

## Estudio de la variabilidad intraespecífica de un hongo ectomicorrícico de *Castanea* sp.: *Boletus fragans* Vitt.\*

A. RODRÍGUEZ, F. J. FERNÁNDEZ DE ANA MAGÁN & R. J. RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ

Centro de Investigacións Forestais de Lourizán. Sección de Fitopatología  
Apdo. Correos 127. 36080 Pontevedra (España)

### Resumen

RODRÍGUEZ, A., FERNÁNDEZ DE ANA MAGÁN, F.J. & RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, R.J. (1992). Estudio de la variabilidad intraespecífica de un hongo ectomicorrícico de *Castanea* sp.: *Boletus fragans* Vitt. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 3: 67-76

Se trata de conocer la variabilidad de *Boletus fragans* Vitt. basándose en cuatro aislamientos de este hongo obtenidos en un micotopo inoculado artificialmente. Para ello se utilizaron cuatro medios de cultivo diferentes como factores que nos permitirán medir la variabilidad intraespecífica. La finalidad de este trabajo es conseguir las cepas de más vitalidad y definir las condiciones nutritivas más adecuadas para su cultivo *in vitro*. Además se realiza una minuciosa descripción, a nivel macroscópico, de las colonias de cada uno de los aislamientos en los cuatro medios de cultivo empleados, así como una descripción del micelio de este hongo a nivel microscópico.

Palabras clave: Ectomicorriza, *Boletus fragans*, Fungi, variabilidad intraespecífica, *Castanea* sp.

### Abstract

RODRÍGUEZ, A., FERNÁNDEZ DE ANA MAGÁN, F.J. & RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, R.J. (1992). A study of the intraspecific variability of an ectomycorrhizae fungus in *Castanea* sp.: *Boletus fragans* Vitt. *Nova Acta Científica Compostelana (Biología)*, 3: 67-76

An understanding of the variability of *Boletus fragans* Vitt. is sought based on four isolations of said fungus obtained from an artificially inoculated mycotopo. Four different means of culture were used as factors that would allow us to measure the intraspecific variability. The object of this project is to find the strains with more vitality and define the best nutritive conditions for each *in vitro* culture. A macroscopic description is also made of the colonies of each one of the four means of culture used as well as a description of the mycelium of this fungus on a microscopic level.

Key words: Ectomycorrhizae, *Boletus fragans*, Fungi, intraspecific variability, *Castanea* sp.

### INTRODUCCION

*Boletus fragans* Vitt. es un basidiomiceto que, en Galicia, forma ectomicorrizas de forma natural con el castaño (*Castanea* sp.) y el roble (*Quercus* sp.), GONZÁLEZ PALMOU (1986). Presenta la particularidad de producir carpóforos comestibles de gran tamaño y fructificar a finales de verano, características éstas que hacen de él un buen candidato para ser utilizado como agente fúngico en la formación de micorrizas en castaño. Sin embargo, presenta el inconveniente

de crecer despacio en los medios de cultivo, caracter que, por el momento, limita su utilización en los programas de micorrización a gran escala de *Castanea* sp. Este hongo ha sido ya utilizado para la micorrización de «soutos», FERNÁNDEZ DE ANA MAGÁN & RODRÍGUEZ (1989), del que se obtuvieron resultados con la micetación del mismo al cabo de siete meses de su inoculación en el campo.

Muchos autores han propuesto una gran cantidad de medios adecuados para el cultivo de hongos ectomicorrízicos; todos ellos se basan en

\*Trabajo presentado al III Congreso Luso-Galaico de Micología, 1989. Vila Real (Portugal)

la variación de las fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas, etc. MODESS (1941), MELIN & RAMADAS (1954), PALMER & HACSKAYLO (1970), MARX (1981). Los resultados son muchas veces confusos, y la variación existente es difícil de determinar si se debe a la variabilidad genética o simplemente a factores extrínsecos, como pueden ser los causados por las impurezas de los constituyentes.

Dado que nuestro objetivo se centra en la consecución de mejores resultados con estos hongos de crecimiento lento, y siendo la variabilidad intraespecífica una posible causa, intentamos obtener las cepas más adecuadas para cada caso concreto. En la bibliografía encontramos una gran cantidad de trabajos referentes a hongos muy dispares. Trabajando con tres cepas de *Boletus edulis* Bull. ex Fr. y dos de *Suillus granulatus* (L. ex Fr.) Kuntze y después de 60 días de cultivo en distintos medios, PORTOI (1978) determina una fuerte variabilidad tanto de crecimiento como de morfología. Sin embargo, MARX (1981) observa que la tasa de crecimiento en medio MMN no está en relación con el potencial infeccioso de los aislamientos de *Pisolithus tinctorius*. Más tarde MARX & KENNEY (1982), hacen una relación de los caracteres que debería reunir un buen hongo micorrízico y señalan la importancia que supone el utilizar varios aislamientos que provengan de distintos árboles y de distintas regiones geográficas.

