

INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES CULTURALES EN EL CRECIMIENTO DE DIFERENTES HONGOS ECTOMICORRÍCICOS

Elena Fernández-Miranda Cagigal¹, Pablo Alvarado García¹, Manuel Alonso-Graña López², Juan Majada Guijo² y Abelardo Casares Sánchez¹

¹ Unidad Fisiología Vegetal, Dpto. de Biología de Organismos y Sistemas, Universidad de Oviedo. C/ Catedrático Rodrigo Uría s/n. 33006-OVIEDO (España)

² SERIDA, Sección Forestal, Finca Experimental "La Mata". 33820-GRADO (Asturias, España)

Resumen

Se estudió la capacidad de crecimiento de 12 especies de hongos ectomicorrícicos en cuatro medios de cultivo (MMN, MFM, BAF y MEPA) que difieren considerablemente en contenido mineral, fuentes de carbono y vitaminas. Los resultados obtenidos permiten determinar la existencia de diferencias significativas en el crecimiento de diferentes especies de hongos ectomicorrícicos en cultivo puro.

Palabras clave: *Hongos ectomicorrícicos, Cultivo puro, MMN, BAF, MEPA, MFM*

INTRODUCCIÓN

En Asturias existen numerosas zonas con suelos pobres o degradados debido a su acidez, incendios o actividades mineras e industriales. Por problemas de impacto ambiental y al amparo de los planes regionales de reforestación sería necesario revegetar con especies autóctonas. Esta recuperación tendría un doble beneficio, por un lado integrar las zonas alteradas en el paisaje natural y por otro aumentaría la disponibilidad de madera para las industrias del sector.

El suelo de estas zonas suele tener una serie de problemas, que hace difícil e incluso imposible su recuperación forestal cuando se realizan técnicas convencionales. Así, problemas de retención de agua, escasez de nutrientes y falta de los microorganismos beneficiosos que colaboran activamente en la nutrición de los vegetales, se presentan habitualmente en estos suelos.

Desde hace años ha quedado establecida la dependencia que tienen los árboles de los hongos

micorrícicos sobre todo cuando las características edáficas, principalmente la fertilidad, son adversas. Entre los beneficios que producen los hongos ectomicorrícicos en las plantas se pueden destacar los siguientes: facilitan la nutrición y toma de agua, mejoran la tolerancia frente al estrés hídrico y salino, favorecen el crecimiento y desarrollo, e incluso, pueden actuar contra los agentes patógenos (HONRUBIA *et al.*, 1992).

Las micorrizas no adquieren su importancia únicamente por el efecto sobre el simbiote arbóreo sino también desde un punto de vista ecológico, ya que los hongos micorrícicos establecen complejas relaciones con otros microorganismos (INGHAM & MOLINA, 1991) y pueden afectar al establecimiento, estructura, composición y dinámica de las comunidades vegetales (MOLINA *et al.*, 1991).

En los últimos años se han desarrollado mejoras tecnológicas encaminadas hacia la producción de planta de calidad y uno de los puntos clave es la mejora de los sistemas radicales de los

plantones. En este aspecto, un buen sistema radical micorrizado permite a los plantones sobrevivir y desarrollarse mejor tras el trasplante.

La micorrización controlada es una herramienta que puede ser de gran ayuda en el establecimiento de repoblaciones, sobre todo en zonas degradadas, debido a la mejora morfológica y fisiológica que puede generar en las plantas (DUÑABEITIA et al., 2004). Numerosos trabajos han demostrado que si se revegetan zonas degradadas con árboles que posean hongos micorrícicos seleccionados se consiguen tasas de supervivencia muy superiores a las alcanzadas con árboles sin micorrizar.

Cuando se pretende seleccionar hongos ectomicorrícicos, un carácter importante es la posibilidad de aislarlos y producirlos en grandes cantidades. En algunas especies, la producción de inóculo miceliar presenta problemas de escaso crecimiento o heterogeneidad de desarrollo entre los subcultivos. Además es preciso manejar grandes volúmenes de inóculo en condiciones asépticas que garanticen su supervivencia tanto en el laboratorio como posteriormente en el vivero.

La diferente respuesta de crecimiento que tienen algunos aislamientos fúngicos en el medio de cultivo plantea serios problemas, ya que es preciso coordinar la producción de planta y hongo en cantidades suficientes, para poder abordar la micorrización controlada en un vivero industrial.

