Captan en proporción de 2 g L<sup>-1</sup>, cada tercer día hasta que el tallo estuvo lignificado a fin de evitar el "damping off". A cada planta se inoculó con 10<sup>6</sup> a 10<sup>8</sup>

nursery of controlled inoculations. However, in Mexico this characterization has been made for very few fungal species and vegetables.

The genus *Laccaria* has been used thoroughly, by being a worldwide mushroom (Cairney and Chambers, 1999). Mueller (1992) recognized 19 species for United States of America and tentatively 40 at world level. The species of *Laccaria* form ectomycorrhizas with a wide host range (*Pinaceae*, *Pinus*, *Larix*, *Picea*, *Pseudotsuga*, *Dipterocarpaceae*, *Dipterocarpus*, *Fagaceae*, *Betula*, *Myrtaceae*, *Eucalyptus*, *Leptospermum*, *Picea*, *Tsuga*, *Abies*, *Fagus*, *Nothofagus*, *Quercus*, *Tiliaceae*, *Tilia*, *Salicaceae* and *Salix*). Inside this great diversity of species are *Laccaria proxima* and *L. bicolor*, which have received scarce attention as for their description and synthesis in laboratory.

Due the great potential use that the species of genus *Laccaria* in Mexico have (Pérez-Moreno *et al.*, 2008; Perea-Estrada *et al.*, 2009), in this work was made the macro and micromorphologic description of ectomycorrhizas synthesized between *Laccaria bicolor* and *L. proxima* with *Pinus pseudostrobus* and *P. patula*.

## MATERIALS AND METHODS

The seeds of *Pinus pseudostrobus* and *P. patula* were sterilized with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 30%. Black plastic tubes of 140 ml were used, washed and then disinfected with alcohol before filling with the substrate. The used substrate consisted on a sand-bark-soil mixture in proportion 2:2:1, which was steam sterilized during 24 h.

The tubes were filled with the substrate, leaving approximately in the superior part a space at 10% of volume to apply the inoculum and then they were filled in at full. The seed of each pine was placed by tube at an approximate depth of 0.5 cm and a layer of fine grains of tezontle was added (<0.5 diameter cm) in the surface for each tube.

The germination occurred three weeks after the planting and Captan fungicide was applied in proportion of 2 g L<sup>-1</sup>, every third day until the stem was lignified in order to avoid "damping off". Each plant was inoculated with 10<sup>6</sup> to 10<sup>8</sup> spores. The preparation of inoculum consisted on

esporas. La preparación del inóculo consistió en deshidratar los píleos de los esporomas de *Laccaria bicolor* y *L. proxima* a una temperatura de 35 °C, los cuales se almacenaron en viales de 1.5 ml hasta la inoculación.

Los esporomas utilizados para el inóculo fueron adquiridos en el mercado de Ozumba, el cual se encuentra ubicado en el sureste del Valle de México. Las coordenadas extremas del municipio son: 19° 02' latitud norte y 98° 48' 14" longitud oeste y una altitud media de 2 340 m. La parte norte y central del municipio presentan un clima templado C(w2) (w) b(i) g, con temperatura media anual entre 12 y 18 °C y la parte sur del municipio posee un clima semicálido (A) C(w2) (w) a(i'), con una temperatura media anual entre 12 y 18 °C (SEGOB, 2010).

Las especies de hongos ectomicorrízicos comestibles del género *Hebeloma* y *Laccaria*, adquiridos en el mercado de Ozumba, se describieron de acuerdo a las principales características macro y microscópicas especificadas por Largent (1973); Largent *et al.* (1977). Las plantas desde la siembra hasta la cosecha permanecieron en condiciones de invernadero durante 397 días, regándose cada tercer día con agua purificada.

### Caracterización macro y micromorfológica

La caracterización macro y micromorfológica se efectuó 397 días después de la siembra. El cepellón se remojó durante 24 h, posteriormente se retiró la parte aérea del pino y se enjuagó cuidadosamente la raíz, la cual fue dividida en tres áreas iguales: superior, media e inferior. Después se prosiguió a extender la raíz de cada área y cortar segmentos de 5 cm, de estos se seleccionaron al azar algunos para su posterior conteo en el estereoscopio. Por cada área se contaron 200 raíces cortas, en total se contabilizaron 600 raíces cortas por pino.