GRENTE & VROT (1984) subrayan la importancia de la utilización de micorrizas en la lucha contra las enfermedades de los árboles y destacan la utilización de varias cepas aisladas a partir, sobre todo, de *Boletus* sp. y *Hebeloma* sp. que presentan una fuerte acción inhibitoria frente al crecimiento de *Phytophthora* sp. CHEVALIER (1985) y THIVOLLE-CAZAT (1987), señalan la importancia de seleccionar lo antes posible cepas de hongos que presenten un amplio espectro de huéspedes así como una gran adaptabilidad a las condiciones donde van a ser implantadas. Los resultados obtenidos por SAMSON & FORTIN (1986) demuestran variaciones intraespecíficas y sugieren una gran variabilidad genética de la actividad fisiológica trabajando con ectomicorrizas de *Larix laricina*. En trabajos más recientes con *Boletus edulis* Bull. ex Fr., ZUCCHERELLI (1988) pone de manifiesto el distinto comportamiento

de las seis cepas empleadas de este hongo, destacando otra especificidad que muchos autores insinuaban con anterioridad: la existente entre el árbol y el hongo.

## MATERIALES Y METODOS

Han sido utilizados para este ensayo cuatro aislamientos de carpóforos de *B. fragans* Vitt. recogidos en un «souto» de castaños (*Castanea x híbrida*) de 12 años de edad en Bora (Pontevedra), en el SW de Galicia (UTM 29TNG349982), con las características que se resumen en la Tabla I.

TABLA I. Fecha de recogida de los carpóforos

Número aislamiento	Fecha recogida	Huésped
1001	14-10-87	Castanea X
1004	16-09-88	«
1006	14-10-88	«
1007	14-10-88	«

Los aislamientos, realizados por el método MOLINA & PALMER (1982), fueron obtenidos a partir de carpóforos sanos y limpios, manteniéndose en MMN (MARX, 1969), con un pH de 5,5. Los cultivos puros están depositados en la colección del Centro de Investigaciones Forestais de Lourizán (Pontevedra).

Los medios de cultivo utilizados con sus correspondientes pH fueron los siguientes:

Raper (Raper & Raper, 1972), con un pH de 6,5.  
MMN con pH de 5,5.  
PDA, con pH de 5,6.  
Agar Malta 4%, con pH 5.

Todos los pH fueron corregidos con HCl o NaOH antes de la esterilización. Para el estudio de crecimiento del hongo se utilizaron placas Petri de 8,5 cm de diámetro que contenían 20 ml de medio cada una.

Con anterioridad al ensayo, cada aislamiento se repicó al medio de cultivo sobre el que sería sembrado. Una vez crecidos, las placas fueron inoculadas con discos de 6 mm de diámetro recogidos en el borde de las colonias de 45 días

de edad, e incubadas a 22 grados en oscuridad. De cada aislamiento y medio se realizaron como mínimo tres repeticiones. A cada placa se le trazó un diámetro y cada siete días se tomaron dos medidas opuestas del diámetro de la colonia, en mm, hasta un total de doce. Para cada diámetro medido se calculó la velocidad media de crecimiento ( $V_m$ ) entre los días 14 y 70. Las razones así obtenidas se procesaron con un análisis de varianza GLM (SAS Institute 1982) y las «diferencias honestamente significativas» (HSD) se identificaron mediante el Test de Turkey con  $P=0,05$ . Al final de este período las colonias de cada aislamiento y medio fueron descritas atendiendo a criterios de textura de la superficie, color del micelio, borde de la colonia, pigmentación del medio, etc. También se hicieron preparaciones microscópicas para observar las dimensiones y forma de las células que componen las hifas, y describir los aspectos más interesantes. El colorante utilizado fué Rojo Congo agua.

