

# *Pseudomonas fluorescens* actúa como bacteria facilitadora favoreciendo la micorrización entre *Cistus ladanifer* y *Boletus edulis*

MEDIAVILLA, O.<sup>1,2</sup>, OLAIZOLA, J.<sup>2</sup>, SANTOS DEL BLANCO, L.<sup>1,2</sup>, ORIA DE RUEDA, J.A.<sup>1</sup>, y MARTÍN-PINTO, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Universitario de Gestión Forestal Sostenible Avda. Madrid, 44 34071 Palencia

<sup>2</sup> IDForest-Biotecnología Forestal Aplicada S. L. Calle Curtidores, 17 34004 Palencia

## Resumen

*Boletus edulis* es uno de los hongos de mayor importancia económica a nivel mundial. Los esfuerzos para su domesticación se han concentrado en la obtención de planta micorrizada de jara (*Cistus ladanifer*) como estrategia para una producción precoz.

Recientemente se ha reconocido el papel clave de algunas bacterias en diversas etapas de la simbiosis micorrícica, conocidas como bacterias facilitadoras de la micorrización. En este estudio, nos planteamos comprobar si una de las bacterias más comúnmente citada como facilitadora de la micorrización, *Pseudomonas fluorescens*, podría ser utilizada para mejorar la eficiencia e intensidad de la micorrización entre *C. ladanifer* y *B. edulis*

Para ello evaluamos el efecto de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* y del tiempo de cultivo del micelio sobre la presencia de micorrizas y el nivel de micorrización de la planta. Los resultados obtenidos confirmaron el éxito de la síntesis micorrícica entre *C. ladanifer* y *B. edulis*. La co-inoculación con la bacteria *P. fluorescens* dobló el nivel de micorrización aunque no incrementó el número de plantas micorrizadas. El mismo patrón siguió el tiempo de cultivo de micelio. Los resultados obtenidos nos acercan a las producciones controladas de *B. edulis* en plantaciones.

## Palabras clave

MHB, síntesis micorrícica, cultivo hongos micorrícicos

## 1. Introducción

Las especies pertenecientes al complejo *Boletus edulis* Bull., se encuentran entre los hongos más apreciados en todo el mundo (HALL ET AL., 1998). Como resultado, los volúmenes comercializados en los mercados globales son altas (BOA, 2004) con un valor anual de mercado excediendo 250 millones de dólares (CATCHESIDE & CATCHESIDE, 2012). Solamente en España, la producción de *B. gr. edulis* recolectada varía ampliamente entre 2000 y 20.000 toneladas, dependiendo del año (ORIA-DE-RUEDA ET AL., 2008). Sin embargo un drástico decrecimiento en la presencia y productividad de *B. gr. edulis* ha sido reportado en varias partes de Europa (SALERNI & PERINI, 2004). Unido a una demanda siempre en aumento de este apreciado hongo (SITTA & FLORIANI, 2008) y considerando que *B. gr. edulis* se recolectan solo de forma natural (CANNON & KIRK, 2007), despierta un gran interés en controlar la producción de este valioso hongo, al igual que se hizo con el hongo micorrícico *Tuber melanosporum* Vitt. (BONET ET AL., 2009).

La mayoría de los boletos solo fructifican asociados a *Pinus*, *Quercus* o *Castanea* (OLIVIER ET AL., 1997), alzando altas producciones en árboles relativamente maduros (más de 40 años) (DÍAZ-BALTEIRO ET AL., 2003), limitando de este modo la viabilidad de su domesticación. Interesantemente, se ha observado la presencia de *B. edulis* bajo matorrales de *Cistus ladanifer* en el norte de España (ORIA-DE-RUEDA ET AL., 2005; MARTÍN-PINTO ET AL., 2006). Este hecho es muy relevante porque la producción de carpóforos tiene lugar en arbustos de a partir de 5 años de edad, obteniendo altas producciones en arbustos de 8 años (ORIA-DE-RUEDA ET AL., 2008).

Los primeros pasos hacia la micorrización controlada de plantas de *C. ladanifer* con *B. edulis* han sido dados (ÁGUEDA ET AL., 2008). Sin embargo, poco se conoce acerca de cómo producir eficientemente un gran número de plantas que alberguen estos hongos ectomicorrícicos (ECM) en su sistema radical. Se sabe que varios factores influyen en el éxito de la ectomicorrización controlada, como la preparación del inoculo fúngico, selección y preparación de sustratos, selección de soluciones nutritivas (HONRUBIA ET AL., 1994; PARLADÉ ET AL., 2004; PERA & PARLADÉ, 2005), y la presencia de otros microorganismos en la rizosfera (WALDER ET AL., 2012).