Se analizaron las características micromorfológicas y anatómicas más comunes de las raíces cortas micorrizadas para cada especie tales como: longitud, diámetro, color, tipo de ramificación, forma de las puntas no ramificadas, textura y anatomía externa del manto de las micorrizas; el procedimiento se realizó de acuerdo al sistema de información para caracterización y determinación de ectomicorrizas (Agerer y Rambold, 2009). Se tomaron fotomicrografías en un estereoscopio Leica EZ4 a las raíces cortas micorrizadas en mejor estado y en las que se observaron las características distintivas para cada especie.

dehydrating the pileus of sporocarp of *Laccaria bicolor* y *L. proxima* at a temperature of 35 °C, which were stored in trays of 1.5 ml until the inoculation.

The sporocarps used for the inoculum were acquired in the market of Ozumba, which is located in the southeast of Valley of Mexico. The coordinates of the municipality are: 19° 02' north latitude and 98° 48' 14" west longitude and a average altitude of 2 340 m. The north and central part of the municipality shows a temperate climate C(w2) (w) b(i)g, with annual average temperature between 12 and 18 °C and the south part of the municipality has a climate semiwarm (A) C(w2) (w) a(i'), with an annual average temperature between 12 and 18 °C (SEGOB, 2010).

The species of ectomycorrhizal edible mushrooms of genus *Hebeloma* and *Laccaria*, acquired in the market of Ozumba, were described according to the main macro and microscopic characteristic specified by Largent (1973); Largent *et al.* (1977). The plants from the sow until the harvest remained under greenhouse conditions during 397 days, being irrigated every third day with purified water.

### Macro and micromorphological characterization

The macro and micromorphological characterization were made 397 days after the sow. The rootball was soaked during 24 h, later was retired the aerial section of the pine and the root was rinsed carefully, which was divided in three equal areas: top, medium and inferior. Then the root of each area was extended and cut to 5 cm segments, of these some were selected at random for their later count in the stereoscope. For each area there were 200 short roots, in total 600 short roots were counted by pine.

The most common micromorphological and anatomical characteristic were analyzed of mycorrhizal short roots for each species such as: length, diameter, color, ramification type, shapes of non-ramified tips, texture and external anatomy of the mantle of the mycorrhizas; the procedure was carried out according to the system of information for characterization and ectomycorrhizas determination (Agerer and Rambold, 2009). Photomicrograph were taken in a Leica EZ4 stereoscope to mycorrhizal short roots in better state and in those that the distinctive characteristics were observed for each species.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto *Laccaria laccata* como *L. proxima* tienen una gran importancia como especies comestibles en diversas partes del centro y sur de México, en donde son conocidas con los nombres comunes de “xocoyotl”, “xocoyoli” o “chocoyul” (Pérez-Moreno *et al.*, 2008). Adicionalmente, diversas investigaciones han utilizado especies del género *Laccaria*, para su aplicación en la micorrización controlada de planta de vivero, debido a que se han registrado efectos benéficos en las plantas inoculadas, en comparación con las plantas no inoculadas en términos de crecimiento aéreo, radical y contenido nutrimental; por ejemplo, *Laccaria laccata* con *Pinus pinaster* (Pera y Parladé, 2005), *Laccaria bicolor* con *Pseudotsuga menziesii* (Parladé y Álvarez, 1993; Parladé *et al.*, 1997; Parladé *et al.*, 1999), *Pinus pinea* (Parladé *et al.*, 1997; Rincón *et al.*, 2001) y *Pinus pinaster* (Perrin *et al.*, 1994; Parladé *et al.*, 1997; Parladé *et al.*, 1999).

A pesar de la gran importancia de especies del género *Laccaria*, a nivel internacional y en México son pocos los estudios enfocados a la descripción anatómica de las ectomicorrizas de *Laccaria bicolor* y *L. proxima*. Estudios previos realizaron la descripción morfológica y anatómica de *Laccaria bicolor* (Santiago *et al.*, 2003) y *Laccaria proxima* (Agerer y Rambold, 2009); sin embargo, es necesario un estudio, comparativo entre las principales características que distinguen estas especies. Es probable que la escasez de trabajos enfocados a la descripción morfológica y anatómica de ectomicorrizas, se deba principalmente a los tiempos prolongados necesarios para obtener ectomicorrizas en estadios adultos. Por ejemplo, en nuestro caso se utilizaron ectomicorrizas de estadios maduros, los cuales se caracterizaron un año después de la inoculación.