## RESULTADOS

### Descripción microscópica del micelio

Las hifas presentan un diámetro de 4,25 - 6,8  $\mu$  ( $\bar{x}=5,57$ ,  $s^2=1,87$ ,  $n=32$ ) y una distancia interseptos de 8,5-15,98  $\mu$  ( $\bar{x}=11,58$ ,  $s^2=1,87$ ,  $n=32$ ). Presenta muy pocas fíbulas y sí muchos hinchamientos repartidos por las hifas, nunca terminales. Estructuras parecidas las encuentra CERUTI *et al.* (1983) en *B. aereus*. Otra característica es la presencia de ondulaciones en las partes terminales de las hifas fácilmente visibles al microscopio óptico.

### Descripción de las colonias

Las colonias después de tres meses de cultivo muestran el siguiente aspecto:

#### *Aislamiento 1001* (Fig. 2)

RAPER. Micelio aéreo de color blanco, flocoso o débilmente funiculado, también zonado. Bordes de las colonias irregulares, con ondas, también hialinas. Colorea el medio intensamen-

te de pardo-rojizo. Crecimiento de la colonia moderado.

PDA. Colonias con micelio aéreo de color blanco marfil, flocosas o débilmente aterciopeladas, también azonadas pero con hendiduras radiales. Borde de la colonia regular. Pigmentación del medio, parda. Crecimiento de la colonia moderado.

MMN. Micelio aéreo de color blanco marfil, flocoso o débilmente funiculoso, también azonado. Borde de la colonia irregular con micelio hialino. Tiñe el medio de un color ambarino con un halo incoloro alrededor de la colonia. Crecimiento lento.

AGAR MALTA. Micelio aéreo de color crema, débilmente funiculado, ocupando sólo 1/3 de la colonia. El resto del micelio crece sumergido, también débilmente zonado. Borde de la colonia regular e hialino. Colorea el medio intensamente de pardo. Crecimiento de la colonia moderado.

#### *Aislamiento 1004* (Fig. 3)

RAPER. Micelio aéreo abundante de color crema, flocoso o débilmente funiculado, con hendiduras radiales también débilmente zonadas. Borde de la colonia hialino e irregular. Colorea el medio intensamente de color pardo. Crecimiento de la colonia bueno (Fig. 4).

PDA. Micelio aéreo de color marfil, aterciopelado, con placa basal coriácea, también con hendiduras radiales. Borde de la colonia regular con márgenes abruptos. Tiñe el medio de color ámbar. Crecimiento de la colonia moderado.

MMN. Micelio aéreo flocoso de color blanco sucio, también azonado. Borde de la colonia irregular e hialino. Pigmentación del medio ámbar con un halo incoloro. Crecimiento lento.

AGAR MALTA. Micelio aéreo de color blanco marfil, flocoso, ocupando menos de 1/3 del total de la colonia, el resto crece sumergido. También débilmente zonado. Borde de la colonia hialino y regular. Tiñe el medio de color pardo y crece moderadamente.

#### *Aislamiento 1006* (Fig. 8)

RAPER. Micelio aéreo flocoso, blanco-cremoso moteado de tonos parduzcos, zonado

con hendiduras radiales. Borde de la colonia hialino e irregular. Pigmentación del medio pardo-rojiza intensa. Crecimiento bueno.

PDA. Micelio aéreo aterciopelado, de color blanco-cremoso, moteado de tonalidades blanco parduzcas, claramente zonado con algunas hendiduras radiales. Borde de la colonia regular, ondulado. Pigmenta el medio de pardo. Crecimiento de la colonia moderado (Fig. 5).

MMN. Colonia con micelio aéreo flocoso, de color crema sucio, también azonado. Borde de la colonia irregular. Pigmenta el medio de un color ambarino con un halo incoloro alrededor de la colonia. Crecimiento lento de la misma.

AGAR MALTA. Micelio aéreo flocoso o débilmente funiculado, escaso y azonado. Borde de la colonia regular e hialino. Medio pigmentado de lento. Crecimiento moderado.

*Aislamiento 1007* (Fig. 9)

RAPER. Micelio aéreo flocoso, o débilmente funiculado, de color blanco-amarillento, también débilmente zonado. Borde de la colonia

hialino y regular. Tiñe el medio intensamente de pardo. Crecimiento bueno.

PDA. Micelio aéreo aterciopelado, de color crema con moteados de pardo, azonado con hendiduras radiales. Borde de la colonia ondulado. Pigmenta el medio de color pardo. Crecimiento de la colonia moderado.

MMN. Micelio aéreo de color crema sucio, flocoso y también azonado. Borde de la colonia irregular e hialino. Pigmenta el medio de color ámbar con un halo incoloro alrededor de la colonia. Crecimiento de la misma lento (Fig. 6).

