



Vicerrectorado de Internacionalización
y Postgrado
Universidad de Oviedo



Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Uso del hongo micorrízico *Scleroderma citrinum* Pers. En la recuperación de zonas degradadas por metales pesados

Miguel Ángel Coto Madrid
Oviedo, 21 de Julio de 2015

Máster en Biotecnología Aplicada a la Conservación y
Gestión Sostenible de Recursos Vegetales

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Uso del hongo micorrícico *Scleroderma citrinum* Pers. En la
recuperación de zonas degradadas por metales pesados**

**Use of mycorrhizal fungi *Scleroderma citrinum* Pers. in the
recovery of areas degraded by heavy metals**

Miguel Ángel Coto Madrid

Elena Fernández-Miranda Cagigal

Abelardo Casares Sánchez



RESUMEN

En el Principado de Asturias existen muchas zonas con suelos degradados, dado su carácter industrial y minero. Éstos terrenos, suelen contener niveles de metales pesados tan altos que comprometen su restauración para otros fines y es necesaria una actuación en los suelos mediante técnicas de ingeniería civil que permita una contención/recuperación (muy costosas y agresivas con el entorno).

Numerosos trabajos de biorremediación están demostrando que la revegetación con planta micorrizada puede postularse como una opción válida, barata y respetuosa.

En este trabajo se recolectaron dos aislamientos del hongo *Scleroderma citrinum* establecido en Nitrastur en zonas con altos niveles de contaminación.

Se recogieron muestras de carpóforos (setas) y de raíces de *Betula celtiberica* micorrizadas y se aisló el hongo desde ambas fuentes de inóculo además de realizarse técnicas macroscópicas e histológicas (como el morfotipado de la raíz para una correcta identificación del hongo y la tinción con azul de algodón y azul de toluidina en cortes de 10 a 30 micras para observar puntas de raíz micorrizada), todo ello para obtener una fuente de inóculo libre de contaminantes y en cultivo puro de los dos aislamientos.

Quedó demostrado, mediante el estudio de la capacidad de crecimiento de los dos aislamientos en diferentes medios de cultivo, que tenían diferentes tasas de crecimiento y diferentes patrones de desarrollo mediante el estudio del área por análisis de imagen y el estudio de los puntos de inflexión

Se produjo micorrización in vitro de *Betula celtiberica* con los dos aislamientos y se confirmó mediante el estudio de las características macro y microscópicas citadas anteriormente.

La aparición de primordios de carpóforos nos hizo realizar un estudio somero.

Una correcta identificación de los dos aislamientos resulta crucial para poder compararlas, por lo que se realizó un estudio filogenético y se confirmó que ambos aislamientos eran *Scleroderma citrinum*.

ABSTRACT

In Asturias there are many areas with degraded soils, given its industrial and mining character. These sites often contain heavy metals levels so high that undertake restoration for other purposes and a performance in soils by civil engineering techniques (very expensive techniques and aggressive with the environment) that allow for containment / recovery is required

Numerous studies are showing that bioremediation replanting with mycorrhizal plants can run as a valid, inexpensive and friendly option.

In this study, two strains of the fungus *Scleroderma citrinum* Pers. established in areas with high pollution levels were collected in Nitrastur.

Carpophores samples (mushrooms) and *Betula celtiberica* mycorrhizal roots were collected and the fungus was isolated from both sources of inoculum addition to macroscopic and histological techniques performed (as the study of morphotypes in roots for proper identification of the fungus and blue staining cotton and toluidine blue cuts 10 to 30 microns to observe mycorrhizal root tips), all to obtain a source of inoculum free from contaminants and pure culture of the two strains.

It was demonstrated by studying the growth capacity of the two strains in different culturing media, which had different growth rates and different development patterns by studying the area by image analysis and study of the turning points

In vitro mycorrhization of *Betula celtiberica* it occurred with both strains and confirmed by the study of macro and microscopic features mentioned above.

The appearance of primordia of fruiting bodies we did make a cursory study.

Proper identification of the two strains is crucial for comparison, so a phylogenetic study was conducted and it was confirmed that both strains were *Scleroderma citrinum*.



AGRADECIMIENTOS

Y ha llegado el final.... Gracias a todas esas personas que me han apoyado o ayudado en la realización de este proyecto. ¡Muchas gracias!

En primer lugar a Abelardo Casares por su ayuda, y por adentrarme gracias a ti y casi sin quererlo en el mundo de la investigación.