Las bacterias pueden favorecer la simbiosis micorrícica de dos formas (FREY-KLETT ET AL., 2007), ayudando a simbiosis micorrícica a tener lugar, o mejorando el porcentaje de micorrización una vez que la planta está micorrizada. En ambos casos nos referimos a ellas como bacterias facilitadoras de la micorrización (GARBAYE, 1994). Los mecanismos por los cuales las bacterias interactúan con los hongos implican estimulación del crecimiento micelial, el aumento de los puntos de contacto entre las raíces y el hongo, y la reducción de estrés ambiental en el micelio (BRULÉ ET AL., 2001; KURTH ET AL., 2013b). No obstante, la actividad de la bacteria puede ser también perjudicial en algunos casos (KATAOKA ET AL., 2009).

Muchos grupos y géneros de bacterias han sido reportados como bacterias facilitadoras para simbiosis endo- y ectomicorrícica (DUPONNOIS & PLENCHETTE, 2003). Entre las especies aisladas de ectomicorrizas, *Pseudomonas fluorescens* Migula es una de las más frecuentes (GARBAYE & BOWEN, 1989; GARBAYE ET AL., 1990). Además, varios estudios han confirmado que *P. fluorescens* generalmente mejora la simbiosis entre ectomicorrizas aumentando el número de raíces micorrícicas y raíces cortas totales (DUPONNOIS & GARBAYE, 1991; DUPONNOIS, 2006), y estimulando el crecimiento del hongo ectomicorrícico bajo condiciones experimentales (FREY-KLETT ET AL., 2007). Interesantemente, en el contexto de la domesticación de hongos ectomicorrícicos, un estudio informó de un significativo aumento en la colonización de las raíces de *Pinus halepensis* Mill por *Tuber melanosporum* bajo la presencia de *P. fluorescens* (DOMINGUEZ ET AL., 2012).

También es relevante para la viabilidad de la producción de planta micorrizada a gran escala, la capacidad de producir un gran número de plantas estériles preparadas para hospedar hongos ectomicorrícicos (DIEZ ET AL., 2000). La micropropagación de planta, es un método rápido que permita mejorar la calidad de la planta seleccionando un material vegetal óptimo y que además proporciona uniformidad genética. Una vez que se consigue un protocolo de producción *in vitro* con un genotipo de planta adecuado para micorrización, el coste de la planta puede ser reducido, creando así un sistema de inoculación productivo. Los buenos resultados obtenidos con las coinoculaciones de hongos ectomicorrícicos y bacterias facilitadoras, junto con las mejoras en los métodos de micropropagación de plantas, abren nuevas expectativas hacia la domesticación de valiosas especies de hongos ectomicorrícicos.

## 2. Objetivos

El objetivo de este estudio fue optimizar el protocolo para la síntesis micorrícica de *B. edulis* con vitroplantas de *C. ladanifer* evaluando los efectos cuantitativos y cualitativos de la coinoculación con la bacteria facilitadora *P. fluorescens*. Los objetivos específicos fueron (i) evaluar la influencia de *P. fluorescens* en la presencia de micorrizas (es decir, en el número de botes que contienen planta micorrizada) y en el nivel de micorrización de las vitroplantas de *C. ladanifer* inoculadas con *B. edulis* y (ii) evaluar la influencia del tiempo de cultivo del inoculo fúngico en la presencia y nivel de micorrización solo y en interacción con *P. fluorescens*.

## 3. Metodología

El protocolo de síntesis micorrícica consistió en un paso preliminar de aislamiento y crecimiento de cepas fúngicas, en paralelo con la propagación de vitroplantas de *C. ladanifer*. Este paso fue seguido de la preparación de inoculo bacteriano y finalmente la coinoculación de

las vitroplantas con la bacteria facilitadora en un sustrato colonizado por *B. edulis*. A continuación se proporciona una detallada descripción de los diferentes pasos.

### *Inoculo fúngico*

Se recolectaron carpóforos de *B. edulis* bajo matorrales de *C. ladanifer*. Los ejemplares recolectados eran inmaduros y no comidos o ramoneados por animales. Posteriormente, los ejemplares se guardaron en bolsas de polietileno para su transporte al laboratorio (HONRUBIA ET AL., 1994). Para realizar el aislamiento de cepas y obtener fragmentos de tejido estériles, se realizó un corte poco profundo a lo largo de la superficie del sombrero del hongo. Los aislamientos se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar en ambiente completamente estéril. Los fragmentos de tejido obtenidos en condiciones de asepsia se transfirieron a placas Petri que contenían medio nutritivo MMN (“Modified Melin-Norkrans”) (MARX, 1969) con pH 5,5 y se incubaron a 22-24°C en condiciones de oscuridad. El micelio fue transferido a placas frescas de MMN cada 10 días para asegurar su vitalidad y crecimiento. De acuerdo a MELLO ET AL. (2006), utilizamos primers ITS específicos para *B. edulis* con el fin de confirmar que el micelio utilizado pertenecía a dicha especie.