### Descripción de esporomas

La caracterización e identificación de los esporomas ectomicorrizicos en campo es indispensable para una colecta adecuada, a continuación se describen las características distintivas de los esporomas de *Laccaria bicolor* y *L. proxima* (Cuadro 1). En total se utilizaron 30 esporomas de cada especie para efectuar su caracterización macro y micromorfológica.

En el Cuadro 1, se comparan las características distintivas entre *Laccaria proxima* y *L. bicolor* en función del material estudiado. Las principales características que sobresalen entre estas dos especies, es la mayor longitud en píleo y

## RESULTS AND DISCUSSION

As much *Laccaria laccata* as *L. proxima* have a great importance as edible species in diverse parts of the center and south of Mexico where are known with the common names of "xocoyotl", "xocoyoli" or "chocoyul" (Pérez-Moreno *et al.*, 2008). Additionally, diverse investigations have used species of the genus *Laccaria*, for their application in the controlled mycorrhization of nursery plant, because they have registered beneficent effects in the inoculated plants, in comparison with the plants not inoculated in terms of air growth, radical and contained nutrimental; for example, *Laccaria laccata* with *Pinus pinaster* (Pera and Parladé, 2005), *Laccaria bicolor* with *Pseudotsuga menziesii* (Parladé and Álvarez, 1993; Parladé *et al.*, 1997; Parladé *et al.*, 1999), *Pinus pinea* (Parladé *et al.*, 1997; Rincón *et al.*, 2001) and *Pinus pinaster* (Perrin *et al.*, 1994; Parladé *et al.*, 1997; Parladé *et al.*, 1999).

In spite of the great importance of species of the genus *Laccaria*, at international level and in Mexico there are few studies focused to anatomical description of ectomycorrhizas of *Laccaria bicolor* and *L. proxima*. Previous studies made the morphological and anatomical description of *Laccaria bicolor* (Santiago *et al.*, 2003) and *Laccaria proxima* (Agerer and Rambold, 2009); however, it is necessary a study, comparative between the main characteristic that distinguish these species. It is probable that the shortage of works focused to morphological and anatomical description of ectomycorrhizas, is due mainly at the necessary long times to obtain ectomycorrhizas in mature state. For example, in our case ectomycorrhizas of mature state were used, which were characterized one year after the inoculation.

### Sporocarps description

The characterization and identification of ectomycorrhizal sporocarps in field are indispensable for an appropriate collection, next the distinctive characteristics of sporocarps of *Laccaria bicolor* and *L. proxima* are described (Table 1). In total 30 sporocarps of each species was used to make its macro and micromorphological characterization.

In Table 1, the distinctive characteristics are compared between *Laccaria proxima* and *L. bicolor* in function of studied material. The main characteristics that outstand between these two species, are the biggest length in pileus



estípites de *Laccaria proxima* y la coloración violeta en la parte basal del estípites de *Laccaria bicolor*. Las características de las dos especies de *Laccaria* descritas en el Cuadro 1, coinciden con las descripciones realizadas por Mueller (1992), a excepción de la forma del estípites y espora (Cuadro 2). En cuanto a las esporas se podría decir que tienden a ser más globosas que elipsoides; pues la relación ancho-longitud es mínima de acuerdo a las mediciones de Mueller (1992).

and stipe of *Laccaria proxima* and purple coloration in the basal part of the stipe of *Laccaria bicolor*. The characteristics of two species of *Laccaria* described in Table 1, coincide with the descriptions carried out by Mueller (1992), to exception in the shape of the stipe and spore (Table 2). About the spores, they tend to be more spherical than ellipsoid; because the relationship width-length is minimum according to measurements of Mueller (1992).

**Cuadro 1. Comparación de las características diagnósticas de *Laccaria bicolor* y *L. proxima* en el material estudiado.**  
**Table 1. Comparison of the diagnostic characteristics of *Laccaria bicolor* and *L. proxima* in the studied material.**

Estructura	Características	<i>Laccaria bicolor</i>	<i>Laccaria proxima</i>
Píleo	Forma	Convexo	Plano
	Color	Vino	Vino
	Diámetro (mm)	8-20*	20-60*
Estípites	Forma	Cilíndrico	Cilíndrico
	Color	Vino y violeta en la parte basal*	Vino*
	Ancho (mm)	2.4-6.8	3.6-9.3
	Longitud (mm)	35-65*	20-80*
Láminas	Adherencia	Libres	Libres
	Color	Rosa	Rosa
Esporas	Forma	Globosa	Globosa
	Color	Café	Café
	Ornamentación	Espinosa	Nodulosa
	Diámetro (µm)	5.5	5.2

\*=principales características distintivas de cada especie.