Elena!! Que sería de mí en este proyecto sin tu ayuda. Siempre dispuesta a ayudarme y a enseñarme cosas, y soportándome ahí al lado, que no es poco. Gracias por los “yo sola!”, “upiiii!”, y tantos momentos divertidos que nadie entiende. Y sobre todo por creer en mí. Me dijiste que soy tan cabezota como tú, así que no me queda más remedio que seguir tu ejemplo.... Cuentas con mi apoyo para todo siempre. ;)

A Luz y Álvaro (o Álvaro y Luz para que no se peleen). Por aguantarnos mutuamente durante todo el máster (Kiwi group!!!) y durante tantas horas de laboratorio, cafés, y risas.

A los integrantes del “grupo oscuro” en whatsapp, por todas esas críticas constructivas que nos hacemos los unos a los otros, jaja.

A todos los compañeros del Máster que me llevo ya como amigos. Por las cenas, escapadas nocturnas y dramas de gente con “moño”.

A Sara, Marcos, Víctor, Marta, Mauro, Sara “zoo”, gracias a todos, por hacerme sentir como uno más día a día en el laboratorio.
Gracias a toda la gente del laboratorio que me lo hicieron todo más fácil (Pilar, “Henry” ...).

A Busto, por todas las ofertas de trabajo, de becas, de cursos... ¡de todo! Por escucharme todos los quebraderos de cabeza, por tantos helados de chocolate y por tanto apoyo a cambio de bien poco.

A mi familia y amigos, y en general a todos los que se preocuparon por mí y soportaron mi inestabilidad emocional perpetua, les aburrí, me aguantaron, me apoyaron y se agobiaron conmigo.

¡Gracias!

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIC	Criterio de Akaike
BAF	Biotina-Aneurina-Ácido Fólico Agar
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
dH ₂ O	Agua destilada
dNTP	Desoxinucleotido Trifosfato
IDEPA	Instituto de desarrollo económico del Principado de Asturias
INDUROT	Instituto de Recursos Naturales y Ordenación del Territorio
ITS	Internal Transcribed Spacer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MCMC	Markov chain Monte Carlo
MFM	Medio Fries
MMN	Medio Melin Norkans
MS	Medio Murashige y Skoog
N-J	Neighbor-Joining
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PNOA©	Plan Nacional de Ortofotografía Aérea
PGO	Plan General de Ordenación
SADEI	Sociedad Asturiana de estudios económicos e industriales
SCR	<i>Scleroderma citrinum</i> aislado a partir de raíces micorrizadas
SCS	<i>Scleroderma citrinum</i> aislado a partir del carpóforo (seta)
UTM	Universal Transversal de Mercator
½ MS	Medio Murashige y Skoog modificado (la mitad de macros y calcio)

Índice

1. Introducción	1
1.1 Antecedentes y situación actual en el Principado de Asturias	1
1.2 Nitrastur	1
1.3 La simbiosis micorrícica	2
1.4 <i>Scleroderma</i>	3
1.5 Planteamientos y objetivos	4
2. Material y métodos	5
2.1 Recogida de muestras	5
2.2.1 Aislamiento fúngico a partir de carpóforo	5
2.2.2 Aislamiento fúngico a partir de ectomicorrizas	6
2.3.1 Extracción de ADN genómico	6
2.3.2 Amplificación y análisis de regiones ITS	6
2.3.3 Análisis filogenético	8
2.4 Capacidad de crecimiento de dos aislamientos de <i>S. citrinum</i> en diferentes medios de cultivo	9
2.5 Síntesis de micorrizas in vitro	11
2.6 Descripción macroscópica y microscópica de los primordios	11
2.7 Instalación en campo de <i>Betula celtiberica</i>	12
2.8 Tratamiento estadístico	13
3. Resultados	14
3.1 Aislamiento fúngico a partir de carpóforo	14
3.2.1 Descripción macroscópica y microscópica de las micorrizas	14
3.2.2 Aislamiento fúngico a partir de ectomicorrizas	16
3.3 Análisis filogenético	16
3.4 Capacidad de crecimiento de dos aislamientos de <i>S. citrinum</i> en diferentes medios de cultivo	19
3.5 Síntesis de micorrizas in vitro	21
3.6 Descripción macroscópica y microscópica de primordios de carpóforo	21
3.7 Plantación de <i>Betula celtiberica</i>	22

4. Discusión	23
5. Conclusiones	26
6. Bibliografía.....	27

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes y situación actual en el Principado de Asturias

El intenso pasado minero (carbón y minería metálica) e industrial (química, siderúrgica y metalúrgica) de Asturias, hace que existan numerosas zonas con suelos contaminados. Según estimaciones del IDEPA, existe una superficie de 15.093.376 m² de suelos industriales (SADEI, 2013). De ellos, según el último cálculo recogido por el Principado de Asturias, existen 268.700 m² contaminados, lo que representa casi el 3% de la superficie del Principado. Estos emplazamientos se encuentran aislados o incluidos en el tejido urbano, por lo que resulta de suma importancia la recuperación de estos suelos.