Como sustrato sólido de expansión, utilizamos una mezcla de turba y vermiculita humedecida con medio nutritivo MMN líquido a pH 5,5. El sustrato fue introducido en botes de vidrio, que fueron cubiertos y esterilizados. Una vez que los botes se enfriaron, fueron inoculados bajo condiciones de asepsia con *B. edulis*. Se utilizó una sola cepa de *B. edulis* en todo el experimento. Los botes inoculados fueron incubados a 22°C durante diferentes periodos de tiempo: 2, 3 o 4 meses dependiendo del ensayo, y con el fin de obtener un adecuado desarrollo del hongo en el suelo en un tiempo mínimo.

### *Inoculo bacteriano*

Se utilizó una sola cepa de *P. fluorescens* en el experimento. La cepa CECT 844 se seleccionó basándose en los buenos resultados obtenidos en la simbiosis micorrízica entre *T. melanosporum* y *P. halepensis* (DOMINGUEZ ET AL., 2012). La cepa fue suministrada por la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo), de la Universidad de Valencia. El inoculo bacteriano fue preparado suspendiendo *P. fluorescens* en un medio nutritivo de malta-glucosa. El medio nutritivo inoculado fue crecido a 22°C y agitado a 100 rpm. Después de un periodo de 48 h, el nivel de concentración bacteriana fue medido con una cámara Thoma, y resuspendido en agua estéril hasta conseguir una concentración de  $5 \cdot 10^8$  bacterias por mililitro.

### *Material vegetal*

El material vegetal fue recogido de matorrales de *C. ladanifer* productores de *B. edulis* en el norte de España. Se recogieron yemas apicales de un arbusto de *C. ladanifer* de cinco años de edad para establecer cultivo *in vitro*. Se introdujeron durante 20 minutos en una solución antioxidante (100mg/l ácido ascórbico y 150 mg/l ácido cítrico) para prevenir el marchitamiento (M'KADA ET AL., 1991). Posteriormente se desinfectaron introduciéndolas en 100% etanol durante 30 s, enjuagándolas con agua destilada estéril y por último desinfectándolas durante 30 min en 1,5% hipoclorito de sodio (NaClO) con unas gotas de detergente Tween 20®. Finalmente, fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril (MADESIS ET AL., 2011).

La propagación del material vegetal se llevó a cabo mediante el cultivo de las yemas apicales en medio de cultivo MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) suplementado con 0,88 mg/l bencilaminopurina, 30 g/l sacarosa, y 8 g/l agar. Las yemas fueron subcultivadas cada 4 semanas. El enraizamiento se llevó a cabo trasplantando los explantos del tercer subcultivo en medio MS suplementado con 0,49 µM de ácido indolbutírico. Las plantas fueron crecidas durante dos meses, hasta inoculación, a  $25 \pm 1$  °C bajo un fotoperiodo de 16 h.

### *Coinoculación fúngica y bacteriana*

Las vitroplantas de *C. ladanifer* se transfirieron a los botes de vidrio que contenían un sustrato de turba-vermiculita donde *B. edulis* había estado creciendo durante 2, 3 o 4 meses o a los botes no inoculados (control). Además, la mitad de los botes fueron inoculados con una dosis de  $5 \times 10^8$  bacterias/planta (BexPf). Posteriormente, las plantas fueron situadas aleatoriamente en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 h a  $25 \pm 1$  °C durante 5 meses.

#### *Diseño experimental*

El experimento siguió un diseño factorial aleatorio, con los siguientes tratamientos: (1) inoculación con *B. edulis* (Be) y (2) coinoculación de *B. edulis* y *P. fluorescens* CECT 844 (BexPf). Cada uno de los tipos de inoculación fue testado para tres tiempos de cultivo de micelio (2, 3, y 4 meses). Además se llevó a cabo un tratamiento control, utilizado para detectar cualquier contaminación potencial de otro hongo. Como resultado, se establecieron un total de 7 tratamientos. Se testaron 18 botes por tratamiento (126 botes), incluyendo cuatro plantas por bote. Por consiguiente, un total de 504 plantas fueron testadas.

#### *Evaluación de micorrizas*

Cinco meses después de la (co)inoculación, las plantas fueron cuidadosamente extraídas de los botes, y las raíces fueron limpiadas de acuerdo a la metodología establecida por FISCHER Y COLINAS (1997). El sistema radical de las plantas fue examinado con lupa binocular para confirmar la presencia de *B. edulis* (AGERER, 1991). Se utilizó como referencia la descripción hecha por ÁGUEDA ET AL. (2008) para confirmar la identificación de las micorrizas de *B. edulis*. Además, se llevó a cabo un análisis molecular para complementar y certificar con absoluta certeza los resultados visuales.

Los niveles de micorrización se estimaron contando el número total de ápices radiculares y aquellos que habían sido colonizados por *B. edulis*. El nivel de micorrización se estimó como el porcentaje del total de raíces que habían sido colonizadas por *B. edulis*.

