TEST DE MICORRIZACION PARA PINOS PRODUCTORES DE NISCALOS.

ANALISIS CUALITATIVO

Enric Grácia *,**, Oscar Martínez **, Miquel Barceló ** y Frederic Ximeno ***

* Departament de Biologia Vegetal. Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona. Avda Diagonal, 645. 08028-BARCELONA (España)

** MICOLOGIA FORESTAL & APLICADA. Saragossa, 51. 08006-BARCELONA (España)

*** Rosselló, 224, 5-A. 08008-BARCELONA (España)

Resumen

Definimos un test (CUG) con el objeto de identificar los hongos micorrízicos presentes en las raíces de pinos productores de níscalos. Partimos de fracciones de raíces para conseguir el aislado de los hongos micorrízicos. Dichos aislados se repican a placas de tres divisiones con tres medios distintos que permiten la valoración de características fisiológicas (degradación de gelatina y urea) y macromorfológicas (color de las colonias). Estudiamos la efectividad del test sobre 8 aislados de raíces y carpóforos de níscalos, así como sobre 13 cepas de hongos micorrízicos de nuestra colección.

El test permite diferenciar las cepas del género *Lactarius* , entre las que se encuentran las productoras de níscalos (*L. deliciosus* , *L. sanguifluus* y *L. vinosus*), en un período de 3 semanas. Destacamos la sensibilidad de los aislados del género *Lactarius* a las pruebas de gelatina y urea, cuantificables a las 24 horas de su inicio.

Concluímos que el CUG es un test rápido y sensitivo, útil para el análisis cualitativo de los planteles micorrizados que se comercializan para la producción de níscalos.

P.C.: Ectomicorrizas, *Lactarius* , test

Abstract

We define a test (CUG) trying to identify the mycorrhizal fungi present on roots of pines that produce saffron milk caps. We starts from roots tips to obtain an isolated of mycorrhizal fungi. The isolates are used for plates with 3-sections filled with 3 different media. The test allows the evaluation of physiological (gelatin and urea degradation) and macromorphological (colour of colonies) characters. We study the effectivity of the test upon 8 isolations from roots and basidiocarps of saffron milk caps, and 13 strains of mycorrhizal fungi from our collection.

The test allows the differentiation of *Lactarius* strains, including those that produce saffron milk caps (*L. deliciosus* , *L. sanguifluus* y *L. vinosus*), in a period of 3 weeks. We points about the sensibility of the *Lactarius* isolates to the gelatine and urea test, that give

FORESTAL MICOLOGIA & APLICADA

positive reactions after 24 hours.

We concluded that CUG is a rapid and sensitive screening test. Could be useful, before distribution, for the qualitative analysis of mycorrhizal seedlings for the production of saffron milk caps.

K. W. Ectomycorrhiza, *Lactarius* , test

INTRODUCCION

En el año 1990 se inició en España la comercialización del pino productor de níscalos, en base a los trabajos de uno de los autores (GRACIA, 1991). Los controles de calidad requerían análisis anatómicos rutinarios que implicaban una dedicación excesiva. HUTCHISON (1990,1991) introdujo los análisis sistemáticos de caracteres bioquímicos y fisiológicos para establecer relaciones taxonómicas en hongos ectomicorrízicos.

La presente investigación se ha dirigido a elaborar un test de laboratorio fiable y rápido que nos permita un control efectivo del producto antes de ponerlo a la venta. Para ello hemos seleccionado la degradación de gelatina y la urea como pruebas rápidas para *Lactarius* , acompañándolas de una prueba de coloración de la colonia.

MATERIALES Y METODOS

+ **Recolección**. Las muestras de raíces micorrizadas se separaron del cepellón de pinos micorrizados y se conservaron en viales con agua destilada estéril, en refrigerador a 4°C hasta su utilización. La permanencia en ella nunca fué superior a 3 días.