Las técnicas que actualmente se utilizan para la restauración de estas zonas y eliminación de contaminantes son la excavación y almacenamiento de suelos, así como el lavado y la separación física o química de los contaminantes. Técnicas con altos riesgos de manipulación, y con altos costes. Por tanto, se hace necesario el desarrollo de nuevas técnicas más económicas, seguras e inocuas como puede ser la fito y micorremediación, que consiste en la utilización de plantas y hongos, por separado o conjuntamente mediante el establecimiento de las asociaciones micorrícicas, que sean capaces de acumular o tolerar altas concentraciones de metales permitiendo la reforestación de estas áreas.

1.2. Nitrastur

Las antiguas instalaciones de Nitrastur están situadas en La Felguera (Fig. 1), en el Concejo de Langreo. La extensión de las instalaciones es de 67.000 m² según la Revisión Parcial del Plan General de Ordenación (PGO), del Municipio de Langreo.



Fig.1: Ortofoto general de la localización de Nitrastur. PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias).

La inauguración de las instalaciones data de 1954, año en el que se ponen en marcha, dedicándose a la elaboración de amoníaco, ácido nítrico, ácido sulfúrico, nitrato amónico y nuevos fertilizantes para cultivos, bajo la denominación de Sociedad Ibérica del Nitrógeno y más tarde de Nitratos Asturianos (Nitrastur). Poco antes del cierre fue absorbido por Explosivos Riotinto, dedicándose únicamente a la fabricación de pólvora y explosivos hasta su cierre en 1997.

A lo largo de todos los años en los que existió actividad industrial, se produjeron una serie de ampliaciones, utilizándose rellenos de origen antrópico constituidos por residuos industriales (siderúrgicos, mineros y de la propia factoría). En la actualidad, tanto por la acción productiva de la empresa, como por los sucesivos rellenos (según el “Inventario y caracterización de suelos contaminados” del Principado de Asturias de 2001) se estima que los rellenos forman parte de más de la mitad de la superficie total de las instalaciones, con un espesor de 4 a 5 metros, lo que hace que el conjunto de las instalaciones se encuentre altamente contaminado.

1.3. La Simbiosis micorrícica

El término micorriza fue acuñado por el botánico alemán Albert Bernard Frank en 1885, y define las relaciones simbióticas o mutualistas, entre el micelio de un hongo (mycos), y las raíces (rhizos) de una planta, en la que ambos organismos se benefician y trabajan activamente. Brundrett (2004) redefine el término micorriza como asociaciones simbióticas esenciales para una o ambas partes, entre un hongo (especializado) y una raíz (u otro órgano de contacto con el sustrato) de una planta viva, y que son las principales responsables de la transferencia de nutrientes. Esta definición se basa en características de desarrollo y funcionales que distinguen y unifican a las micorrizas (Brundrett, 2009). Actualmente se reconocen hasta 5 tipos de micorrizas diferenciados entre sí por su morfología y la taxonomía de los simbioses implicados (Brundrett, 2004): Micorrizas arbusculares, Ectomicorrizas, Ericoides, Orquidioides y Subepidermicas.

Esta simbiosis proporciona beneficios a la planta joven y adulta, especialmente incrementando la superficie de absorción de agua y nutrientes del sistema radicular (Bowen, 1973; Harley, 1989; Harley y Smith, 1983). A cambio, la planta proporciona al hongo sus requerimientos de energía (Jackson y Mason, 1984). Además, el micelio extra radical puede conectar a varias plantas formando una red subterránea de transporte de agua y nutrientes entre diferentes plantas de la comunidad vegetal (Simard et al., 2002). Esta relación, por tanto tiene una gran importancia en la supervivencia y crecimiento de especies con alto interés forestal y debe considerarse para evaluar la calidad del sistema radicular de las plantas en reforestación y para predecir el éxito del trasplante (Landis et al., 1989). Las micorrizas no adquieren su importancia únicamente por su efecto sobre el simbionte arbóreo sino también desde un punto de vista ecológico, ya que los hongos ectomicorrícicos establecen complejas relaciones con otros microorganismos (Ingham y Molina, 1991) y pueden afectar al establecimiento, estructura, composición y dinámica de las comunidades vegetales (Molina et al., 1991). Los hongos formadores de ectomicorrizas forman parte principalmente de la subdivisión Basidiomycota (*Amanita*, *Boletus*, *Scleroderma*) y Ascomycota (*Balsamia* sp., *Tuber* sp., etc.), e incluyen muchas especies comunes en los bosques (Trappe, 1962; Miller, 1983).