A continuación se presenta la caracterización macro y micromorfológica realizada a las raíces cortas micorrizadas con *Laccaria bicolor* y *L. proxima* con *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*. Dichas especies de pino son nativas de México y de gran importancia forestal. En el caso de *Pinus patula*, aunque es una especie nativa de México en donde posee una distribución natural restringida, ha tenido mucho éxito en plantaciones a nivel internacional, tanto en áreas tropicales como en zonas templadas desde la década de 1940, incluyendo el sur de África, el subcontinente de la India, América del Sur y Australia (Gillespie, 1992).

***Laccaria bicolor*.** Raíces micorrizadas con ramificaciones en su mayoría dicotómicas (Figura 1c), y en menor abundancia ausente de 1-4.5 mm de longitud y 0.3 mm de diámetro, sin rizomorfos y superficie lisa (Figura 1e). Las puntas no ramificadas de jóvenes estaban estranguladas entre la parte más vieja y la más joven o rectas, se observó que en este estadio la base tiene una longitud apenas

Macro and micromorphological characterization carried out to short mycorrhizal roots with *Laccaria bicolor* and *L. proxima* with *Pinus patula* and *P. pseudostrobus* is hereafter shown. This pine species are native of Mexico and of great forest importance. In the case of *Pinus patula*, although it is a native species of Mexico where has a restrictive natural distribution, has been very successful in plantations at international level, as much in tropical areas as in temperate areas from the decade of 1940, including the south of Africa, the subcontinent of India, South America and Australia (Gillespie, 1992).

***Laccaria bicolor*.** Mycorrhizal roots with ramifications in their majority dichotomic (Figure 1c), and in smaller extent absence of 1-4.5 mm of length and 0.3 mm of diameter, without rhizomorphs and flat surface (Figure 1e). The not ramified tips of youth were strangled between the oldest part and the youngest or straight, it was observed that in this stage the base has a length hardly perceptible, its

**Cuadro 2. Descripción macro y micromorfológica de raíces cortas de *Laccaria bicolor* y *L. proxima*.**  
**Table 2. Macro and micromorphological description of short roots of *Laccaria bicolor* and *L. proxima*.**

Estructura	Característica	<i>L. bicolor</i>	<i>L. proxima</i>
Píleo	Forma	Convexo a plano y frecuentemente deprimido	Acampanado a convexo, llega a ser plano a levantado, algunas veces deprimido
	Color	Rosáceo como la carne fresca	Rojizo a marrón anaranjado
	Diámetro (mm)	8-70	15-70
Estípite	Forma	Subclavado o levemente bulboso	Subclavado, en ocasiones levemente bulboso
	Color	Rojo marrón oscuro	Rojo oscuro
	Ancho (mm)	SD	3-10
	Longitud (mm)	23 - 85	24-72
	Cutícula	Fibrosa	SD
Láminas	Adherencia	Distante o libre	Distante o libre
	Color	Ligeramente vináceo,	Rosáceo de la carne
Esporas	Forma	Subglobosa, ampliamente elipsoide, ocasionalmente globosa	Elipsoide
	Color	SD	SD
	Ornamentación	Equinulada	Equinulada
	Longitud (µm)	8-11	7-9
	Ancho (µm)	7-9	6-8