#### *Análisis de datos*

Se eligió el bote como unidad experimental, dada su posible influencia en las plantas que contenía. Se utilizaron tests Chi-cuadrado para comparar la frecuencia de micorrización ente diferentes tratamientos. El promedio de micorrización se utilizó para evaluar el nivel de micorrización. Un análisis factorial de la varianza se llevó a cabo para evaluar la influencia del tiempo de cultivo y de la bacteria, así como sus interacciones. Los datos fueron sujetos a una transformación angular previa al análisis, y el modelo fue validado comprobando la normalidad y la homocedasteicidad de los residuales. Los valores medios de los niveles dentro de los factores se compararon mediante tests LSD de Fisher ( $P < 0,05$ ). Los controles sólo se utilizaron para verificar la ausencia de *B. edulis* o cualquier otro hongo micorrícico. Todos los análisis estadísticos fueron hechos con el software R versión 3.0.1. (2013).

## **4. Resultados**

La síntesis micorrícica entre *B. edulis* y *C. ladanifer* fue exitosa. Se formaron micorrizas en los dos tratamientos donde *B. edulis* había sido inoculado: en las plantas inoculadas exclusivamente con *B. edulis*, y en las plantas inoculadas con *B. edulis* y *P. fluorescens*, mostrando en este caso un aumento significativo en los niveles de micorrización. Las plantas control permanecieron sin micorrizar.

Las ectomicorrizas mostraron las características propias de Boletales, y se ajustaron a la descripción hecha por ÁGUEDA ET AL. (2008). Sin embargo, se apreciaron algunas diferencias en la coloración (amarronado) y el manto plectenquimatoso y los rizomorfos tuvieron hifas altamente diferenciadas.

## Presencia de micorrizas

Del total de 108 botes inoculados, 35 (32%) botes fueron micorrizados. Sin embargo, la coinoculación con bacteria no afectó significativamente la presencia de micorrizas ( $P=0,836$ ). De los dos grupos de 54 botes por cada tipo de inoculación, 18 (33%) fueron micorrizados en el tratamiento en el que se había inoculado solamente *B. edulis*, y 17 (31%) en el tratamiento en el que se había coinoculado *B. edulis* y *P. fluorescens*. Tampoco afectó el tiempo de cultivo de micelio a la presencia de micorrizas ( $P=0,743$ ). Un tiempo de cultivo del micelio de 2 meses proporcionó un 28% de éxito en la micorrización de botes inoculados, 36% a los 3 meses, y 33% a los 4 meses. No se detectó interacción entre la coinoculación con bacteria y el tiempo de cultivo del micelio ( $P=0,742$ ).

## Nivel de micorrización dentro de las plantas micorrizadas

Se confirmó una influencia positiva de la coinoculación con bacteria ( $P<0,001$ ) y un tiempo de cultivo de micelio prolongado (4 meses) ( $P=0,004$ ) en el nivel de micorrización. No se encontró interacción entre estos dos factores ( $P=0,57$ ). Para todos los tiempos de cultivo, los niveles de micorrización fueron doblados cuando se coinoculó con *P. fluorescens*. Los mejores resultados (23,5%) se consiguieron para las plantas cuyo micelio había crecido durante 4 meses y además fueron coinoculadas con *B. edulis* y *P. fluorescens*. El nivel de micorrización a los 4 meses de cultivo de micelio fue significativamente diferente a aquellos con 2 meses ( $P=0,01$ ) o 3 meses de cultivo ( $P<0,001$ ). No obstante, el nivel de micorrización entre 2 y 3 meses de cultivo de micelio no fue significativamente diferente ( $P=0,44$ ).

## 5. Discusión

Las micorrizas observadas en las plantas se contrastaron con las descritas por (ÁGUEDA ET AL., 2008), y se observaron diferencias en la coloración, siendo nuestras micorrizas más oscuras. Certificamos a través de técnicas moleculares que las micorrizas obtenidas fueron el resultado del aislamiento de *B. edulis* y no fueron producidas por un contaminante.

A pesar de conseguir la síntesis micorrícica, varias plantas no formaron micorrizas. Con respecto a la presencia de micorrizas no hubo diferencias significativas entre tratamientos. FREY-KLETT ET AL. (2007) aclaró las diferencias entre bacterias facilitadoras de la micorrización, cuando las bacterias influyen en la presencia de micorrizas, y cuando las bacterias mejoran el nivel de micorrización una vez que la planta es micorrizada. De este modo, en el contexto de nuestro estudio, *P. fluorescens* actúa como bacteria facilitadora incrementando el nivel de micorrización.