De todas ellas cabe destacar a las ectomicorrizas debido a su gran importancia ecológica y económica, son un componente esencial de la mayoría de las comunidades forestales, ya que las especies arbóreas dominantes en bosques templados, en regiones alpinas y boreales, muchos bosques mediterráneos y en grandes áreas tropicales y subtropicales poseen este tipo de asociaciones (Tedersoo et al., 2009), encontrándose en familias como Betulaceae, Fagaceae, Salicaceae, Ulmaceae o Pinaceae, todas ellas con interés agroforestal (Marx y Cordell, 1989).

En ectomicorrizas, el proceso de simbiosis comienza en raíces laterales cortas, formándose sobre ellas un manto constituido por un entramado de hifas; además, se produce una estructura interna en entre las células de la raíz, denominado red de Hartig (siendo epidérmica si la extensión solo se limitan a éstas células, o cortical si llega a discurrir por células del córtex) (Fig. 2).

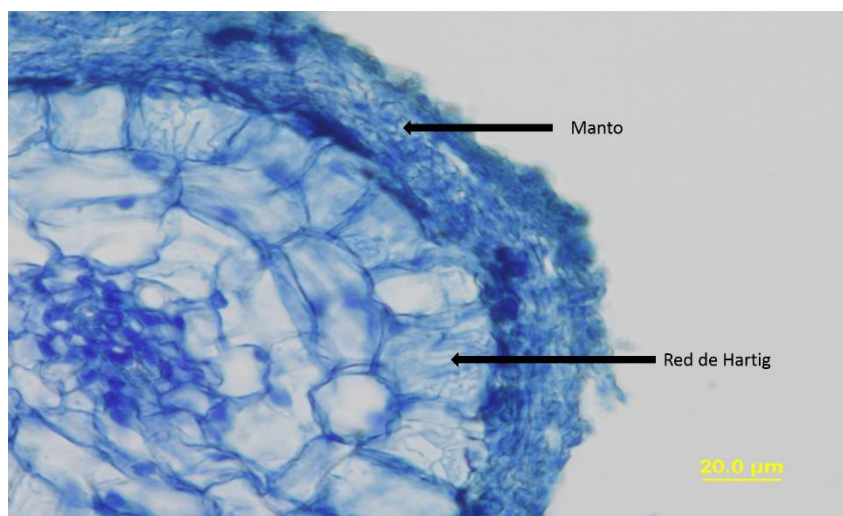


Fig. 2: Corte transversal de raíz de *Betula celtiberica* micorrizada con *Paxillus cuprinus* (Fernández-Miranda, 2014).

1.4. *Scleroderma*

Scleroderma citrinum Pers. es un hongo que produce esporocarpos macroscópicos entre la hojarasca, hierba o sobre suelo desnudo adyacente a áreas boscosas (Jeffries, 1999). Su carpóforo es de tamaño variable; se pueden encontrar ejemplares desarrollados de 3 cm de diámetro y otros a su lado de más de 10, de forma generalmente esférica o globosa, pero un tanto imperfecta, pues a veces se aplana en la zona apical. Superficie externa de color amarillo cítrico mate u ocre amarillento. Posee un peridio bastante grueso, hasta 3 mm de ancho, de color pálido, recubierto externamente por escamas amarillentas remarcadas que tienden a volverse ocre con la edad y la desecación, de consistencia dura y algo elástica. Se abre por el ápice para liberar las esporas producidas en la gleba. Pie prácticamente inexistente, se une al sustrato por una serie de cordones miceliares que a veces parecen un pseudoestípite (Fig. 3).



Fig. 3: *Scleroderma citrinum* (Fernández-Miranda, 2014).

Gleba blancuzca o rosada al principio, pronto se vuelve gris y luego negruzca con la maduración de las esporas. Es de consistencia dura de joven, luego pulverulenta. No comestible y su olor es penetrante y desagradable.

El género *Scleroderma* aparece descrito como un hongo abundante en la colonización de individuos juveniles y de etapas tempranas en la sucesión (Mason *et al.*, 1983) y en terrenos alterados como escombreras de minería, es un colonizador primario (Newton, 1992). Éstas características pueden ser debidas a su capacidad para generar rizomorfos que le permiten explorar porciones del substrato alejadas (Agerer 2001), y por tanto, favorecer una alta propagación y una rápida colonización en sistemas radiculares en plantas (Jeffries, 1999).

