

Los tratamientos preventivos de incendios forestales afectan a la presencia de micelio de *Boletus edulis* en suelos de sistemas forestales dominados por *Cistus ladanifer*

MEDIAVILLA, O.^{1,2}, HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.¹, OLAIZOLA, J.², SANTOS DEL BLANCO, L.^{1,2}, ORIA DE RUEDA, J.A.¹, y MARTÍN-PINTO, P.¹

¹Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible Avda. Madrid, 44 34071 Palencia

²IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S. L. Calle Curtidores, 17 34004 Palencia

Resumen

Los jarales de *Cistus ladanifer* albergan una extraordinaria producción de hongos entre los que destaca el apreciado *Boletus edulis*. Su fructificación es típicamente variable debido a diversos factores, desconociéndose en gran medida la evolución del micelio en el suelo en función de esos factores.

Bajo la hipótesis de que el manejo influye en el micelio de *B. edulis* en el suelo, se realizaron diferentes tratamientos de reducción de combustible en jarales naturales de origen variado. Se tomaron muestras de suelo en tres momentos del año, cuantificando el ADN de *B. edulis* mediante PCR a tiempo real.

En general, se confirmó la presencia del hongo en el suelo, pero en cantidad variable. Fue más abundante en zonas no tratadas y en aquellas desbrozadas al 50%. En cuanto al origen de la masa, parcelas que fueron quemadas ocho años atrás, albergaron una mayor cantidad de micelio. Finalmente, el micelio de *B. edulis* en el suelo, a pesar de no haber diferencias significativas entre tiempos, tendió a ser más abundante en diciembre. Basándonos en los resultados obtenidos, se propondrán las prácticas de manejo óptimas para promover una mayor producción de *B. edulis* de forma sostenible.

Palabras clave

Micelio extrarradical, PCR a tiempo real, Selvicultura fúngica, Técnicas selvícolas para la biodiversidad

1. Introducción

El ecosistema de *Cistus sp.* se distribuye por el noroeste de la península ibérica y norte de Marruecos. Estos matorrales mediterráneos crecen en suelos poco desarrollados, deficientes en nutrientes y ácidos (ROSSINI-OLIVA ET AL., 2016). A pesar de ser considerados tradicionalmente como suelos improductivos, albergan una elevada producción de hongos altamente demandados por su interés gastronómico (ORIA-DE-RUEDA ET AL., 2008). Las especies del género *Boletus* (*Boletus edulis* y *Boletus aereus*, principalmente) son las que mayor valor económico tienen en estos ecosistemas (ORIA-DE-RUEDA ET AL., 2008).

Boletus edulis L. es uno de los hongos más valorados en *todo el mundo* (BOA, 2004), especialmente en los mercados de muchos países donde su comercio se ha convertido en una importante actividad económica complementaria (CAI ET AL., 2011; MARTÍNEZ ET AL., 2011; VOCES ET AL., 2012). Sin embargo la disponibilidad de este hongo, como la mayoría de hongos ectomicorrícicos depende de su fructificación natural, ya que hasta el momento no se ha conseguido su producción controlada (MEDIAVILLA ET AL., 2016). De este modo, la recolección natural en bosques es la única forma de obtener este recurso (DE LA VARGA ET AL., 2013).

Además, se ha observado que su fructificación es típicamente variable debido a diversos factores, y solo puede ser recolectado cuando las condiciones climáticas y de hábitat sean adecuadas para su fructificación (LIU ET AL., 2016). En este sentido, se han llevado a cabo varios

estudios para testar la influencia de algunos factores como: a) factores climáticos (BONET ET AL., 2010; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ ET AL., 2015); b) estructura de la masa (MARTÍNEZ-PEÑA ET AL., 2012); o c) edad (BONET ET AL., 2004), pero se desconoce en gran medida la evolución del micelio en el suelo en función de esos factores. Por lo que, falta información importante sobre el ciclo de vida y dinámicas estacionales del micelio de *B. edulis* en el suelo. Esta información podría ser relevante para establecer prácticas de manejo que permitan mantener e incrementar la producción de carpóforos, conservando al mismo tiempo la diversidad fúngica (EGLI ET AL., 2010)

Hoy en día, gracias al desarrollo de técnicas de alta sensibilidad y especificidad (SIMENG ET AL., 2015), como PCR a tiempo real, es posible monitorear y cuantificar la distribución de micelio extrarradical en el suelo (DE LA VARGA ET AL., 2013; PARLADÉ ET AL., 2013).