+ **Aislamientos**. Las cepas que se aislaron tanto de raíces micorrizadas como de carpóforos se cultivaron sobre medio MAI, modificación del agar Melin-Norkrans modificado (MARX, 1969): Glucosa 5.0 gr; extracto de malta 2.0 g; extracto de levadura 1.0 g; fosfato potásico monobásico 500 mg; fosfato amónico monobásico 250 mg; sulfato magnésico 150 mg, cloruro cálcico 50 mg; cloruro sódico 25 mg; cloruro férrico (solución 1%) 1.2 ml; sulfato de zinc (solución 0.1 %) 1.0 ml; sulfato de manganeso (solución 0.5 %) 1.0 ml; agua destilada 900 ml; agar 15.0 g. Después del autoclavado a 115°C durante 30 minutos, se añadió por inyección a través de filtro de 0.45 μm, 25 mm diámetro: Cloruro de tetraciclina 2.0 mg; sulfato de estreptomicina 100 mg; benomilo (solución 40 % Benlate, Du Pont Co.)10 ml; dicloran (solución 25 % Fubotran, DowElanco) 10 ml; oxamilo (Vydate L, Du Pont) 0.4 ml; agua destilada 100 ml. Benlate y dicloran se prepararon según WORRALL (1991). El oxamilo se empleó como acaricida (OORT, 1981)

Todos los cultivos estan depositados en la colección de Micologia Forestal & Aplicada, Barcelona.

A partir del interior de basidiocarpos se aislaron asépticamente porciones de tejido, que se sembraron sobre placas de MAI.

Fragmentos de raiz con extremos en forma de Y, los puntos micorrízicos, se disponen en una placa de Petri con agua destilada. Bajo la lupa binocular se aislan los fragmentos más característicos y se eliminan los restos minerales u orgánicos manifiestos. Los fragmentos se esterilizaron en superficie por inmersión en hipoclorito sódico al 1 % durante un minuto. Los restos de desinfectante se eliminaron con 5 lavados en agua destilada estéril. Con la ayuda de un bisturí flameado se escindieron a lo largo las raíces y se procedió a su siembra por triplicado en una placa con 12 ml de MAI.

Opcionalmente, los aislados se repicaron sobre MAI para asegurar la eliminación de

FORESTAL MICOLOGIA & APLICADA

contaminantes, principalmente bacterias.

+ Material de colección

El material de colección, 13 aislamientos, provienen exclusivamente de basidiocarpos.

+ Test de micorrización

El test se compone de tres pruebas distintas que se llevan a término en placas de Petri de 100 mm, con tres divisiones. Cada división presenta un medio de cultivo distinto. Se empleó 6 ml para la prueba de gelatina (MGL), y 7 ml para la de urea (MUR) y la de crecimiento (MCR). Los tres medios carecen de benomilo, dicloran y oxamilo. Las placas se inocularon con un disco de 5 mm procedente de una misma placa de aislamiento. Las placas se cultivaron en oscuridad, a temperatura de laboratorio, 18 °C, durante 35 días.

+ Prueba de la gelatina

El medio MGL se basa en HUTCHISON (1990) según la modificación de EGGER (1986). La formulación es parecida al MAI, pero sustituyendo la glucosa (1.0 g), eliminando el fosfato amónico monobásico y sustituyendo el agar por 120 g de gelatina. Se esterilizó a 110 °C durante 25 minutos (SKERMAN, 1967).

Se considera una reacción positiva cuando existe licuefacción de la gelatina alrededor o bajo la colonia. Se valoró según su diámetro: Menor de 15 mm (+), entre 15 mm y 30 mm (+ +) y superior a 30 mm (+ + +).

+ Prueba de la urea

Se basa en HUTCHISON (1990). El MUR difiere del MAI en la ausencia de fosfato amónico monobásico y en la presencia de 12 mg de rojo fenol. En el postesterilizado, conjuntamente con los antibióticos, se inyectó 20 g de urea. El color del medio debe ser amarillo dorado, en caso contrario se inyectaron 2-3 gotas de acido clorhídrico concentrado hasta el viraje.

La valoración se basa en los cambios de color del rojo fenol, indicador de pH. Empleamos como referencia la tabla de identificación de colores de Henderson et al. (1969). Consideramos significativos: (I), cambio de color del disco de repicado, desde el amarillo original (straw, 50) al azafrán (saffron, 49) que no se difunde al agar circundante; (+), viraje del agar hacia el color del disco, de anaranjado (orange, 48) a albaricoque (apricot, 47); (+ +), agar de escarlata pálido (scarlet, 43) a rojo frambuesa (red, 42); (+ + +), agar de púrpura (purple, 40) a rosáceo (rose, 39). Todas las mediciones se realizaron disponiendo las placas en contacto sobre un fondo blanco. Conjuntamente con la ultima medición (día 21) se valoró el diámetro de la colonia.