El objetivo de este trabajo fue optimizar el crecimiento de varias especies fúngicas, empleando cuatro medios de cultivo, MMN, MFM, BAF y MEPA, que difieren en contenido mineral, fuentes de carbono y vitaminas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material fúngico

Se utilizaron aislamientos de 12 especies de hongos ectomicorrícicos: *Astraeus hygrometricus*, *Hebeloma crustuliniforme*, *Lactarius deliciosus*, *L. quieticolor*, *L. blumii*, *Leccinum scabrum*, *Paxilus filamentosus*, *Paxilus involutus*, *Rhizopogon luteolus*, *Scleroderma citrinum*, *Suillus luteus* y *Xerocomus badius*. Estos aislamientos se mantenían en oscuridad a 20°C en el medio MMN.

Efecto del medio de cultivo en la producción de inóculo fúngico

Se valoró la capacidad de crecimiento de cada especie fúngica en los medios de cultivo MMN (MARX, 1969), BAF (MOSER, 1960), MFM (DANELL, 1994) y MEPA (BORMANN et al., 1999). Para ello se tomó, con ayuda de un sacabocados de 1 cm de diámetro, círculos del borde de la colonia de los 12 aislamientos y se colocaron en placas Petri con los 4 medios de cultivo. Por cada especie fúngica y medio de ensayo, se sembraron 16 placas que se incubaron a 20°C en oscuridad y se evaluaron a los 60 días.

El crecimiento en medio sólido se cuantificó mediante análisis de imágenes digitalizadas de los distintos medios de cultivo. Tradicionalmente se mide el diámetro de la colonia fúngica para calcular su área de crecimiento. Este sistema no es muy exacto ya que las colonias pueden presentar un crecimiento irregular. Para resolver este problema se diseñó una rutina específica en el programa informático de análisis de imágenes Leica Q550 QUANTIMENT que permitió evaluar de forma automática, independientemente de su simetría, el área de crecimiento de cada colonia a partir de imágenes digitalizadas (Figura 1)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El medio de cultivo más utilizado es el MMN pero existen numerosas especies que presentan problemas a la hora de ser cultivadas en él, dificultando o imposibilitando su uso como inóculo. Estudios preliminares realizados por MOLINA & PALMER (1982), defienden que estos problemas, probablemente se deban a la utilización de un medio de cultivo inadecuado, que no aporte los requerimientos nutritivos que suelen obtener de su hospedante en la simbiosis, hecho que se ha demostrado en el caso de *Cantharellus*, al conseguir su aislamiento en cultivo puro utilizando un medio nutritivo más complejo, el MFM (DANELL, 1994). De acuerdo con estos estudios, nuestros resultados determinan que el crecimiento de las doce especies fúngicas estudiadas se ve muy afectado por el medio de cultivo empleado.

En nuestro caso, *P. filamentosus* fue la especie que presentó un mayor crecimiento, seguida

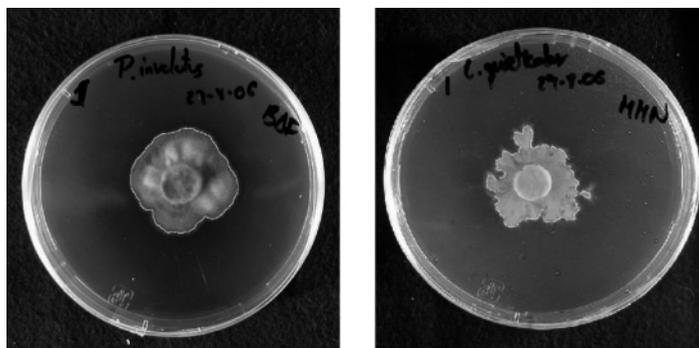


Figura 1. Fotografías de colonias cuantificadas por análisis de imagen Leica Q550 Quantimet. A: *Paxillus involutus* y B: *Lactarius quieticolor*. La flecha indica el contorno de la colonia analizado por el programa y utilizado para la cuantificación

de *R. luteolus* y *S. luteus* (Tabla 1). Los dos primeros, presentan un patrón de crecimiento muy similar, siendo los medios BAF, MMN y MFM los que presentaron un mejor crecimiento, no presentando diferencias significativas entre ellos. En el caso de *S. luteus* el medio BAF es el mejor, seguido de MMN y MFM, que no presentan diferencias significativas entre ellos pero sí con BAF. En el medio MEPA las colonias de

estos tres hongos desarrollaron la menor superficie, presentando diferencias significativas con el resto de medios.