En consecuencia, en este estudio nos preguntamos qué efecto tienen diferentes prácticas de manejo selvícola en la presencia y cantidad de micelio de *B. edulis* en el suelo, si se podría incrementar la cantidad de micelio a través de prácticas selvícolas y por lo tanto, la producción de hongos.

2. Objetivos

El objetivo de este estudio fue testar como afectan diferentes tratamientos selvícolas a la presencia y cantidad de micelio de *B. edulis* en el suelo.

3. Metodología

La zona de estudio se localizó en la provincia de Zamora y está dominada exclusivamente por arbustos de *C. ladanifer*. Se caracteriza por tener clima mediterráneo, con una estación seca durante el verano y fríos inviernos. La precipitación media anual es 450-700 mm, y las temperaturas medias oscilan entre 14,5 y 15,8°C. Los datos climáticos fueron proporcionados por la estación meteorológica más cercana (Alcañices, 0724617 Longitud-UTM, 4618218 Latitud-UTM, Huso 29T y 806 m sobre el nivel del mar, Agencia Meteorológica Española). La zona de estudio estaba formada por tres zonas con diferente edad y origen: a) una masa de 8 años de edad cuyo origen fue un incendio forestal; b) una masa de 8 años de edad cuyo origen fue un desbroce de la masa; c) una masa de 20 años de edad cuyo origen fue un incendio forestal.

Los tratamientos se establecieron dependiendo de su aplicabilidad de acuerdo a la edad y características de la vegetación. Para las masas de 8 años de edad (a y b), los tratamientos llevados a cabo consistieron en diferentes niveles de reducción del combustible: 1) sin desbroce (control); 2) desbroce del 50% y 3) desbroce total. En la masa de 20 años de edad (c), los tratamientos de reducción de combustible fueron: 1) sin desbroce (control); 2) desbroce total y 3) quema controlada.

De este modo, se estudiaron tres zonas diferentes con tres tratamientos por zona, y tres parcelas por tratamiento, resultando en un total de 27 parcelas muestreadas. Las parcelas de muestreo consistieron en transectos de 2x50 m, establecidos de acuerdo a estudios previos (LUOMA ET AL., 1991; SMITH ET AL., 2002).

Las muestras de suelo se recogieron en tres momentos diferentes: al final de la temporada de fructificación de los carpóforos (diciembre), en abril y en julio. Para ello se utilizó un extractor (3,5 cm de diámetro y 26 cm de profundidad), y se tomaron 5 muestras de suelo en cada parcela, separadas 5 m entre sí, y siguiendo la forma de la parcela (TAYLOR, 2002).

Extracción de ADN del suelo

Se preparó el suelo antes de llevar a cabo la extracción de ADN. Para ello, fue secado a temperatura ambiente y posteriormente tamizado con un tamiz de 1mm para eliminar piedras y elementos gruesos.

Las extracciones de ADN se realizaron con el kit de extracción “PowerSoil® DNA Isolation Kit” (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA), a partir de 0,25 g de suelo por muestra, de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se procesaron un total de 81 muestras. El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta su uso.

Cuantificación de micelio del suelo mediante PCR a tiempo real

El ADN extraído de *B. edulis* se amplificó mediante PCR a tiempo real en un sistema de PCR a tiempo real de Applied Biosystems® 7500 (Applied Biosystems, Mannheim, Germany), usando el kit “qPCR Boletus edulis-VK” provisto por Vacunek S.L., y de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para un volumen de reacción final de 25 µl. El kit proporcionó los reactivos y enzimas necesarios, mezclados en un único master mix. El kit utiliza una sonda Taqman marcada con FAM-BHQ1® y también un control interno positivo (CIP) con cebadores y una sonda Taqman marcada con JOE-BHQ1®, que permite detectar falsos negativos causados por la inhibición. Se añadieron cinco microlitros del ADN extraído de las muestras de suelo. También se añadió un control positivo en el análisis, con una cantidad conocida de ADN.

Se incluyeron tres replicas por muestra, así como un control negativo. Se generó una curva estándar con 5 puntos y tres réplicas por punto, usando cantidades conocidas de micelio. Se realizaron diluciones seriadas desde 11.400.000 a 1,140 ng de micelio/g de suelo. Las condiciones de ciclo de PCR fueron: 10 minutos a 95°C, 45 ciclos a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos.

Análisis de datos

Las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA). Los valores medios fueron comparados mediante test de Fisher (LSD) ($P < 0,05$). Los datos se transformaron cuando fue necesario para cumplir los requisitos de ANOVA. Todos los análisis se realizaron con el software R, versión 3.0.1. (2013).