La competencia entre el hongo y la bacteria al colonizar el sustrato puede afectar el grado de formación de micorrizas (ASPRAY ET AL., 2006). Del mismo modo, BRULÉ ET AL. (2001) reportaron la dominancia de la bacteria sobre el hongo en un medio de cultivo rico y declararon que el éxito de la inoculación depende de la supervivencia del inoculo fúngico en el suelo durante la presimbiótica vida del hongo. Dado que *B. edulis* es un hongo micorrícico de crecimiento relativamente lento en condiciones saprófitas (OLAIZOLA, 2007), *P. fluorescens* y *B. edulis* pueden competir por nutrientes en un periodo presimbiótico, y consecuentemente, *B. edulis* puede no haberse beneficiado por la bacteria antes de la micorrización. KURTH ET AL. (2013) también sugirió que la competencia por recursos entre el hongo y la bacteria puede inhibir el desarrollo micorrícico. De este modo, el desarrollo de métodos para cuantificar la abundancia de bacterias y hongos, unos en presencia de otros, necesita mayor investigación.

Nuestros resultados mostraron que el tiempo de cultivo del micelio no afectó significativamente la presencia de micorriza. Este resultado puede deberse al lento crecimiento del micelio de *B. edulis*. OLAIZOLA (2007) estudió la tasa de crecimiento de 12 aislados de diferentes hongos micorrícicos bajo condiciones asépticas. Se observó que *B. edulis* fue uno de los aislados con menor tasa de crecimiento, significativamente inferior que *Lactarius deliciosus*

(L.) Gray, una especie cuyo micelio coloniza todo el sustrato después de un mínimo de dos meses bajo condiciones idóneas (PARLADÉ ET AL., 2004). Por lo que, considerando el lento crecimiento de *B. edulis*, los botes pueden no haber sido uniformemente colonizados por el micelio, disminuyendo las posibilidades de contacto entre el micelio y los ápices de la raíz, y por consiguiente el desarrollo de micorrizas.

Respecto al nivel de micorrización, ambos, tiempo y presencia de la bacteria tuvieron efectos significativos, pero no hubo interacción entre ellos. En nuestro experimento, el nivel de micorrización fue duplicado cuando se coinoculó con *B. edulis* y *P. fluorescens*. La importancia de la coinoculación con bacterias ha sido reportada en varios estudios donde la bacteria favorecía el desarrollo de micorrizas (GARBAYE & BOWEN, 1987; DE OLIVEIRA & GARBAYE, 1989; DUPONNOIS & PLENCHETTE, 2003). Resultados similares fueron obtenidos en estudios previos por DOMINGUEZ ET AL. (2012) que inoculó plántulas de *Pinus halepensis* con *P. fluorescens* cepa CECT 844 y *T. melanosporum*, obteniendo como resultado una duplicación en el nivel de micorrización del 15 al 28%, con respecto a la inoculación solamente con *T. melanosporum*. No obstante, nuestros resultados fueron inferiores a aquellos obtenidos por WU ET AL. (2012) que evaluó los efectos de coinocular *B. edulis* y la bacteria *Bacillus cereus* Frankland and Frankland en *Pinus thunbergii* Parl. También observaron un efecto positivo de la coinoculación con bacteria, incrementando los niveles de micorrización de 42% en las plantas inoculadas solamente con *B. edulis* a 62% en las plantas coinoculadas con *B. edulis* y bacteria. Sin embargo, este estudio no se llevó a cabo bajo condiciones *in vitro*, y no se proporcionó información sobre la micorrización de las plantas control. De este modo, a pesar de que el efecto positivo de la bacteria sigue siendo claro, se desconoce si se trata de *B. edulis* o de otra especie fúngica la que se benefició más de la presencia de la bacteria.

Los porcentajes relativamente bajos de micorrizas de *B. edulis* obtenidos en nuestro estudio (hasta el 23,5%) pueden ser debidos a los bajos niveles de expansión del micelio, potencialmente relacionados con varios factores. PARLADÉ ET AL. (2004) indicó que aunque el sustrato formado por turba/vermiculita sea el más adecuado para el crecimiento del inóculo vegetativo, puede sufrir desecación. En nuestro estudio, el filtro de celulosa que llevaban las tapas de los botes que contuvieron las plantas inoculadas para garantizar el intercambio de gases, pudo contribuir a la pérdida de humedad del sustrato. Esto pudo haber tenido a su vez un impacto negativo en la expansión del micelio. Otro factor importante relativo a la expansión del micelio es el tiempo de cultivo del mismo, ya que un crecimiento fúngico lento puede dar lugar a una calidad del inóculo no homogénea en los botes. También, después de largos periodos de cultivo del micelio, la disponibilidad de nutrientes desciende. En la medida en la que baja la disponibilidad de nutrientes, aumenta la capacidad de los hongos para formar micorrizas (REQUENA ET AL., 1996), por lo que se esperaría alcanzar mayores tasas de micorrización en periodos de cultivo de micelio más largos. En este sentido, se observó una correlación positiva entre el tiempo de cultivo y el nivel de micorrización en nuestro estudio, con el nivel más alto de micorrización adquirido a los 4 meses de cultivo de micelio. Con el fin de mejorar los niveles de micorrización, podría ser interesante explorar el tiempo de cultivo de micelio más allá de los 4 meses.