AGAR MALTA. Micelio aéreo funiculado o débilmente flocoso, de color marfil, también débilmente zonado. Borde de la colonia regular. Tiñe el medio de pardo. Presenta crecimiento moderado (Fig. 7).

#### *Prueba de crecimiento*

Se encuentran diferencias significativas entre las Vm para cada combinación de medio y aislamiento (Tabla II).

TABLA II. Velocidad de crecimiento de las colonias en los diferentes medios de cultivo

AISLAMIENTO	Vm de crecimiento (entre los días 14 y 70)			
	RAPER	PDA	AM	MMN
1001	0,6520 b	0,5257c	0,5193cd	0,4040e
1004	0,7950a	0,4410cde	0,3986 e	0,3986f
1006	0,8200a	0,4707cde	0,4300 de	0,2157f
1007	0,8429a	0,4420cde	0,4475cde	0,2242f

HSD=0,09112; P=0,05; grados de libertad=174.

Las Vm con alguna letra en común no son significativamente diferentes.

Vm en mm/día.

Utilizando las variables aislamiento y medio con efectos clasificatorios, el medio RAPER se separa netamente de los demás dando el mejor crecimiento en todos los casos. Las diferencias entre los aislamientos son de menor magnitud que las diferencias entre los medios y de similar orden con la interacción, particularmente en los medios PDA, AM y MMN. Un análisis más

profundo de los datos obtenidos y más ensayos, serán necesarios para clarificar el comportamiento de los aislamientos en estos medios.

En la Tabla III se reflejan las HSD para los medios y los aislamientos considerados por separado, y los resultados se exponen gráficamente en la Fig. 1.

Tabla III

MEDIO	$V_m (x_1)$	n	AISLAMIENTO	$V_m (x_2)$	n
RAPER	0,7840	42	1001	0,5248	148
PDA	0,4746	48	1007	0,5111	144
AM	0,4490	50	1006	0,4717	154
MMN	0,2550	50	1004	0,4036	144
HSD=0,0330			HSD=0,03311		

$P=0,05$ ; grados de libertad=174.

$x_1$  =media de los cuatro aislamientos en cada medio.

$x_2$  =media de cada aislamiento en los cuatro medios.

Las líneas continuas unen las  $V_m$  que no son diferentes significativamente.  $V_m$  en mm/día.

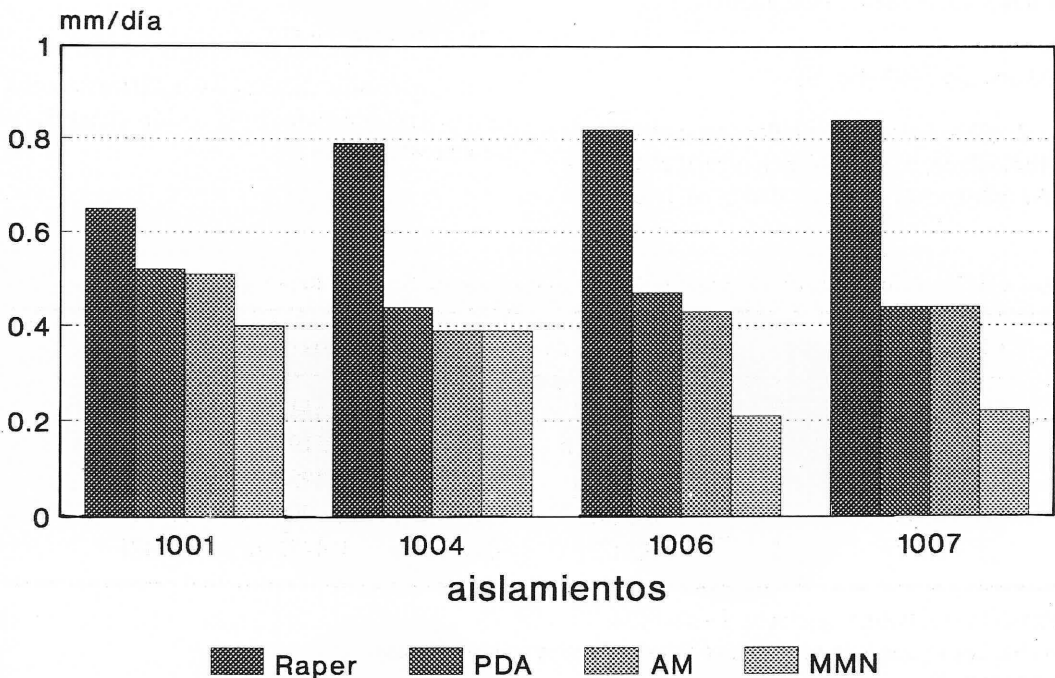


Fig. 1. Velocidad media de crecimiento en mm/día.