4. Resultados

Nuestros resultados confirmaron la presencia extendida de micelio de *B. edulis* en el suelo. Así, la presencia de *B. edulis* se confirmó en 78 de las 81 muestras de suelo recolectadas. Las tres muestras donde la amplificación no se llevó a cabo pertenecían a las parcelas en las que se había realizado un desbroce total de la masa. En dichas parcelas, no había habido fructificación de *B. edulis* el otoño anterior.

Hubo amplificación de ADN de *B. edulis* en todos los tratamientos. Sin embargo, la cantidad estimada de micelio en el suelo fue significativamente menor en las parcelas en las que se había efectuado el desbroce total con respecto a las parcelas donde se había hecho un desbroce al 50% ($P = 0,0016$) y las parcelas control ($P < 0,001$). No hubo diferencias significativas entre las parcelas control y las parcelas con desbroce al 50% ($P = 0,06$).

La curva estándar cumplió los requerimientos en términos de eficiencia $R = 0,99$. Los controles negativos (muestras negativas), recogidas en un área cercana sin producción de *B. edulis*, y con características de suelo similares, no mostraron amplificación.

La cantidad más baja detectada de micelio de *B. edulis* fue $4,48 \cdot 10^{-6}$ mg de micelio por gramo de suelo, y fue recogida en el mes de julio en las parcelas donde se había realizado un desbroce total. El límite máximo de detección fue registrado en diciembre en las parcelas aclaradas al 50% con 0,084 mg de micelio por gramo de suelo.

De acuerdo al origen de la masa, las parcelas jóvenes cuyo origen fue un fuego mostraron una cantidad de micelio significativamente más alta que aquellas cuyo origen fue un desbroce ($P < 0,001$) y también que las senescentes ($P = 0,001$).

Teniendo en cuenta las dinámicas estacionales, a pesar de que no se evidenció ninguna diferencia significativa en tiempos diferentes, la tendencia de datos sugiere que la cantidad estimada de micelio en el suelo durante la estación de fructificación (diciembre) fue superior que en abril y en julio.

5. Discusión

Se confirmó una extendida presencia de *B. edulis* en el suelo, amplificando en todos los tratamientos. Este hecho puede resultar impactante, ya que uno de los tratamientos realizados consistió en la completa eliminación de la especie hospedante (desbroce total), y *B. edulis* es una especie micorrízica, cuya supervivencia depende de un hospedante. Sin embargo, se cree que esta alta resiliencia del hongo se pueda deber a la existencia de propágulos micorrízicos en el suelo. Después de perturbaciones, los bancos de esporas y los propágulos fúngicos resistentes desempeñan un papel fundamental en la recuperación fúngica (BUSCARDO ET AL., 2010). Además, *C. ladanifer* ha sido reconocida como especie hospedante puente (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ ET AL., 2013), proporcionando inóculo micorrízico disponible para colonizar nuevos hospedantes.

Respecto a las cantidades de micelio en suelo, se obtuvo como límite de detección inferior $4,48 \cdot 10^{-6}$ mg de micelio de *B. edulis* por gramo de suelo. Este resultado avala la alta precisión del kit empleado para la cuantificación de micelio extrarradical de *B. edulis* en suelo. Al comparar las cantidades de micelio recogidas en nuestras parcelas con las recogidas en otros estudios, fueron similares a las reportadas por SUZ ET AL. (2008), e inferiores a DE LA VARGA ET AL. (2013). Sin embargo para hacer comparables los resultados sería necesario estandarizar la metodología, especialmente las características del material fúngico empleado para realizar las curvas estándar (PARLADÉ ET AL., 2013).

Las parcelas jóvenes cuyo origen fue un incendio mostraron una significativamente mayor cantidad de micelio en el suelo que aquellas procedentes de un desbroce y que las parcelas senescentes. Esto puede ser debido por el carácter pirófito de *C. ladanifer* (ÁGUEDA ET AL., 2008). Las altas temperaturas generadas por el fuego en las capas superiores del suelo provocan la germinación de las semillas (BASTIDA & TALAVERA, 2002). Esta mayor germinación de semillas, podría propiciar un mayor número de plantas, y en consecuencia, un sistema radical más extenso que sea capaz de albergar una mayor cantidad de micelio en sus raíces. Por el contrario, los inferiores valores de micelio en las parcelas senescentes, a pesar de ser originadas por incendio forestal, podrían ser explicados por la baja actividad fotosintética de las plantas senescentes (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ ET AL., 2013), ya que el desarrollo de los hongos ectomicorrízicos depende del carbono fijado fotosintéticamente por sus especies hospedantes (EGLI, 2011).

