SINTESIS MICORRICICA DE *LACTARIUS DELICIOSUS* FR. Y *PINUS SYLVESTRIS* L.

P. ROYO
M. FERNANDEZ TOIRAN
C. R. FISCHER
Dpto. de Investigación Forestal de Valonsadero
Apdo. 175. 42080 Soria (ESPAÑA)

RESUMEN

Se evalúa el crecimiento en diferentes medios de cultivo de las especies *Boletus edulis Bull.:* Fr., *Lactarius deliciosus* Fr. y *Suillus luteus* (L.:Fr.) Gray. Los resultados no permiten determinar el medio nutritivo óptimo para cada especie fúngica estudiada debido a la existencia de interacciones significativas entre los factores cepa y medio nutritivo. Se describen las micorrizas obtenidas en cultivo puro de *Lactarius deliciosus* Fr. y *Pinus sylvestris* L.

PALABRAS CLAVE: Ectomicorrizas
Pinus sylvestris
Lactarius deliciosus

INTRODUCCION

En la provincia de Soria (España), las masas de *Pinus sylvestris* L. se encuentran localizadas fundamentalmente en la llamada Comarca de Pinares, situada en la parte septentrional del Sistema Ibérico, comprende la vertiente Sur de la Sierra de Urbión y parte de la Sierra de la Umbría. Con una extensión aproximada de 57.000 ha, y situada entre los 1.000 y 2.000 m de altitud, se trata de una zona con una fuerte tradición forestal, donde todos los montes están ordenados para la producción de madera.

La explotación de los recursos micológicos de estos bosques es un hecho relativamente reciente pero que presenta una gran importancia económica y social. Según datos del Registro de Industrias Agrarias de la Junta de Castilla y León, existen siete empresas conserveras en la provincia que comercializan aproximadamente 4l7 t anuales de hongos procedentes exclusivamente de Soria. Entre las especies comercializadas destacan: *Boletus edulis* Bull.: Fr. y *B. pinophilus* Pilát & Dermek, con 290 t anuales y con un precio que oscila entre las 600-1.000 pta/kg; *Lactarius deliciosus Fr.,* 100 t anuales, con un precio que oscila entre 100-500 pta/kg (Fernández Toirán, 1994). Señalar que gran parte de las producciones recogidas en la provincia se distribuyen directamente o mediante intermediarios a industrias o mercados fuera de ésta, lo que hace que estas cifras sean muy superiores.

Recibido: 16-6-97
Aceptado para su publicación: 15-1-98

Además de la importancia económica, los hongos micorrícicos presentan un elevado interés ecológico, reflejando el carácter y condiciones de los ecosistemas forestales. Todas las actividades derivadas de la gestión forestal producen alteraciones en el suelo y en la masa arbórea que pueden repercutir en su supervivencia y fructificación. El empleo de planta micorrizada en el sector forestal reviste un notable interés desde el punto de vista tanto económico como de salvaguardar el equilibrio biológico de muchas áreas forestales. La posibilidad de producir especies micorrícicas de interés económico puede aumentar el interés de los propietarios privados por la reforestación, de esta forma podrían revalorizarse áreas marginales actualmente abandonadas. Por otra parte, en un momento en que la demanda de planta micorrizada con especies de interés comercial es alta, se hace imprescindible la caracterización de los principales tipos de micorrizas como base para un control de calidad de esta planta.

Esta extraordinaria importancia, tanto económica como ecológica, indujo el inicio de un proyecto cuyos objetivos son el seguimiento y cuantificación de la productividad micológica en masas forestales, así como la introducción de planta micorrizada con especies de interés comercial (proyecto INIA SC94-043-C3), donde se enmarca el trabajo que aquí se presenta.

En una primera fase se obtuvo una colección de cultivos miceliares de distintas especies para, posteriormente, llevar a cabo la síntesis de micorrizas, lo que permitió realizar su descripción anatómica y morfológica. Estudios similares han sido desarrollados por diversos autores (Poitou *et al.*, 1982, 1984; Meotto, Pellegrino, 1989; Zucherelli, 1988).