1.5. Planteamiento y objetivos

En base a la problemática expuesta, el objetivo general que planteamos en este trabajo fin de Máster fue el aislamiento del hongo micorrícico *S. citrinum* en zonas contaminadas por metales pesados, su producción como fuente de inóculo, su identificación molecular e histológica así como el desarrollo y optimización de las técnicas de micorrización controlada.

Para la consecución del trabajo Fin de Máster se abordarán los siguientes **objetivos**:

- Aislamiento de diferentes aislamientos del hongo a partir de carpóforos y raíces micorrizadas y obtención de inóculo en cultivo puro.
- Confirmación de la identidad de los aislamientos asociados a *Betula celtiberica* mediante el análisis filogenético de las secuencias ITS (*Internal Transcribed Spacer*).
- Estudio del crecimiento de los aislamientos aislados en diferentes medios de cultivo y estudio del patrón de crecimiento.
- Micorrización *in vitro* de *B. celtiberica* y plantación en campo (El Terronal).

2. MATERIAL Y METODOS

2.1 Recogida de muestras.

Se recogieron carpóforos de *S.citrinum* en las inmediaciones de un pie de *Betula celtiberica* de 4 metros de longitud (Fig. 4), a 3 metros de la base del mismo, no habiendo pies de otros géneros en las inmediaciones. Del mismo pie, se procedió a la recogida de raíces micorrizadas que asumimos se trataban del mismo hongo (dado que es el único carpóforo encontrado en las inmediaciones y el morfotipo era el mismo), obteniéndose raíces laterales derivadas de la raíz principal a unos dos metros de la base.



Fig. 4.: Ortofoto de las coordenadas de recogida de muestras en la localización de Nitrastur. PNOA © del Instituto Geográfico Nacional de España - (Principado de Asturias).

Se realizó un estudio de los morfotipos (que consiste en la descripción detallada de las características morfológicas, anatómicas y citológicas de las distintas micorrizas (Agerer, 2001; Kranabetter y Friesen, 2002), utilizando fichas identificativas (Anexo 1; Fernández-Miranda, 2014) basadas en la metodología de Agerer (1990) y Goodman et al. (1996). La recogida de muestras se realizó en bolsas de plástico y se trasladaron al laboratorio.

2.2.1 Aislamiento fúngico a partir de carpóforo

El aislamiento de esta especie en cultivo puro se realizó a partir de los tejidos internos de la zona central de la gleba no expuestos al exterior, en un ambiente estéril trabajando en cámara de flujo laminar. El medio de cultivo utilizado fue el MS (Murashige y Skoog, 1962), (Tabla 3) (pH 5,6), que se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20

minutos y que posteriormente se dispensó en placas Petri (90 x 15 mm), unos 15 ml por placa en cámara de flujo laminar, manteniendo las condiciones de asepsia. Los fragmentos de tejido fúngico se transfieren a las placas Petri con el medio de cultivo y se incubaron a 23 °C en oscuridad. Se revisaron periódicamente las placas eliminando los cultivos que presenten signos de contaminación. Transcurrido un mes de cultivo, aquellos hongos que hayan crecido se repican, transfiriendo pequeños fragmentos de micelio del borde de la colonia a placas Petri en medio fresco.

2.2.2 Aislamiento fúngico a partir de ectomicorrizas

Se realizó un tratamiento previo de limpieza en la raíz para eliminar la mayor cantidad de tierra adherida posible. Para ello, se lavaron con abundante agua en agitación, porciones seleccionadas de raíz. Posteriormente, con ayuda de una lupa NIKON® modelo SMZ-U, lanceta y bisturí, obtuvimos ápices de raíz micorrizados que se mantuvieron en condiciones húmedas hasta su posterior asepsia.

Una vez obtenida una cantidad suficiente de micorrizas y trabajando en condiciones estériles en cámara de flujo laminar, se procede a realizar el protocolo de asepsia descrito por Erland y Söderstrom (1990). Para ello, se realizó en primer lugar un lavado en H₂O destilada estéril y posteriormente en H₂O estéril con Twin80® al 0,2%. Seguidamente se sumergieron las micorrizas en H₂O₂ al 30% durante 20 segundos y se aclararon con H₂O destilada. El medio de cultivo MS se elaboró de igual manera que la descrita en la tabla 3, pero antes de su solidificación, se añadió la siguiente combinación de antibióticos con actividad anti bacteriana y fúngica: Benomilo (4 mg/l) + ácido nalidíxico (20 mg/l) + Vancomicina (100 µg/ml).