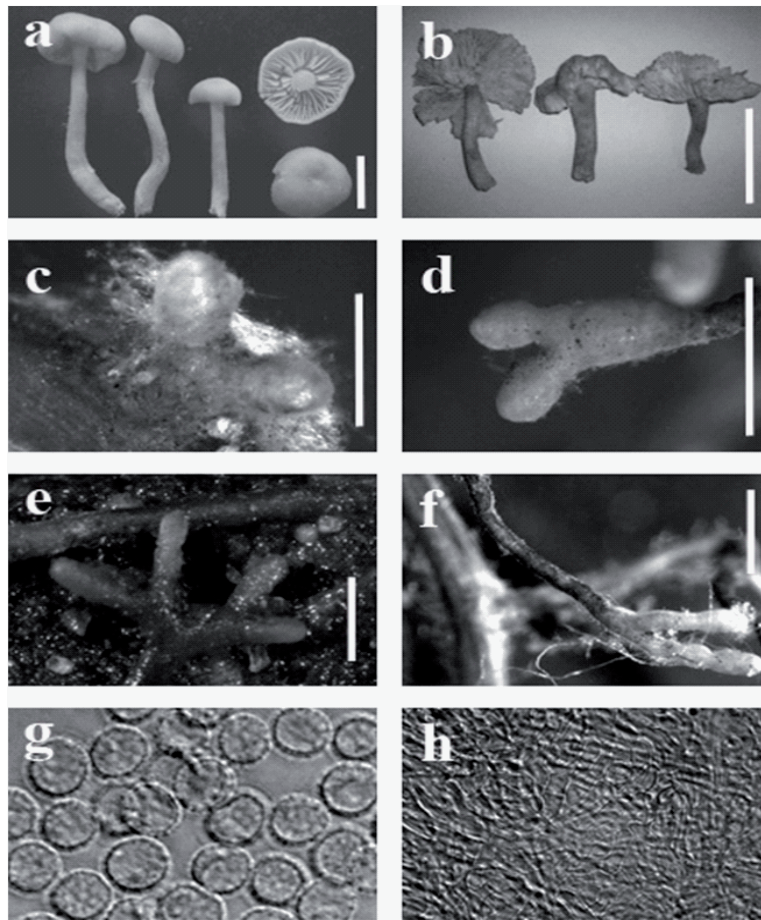
SD= sin dato.

perceptible, su coloración en las etapas iniciales fue café claro, tendiendo a naranja y con el tiempo se tornaron café rojizo con algunos puntos plateados; la base de la micorriza permaneció café oscuro en sus diferentes etapas. Las hifas de la capa externa del manto presentó un arreglo plectenquimatoso. Macromorfológicamente se apreciaron hifas gelatinosas de color café rojizo. Los primordios que se observaron en tubetes de *Laccaria bicolor* presentaron una coloración rosa claro y en la base tonos violáceos.

***Laccaria proxima*.** La micorriza presentó un tipo de ramificación en su mayoría ausente y en menor proporción dicotómica, con una longitud de 1 a 8 mm y 0.2 mm de diámetro, la morfología de las puntas no ramificadas fueron sinuosos o inclinados. De jóvenes presentaban una coloración café claro distribuido homogéneamente; por el contrario, con el tiempo se va diferenciado la base de un color café oscuro y la punta café claro, con la terminación cilíndrica (Figura 1f). En su etapa adulta la base es mayor que el ápice. El tipo de manto en la superficie era liso (Figura 1d), su anatomía fue plectenquimatoso (Figura 1h). Macromorfológicamente, se apreciaron estructuras alargadas de las hifas, color café y blanco en las puntas.

coloration in the initial stages was brown clear, tending to orange, and with the time became reddish brown with some silver points; the base of mycorrhiza remained dark coffee in its different stages. The hyphas of external layer of the mantle showed a plectenchymatic arrangement. Macromorphologically was appreciated gelatinous hyphas of reddish brown color. The primordium that were observed in tubes of *Laccaria bicolor* showed a clear pink coloration and in the base purple tones.

***Laccaria proxima*.** The mycorrhiza showed a ramification type in its majority absent and in smaller dichotomic proportion, with a length of 1 to 8 mm and 0.2 mm of diameter, the morphology of the non-ramified tips was serpentine or inclined. Of youth they showed a clear brown coloration distributed homogeneously; on contrast, with the time it is differentiated the base of a dark brown color and the clear brown tip, with the cylindrical termination (Figure 1f). In their adult stage the base is bigger than the apex. The mantle type in the surface was flat (Figure 1d), its anatomy was plectenchymatic (Figure 1h). Macromorphologically, lengthened structures of hyphas were appreciated, brown and white color in the tips.



**Figura 1.** *Laccaria bicolor* y *L. próxima*. a) esporoma de *Laccaria bicolor*; b) esporoma de *Laccaria próxima*; c) ramificación dicotómica de *Laccaria bicolor* con *Pinus patula*; d) acercamiento al morfotipo de *Laccaria próxima* con *Pinus pseudostrobus*; e) *Laccaria bicolor* viva con *Pinus patula*; f) punta cilíndrica de *Laccaria próxima* con *Pinus pseudostrobus*; g) esporas de *Laccaria bicolor*; y h) manto plectenquimatoso de *Laccaria bicolor*. Las barras blancas en los incisos corresponden a: 4 mm (a), 8 mm (b) y 1 mm (c, d, e y f).