MATERIAL Y METODOS

Características morfológicas de las colonias y crecimiento en medio de cultivo

Para la obtención de cultivos puros se siguió la metodología propuesta por Molina, Palmer (1982). Los carpóforos de *Boletus edulis, Lactarius deliciosus* y *Suillus luteus* fueron recolectados en masas de *Pinus sylvestris* de la Comarca de Pinares. Los aislamientos se realizaron en placas Petri que contenían 20 ml Modified Melin Nokrans (MMN) (Marx, 1969) y se incubaron a 23º C en condiciones de oscuridad. De cada especie se evaluaron varias cepas: *Boletus edulis* (105, 130, 133, 158); *Lactarius deliciosus* (197, 198, 263, 274); *Suillus luteus* (139, 140.2, 140.5, 146, 179).

Con el objeto de seleccionar el medio nutritivo más adecuado para el cultivo de cada cepa se evaluaron cinco medios: Agar-Malta 4 p. 100 (Poitou, 1978), MMN (Marx, 1969), Oddoux-l (Poitou *et al.*, 1981), PDA (Ferri, 1985) y Raper (Raper, Raper, 1972). El diseño consistió en seis placas Petri por cada combinación cepa/medio nutritivo. En cada placa se midieron los diámetros de las colonias, con éstos se calculó el área de cada colonia. Para determinar el medio nutritivo óptimo los datos se sometieron a un análisis de varianza, previa normalización de los datos de las especies *Boletus edulis* y *Lactarius deliciosus* a través de la transformación logaritmo y raíz cuadrada, respectivamente. Para la comparación de medias se utilizó el test LSD ($P<0,05$). Se describen las características macroscópicas y microscópicas de las colonias de cada especie.

Síntesis de micorrizas en cultivo puro

Para la síntesis aséptica de ectomicorrizas se siguió el método desarrollado por Molina (1979, 1981) y Molina, Trappe (1982). Los inóculos de *Boletus edulis, Lactarius deliciosus* y *Suillus luteus* se obtuvieron a partir del margen de las colonias, que se transfirieron a tubos que contenían 7 ml de MMN líquido y se incubaron durante 30 días a 23º C. Las semillas *de Pinus sylvestris* se desinfectaron en superficie. Para ello se lavaron con agua corriente durante 24 h, se sumergieron durante 30 min en H_2O_2 al 30 p. 100 en agitación y, tras su lavado con agua estéril, se sembraron asépticamente en viales que contenían 3 ml de una solución de agar (l p. 100) y malta (l p. 100). Las semillas se incubaron a temperatura ambiente hasta su germinación.

La síntesis se realizó en tubos de vidrio (290x40 mm) que contenían un sustrato formado por 110 ml de vermiculita (tamaño partícula 2 mm) y 10 ml de turba (tamaño partícula 1 mm), humedecido con 70 ml de MMN líquido al que se le había modificado su composición reduciendo la cantidad de glucosa a 2,5 g/l. El conjunto fue autoclavado a 120º C durante 30 min.

La siembra e inoculación de los tubos fue simultánea. Las plantas se mantuvieron a una temperatura ambiente de 20-30º C y bajo un fotoperíodo de 16 h con una luminancia de 11.000 lux, la temperatura radical se mantuvo a 18º C. Pasados seis meses se extrajeron las plantas de los tubos de síntesis y se limpió el sistema radical sumergiéndolo en agua corriente, para posteriormente describir las características morfológicas de las micorrizas. Se realizan cortes transversales y longitudinales de éstas para describir el manto y la red de Hartig.