Finalmente colocamos de 3 a 5 micorrizas por placa Petri, en un total de 10, y se conservan en cámara de cultivo en oscuridad y temperatura constante de 23 °C.

2.3.1 Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico, se homogeneizaron muestras de micelio obtenidas en cultivo puro de cada uno de los aislamientos de *S.citrinum* (SCS para el aislamiento a partir de carpóforo y SCR para el aislamiento a partir de raíz), con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido sin romper en ningún momento la cadena de frío. El ADN se extrajo mediante el kit DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, siguiendo el protocolo de extracción para SCS de Fernández-Miranda (2014) y para SCR de Pérez et al. (2015). La cantidad y calidad de ADN genómico extraído se evaluó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa (1% y 0,5 µg/ml de bromuro de etidio) empleando un sistema Gel Logic 100 (KODAK®) y el programa informático KODAK 1D Image Analysis.

2.3.2 Amplificación y análisis de regiones ITS

Para la identificación de los dos aislamientos del hongo *S.citrinum*, se amplificó la región ITS constituida por ITS 1, ITS 2 y el 5.8S rRNA utilizando las parejas de cebadores ITS 1 e ITS 4 (Tabla 1).

Tabla 1: Cebadores utilizados en la amplificación de la región ITS mediante PCR, con sus respectivas secuencias de bases y la procedencia de los mismos. F y R indican los cebadores forward y reverse respectivamente.

Región	Cebador	ITS	Secuencia (5´-3´)	Referencia.
ITS	ITS 1	F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> (1990)
	ITS 4	R	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

Se realizaron amplificaciones en reacciones de 25 µL siguiendo el protocolo de Hedh *et al.* 2008 de volumen final con 10 ng de ADN, 2,5 µl de 10x PCR buffer (2 mM Bioline), 1 µl de MgCl₂ (50 mM Bioline), 0,5 µl dNTPs (10 mM BioLabs), 0,5 µl de cada cebador (10 µM IDT) y 0,1 µl de Taq polimerasa (Bioline 5u/µl). Las reacciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min, seguido de una desnaturalización a 95 °C durante 40 s, anillamiento a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 1,50 min durante 30 ciclos, terminando el proceso con una fase de extensión final a 72 °C durante 7 min. Como no se logró una amplificación de la banda, se realizó una Re-PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente con 2 µl del producto anterior. En el caso de no conseguir ningún tipo de amplificación con el protocolo anterior de PCR, se utilizó el descrito por Hedh *et al.* (2008). Las amplificaciones en este protocolo se realizaron en reacciones de 20 µL de volumen final con 10 ng de ADN, 2 µl de 10x PCR buffer (2 mM Bioline), 0,8 µl de MgCl₂ (50 mM Bioline), 0,4 µl dNTPs (10 mM BioLabs), 0,4 µl de cada cebador (10 µM IDT) y 0,08 µl de Taq polimerasa (Bioline 5u/µl). Las reacciones de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 7 min, seguido de una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, anillamiento a 50 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 2,30 min durante 35 ciclos, terminando el proceso con una fase de extensión final a 72 °C durante 7 min. En caso de no obtener la amplificación se realizó una Re-PCR con las mismas condiciones que las descritas anteriormente.

Posteriormente se llevó a cabo una purificación del producto de PCR resultante, mediante el kit NucleoSpin® Gel and PCR *Clean-Up* de Macherey-Nagel siguiendo el protocolo del fabricante. La secuenciación de las regiones amplificadas se llevó a cabo a través de un servicio externo, Stab Vida, utilizando los mismos cebadores usados en la amplificación y bajo condiciones de terminación BigDye™. Posteriormente la lectura se realizó en un secuenciador automático ABI 3730 XL y utilizando el sistema LongTrac, también a través de la misma empresa.

Las secuencias *forward* y *reverse*, fueron analizadas, corregidas las indeterminaciones y alineadas mediante el programa Geneious Pro 7.1.3., generando una secuencia consenso de mayor calidad. Las ambigüedades presentes en las secuencias fueron sustituidas por los símbolos del código internacional de la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Por último, se hizo un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Con las secuencias consenso utilizando las secuencias disponibles en el GenBank (NCBI, Altschul *et al.*, 1997) para identificarlas provisionalmente antes de los análisis filogenéticos.

2.3.3 Análisis filogenético

Todas las secuencias del GenBank utilizadas para el análisis filogenético se encuentran en la tabla 2, señalando ubicación geográfica, posible hospedador y autor.