## CONCLUSIONES

La componente significativa de la interacción no nos permite decidir sobre la influencia de los factores aislamiento y medio, sobre la velocidad media de crecimiento. No obstante, la elevada significación del componente medio y la clasifi-

cación en grupos no significativamente diferentes, nos permite afirmar que el Raper es el medio más adecuado para el crecimiento vegetativo de *B. fragans* Vitt. en los casos estudiados.

La recogida del material utilizado en la siembra fué realizada en un centro de recogida comercial, por lo que desconocemos la variabilidad de

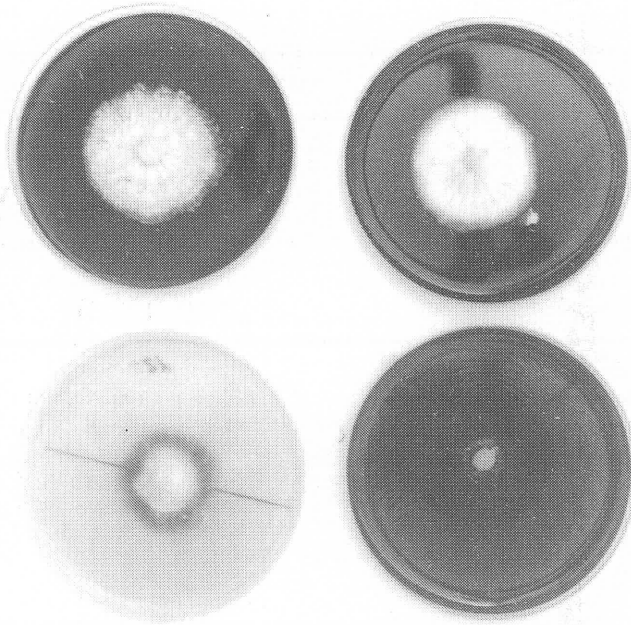


Fig. 2. Aspecto morfológico del aislamiento 1001, de izquierda a derecha y de arriba a abajo AM, MMN, PDA y RAPER.

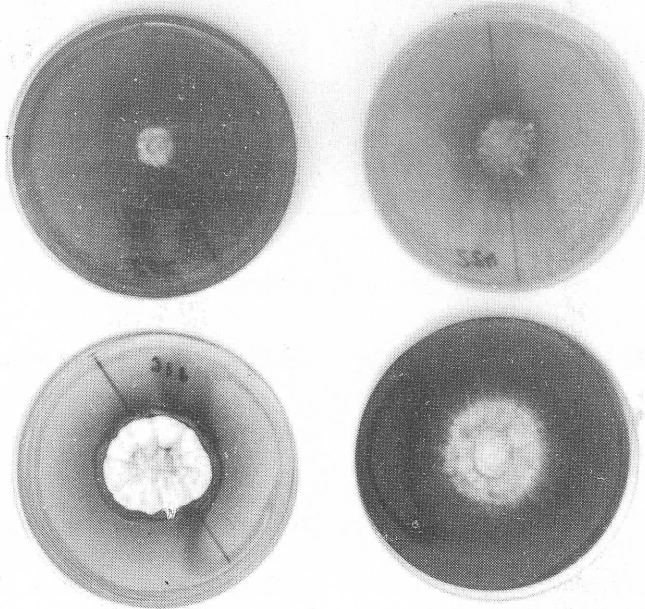


Fig. 3. Morfología del aislamiento 1004. De izquierda a derecha y de arriba a abajo AM, MMN, PDA y RAPER.