RESULTADOS

Características morfológicas de las colonias y crecimiento en medio de cultivo

Las siguientes descripciones corresponden al aspecto presentado por las colonias en medio MMN sólido:

Boletus edulis: El borde de las colonias varía entre circular irregular a circular regular. La forma de crecimiento es aérea, con una textura aterciopelada y ocasionalmente flocosa en el centro. El color del micelio es blanco, tomando con la edad tonos marrones claros en los bordes. Hifas de (2) 3-4 (5) µm de diámetro, hialinas, presentan fíbulas.

Lactarius deliciosus: El borde de la colonia varía de circular irregular a irregular. Textura funiculada, algunas veces flocosa o plumosa en el centro. El color del micelio varía entre amarillo pálido a amarillo rojizo, con matices verdosos; márgenes hialinos y cordones funiculares naranja pálido o blanquecinos. Hifas de 3-4 µm de diámetro, hialinas, no se observan fíbulas.

Suillus luteus: Colonias con margen circular irregular, con textura algodonosa o aterciopelada. El micelio, de color blanco al principio, con la edad adquiere un aspecto zonado, con tonalidades que oscilan entre el gris-rosáceo al marrón-grisáceo. En ocasiones, por debajo de la colonia, aparecen ligeras hendiduras en el agar. Un total de cuatro de las cinco cepas evaluadas presentan exudados de color marrón oscuro. Hifas de 2-3 (5) µm, hialinas, sin fíbulas.

A continuación, se presentan los valores de crecimiento de las distintas cepas en los distintos medios de cultivo evaluados. Los resultados del análisis de varianza indican que no es posible determinar el medio nutritivo óptimo para cada especie debido a la existencia de interacciones significativas entre los factores cepa y medio nutritivo. Por ello, sólo se ha podido definir el medio más adecuado para el cultivo de cada una de las cepas aisladas, cuyo resultados se pueden apreciar en las Figuras 1, 2 y 3.

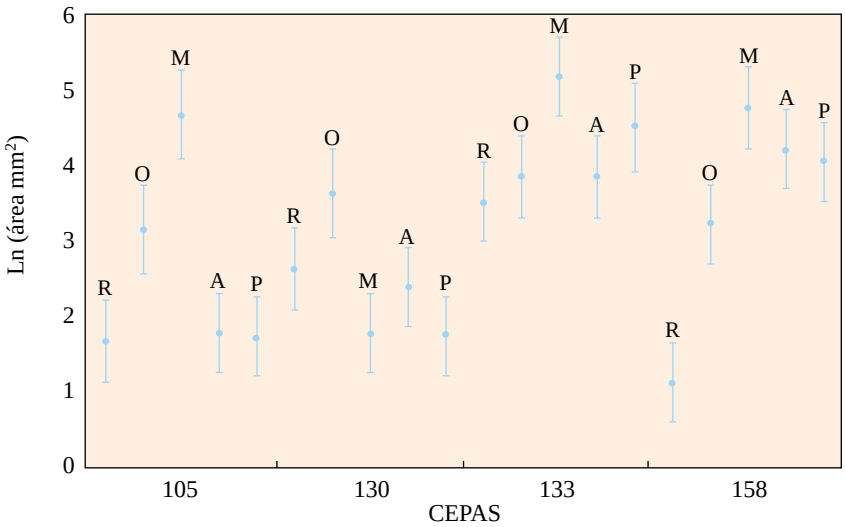

Fig. 1.—Valor medio e intervalo de confianza (P<0,05) para las distintas cepas de *Boletus edulis*
Mean value and confidence limit (P<0.05) for each strain of Boletus edulis