+ Prueba del color de la colonia

El medio de crecimiento (MCR) empleado fue el BAF modificado (HUTCHISON, 1991). Respecto al MAI se diferencia: glucosa (30.0 g), peptona (2.0 g) que substituye al extracto de malta; sulfato magnésico (500 mg); cloruro cálcico (100 mg), ausencia de cloruro sódico; cloruro férrico (solución 1%) 1.0 ml. Las valoraciones se realizaron el día 21 después de la siembra.

RESULTADOS

Se analizaron 21 cepas correspondientes a 14 especies de basidiomicetes. Para cada una de ellas se valoró su actividad gelatinásica y ureásica (1 medida semanal durante 3 semanas), así como su tasa de crecimiento en MUR y MCR (1 medida a las 3 semanas). Los resultados estan expuestos en la tabla 1.

FORESTAL MICOLOGIA & APLICADA

DISCUSION

La reacción positiva de la gelatina, su licuefacción, se debe a la producción por parte del hongo de una gelatinasa que descompone la gelatina en sus aminoácidos constituyentes. Para incentivar esta reacción, se elimina el fosfato amónico monobásico del medio. Según los datos aportados, 7 de las 14 especies analizadas producen gelatinasas (24 sobre 96 especies en HUTCHISON, 1990). De ellas sólo las especies de *Lactarius* muestran licuefaccion en la primera semana. De hecho, y sólo en las especies de *Lactarius*, puede observarse el hundimiento del disco de agar en el medio de gelatina en las 24 horas posteriores a la siembra

A las 24 horas de la siembra sobre MUR se comprobó que sólo en el caso de *Lactarius* existía un cambio del pH en los discos de agar. Esta sensibilidad coincide con el posterior desarrollo de la prueba: en el caso de las cepas estudiadas, las de *Lactarius* mostraron la progresión más acentuada. Esta variación de pH, que sugiere la escisión de urea a amonio y anhódrido carbónico, no coincide con su posterior utilización por parte de la colonia: Ninguna de las especies de *Lactarius* analizadas muestran crecimiento en MUR. El aumento de pH resultante se refleja en el cambio de color del indicador, rojo fenol, que pasa de amarillo dorado (ph 6.8-6.9) a rojo o rosa (ph>8.2). Debido a que la urea se emplea como fuente de nitrógeno, el medio de cultivo carece de fosfato amónico monobásico.

De entre las especies analizadas, *Hebeloma edurum*, *Laccaria laccata* y *Suillus bellinji*, muestran crecimiento de micelio en MUR, mientras únicamente *Laccaria laccata* asocia θste crecimiento con una reacción negativa a la ureasa. Este dato no coincide con HUTCHISON (1990) que señala que todas las especies del género *Laccaria* estudiadas dan una reacción positiva a las ureasas.

Sobre el medio MCR todas las especies de *Lactarius* analizadas mostraron un color de colonia próximo al anaranjado pálido, a menudo con estrφas verdosas que coinciden con tubos laticíferos. HUTCHISON (1991) presenta los resultados de los análisis de distintos caracteres fisiológicos, macro y micromorfológicos de 96 especies de hongos ectomicorrízicos americanos. Si tomamos como base sus datos respecto a las reacciones gelatina (+), ureasa (+) y crecimiento en MUR (-), sólo hallamos 10 especies que manifiesten los tres resultados conjuntamente. De ellas sólo el género *Lactarius* presenta la coloración de micelio observada en las muestras españolas.

HUTCHISON (1990) indica para algunas especies americanas de *Lactarius deliciosus* dos tipos de reacciones al test de la urea: Una reacción positiva asociada a una ausencia de crecimiento en este medio y una reacción negativa con crecimiento presente. En θste ·ltimo caso, no manifestado en las especies españolas, la prueba de la gelatina y la coloración de la colonia permite la separación con el resto de las especies.

Según los datos aportados en el presente trabajo concluimos que el test CUG permite la identificación del género *Lactarius* en un plazo de 3 semanas. Consideramos significativo el comportamiento de los representantes del gθnero *Lactarius* en las primeras 24-36 horas de análisis. Destacamos el valor taxonómico de dicha sensibilidad, no representada en los análisis absolutos a 3-5 semanas que se realizaban hasta el momento. Debido a· las caracterφsticas innovadoras del presente test, ampliable al análisis de cualquier micorriza del gθnero *Lactarius*, se ha tramitado la solicitud de patente antes de su publicación.