Tabla 2: Listado de secuencias utilizadas para el análisis filogenético.

Scleroderma					
Especie	ID Espécimen	ID GenBank	Ubicación geográfica	Hospedador	Autor
<i>S. areolatum</i>	JMP0080	EU819438	Wisconsin, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	Palmer et al., 2008
<i>S. bermudense</i>	BZ3961	EU718118	¿?	¿?	Wilson et al., 2008 Sin publicar
<i>S. bovista</i>	RT00034	EU819517	Wisconsin, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	Palmer et al., 2008
<i>S. cepa</i>	RBG Kew K(M)54373	EU784412	¿?	¿?	Brock et al., 2009
<i>S. citrinum</i>	AWW212	EU718119	Norte América	¿?	Wilson et al., 2012
		FJ824090	Ohio, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	Bauman, 2010
	F:PRL5772	GQ166907	Indiana, EEUU	<i>Quercus</i> sp.	Avis et al., 2009
	CITSCL_1	FM213344	Wisconsin, EEUU	¿?	Sin publicar Phosri et al., 2009
	CITSCL_2	FM213345	Wisconsin, EEUU	¿?	“
	ScL_1-3-1H	JX030202	New York, USA	<i>Castanea dentata</i>	Tourtellot, 2012 Sin publicar
	ScL_2-2-1H	JX030205	New York, USA	<i>Tsuga canadensis</i>	“
	ecmSC2	JX679368	Ceske Budejovice, República Checa	<i>Quercus</i> sp.	Kavkova et al., 2012 Sin publicar
<i>S. columnare</i>	KHS3	AB459512	Chachoengsao, Tailandia	<i>Dipterocarpus alatus</i>	Yomyart et al., 2008 Sin publicar
<i>S. dictyosporum</i>	IR109	FJ840442	Burkina Faso	<i>Afzelia africana</i>	Sanon et al., 2009
<i>S. meridionale</i>	05MCF5505	HF933239	Bogdanci, Macedonia	<i>Carpinetum orientalis</i>	Rusevska et al., 2014
<i>S. michiganense</i>	E00278311	EU819441	Wisconsin, EEUU	<i>Castanea dentata</i>	Palmer et al., 2008
<i>S. polyrhizum</i>	E00278315	FM213349	Wisconsin, EEUU	¿?	Phosri et al., 2009
<i>S. septentrionale</i>	SEPSCL3	FM213338	Wisconsin, EEUU	¿?	“
<i>S. sinnamariense</i>	SINSCL9	FM213364	Muang, Tailandia	¿?	Martin et al., 2008
<i>S. verrucosum</i>	RBG Kew K(M)30670	EU784415	¿?	¿?	Brock et al., 2009
<i>S. xanthochroum</i>	AWW254	EU718126	Sudeste asiatico	¿?	Wilson et al., 2011
Grupo Externo					
<i>Astraeus odoratus</i>	ASTRAE-58	AJ629874	Roi Et, Tailandia	¿?	Phosri et al., 2007

Las secuencias se alinearon utilizando el programa de alineamiento múltiple MUSCLE v3.7 (Edgar, 2004). Los alineamientos obtenidos se corrigieron de forma manual utilizando el programa MEGA versión 5.2 (Tamura *et al.*, 2011), mediante el método de Máxima Probabilidad (Maximum Likelihood (ML)) y con el programa MrBayes v3.2.2. (Ronquist *et al.*, 2012) para el cálculo de la inferencia Bayesiana.

El modelo evolutivo se seleccionó utilizando el programa jModelTest-2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012), siguiendo el criterio de Akaike (AIC (Akaike, 1974)), resultando el mejor modelo el HKY + G (Hasegawa-Kishiro-Yano (Hasegawa *et al.*, 1985), junto con el parámetro de la distribución gamma,G).

Para el análisis de ML se realizó una búsqueda exhaustiva del mejor árbol filogenético entre 10.000 aleatorizaciones de las muestras realizadas mediante “*bootstrap*”. Para el cálculo de la inferencia bayesiana se ejecutó un *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) con cuatro cadenas simultáneas. El número total de generaciones analizadas fue de 1.000.000 de manera que la razón de verosimilitud fue inferior a 0,01. Se muestreó cada 1000 generaciones, mostrando la razón de verosimilitud cada 5000. Se han descartado el 25% de los primeros árboles generados como *burn-in*, calculando la probabilidad posterior con los restantes. La visualización de los árboles obtenidos se llevó a cabo mediante el software FigTree v1.4.1.