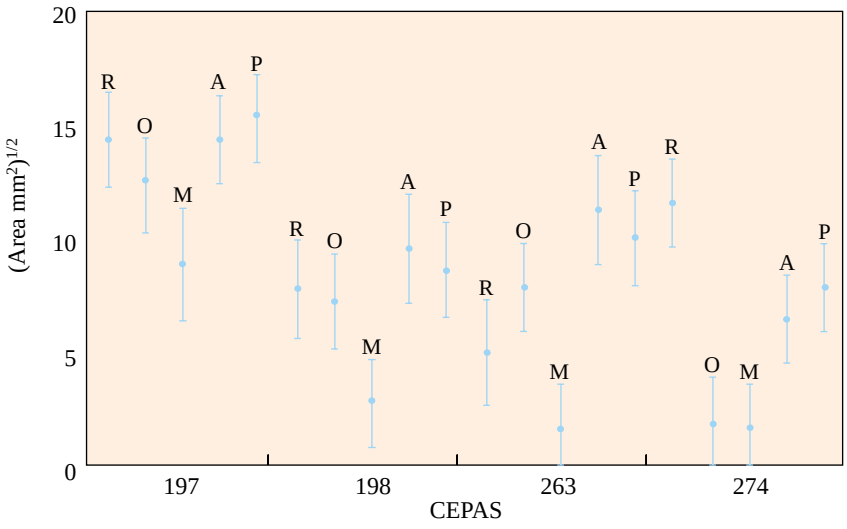

Fig. 2.—Valor medio e intervalo de confianza (P<0,05) para las distintas cepas de *Lactarius deliciosus*
Mean value and confidence limit (P<0.05) for each strain of Lactarius deliciosus

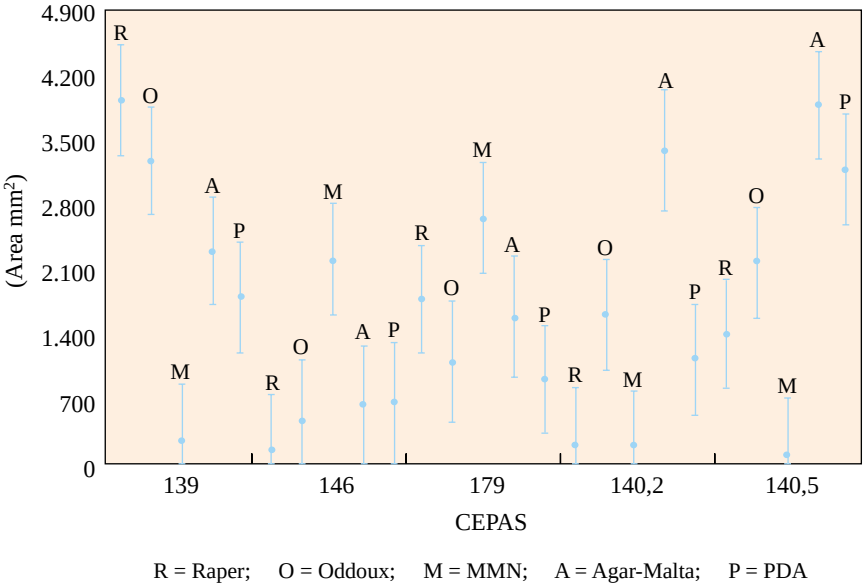

Fig. 3.—Valor medio e intervalo de confianza (P<0,05) para las distintas cepas de *Suillus luteus*
Mean value and confidence limit (P<0.05) for each strain of Suillus luteus

Síntesis de micorrizas en cultivo puro

De las tres especies evaluadas, sólo *Lactarius deliciosus* demostró su capacidad de formar ectomicorrizas en condiciones de cultivo puro. Estas presentan las siguientes características morfológicas: ectomicorrizas monopodiales, bifurcadas o coraloides, de 2 a 4 mm de longitud, distribuidas por todo el sistema radical, pero especialmente abundantes en la parte superior (Fig. 4). Rodeando a la micorriza aparece una capa de aspecto gelatinoso formada por una densa red de hifas hialinas. Los rizomorfos, de color marrón rojizo y 120 µm de diámetro son poco frecuentes y están formados por hifas apretadas similares a las del manto, de 10 µm de diámetro (Fig. 7). El manto es plectenquimatoso, de superficie suave, reticulada en algunas ocasiones, de color pardo amarillento, a veces con tonalidades verdosas (Fig. 5), destaca la presencia de hifas laticíferas (2-3 µm de diámetro) y gotas de látex de color rojizo (Fig. 6). La red de Hartig penetra hasta la tercera capa de células del córtex radical.