La obtención de micorrizas de *B. edulis* en plantas de *C. ladanifer* es un primer paso relevante hacia el logro de plantaciones comerciales para la producción temprana de carpóforos de *B. edulis*, especialmente en un momento en el que la producción natural de este hongo es probable que disminuya cada año como consecuencia de la sobreexplotación y falta de regulación de este recurso (SALERNI & PERINI, 2004). Desarrollar un protocolo eficiente para la micorrización controlada es vital para permitir el uso de una especie ectomicorrícica en selvicultura (GUERIN-LAGUETTE ET AL., 2000). Incorporar métodos de micorrización controlada en viveros forestales implica la combinación de hasta tres organismos diferentes: planta, hongo, y también bacteria (HONRUBIA ET AL., 1997). Los desafíos asociados a este incremento del nivel de complejidad necesitarán ser afrontados con el fin de obtener planta micorrizada a nivel comercial (PERA & PARLADÉ, 2005). Una vez dominada la producción de plantas micorrizadas, será necesario

desarrollar prácticas de manejo adecuadas, por ejemplo, micoselvicultura, para ayudar en la producción comercial de carpóforos (SAVOIE & LARGETEAU, 2011).

Un aspecto relevante de nuestro estudio es la producción y uso de plantas *in vitro* de *C. ladanifer*. Pocos estudios se han centrado en la micropropagación de Cistáceas hasta la fecha (M'KADA ET AL., 1991; MORTE & HONRUBIA, 1992; IRIONDO ET AL., 1995; PELA ET AL., 2000; MADESIS ET AL., 2011). Las técnicas de micropropagación no han sido aplicadas con anterioridad para *C. ladanifer* debido a su escaso valor económico y a su gran capacidad colonizadora en su hábitat natural. Sin embargo, dadas las dificultades de obtener plántulas axénicas a partir de semillas por frecuente contaminación (TALEI ET AL., 2011), así como a la reducción de la germinación y la viabilidad de las semillas cuando son fuertemente desinfectadas (SWEET & BOLTON, 1979), la producción de vitroplantas presenta algunas ventajas. Además mediante el uso de genotipos replicados, el cultivo *in vitro* permite controlar la variación genética de la planta huésped, lo que también permite influir en la micorrización (TAGU ET AL., 2001).

## 6. Conclusiones

La síntesis micorrícica entre *C. ladanifer* y *B. edulis* se logró con éxito a partir de una cepa de *B. edulis* recogida bajo arbustos de *C. ladanifer*. Los resultados obtenidos confirmaron los efectos beneficiosos de *P. fluorescens* en la mejora del nivel de micorrización comparado con la inoculación solamente con *B. edulis*. Un tiempo de cultivo del micelio más largo también mejoró el nivel de micorrización. El uso de vitroplantas de *C. ladanifer* puede permitir una producción más eficiente de plantas micorrizadas en comparación con el uso de semillas. Estos resultados nos acercan a la producción de plantas micorrícicas inoculadas con hongos económicamente valiosos para su uso forestal.

## 7. Agradecimientos

Este estudio fue parcialmente financiado por el proyecto de investigación VA206U13 (Junta de Castilla y León). Nos gustaría agradecer al Doctor Valentín Pando (Departamento de estadística, Universidad de Valladolid) por el apoyo estadístico y María Hernández Rodríguez (Doctora Ingeniera de Montes, Universidad de Valladolid) por ayudar a mejorar este documento.

## 8. Bibliografía

AGERER, R; 1991. Characterization of ectomycorrhiza. In: Techniques for the study of mycorrhiza. (Norris JR, Read DJ, Varma AK, eds.) Methods in. Academic Press, London. pp: 25–73.

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.

ASPRAY, TJ.; FREY-KLETT, P.; JONES, JE.; WHIPPS, JM.; GARBAYE, J.; BENDING, GD; 2006. Mycorrhization helper bacteria: a case of specificity for altering ectomycorrhiza architecture but not ectomycorrhiza formation. *Mycorrhiza* 16: 533–541.

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.; OLIACH, D.; FISCHER, CR.; MARTÍNEZ DE ARAGÓN, J.; COLINAS, C; 2009. Cultivation methods of the black truffle, the most profitable mediterranean non-wood forest product; a state of the art review. In: Modeling, valuing and managing Mediterranean forests ecosystems for non-timber goods and services. (Palahí M, Birot Y, Bravo F, Gorrioz E, eds.) EFI Proceedings. pp: 57–71.

BRULÉ, C.; FREY-KLETT, P.; PIERRAT, JC.; COURRIER, S.; GÉRARD, F.; LEMOINE, MC.; ROUSSELET, JL.; SOMMER, G.; GARBAYE, J; 2001. Survival in the soil of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* and the effects of a mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biol Biochem* 33: 1683–1694.