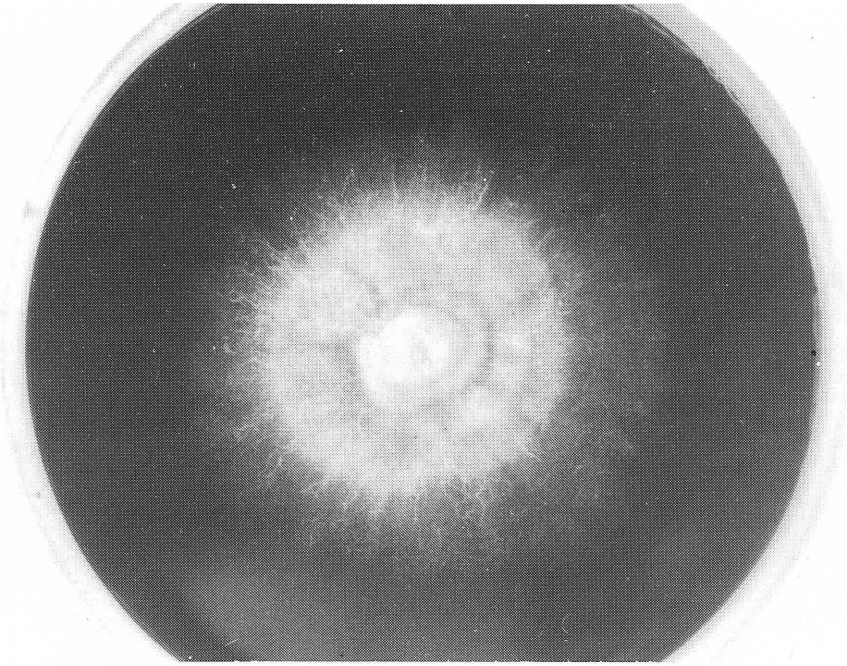


Fig. 4. Morfología en medio gelosado del aislamiento 1004 en RAPER.

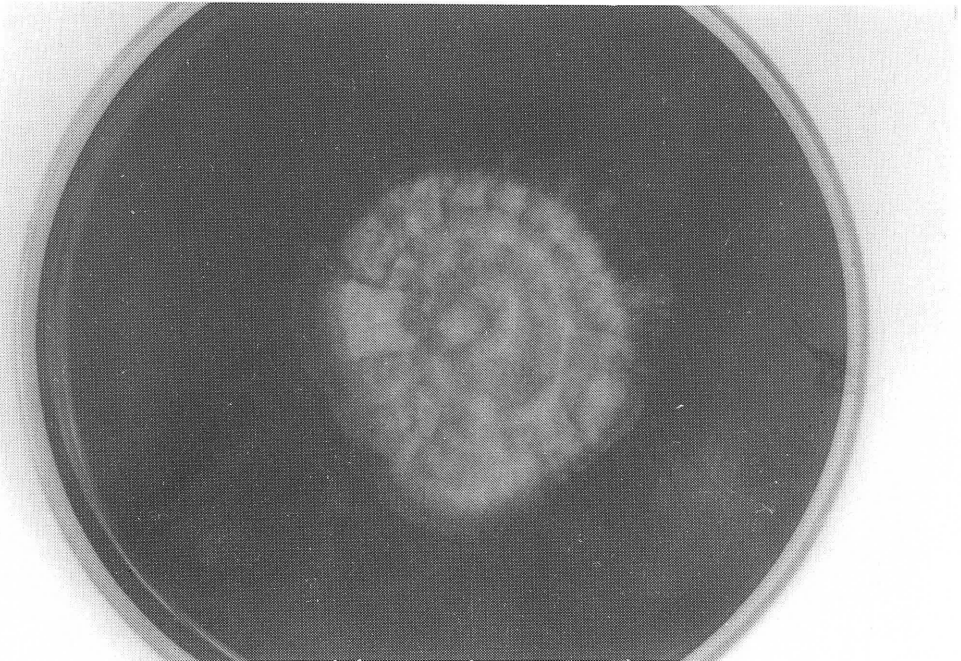


Fig. 5. Morfología en medio gelosado del aislamiento 1006 en PDA.