Con ninguna de las cepas de *Boletus edulis* o *Suillus luteus* se ha conseguido la síntesis de micorrizas. Las dos especies han presentado un crecimiento miceliar escaso en el sustrato. En el caso de *Boletus edulis*, al observar las raíces terciarias, en algunas se apreciaban formas monopodiales, engrosadas en el ápice o bifurcadas, de color blanco grisáceo, pero al observar cortes transversales de éstas no se observaba red de Hartig.

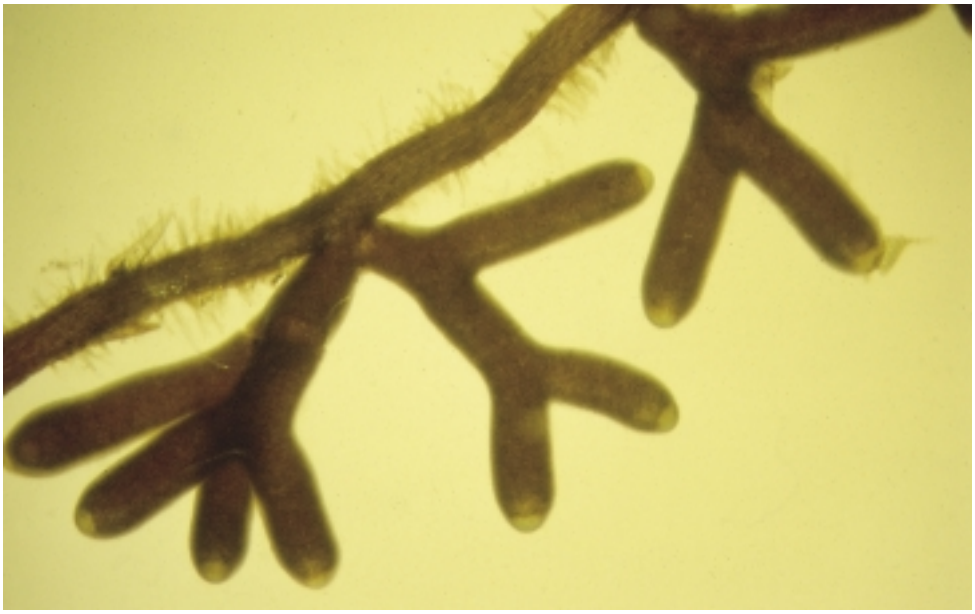

Fig. 4.—Ectomicorrizas de *Lactarius deliciosus*
Ectomycorrhizae of Lactarius deliciosus