CANNON, PF.; KIRK, PM; 2007. Fungal Families of the World. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK.

CATCHESIDE, PS.; CATCHESIDE, DEA; 2012. *Boletus edulis* ( *Boletaceae* ), a new record for Australia. *J Adelaide Bot Gard* 25: 5–10.

DÍAZ-BALTEIRO, L.; ÁLVAREZ-NIETO, A.; ORIA-DE-RUEDA, JA; 2003. Integración de la producción fúngica en la gestión forestal. Aplicación al monte «Urcido» (Zamora). *Invest Agrar Sist Recur For* 12: 5–19.

DIEZ, J.; MANJÓNA, JL.; KOVÁCS, GM.; CELESTINO, C.; TORIBIO, M; 2000. Mycorrhization of vitroplants raised from somatic embryos of cork oak (*Quercus suber* L.). *Appl Soil Ecol* 15: 119–123.

DOMINGUEZ, JA.; MARTIN, A.; ANRIQUEZ, A.; ALBANESI, A; 2012. The combined effects of *Pseudomonas fluorescens* and *Tuber melanosporum* on the quality of *Pinus halepensis* seedlings. *Mycorrhiza* 22: 429–436.

DUPONNOIS, R.; GARBAYE, J; 1991. Mycorrhization helper bacteria associated with the Douglas fir-*Laccaria laccata* symbiosis : effects in aseptic and in glasshouse conditions. *Ann Sci* 48: 239–251.

DUPONNOIS, R.; PLENCHETTE, C; 2003. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza* 13: 85–91.

DUPONNOIS, R; 2006. Bacteria Helping Mycorrhiza Development. In: Soil Biology. (Mukerji KG, Manoharachary J, eds.) Vol. 7. Springer- Verlag Berlin Heidelberg.

FISCHER, C.; COLINAS, C; 1997. Propuesta de metodología para la certificación de planta de *Quercus ilex* inoculada con *Tuber melanosporum* para la aplicación comercial. Soria.

FREY-KLETT, P.; GARBAYE, J.; TARKKA, M; 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytol* 176: 22–36.

GARBAYE, J.; BOWEN, GD; 1987. Effect of different microflora on the success of mycorrhizal inoculation of *Pinus radiata*. *Can J For Researc* 17: 941–943.

GARBAYE, J.; BOWEN, GD; 1989. Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytol* 112: 383–388.

GARBAYE, J.; DUPONNOIS, R.; WAHL, JL; 1990. The bacteria associated with *Laccaria laccata* ectomycorrhizas or sporocarps: effect of symbiosis establishment on Douglas fir. *Symbiosis* 9: 267–273.

GARBAYE, J; 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol* 128: 197–210.

GUERIN-LAGUETTE, A.; PLASSARD, C.; MOUSAIN, D; 2000. Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented



fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Can J Microbiol* 46: 790–799.

HALL, I. R.; LYON, A. J. E.; SINCLAIR, L.; 1998. Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies. *Boletus edulis*. *Econ Bot* 52: 44–56.

HONRUBIA, M.; DÍAZ, G.; GUTIÉRREZ, A.; 1997. Micorrización controlada de *Pinus halepensis* en vivero en función del tipo de inóculo y técnicas de cultivo. In: I Congreso Forestal Hispano Luso. Pamplona. pp: 301–306.

HONRUBIA, M.; TORRES, P.; DIAZ, G.; MORTE, A.; 1994. Biotecnología forestal: Técnicas de micorrización y micropropagación de plantas.

IRIONDO, J. M.; MORENO, C.; PÉREZ, C.; 1995. Micropropagation of Six Rockrose (*Cistus*) Species. *HortScience* 30: 1080–1081.

KATAOKA, R.; TANIGUCHI, T.; FUTAI, K.; 2009. Fungal selectivity of two mycorrhiza helper bacteria on five mycorrhizal fungi associated with *Pinus thunbergii*. *World J Microbiol Biotechnol* 25: 1815–1819.

KURTH, F.; ZEITLER, K.; FELDHAHN, L.; NEU, T. R.; WEBER, T.; KRIŠTÚFEK, V.; WUBET, T.; HERRMANN, S.; BUSCOT, F.; TARKKA, M. T.; 2013a. Detection and quantification of a mycorrhization helper bacterium and a mycorrhizal fungus in plant-soil microcosms at different levels of complexity. *BMC Microbiol* 13: 205.

KURTH, V. J.; FRANSIOLI, N.; FULÉ, P. Z.; HART, S. C.; GEHRING, C. A.; 2013b. Stand-replacing wildfires alter the community structure of wood-inhabiting fungi in southwestern ponderosa pine forests of the USA. *Fungal Ecol* 6: 192–204.

M'KADA, J.; DORION, N.; BIGOT, C.; 1991. In vitro propagation of *Cistus × purpureus* Lam. *Sci Hortic (Amsterdam)* 46: 155–160.