**Figure 1.** *Laccaria bicolor* and *L. próxima*. a) sporocarp of *Laccaria bicolor*; b) sporocarp of *Laccaria próxima*; c) dichotomic ramification of *Laccaria bicolor* with *Pinus patula*; d) zoom to morphotype of *Laccaria próxima* with *Pinus pseudostrobus*; e) *Laccaria bicolor* live with *Pinus patula*; f) cylindrical tip of *Laccaria próxima* with *Pinus pseudostrobus*; g) spores of *Laccaria bicolor*; and h) plectenchymatic mantle of *Laccaria bicolor*. White bars on incien los section correspond to: 4 mm (a), 8 mm (b) and 1 mm (c, d, e y f).

En el Cuadro 3, se comparan las características de *Laccaria laccata* y *L. bicolor* descritas anteriormente. Cabe destacar que las raíces cortas de *Laccaria próxima* fueron de mayor longitud, a diferencia de *L. bicolor*, esta última se distinguió principalmente por su coloración del manto café anaranjado en su etapa adulta además que la mayor proporción de raíces cortas presentaron un tipo de ramificación dicotómica.

In Table 3, the previously described characteristics of *Laccaria laccata* and *L. bicolor* are compared. It is necessary to highlight that short roots of *Laccaria próxima* were of more length, contrary to *L. bicolor*, this last one was distinguished mainly by their mantle coloration of orange brown in their mature stage also that the biggest proportion of short roots showed a type of dichotomical ramification.



**Cuadro 3. Características entre *Laccaria bicolor* y *L. proxima* de raíces cortas micorrizadas en *Pinus patula* y *P. pseudostrobus* después de 397 días de la siembra e inoculación.**

**Table 3. Characteristic between *Laccaria bicolor* and *L. proxima* of short mycorrhizal roots in *Pinus patula* and *P. pseudostrobus* after 397 of planting and inoculation.**

Características	<i>Laccaria bicolor</i>	<i>Laccaria proxima</i>
Longitud (mm)	1-4.5*	1-8*
Diámetro (mm)	0.03	0.02
Proporción de longitud (base: ápice)	Similar	Mayor la base que el ápice
Tipo de ramificación	En su mayoría dicotómicas* y en menor proporción ausentes	Mayoría ausente* y en menor proporción dicotómica
Forma de las puntas no ramificadas	Recto* o moniliformes	Sinuosas* o inclinadas*
Textura del manto	Liso	Liso
Color del ápice (estadio juvenil)	Café claro	Café claro
Color del ápice (estadio maduro)	Café claro (cercano a naranja)* con algunos puntos plateados	Café claro y la base del ápice café oscuro
Anatomía en la capa externa del manto	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso

\*= principales características distintivas de cada especie.

En general, las características de *Laccaria bicolor* descritas en el presente trabajo coinciden con las realizadas por Santiago *et al.* (2003), a excepción de la longitud y diámetro de la micorriza (Cuadro 4). En el caso de *Laccaria proxima*, se observaron diferencias con respecto a las descritas por Agerer y Rambold (2009) en el tipo de color del ápice, diámetro de la micorriza y textura brillante del manto (Cuadro 4).

In general, the characteristics of *Laccaria bicolor* described in this work coincide with those carried out by Santiago *et al.* (2003), to exception of length and diameter of mycorrhiza (Table 4). In the case of *Laccaria proxima*, differences were observed with regard to those described by Agerer and Rambold (2009) in the type of color of the apex, diameter of the mycorrhiza and brilliant texture of the mantle (Table 4).