Del resto de Boletales estudiados, también descritos como especies pioneras, *L. scabrum* y *P. involutus*, son las dos únicas especies que presentan un mejor crecimiento en el medio MFM. En el caso de *L. scabrum* no se observan diferencias significativas entre los medios MFM, MMN

Especie	Medio de Cultivo			
	BAF	MEPA	MFM	MMN
AGARICALES				
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	4,81 ± 0,60 ac	0,96 ± 0,01 b	3,61 ± 0,57 c	5,46 ± 0,13 a
RUSSULALES				
<i>Lactarius blumii</i>	3,50 ± 0,73 a	5,93 ± 1,49 a	3,28 ± 1,96 a	2,03 ± 0,30 a
<i>Lactarius deliciosus</i>	16,54 ± 1,05 a	21,11 ± 1,36 b	4,34 ± 0,33 c	7,94 ± 0,40 d
<i>Lactarius quieticolor</i>	13,83 ± 1,44 a	11,44 ± 0,79 a	4,81 ± 0,72 b	6,53 ± 0,38 b
BOLETALES				
<i>Leccimun scabrum</i>	11,94 ± 1,56 a	4,28 ± 0,72 b	12,06 ± 0,89 a	11,66 ± 1,10 a
<i>Paxilus filamentosus</i>	58,36 ± 0,77 a	34,12 ± 9,55 b	53,75 ± 1,65 a	57,68 ± 0,97 a
<i>Paxilus involutus</i>	7,11 ± 0,84 ac	5,22 ± 1,29 a	15,51 ± 4,43 b	14,62 ± 1,82 bc
<i>Rhizopon luteolus</i>	46,06 ± 0,83 a	18,17 ± 3,16 b	42,90 ± 2,18 a	45,16 ± 1,35 a
<i>Suillus luteus</i>	46,87 ± 0,52 a	19,97 ± 1,90 b	28,73 ± 3,13 c	30,46 ± 1,57 c
<i>Xerocomus badius</i>	1,86 ± 0,18 a	1,13 ± 0,10 a	19,94 ± 0,99 b	22,45 ± 1,38 c
GASTERALES				
<i>Astraeus hygrometricus</i>	30,42 ± 1,10 a	8,39 ± 2,04 b	17,84 ± 1,23 c	10,72 ± 0,27 b
<i>Scleroderma citrinum</i>	29,88 ± 2,17 a	5,10 ± 0,45 b	18,99 ± 1,28 c	15,29 ± 0,94 c

Tabla 1. Medias ± error estándar de las áreas de las colonias fúngicas expresada en cm², tras 60 días de crecimiento en los cuatro medios diferentes. Letras iguales dentro de cada fila indican que no hay diferencia significativas entre medios de cultivo para cada especie fúngica a un nivel P=0,05. (Test de mínimas diferencias significativas, DMS)

y BAF, y si con MEPA donde se ve el menor crecimiento. De manera similar *P. involutus* muestra el menor crecimiento en el medio MEPA, sin presentar diferencias significativas con el medio BAF, y si con los medios MFM y MMN que no presentan diferencias significativas entre ellos. En el caso de *X. badius* el mejor crecimiento se presenta en el medio MMN, seguido del medio MFM presentando diferencias significativas entre ellos, obteniendo un escaso crecimiento en los medios BAF y MEPA sin presentar diferencias significativas entre ellos pero sí con el crecimiento en los medios MMN y MFM.

Los Boletales estudiados han sido descritos por numerosos autores como organismos pioneros (MASON et al., 1983; GRZYTA et al., 1997), que aparecen en las primeras etapas de la repoblación natural forestal. Son hongos que demandan menos glucosa que los de etapas avanzadas (DEACON et al., 1983) y tienen una alta capacidad competitiva con otros hongos micorrícicos para tomar nutrientes en suelos pobres en materia orgánica.

Dentro del género *Lactarius*, las tres especies ensayadas, mostraron un comportamiento similar, ya que sus mejores crecimientos se consiguieron en los medios más ricos, MEPA y BAF, hecho que coincide con trabajos realizados con especies de este género (SÁNCHEZ et al., 2000).

Los hongos del género *Lactarius* se han descrito como característicos de etapas tardías de la sucesión, necesitando suelos ricos con abundante materia orgánica. Por lo tanto, no es de extrañar que sus mayores crecimientos se registren en los dos medios con mayor cantidad de materia orgánica fácilmente disponible. *L. deliciosus* presenta diferencias significativas de crecimiento en todos los medios; *L. quieticolor* presenta diferencias significativas entre los medios más ricos (BAF y MEPA) y los pobres (MMN y MFM) y *L. blumii* no presenta diferencias significativas en el crecimiento en los cuatro medios, lo que podría indicar que esta especie tiene menores requerimientos nutricionales.

En los dos representantes del orden Gasterales, también se observa un patrón homogéneo de crecimiento, siendo el mejor medio en ambos casos el BAF, seguido del MFM y MMN. Por el contrario, en el medio MEPA las colonias de estos dos hongos desarrollaron la menor superficie, existiendo en el caso de *A. hygrome-*

tricus diferencias significativas con BAF y MFM pero no con MMN, y en el caso de *S. citrinum* presenta diferencias con el resto de los medios.