CONCLUSIONES

1) En todas las muestras analizadas pertenecientes al género *Lactarius*, se observó

FORESTAL MICOLOGIA & APLICADA

licuefacción de la gelatina a las 24 horas. Esta reacción no se observó en las demás especies estudiadas.

2) Todos los aislados pertenecientes al género *Lactarius* mostraron una reacción positiva a las 24 horas sobre el MUR. Esta reacción no se observó en las demás especies.

3) La prueba de la coloración de la colonia es efectiva para la separación de las especies dudosas.

4) Complementando nuestros datos con los aparecidos en la bibliografía internacional sobre un total de 102 especies únicamente aquellas pertenecientes al género *Lactarius* coinciden con nuestros resultados.

5) El test CUG es válido para la identificación del micosimbionte en pinos micorrizados para la producción de níscalos.

BIBLIOGRAFIA

EGGER, K.N. (1986). Substrate hydrolysis patterns of post-fire ascomycetes (Pezizales). *Mycologia* 78(5): 771-780.

GRACIA, E. (1991). *Patente de invención P-9102778: " Técnica para la producción de inóculo de hongos filamentosos".*

HENDERSON, D.M., ORTON, P.O. & WATLING, R. (1969). *British Fungus Flora Agarics and Boleti: Introduction*. Royal Botanic Garden. Edinburgh.

HUTCHISON, L.J. (1990). Studies on the systematics of ectomycorrhizal fungi in axenic culture. II. The enzymatic degradation of selected carbon and nitrogen compounds. *Can. J. Bot.* 68: 1522- 1530.

HUTCHISON, L.J. (1991). Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* 42: 387-504.

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 pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59: 153-163.

OORT, A.J.P. (1981). Nutritional requirements of *Lactarius* species, and cultural characters in relation to taxonomy. *Ver. K. Neder. Akad. Wet.* 76, 95 pp. North-Holland Publishing Company. Amsterdam.The Netherlands.

SKERMAN, V.D.B. (1967). *A guide to the identification of the Genera of Bacteria*. 303 pp. Williams & Wilkins Company. Baltimore. USA.

WORRALL, J.J. (1991). Media for selective isolation of Hymenomycetes. *Mycologia* 83 (3): 296-302.

TABLA 1. RESULTADOS TEST CUG

ESPECIE	MGE-A 07	MGE-A 14	MGE-A 21	MUR-A 07	MUR-A 14	MUR-A 21	MUR-C	MCR-C
Amanita ovoidea								
201	-	+	+ +	-			-	11
Hebeloma edurum								
102	-	-	-	(I)	+ +	+ +	24	22
Laccaria laccata								
s238	-	-	-	(I)	-	-	36	32
Lactarius deliciosus								
101	+	+ +	+ +	(I)	(I)	+	-	14
200	+ +	+ +	+ +	+	+ + +	+ + +	-	8
202	+ +	+ + +	+ + +	+ +	+ + +	+ + +	-	26
204	+	+	+ +	(I)	+	+ / + +	-	15
206	+ +	+ +	+ + +	+ + +		+ + +	+ + + -	17
Lactarius sanguifluus								
002	+	+ + +	+ + +	+ +	+ + +	+ + +	-	18
Lactarius tesquorum								
200	+	+ +	+ + +	(I)	(I)/ +	+	-	30
Lactarius vinosus								
202	+ +	+ + +	+ + +	+ + +		+ + +	+ + + -	6
Pisolithus arhizus								
101	-	-	-	-	-	-	-	26
Rhizopogon roseolus								
101	-	-	+	-	-	-	-	39
200	-	-	+	-	-	-	-	32
Rhizopogon vulgaris								
200	-	-	-	(I)	+	+	-	43
Suillus bellini								
103	-	-	-	(I)	+	+ +	32	31
Suillus granulatus								
200	-	-	+	(I)	+	+ / + +	-	28
Suillus luteus								
200	-	-	-	(I)	+	+ / + +	-	44
201	-	-	-	-	-	-	-	27
Suillus variegatus								
200	-	-	-	-		-	-	24
201	-	-	-	-	-	-	-	22

MGE-A: Actividad gelatinásica. MUR-A: Actividad ureásica. MUR-C: Crecimiento en MUR (mm Ø)
MCR-C: Crecimiento en MCR (mm Ø)

FORESTAL MICOLOGIA & APLICADA