Atendiendo a las dinámicas estacionales del hongo, no se apreciaron diferencias significativas en diferentes momentos, sin embargo en los suelos recogidos en diciembre la cantidad de micelio fue superior que en los meses de abril y julio. DE LA VARGA ET AL. (2013) también reportaron una mayor cantidad de micelio en suelo para *B. edulis* y *L. deliciosus* durante los meses más fríos. Esto podría deberse a que el micelio necesitaría aumentar su superficie de absorción para contrarrestar la baja actividad del hospedante durante los meses de frío (DE LA VARGA ET AL., 2013).

6. Conclusiones

Los resultados obtenidos confirmaron una presencia extendida de micelio de *B. edulis* en el suelo, amplificando en todos los tratamientos. La mayor cantidad de micelio en suelo se encontró en las parcelas control y las parcelas desbrozadas al 50%. De acuerdo al origen de la masa, se recogió una mayor cantidad de micelio extrarradical de *B. edulis* en las masas jóvenes y

procedentes de un incendio forestal. A pesar de no haber diferencias significativas estacionales, se evidenció una cantidad de micelio superior en el mes de diciembre. En base a los resultados de este estudio, se recomendaría efectuar tratamientos de reducción del combustible al 50%, así como promover un rejuvenecimiento de la masa para fomentar mayores producciones de micelio de *B. edulis* en suelo.

7. Agradecimientos

Este estudio fue parcialmente financiado por el proyecto de investigación VA206U13 (Junta de Castilla y León) y por la empresa de base tecnológica IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S. L. Nos gustaría agradecer a la Doctora Isbene Sanchez (Vacunek S.L.) por el apoyo en el análisis de cuantificación. El trabajo realizado por Olaya Mediavilla está cofinanciado por un contrato predoctoral de la Junta de Castilla y León y del Fondo Social Europeo.

8. Bibliografía

ÁGUEDA, B.; PARLADÉ, J.; FERNÁNDEZ-TOIRÁN, LM.; CISNEROS, O.; DE MIGUEL, AM.; MODREGO, MP.; MARTÍNEZ-PEÑA, F.; PERA, J; 2008. Mycorrhizal synthesis between *Boletus edulis* species complex and rockroses (*Cistus* sp.). *Mycorrhiza* 18: 443–449.

BASTIDA, F.; TALAVERA, S; 2002. Temporal and Spatial Patterns of Seed Dispersal in Two *Cistus* Species (*Cistaceae*). *Ann Bot* 89: 427–434.

BOA, E; 2004. Wild edible fungi: A global overview of their use and importance to people. In: Non-wood Forest Products N°17. FAO, Rome. pp: 1–147.

BONET, JA.; FISCHER, CR.; COLINAS, C; 2004. The relationship between forest age and aspect on the production of sporocarps of ectomycorrhizal fungi in *Pinus sylvestris* forests of the central Pyrenees. *For Ecol Manage* 203: 157–175.

BONET, JA.; PALAHÍ, M.; COLINAS, C.; PUKKALA, T.; FISCHER, CR.; MIINA, J.; MARTÍNEZ DE ARAGÓN, J; 2010. Modelling the production and species richness of wild mushrooms in pine forests of the Central Pyrenees in northeastern Spain. *Can J For Res* 40: 347–356.

BUSCARDO, E.; RODRÍGUEZ-ECHEVERRÍA, S.; MARTÍN, MP.; DE ANGELIS, P.; PEREIRA, JS.; FREITAS, H; 2010. Impact of wildfire return interval on the ectomycorrhizal resistant propagules communities of a Mediterranean open forest. *Fungal Biol*: 628–636.

CAI, M.; PETTENELLA, D.; VIDALE, E; 2011. Forest Policy and Economics Income generation from wild mushrooms in marginal rural areas. *For Policy Econ* 13: 221–226.

EGLI, S.; AYER, F.; PETER, M.; EILMANN, B.; RIGLING, A; 2010. Is forest mushroom productivity driven by tree growth? Results from a thinning experiment. *Ann For Sci* 67: 509–509.