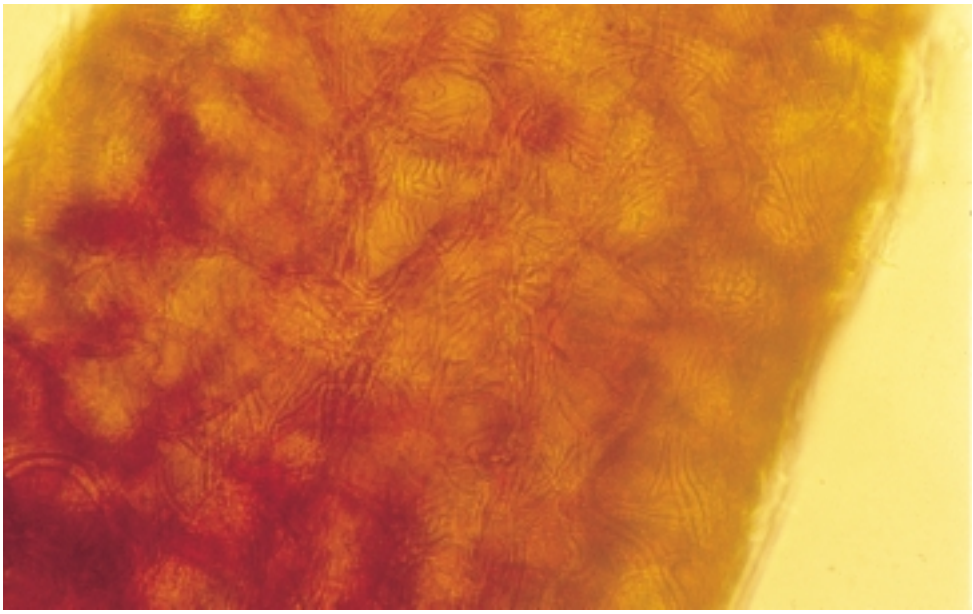

Fig. 5.—Aspecto del manto de una micorriza de *Lactarius deliciosus*
Surface view of mycorrhizal mantle of Lactarius deliciosus

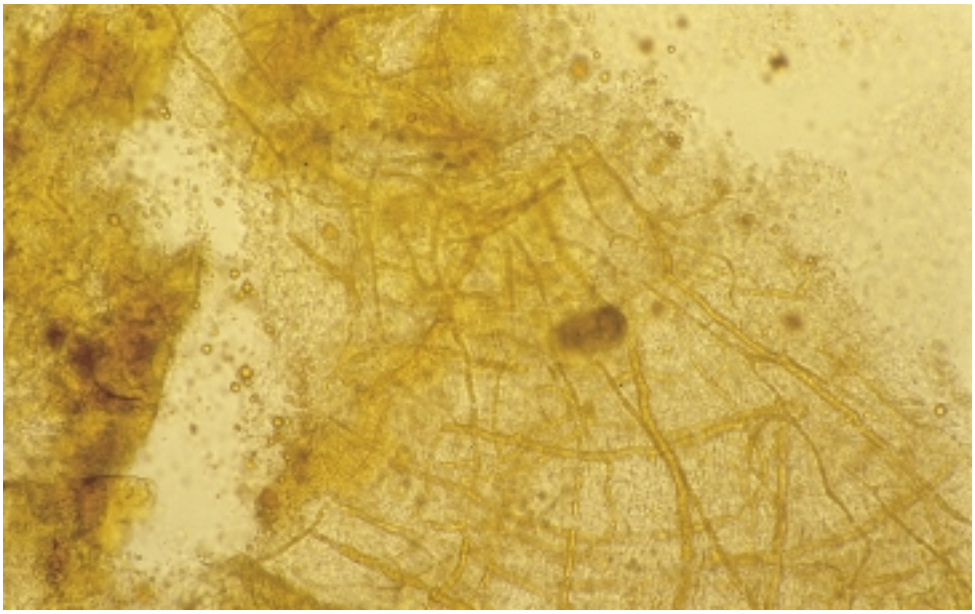

Fig. 6.—Sección transversal. Hifas laticíferas y gotas de látex
Cross-section. Laticiferous hyphae and drops of latex