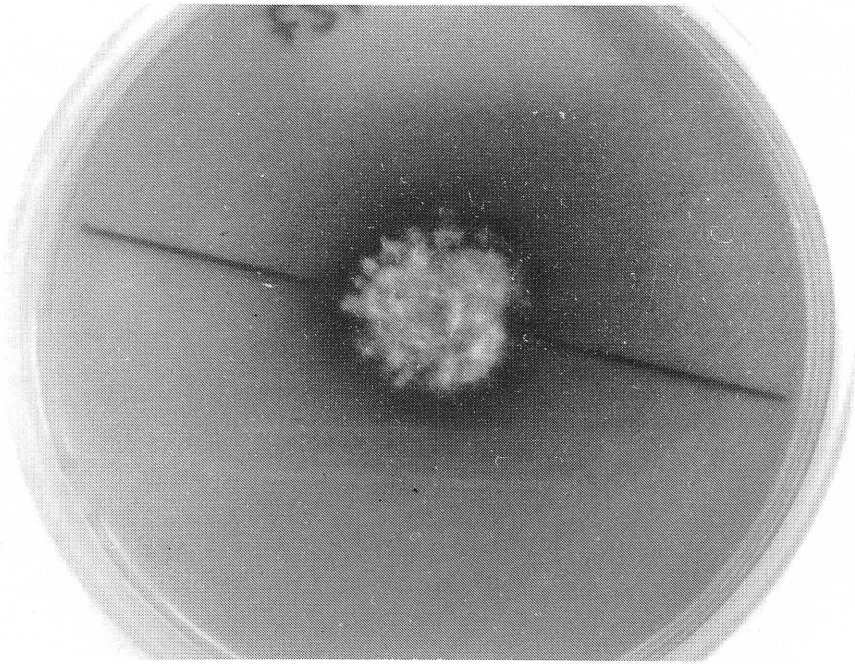


Fig. 6. Morfología en medio gelosado del aislamiento 1007 en MMN.

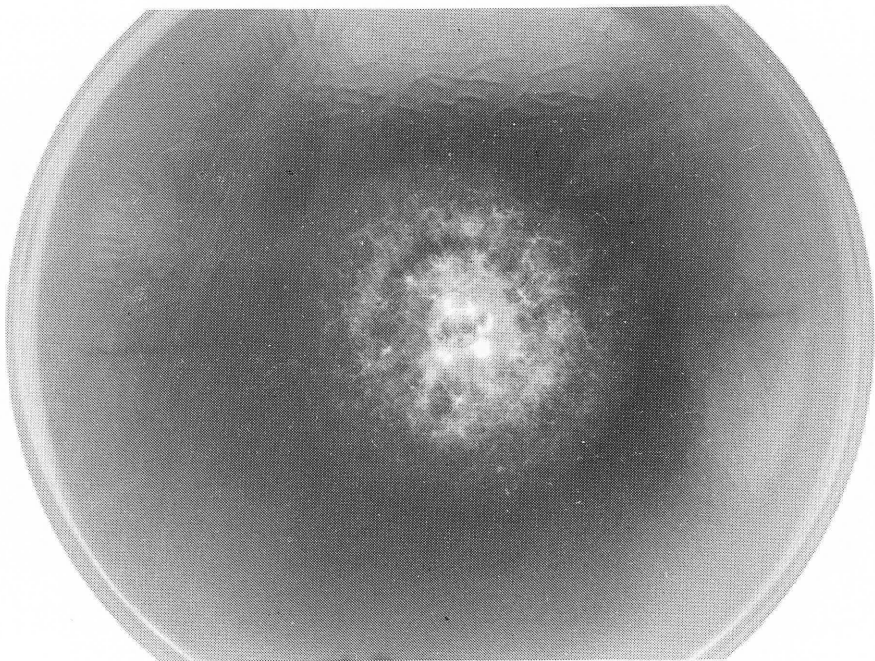


Fig. 7. Morfología en medio gelosado del aislamiento 1007 en AM.

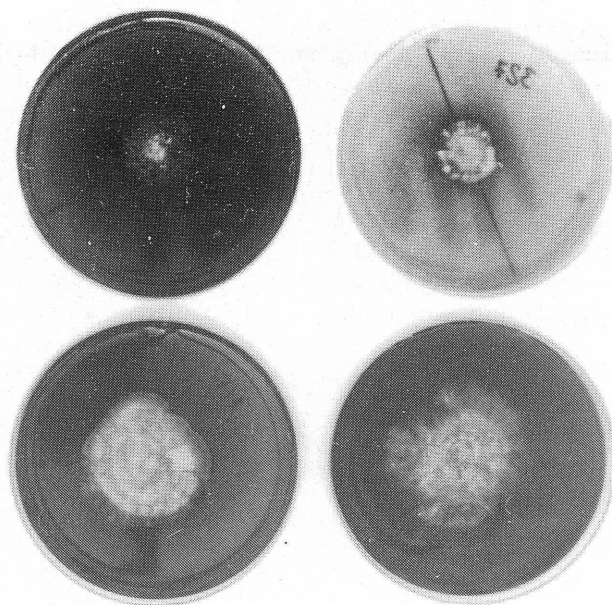


Fig. 8. Morfología en medio gelosado del aislamiento 1006. De izquierda a derecha y de arriba a abajo AM, MMN, PDA y RAPER.