**Cuadro 4. Características micromorfológicas de las raíces cortas micorrizadas con *Laccaria* spp., reportados en estudios previos.**

**Table 4. Micromorphological characteristic of short mycorrhizal roots with *Laccaria* spp., reported in previous studies.**

Características	<i>Laccaria bicolor</i> (Santiago <i>et al.</i> , 2003) <sup>c</sup>	<i>Laccaria proxima</i> (Agerer y Rambold, 2009) <sup>a</sup>	<i>Laccaria laccata</i> (Mohan <i>et al.</i> , 1993) <sup>b</sup>
Longitud (mm)	2.5 - 3.6	8	5.5
Diámetro (mm)	0.4	0.6	0.6
Tipo de ramificación	Simple a dicotómica	Dicotómica	En su mayoría dicotómica y raramente mono, tri y tetrapodial
Forma de las puntas no ramificadas	SD	Sinuoso a inclinado	ligeramente tortuoso
Textura del manto	Granulosa y con brillo metálico	Liso y brillante	SD
Color del ápice (estadio juvenil)	Café clara	De blanco a café	Blanco
Color del ápice (estadio maduro)	Naranja café	Café rojizo	Naranja claro a marrón grisáceo
Anatomía en la capa externa del manto	Plectenquimatoso	Plectenquimatoso	Prosenquimatoso

<sup>a</sup>= descripción de *Laccaria proxima* en *Pinus* sp.; <sup>b</sup>= descripción de *Laccaria laccata* en *Pinus patula* en la India; <sup>c</sup>= descripción de *Laccaria bicolor* en *Pinus montezumae*; SD= sin dato.

En el Cuadro 3 y 4, se sintetizan las características distintivas para cada especie fúngica, siendo evidente la diferencia en longitud entre especies. En la etapa juvenil de las micorrizas, las diferencias entre especies son casi imperceptibles y la similitud se encontró en la anatomía de la capa externa del manto.

## CONCLUSIONES

Se logró con éxito la micorrización de *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus* con *Laccaria bicolor* y *Laccaria proxima*, mediante la inoculación con esporas.

Existieron diferencias morfológicas entre las raíces cortas de *Laccaria bicolor* y *Laccaria proxima*; aunque poco perceptibles en sus estadios jóvenes. Las características distintivas (longitud, diámetro, color, tipo de ramificación, forma de las puntas no ramificadas, textura y anatomía externa del manto de las micorrizas) entre *Laccaria bicolor* y *Laccaria proxima* son más notorias en su etapa adulta.

En términos generales las características micromorfológicas por especie de hongo fueron iguales en *Pinus patula* y *Pinus pseudostrobus*.

La descripción de los esporomas de *Laccaria bicolor* y *Laccaria proxima*, es fundamental debido a su amplio uso biotecnológico. La principal característica distintiva entre estas dos especies fue la diferencia en tamaño del píleo y estípite, así como la coloración violáceo intenso en la base del estípite de *Laccaria bicolor* de la cual carece *Laccaria proxima*.

## AGRADECIMIENTOS

La primera autora agradece el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada. Así como el proyecto SEMARNAT-CONACYT-2004-01-45: "Los hongos silvestres comestibles del Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y anexos", por el financiamiento otorgado. Al Dr. Jorge Valdez Carrasco, por su amable asesoramiento en la toma de fotografías.

In Tables 3 and 4, the distinctive characteristics are synthesized for each fungal species, being evident the difference in length between species. It is necessary to mention that in the juvenile stage of the mycorrhizas, the differences between species are almost imperceptible. As for main similarity it was found in the anatomy in the external layer of the mantle.

## CONCLUSIONS

It was achieved with success the mycorrhization of *Pinus patula* and *Pinus pseudostrobus* with *Laccaria bicolor* and *Laccaria proxima* by means of inoculation with spores.

Morphological differences existed between the short roots of *Laccaria bicolor* and *Laccaria proxima*; although not very perceptible in their young stages. The distinctive characteristics (length, diameter, color, ramification type, shapes of non-ramified tips, texture and external anatomy of mantle of the mycorrhizas) between *Laccaria bicolor* and *Laccaria proxima* are more notorious in its adult stage.

In general terms the micromorphological characteristic for mushroom species was same in *Pinus patula* and *Pinus pseudostrobus*.

The description of sporocarp of *Laccaria bicolor* and *Laccaria proxima* are fundamental due to their wide biotechnical use. The main distinctive characteristic between these two species was the difference in size of the pileus and stipe, as well as the intense purple coloration in the base of the stipe of *Laccaria bicolor* of which *Laccaria proxima* lacks.

*End of the English version*



## LITERATURA CITADA

Agarwal, P. and Sah, P. 2009. Ecological importance of ectomycorrhizae in world forest ecosystems. *Nature and Science* 7(2):107-116.