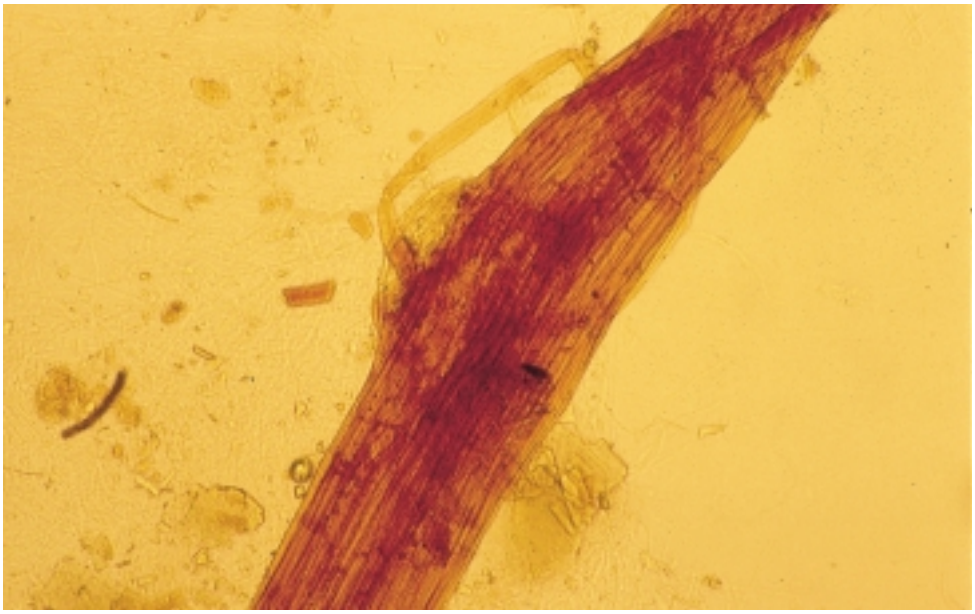

Fig. 7.—Rizomorfo de *Lactarius deliciosus*
Rhizomorph of Lactarius deliciosus

CONCLUSIONES

No es posible determinar el medio nutritivo óptimo para cada especie fúngica estudiada al existir interacciones significativas entre los factores cepa y medio nutritivo. No obstante, la mayoría de las cepas crecen adecuadamente en los medios de cultivo utilizados como Agar-Malta 4 p. 100 o MMN. Oort (1981) estudió los requerimientos nutricionales de distintas especies *de Lactarius*, concluyendo que las especies pertenecientes a la sección Dapetes crecen mejor en Baf (Oort, 1981).

El método de síntesis utilizado permite la formación de ectomicorrizas bien desarrolladas de *Lactarius deliciosus* y *Pinus sylvestris*. Ninguna de las cepas de *Boletus edulis* y *Suillus luteus* formó ectomicorrizas con *Pinus sylvestris*, a pesar de tratarse de especies micorrícicas citadas para esta especie forestal (Trappe, 1962). La imposibilidad de obtener micorrizas en cultivo puro con la especie *Boletus edulis* ha sido recogida por otros autores (Pachlewski, Pachlewska, 1974; Pera, 1992). Sugiere este último autor que la falta de resultados positivos puede estar relacionada con el crecimiento extremadamente lento de estos hongos o con la edad de la planta; sin embargo, Zuccherelli (1988) obtiene planta de *Castanea sativa* y de diferentes especies de *Quercus* micorrizadas con esta especie fúngica. La síntesis micorrícica de *Suillus luteus* ha sido obtenida por distintos autores (Torres, Honrubia, 1993; Pera, 1992). Los resultados negativos obtenidos por nosotros con esta especie indican que las condiciones experimentales no eran las adecuadas.

La falta de formación de micorrizas en cultivo puro puede estar relacionada con la edad de la planta (Pera, 1992; Torres, Honrubia, 1993), el lento crecimiento de los hongos, los niveles de fósforo, nitrógeno y glucosa del medio (Gibson, Deacon, 1990) o el contenido hídrico del sustrato (Stenström, 1991). Según Torres, Honrubia (1993), es muy importante para conseguir la síntesis de ectomicorrizas conocer la fase de desarrollo idóneo en el que las plantas deben ser inoculadas, de tal forma que, para que la síntesis se lleve a cabo, las plántulas deben poseer o estar desarrollando raíces secundarias que son las que serán colonizadas por el hongo simbionte. En nuestro caso, el trasplante y la inoculación se realizó al mismo tiempo, por lo que tal vez la plántula no había desarrollado suficientemente su sistema radicular. Con los resultados obtenidos y con las referencias citadas anteriormente, deducimos que se trata de especies poco infectivas pero cuya síntesis micorrícica es posible modificando las condiciones experimentales.

SUMMARY

Ectomycorrhizal synthesis of *Lactarius deliciosus* Fr. *and Pinus sylvestris* L.