MADESIS, P.; KONSTANTINIDOU, E.; TSAFTARIS, A.; NIANIOU-OBEIDAT, I.; 2011. Micropropagation and shoot regeneration of *Cistus creticus* ssp. *Creticus*. *J Appl Pharm Sci* 1: 54–58.

MARTÍN-PINTO, P.; VAQUERIZO, H.; PEÑALVER, F.; OLAIZOLA, J.; ORIA-DE-RUEDA, J. A.; 2006. Early effects of a wildfire on the diversity and production of fungal communities in Mediterranean vegetation types dominated by *Cistus ladanifer* and *Pinus pinaster* in Spain. *For Ecol Manage* 225: 296–305.

MARX, D.; 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.

MELLO, A.; GHIGNONE, S.; VIZZINI, A.; SECHI, C.; RUIU, P.; BONFANTE, P.; 2006. ITS primers for the identification of marketable boletes. *J Biotechnol* 121: 318–329.

MORTE, A.; HONRUBIA, M.; 1992. In vitro propagation of *Helianthemum almeriense* Pau (Cistaceae). *Agronomie* 12: 807–809.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.; 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473–479.

OLAIZOLA, J; 2007. Selección de hongos ectomicorrícicos comestibles para su utilización en el control biológico del Damping-off causado por *Fusarium oxysporum* Schlecht y *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

DE OLIVEIRA, VL.; GARBAYE, J; 1989. Les microorganismes auxiliaires de l'établissement des symbioses ectomycorrhiziennes. *Eur J For Pathol* 19: 54–64.

OLIVIER, JM.; GUINBERTEAU, J.; RONDET, J.; MAMOUN, M; 1997. Vers l'inoculation contrôlée des cèpes et bolets comestibles? *Rev Fr* 49: 222–234.

ORIA-DE-RUEDA, JA.; MARTIN-PINTO, P.; OLAIZOLA, J; 2005. *Boletus edulis* production in xerophilic and pirophitic shrubs of *Cistus ladanifer* and *Halimium lasianthum* in western Spain. In: IV International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms.

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

PARLADÉ, J.; PERA, J.; LUQUE, J; 2004. Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza*: 171–176.

PELA, Z.; PENCHEVA, M.; GERASOPOULOS, D.; MALOUPA, E; 2000. In vitro induction of adventitious roots and proliferation of *Cistus creticus creticus* plants. *Acta Hort* 541: 518–524.

PERA, J.; PARLADÉ, J.; 2005. Inoculación controlada con hongos ectomicorrícicos en la producción de planta destinada a repoblaciones forestales : estado actual en España. *Invest Agrar Sist Recur For* 14: 419–433.

REQUENA, N.; JEFFRIES, P.; BAREA, JM; 1996. Assessment of natural mycorrhizal potential in a desertified semiarid ecosystem. *Appl Environ Microbiol* 62: 842–847.

SALERNI, E.; PERINI, C; 2004. Experimental study for increasing productivity of *Boletus edulis* s.l. in Italy. *For Ecol Manage* 201: 161–170.

SAVOIE, JM.; LARGETEAU, ML; 2011. Production of edible mushrooms in forests: Trends in development of a mycosilviculture. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 971–979.

SITTA, N.; FLORIANI, M; 2008. Nationalization and globalization trends in the wild mushroom commerce of Italy with emphasis on Porcini (*Boletus edulis* and allied species). *Econ Bot* 62: 307–322.

SWEET, HC.; BOLTON, WE; 1979. The surface decontamination of seeds to produce axenic seedlings. *Amer J Bot* 66: 692–698.

TAGU, D.; FAIVRE RAMPANT, P.; LAPEYRIE, F.; FREY-KLETT, P.; VION, P.; VILLAR, M; 2001. Variation in the ability to form ectomycorrhizas in the F1 progeny of an interspecific poplar (*Populus spp.*) cross. *Mycorrhiza* 10: 237–240.

TALEI, D.; SAAD, MS.; YUSOP, MK.; KADIR, MA.; VALDIANI, A; 2011. Effect of different surface sterilizers on seed germination and contamination of king of bitters (*Andrographis paniculata* Nees.). *Am J Agric Environ Sci* 10: 639–643.

WALDER, F.; NIEMANN, H.; NATARAJAN, M.; LEHMANN, MF.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A; 2012. Mycorrhizal Networks: common goods of plants shared under unequal terms of trade. *Plant Physiol* 159: 789–797.

Wu, XQ.; HOU, LL.; SHENG, JM.; REN, JH.; ZHENG, L.; CHEN, D.; YE, JR; 2012. Effects of ectomycorrhizal fungus *Boletus edulis* and mycorrhiza helper *Bacillus cereus* on the growth and nutrient uptake by *Pinus thunbergii*. *Biol Fertil Soils* 48: 385–391.