H. crustuliniforme, está considerada como característica de etapas primarias de la sucesión (DIGHTON et al., 1986) presentando el mejor crecimiento en los medios MMN y BAF sin presentar diferencias significativas entre ellos. Esta especie, al igual que *X. badius*, prácticamente no creció en el medio MEPA.

Teniendo en cuenta el crecimiento de los doce hongos en los cuatro medios de cultivo, y a modo de conclusión podemos observar que los medios MMN y MFM tienen unas características nutricionales parecidas, ya que 8 de los 12 hongos no mostraron diferencias significativas. Podemos decir de manera global que el medio BAF es el mejor, ya que es adecuado para nueve especies. Por el contrario el medio MEPA es el peor ya que en él nueve especies tienen un escaso desarrollo. Los resultados obtenidos en este medio son lógicos si tenemos en cuenta que la mayoría de los hongos utilizados están destinados a recuperar zonas degradadas, y por lo tanto abundan las especies pioneras poco exigentes en nutrientes.

Este trabajo pone de manifiesto la necesidad de hacer este tipo de ensayos para optimizar la producción de inóculo fúngico cuando manejan distintas especies de hongos ectomicorrícicos. Los datos obtenidos reflejan la importancia que tiene en un determinado hongo, la elección del medio de cultivo para obtener la mayor cantidad posible de inóculo

BIBLIOGRAFÍA

- BORMANTEN C.; BAIER D.; HÖRR I.; RAPS C.; BERGER J.; JUNG G. & SCHAWRZ, H.; 1999. Characterization of a Novel, Antifungal, Chitin-Binding Protein from *Streptomyces tendae* Tü901 that interferes with growth polarity. *J. Bact.* 181: 7421-7429.
- DANELL, E.; 1994. *Cantharellus cibarius*: Mycorrhiza formation and Ecology. *Acta Univ. Ups., Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology* 35.
- DEACON, J.W.; DONALDSON, S.J. & LAST, F.T.; 1983. Sequences and interactions of

- mycorrhizal fungi on birch. *Plant Soil*. 71: 257-262.
- DIGHTON, J.; POSKITT, J.M. & HOWARD, D.M.; 1986. Changes in occurrence of basidiomycete fruit bodies during forest stand development with specific reference to mycorrhizal species. *Trans. Brit. Mycolo. Soc.* 87: 163-171.
- DUÑABEITIA, M.K.; HORMILLA, S.; GARCÍA PLAZAOLA, J I.; TXARTERINA, K.; ARTECHE, U. & BECERRIL, J.M.; 2004. Differential responses of three fungal species to environmental factors and their role in the mycorrhization of *Pinus radiata* D. Don. *Mycorrhiza* 14: 11-18.
- GRYTA, H.; DEBAUD, J.C.; EFFOSSE, A., GAY, G. & MARMEISSE, R.; 1997. Fine scale structure of populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in coastal sand dune forest ecosystems. *Mol. Ecol.* 6: 353-364.
- HONRUBIA, M.; TORRES, P.; DIAZ, G. Y CANO, A. 1992. *Manual para micorrizar plantas en viveros forestales*. Instituto Nacional para la Conservación de la Naturaleza, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. LUDECME VIII. Monografías 54. Murcia.
- INGHAM, E.R. & MOLINA, R.; 1991. Interactions between mycorrhizal fungi, rhizosphere organisms, and plants. In: P. Barbosa (ed.), *Microorganisms, Plants and Herbivores*: 169-197. John Wiley and Sons. NY.
- MARX, D.H.; 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.
- MASON, P.A.; WILSON, J.; LAST, F.T. & WALKER, C.; 1983. The concept of succession in relation with the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soil. *Plant Soil* 71: 247-256.
- MOLINA, R. & PALMER, J.G.; 1982. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: N.C. Schenck (ed.), *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*: 115-129. Am. Phytopath. Soc. St. Paul, MN.
- MOLINA, R.; MASSICHOTEL, H. & TRAPPE, J.M.; 1991. Ecological role of specificity phenomena in ectomycorrhizal plant communities: Potentials for interplant linkages and guild development. In: *Abstract of the Third European Symposium on Mycorrhizas. Mycorrhizas in Ecosystems- Structure and Function*. August. Sheffield, England.
- MOSER, M.; 1960. *Die Gattung Phlegmacium. Die Pilze Mitteleuropas* 4. J. Bad Heilbrunn.
- SÁNCHEZ, F.; HONRUBIA, M. Y TORRES, P.; 2000. Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: 127-134.