Several nutritive media were tested to select the optimal medium for the mycelial growth of *Boletus edulis* Bull.: Fr., *Lactarius deliciosus* Fr., y *Suillus luteus* (L.: Fr.) Gray. The results show that it is not possible to determine the optimal nutritive medium for each species, because of the existence of a significant interaction between the strain factor and the nutritive medium. Ectomycorrhizae of *Lactarius deliciosus* Fr. y *Pinus sylvestris* L. are described.

KEY WORDS: Ectomycorrhizae
Pinus sylvestris
Lactarius deliciosus

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

FERNANDEZ TOIRAN M., 1994. Estudio de la producción micológica actual en la Comarca de Pinares de Soria y ensayo de técnicas de mejora de la misma. Tesis Doctoral. Univ. de Santiago.

FERRI F., 1985. I funghi. Edagricole, Bologna, 398 pp.

GIBSON F., DEACON J.W., 1990. Establishment of ectomycorrhizas in aseptic culture: effects of glucosa, nitrogen and phosphorus in relation to successions. Mycol. Res., 94, 166-172.

MARX D.H., 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root patogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology, 59, 153-163.

MEOTTO F., PELLEGRINO S., 1989. Comportamento in campo di querce e castagni micorrizati con Boletus edulis Bull.

MOLINA R., 1979. Pure culture synthesis and host specificity of red alder mycorrhizae. Can. J. Bot., 57, 1223-1228.

MOLINA R., 1981. Ectomycorrhizal specificity in the genus Alnus. Can. J. Bot., 59, 325-334.

MOLINA R., PALMER J.G., 1982. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. En: Schenck, N.C. (ed.). Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Am. Phytopath. Soc., 115-129.

MOLINA R., TRAPPE J.M., 1982. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. Forest Sci., 28, 423-457.

OORT A.J.P. 1981. Nutritional requeriments of *Lactarius* species and cultural characters in relation to taxonomy. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

PACHLEWSKI R., PACHLEWSKA J., 1974. Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of pine (*Pinus sylvestris* L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure cultures on agar. Forest Rescarch Institute Warsaw, Poland.

PERA J., 1992. Selección de hongos ectomicorrícicos de *Pinus pinaster* Ait. para su aplicación en reforestación. Tesis doctoral. Univ. Autónoma de Barcelona. 196 pp.

POITOU N., 1978. Cultures mycéliennes de champignons mycorhiziens et techniques d'incorporation aux plantes-hôtes. Mushroom Science, X, 891-901.

POITOU N., MAMOUN M., DELMAS J., 1981. Cultures myceliennes de champignos mycorhiziens en milieu optimal. Mushroom Science XI. 885-892 pp.

POITOU N., MAMOUN M., DELMAS J., 1982. Quelques résultats obtenus concernat la mycorhization de plantes-hôtes par les champignons mycorhiziens comestibles. Les Coloques de l'INRA, n.º 13:295-300 pp.

POITOU N., MAMOUN M., DUCAMP M., DELMAS J., 1984. Après le bolet granuleux, le lactaire delicieux obtenu en fructification au champ à partir de plants mycorhizés. Rev. Horticole, 244: pp. 65-68.

RAPER C.A., RAPER J.R., 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus.* Mycologia, 64.

STENSTRÖM E., 1991. The effect of flooding on the formation of ectomycorrhizas in *Pinus sylvestris* seedlings. Plant Soil, 131, pp. 247-250.

TORRES P., HONRUBIA M., 1993. Ectomicorrizas de *Pinus halepensis* Miller. Actas Congreso Forestal Español. Lourizán. Tomo III. pp. 421-426.

TRAPPE J.M., 1962. Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. Bot. Rev., 28: 538-606.

ZUCCHERELLI G., 1988. Prime esperience sulla produzione di piante forestali micorrizate con *Boletus edulis.* Edagricole. Monti e Boschi, n.º 3 : 11-14.