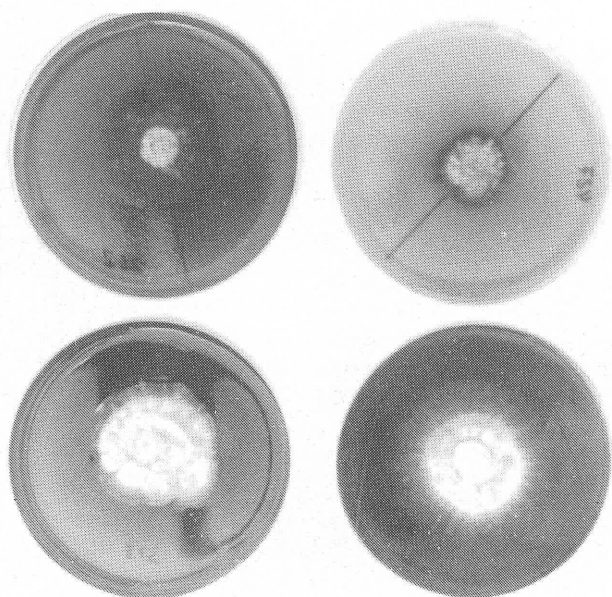


Fig. 9. Morfología en medio gelosado del aislamiento 1007. De izquierda a derecha y de arriba a abajo AM, MMN, PDA y RAPER.

la población inicial en la zona. Pese a la posible confusión taxonómica de *B. fragans* Vitt. con otros boletos, la ausencia de citas sobre esta especie en otras áreas próximas nos hace suponer que trabajamos con una población aislada. El estudio de la Vm entre los límites de tiempo aquí definidos, y la morfología de la colonia, son un primer intento de encontrar un parámetro que nos permita conocer la estructura de la población del hongo en el «souto» estudiado y la evolución de su comportamiento.

### AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a Guillermo Vega por sus consejos en informática.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CERUTI, A., CERUTI, I. & TOZZI, M. (1983). Síntesis micorrizica tra *Boletus aereus* e *Quercus pubescens*. *C.N.R.*, **292**: 5-17.
- CHEVALIER, G. (1985). La mycorrhization contrôlée en pépinière forestière possibilités d'application aux conteneurs. *Revue For. Française*, **37**: 93-106.
- FERNÁNDEZ DE ANA MAGÁN, F. & RODRÍGUEZ, A. (1989). O *Boletus fragans* Vitt. e a sua reprodución. *Braña. Monográfico I*: 179-173.
- GONZÁLEZ PALMOU, O. (1986). *Revisión del orden Boletales en Galicia*. Tesis de licenciatura. Facultade de Biología. Universidade de Santiago de Compostela.
- GRENTE, J. & VROT, F. (1984). Recherche d'un moyen de lutte biologique contre la maladie de l'encere par utilisation de la symbiose mycorrhizienne. *I Congreso Internacional sobre el Castaño*. Lourizán (Pontevedra).
- 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.
- MARX, D.H. (1981). Variability in ectomycorrhizal development and growth among isolates of *Pisolithus tinctorius* as affected by source, age, and reisolation. *Can. J. For. Res.*, **11**: 168-174.
- MARX, D.H. & KENNEY, D.S. (1982). Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. pp 131-146. N.C. Schenck ed. University of Florida.
- MELIN, E. & RAMADAS, V.S. (1954). Influence of root-metabolites on the growth of tree mycorrhizal fungi. *Physiol. Plant.*, **7**: 851-858.
- MODESS, O. (1941). Zur Kenntniss der Mykorrhizabildner von Kiefer und Fichte. *Symb. Bot. Upsal.*, **5**: 1-146.
- MOLINA, R. & PALMER, J.G. (1982). Isolation, maintenance and culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Schenk. The American Phytopathological Society. Nc. Schenck. University of Florida.
- PALMER, J.G. & HACSKAYLO, E. (1970). Ectomycorrhizal fungi in pure culture I. Growth on single carbon sources. *Physiol. Plant.*, **23**: 1187-1197.
- POITOI, N. (1978). Cultures mycéliennes de champignons mycorrhiziens et techniques d'incorporation aux plantes-hôtes. *Mushroom Science X*, Part I: 891-902.
- RAPER, C.A. & RAPER, J.R. (1972). Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, **64**(5).
- THIVOLLE-CAZAT, A. (1987). Les mycorrhizes. Intérêt en pépinière et en forêt. *Afocel Armeif Infor. For.*, **3**(322).
- SAMSON, J. & FORTIN, A. (1986). Ectomycorrhizal fungi of *Larix laricina* and the interspecific and intraspecific variation in response to temperature. *Can. J. Bot.*, **64**: 3020-3028.
- ZUCCHERELLI, G. (1988). Prime esperienze sulla produzione di piante forestali micorrizzate con *Boletus edulis*. *Monti e Boschi*, **3**: 11-14.