EGLI, S; 2011. Mycorrhizal mushroom diversity and productivity – an indicator of forest health? *Ann For Sci*: 81–88.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; DE MIGUEL, S.; PUKKALA, T.; ORIA-DE-RUEDA, JA.; MARTÍN-PINTO, P; 2015. Climate-sensitive models for mushroom yields and diversity in *Cistus ladanifer* scrublands. *Agric For Meteorol* 213: 173–182.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; ORIA-DE-RUEDA, JA.; MARTÍN-PINTO, P; 2013. Post-fire fungal succession in a Mediterranean ecosystem dominated by *Cistus ladanifer* L. *For Ecol Manage* 289: 48–57.

DE LA VARGA, H.; ÁGUEDA, B.; ÁGREDA, T.; MARTÍNEZ-PEÑA, F.; PARLADÉ, J.; PERA, J; 2013. Seasonal dynamics of *Boletus edulis* and *Lactarius deliciosus* extraradical mycelium in pine forests of central Spain. : 391–402.

LIU, B.; BONET, JA.; FISCHER, CR.; ARAGÓN, JM DE.; BASSIE, L.; COLINAS, C; 2016. Forest Ecology and Management *Lactarius deliciosus* Fr . soil extraradical mycelium correlates with stand fruitbody productivity and is increased by forest thinning. *For Ecol Manage* 380: 196–201.

LUOMA, DL.; FRENKEL, RE.; TRAPPE, JM; 1991. Fruiting of hypogeous fungi in Oregon Douglas-Fir forests: seasonal and habitat variation. *Mycología* 83: 335–353.

MARTÍNEZ, J.; ARAGÓN, D.; RIERA, P.; GIERGICZNY, M.; COLINAS, C; 2011. Forest Policy and Economics Value of wild mushroom picking as an environmental service. *For Policy Econ* 13: 419–424.

MARTÍNEZ-PEÑA, F.; PUKKALA, T.; BONET, JA.; ORTEGA-MARTÍNEZ, P.; ALDEA, J; 2012. Forest Ecology and Management Yield models for ectomycorrhizal mushrooms in *Pinus sylvestris* forests with special focus on *Boletus edulis* and *Lactarius group deliciosus*. 282: 63–69.

MEDIAVILLA, O.; OLAIZOLA, J.; SANTOS-DEL-BLANCO, L.; ORIA-DE-RUEDA, JA.; MARTÍN-PINTO, P; 2016. Mycorrhization between *Cistus ladanifer* L. and *Boletus edulis* Bull is enhanced by the mycorrhiza helper bacteria *Pseudomonas fluorescens* Migula. *Mycorrhiza*: 161–168.

ORIA-DE-RUEDA, JA.; MARTÍN-PINTO, P.; OLAIZOLA, J; 2008. Bolete productivity of *Cistaceae* scrublands in Northwestern Spain. *Econ Bot* 62: 323–330.

PARLADÉ, J.; VARGA, H DE.; MIGUEL, AM DE.; SÁEZ, R.; PERA, J; 2013. Quantification of extraradical mycelium of *Tuber melanosporum* in soils from truffle orchards in northern Spain. : 99–106.

ROSSINI-OLIVA, S.; MINGORANCE, MD.; MONACI, F.; VALDÉS, B; 2016. Ecophysiological indicators of native *Cistus ladanifer* L . at Riotinto mine tailings (SW Spain) for assessing its potential use for rehabilitation. *Ecol Eng* 91: 93–100.

SIMENG, Z.; SACHA, G.; ISABELLE, H.; MARIE-NOËLLE, R; 2015. A PCR-based method to quantify fungal growth during pretreatment of lignocellulosic biomass. *J Microbiol Methods* 115: 67–70.

SMITH, JE.; MOLINA, R.; HUSO, MMP.; LUOMA, DL.; MCKAY, D.; CASTELLANO, MA.; LEBEL, T.; VALACHOVIC, Y; 2002. Species richness, abundance, and composition of hypogeous and epigeous ectomycorrhizal fungal sporocarps in young, rotationage, and old-growth stands of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) in the Cascade Range of Oregon, USA. *Can J Bot* 80: 186–204.

SUZ, LM.; MART, P.; OLIACH, D.; FISCHER, CR.; COLINAS, C; 2008. Mycelial abundance and other factors related to truffle productivity in *Tuber melanosporum* ^ *Quercus ilex* orchards. 285: 72–78.

TAYLOR, AFS; 2002. Fungal diversity in ectomycorrhizal communities : sampling effort and species detection. : 19–28.

VOCES, R.; DIAZ-BALTEIRO, L.; ALFRANCA, Ó; 2012. Demand for wild edible mushrooms . The case of *Lactarius deliciosus* in Barcelona (Spain). *J For Econ* 18: 47–60.