- Agerer, R. and Rambold, G. 2009. DEEMY. An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. München, Germany. URL: <http://www.deemy.de/>.
- Cairney, J. W. G. and Chambers, S. M. 1999. Ectomycorrhizae fungi: key genera in profile. Ed. Springer. Berlin. 369 p.
- Gillespie, A. J. R. 1992. *Pinus patula* Schiede and Deppe. *Patula pine*. SO-ITF-SM-54. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 404-409 pp.
- Honrubia, M.; Torres, P.; Díaz, G. y Cano, A. 1992. Manual para micorrizar plantas en viveros forestales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid, España. ICONA. 47 p.
- Largent, D. L. 1973. How to identify mushrooms to genus I: macroscopic features. Mad River Press Inc. Eureka, California. 86 p.
- Largent, D. L.; Johnson, D. and Watling, R. 1977. How to identify mushrooms to genus III: microscopic features. Mad River Press Inc. Eureka, California. 148 p.
- Mueller, G. M. 1992. Systematics of *Laccaria* (Agaricales) in the continental United States and Canada, with discussions on extralimital taxa and descriptions of extant types. Fieldiana: Botany, Chicago: Field Museum of Natural History. 158 p.
- Parladé, J. and Álvarez, I. F. 1993. Coinoculation of aseptically grown Douglas-fir with pairs of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 3:93-96.
- Parladé, J.; Álvarez, I. F. and Pera, J. 1999. Coinoculation of containerized Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) seedlings with the ectomycorrhizal fungi *Laccaria bicolor* and *Rhizopogon* spp. *Mycorrhiza*. 8:189-195.
- Parladé, J.; Pera, J. and Álvarez, I. F. 1997. La micorrización controlada del Douglas en el norte de España: primeros resultados en plantación. *Revue Forestière Française*. 49:163-173.
- Pera, J. y Parladé, J. 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrízicos en la producción de plantas destinadas a repoblaciones forestales: estado actual en España. *Investigación Agraria: Sistema y Recursos Forestales*. 14(3):419-433.
- Perea-Estrada, V. M.; Pérez-Moreno, J.; Villareal-Ruiz, L.; Trinidad-Santos, A.; Bauer, M. L. y Cetina-Alcalá, V. M. 2009. Humedad edáfica, nitrógeno y hongos ectomicorrízicos comestibles en el crecimiento de pino. *Rev. Fitotec. Mex.* 32(2):93-102.
- Pereira, G.; Herrera, J.; Machuca, A. y Sánchez, M. 2007. Efecto del pH sobre el crecimiento *in vitro* de hongos ectomicorrízicos recolectados de plantaciones de *Pinus radiata*. *Bosque*. 28(3):215-219.
- Pérez-Moreno, J. and Read, D. J. 2001a. Exploitation of pollen by mycorrhizal mycelial systems with special reference to nutrient recycling in boreal forests. *Proceedings of the Royal Society of London*. 268:1329-1335.
- Pérez-Moreno, J. and Read, D. J. 2001b. Nutrient transfer from soil nematodes to plants: A direct pathway provided by the mycorrhizal mycelial network. *Plant Cell Environ.* 24:1219-1226.
- Pérez-Moreno, J. y Read, D. J. 2004. Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivos que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*. 29(5):239-247.
- Pérez-Moreno, J.; Martínez-Reyes, M.; Yesca-Pérez, A.; Delgado-Alvarado, A. y Xoconostle-Cázares, B. 2008. Wild mushroom markets in central Mexico and a case study at Ozumba. *Econ. Bot.* 62(3):425-436.
- Perrin, R.; Pera, J. and Parladé, J. 1994. Réceptivité des sols forestiers à l'association ectomycorrhizienne. Application à la définition de la compétence écologique de souches sélectionnées. *Acta Botanica Gallica*. 141(4):541-545.
- Rincón, A.; Álvarez, I. F. and Pera, J. 2001. Inoculation of containerized *Pinus pinea* L. seedlings with seven ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza*. 11:265-271.
- Santiago-Martínez, G.; Estrada-Torres, A.; Varela, L. y Herrera, T. 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis *in vitro* de una cepa de *Laccaria bicolor*. *Agrociencia*. 37:575-584.
- Secretaría de Gobernación (SEGOB), 2010. Enciclopedia de los municipios del Estado de México. Municipio de Ozumba. Gobierno Federal. México. URL: <http://www.elocal.gob.mx/work/templates/enciclo/mexico/mpios/15068a.htm>.
- Smith, S. E. and Read, D. J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York, USA. 787 p.