2.4 Capacidad de crecimiento de dos aislamientos de *S. citrinum* en diferentes medios de cultivo.

Tradicionalmente se ha utilizado el diámetro de la colonia fúngica para cuantificar su crecimiento en un medio de cultivo. Este sistema puede dar lugar a errores, ya que no todas las colonias presentan un crecimiento diametralmente homogéneo. Para resolver este problema se diseñó una rutina específica en el programa informático de análisis de imágenes ImageJ® 1.47v, que permitió evaluar de forma automática, independientemente de su simetría, el área de crecimiento de cada colonia a partir de imágenes digitalizada (Fig. 5).

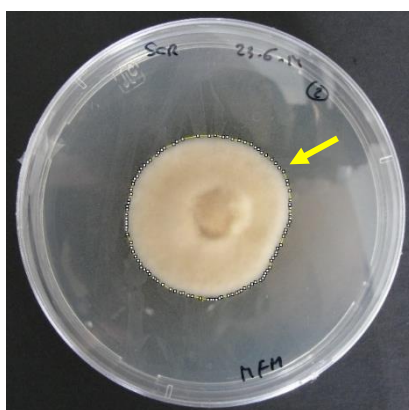


Fig. 5.: Fotografía de una colonia de *S. citrinum* cuantificada por análisis de imagen a los 15 días de cultivo. La flecha indica el contorno de la colonia analizado por el programa y utilizado para la cuantificación.

Se valoró la capacidad de crecimiento de cada uno de los aislamientos de *S. citrinum* en 5 medios de cultivo que difieren considerablemente en contenido mineral, fuentes de carbono y vitaminas (Tabla 3). Para ello, a partir de cultivos puros de los dos aislamientos de *S. citrinum* (SCR y SCS) establecidos en medio MS y conservados en

oscuridad a 23 °C, se procedió a sembrar placas Petri con los medios de cultivo mostrados en la Tabla 3 y a pH de 5,6: MMN (Marx, 1969), BAF (Moser, 1960), MFM (Danell, 1994), MS y MS modificado, reduciendo el contenido en calcio y macronutrientes a la mitad (1/2 MS).

Tabla 3. Composición de los medios de cultivo utilizados para el cultivo de los hongos ectomicorrícicos.

	MMN	MS	MFM	BAF	½ MS
MACRONUTRIENTES	g/L				
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05	0,44	0,026	0,1	0,22
NaCl	0,025		0,02		
KH ₂ PO ₄	0,5	0,17	0,2	0,5	0,085
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,25				
NH ₄ NO ₃		1,65			0,825
NH ₄ Cl			0,58		
KNO ₃		1,9			
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,15	0,37	0,1	0,5	0,185
MICRONUTRIENTES	mg/L				
MnSO ₄ .H ₂ O		16,9	0,85	5,6	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O		8,6	1,435	1	8,6
MnCl ₂ .2H ₂ O					
CuCl ₂ .2H ₂ O					
KI		0,83	0,375		0,83
H ₃ BO ₃		6,2	0,315		6,2
CoCl ₂ .6H ₂ O		0,025	0,0125		0,025
NaMo ₄ .2H ₂ O		0,25	0,0125		0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O		0,025	0,0125		0,025
HIERRO					
Cl ₃ Fe .7H ₂ O	10		10	100	
FeSO ₄ .7H ₂ O		2,785			2,785
VITAMINAS Y AC. ORGÁNICOS	mg/L				
Tiamina	0,05	0,1	0,1	0,05	0,1
Biotina			0,025	1 10 ⁻³	
Myo-inositol		10	10	0,05	10
Piridoxina		0,05	1		0,05
Ac. Nicotínico		0,05			0,05
Glicina		2			2
Riboflavina			1		
Nicotinamida			1		
Ac. P-Aminobenzoico			1		
Ac. Pantoténico			1		
Ac. Succínico			590		
Ac. Fólico				0,1	
PRODUCTOS COMPLEJOS	g/L				
Extracto de malta	3				
Extracto de levadura				0,2	
Peptona				2	
AZUCARES	g/L				
Glucosa	10		2,2	30	
Maltosa					
Sacarosa		30			30
Fructosa			2		
AGAR	15	15	15	15	15

Los medios de cultivo se realizaron de forma análoga a procedimientos de esterilización explicados en apartados anteriores. Con ayuda de un sacabocados de 1 cm de diámetro, se tomaron fragmentos del borde de la colonia y se colocaron en las placas Petri con los 5 medios de cultivo fresco. Se sembraron 10 placas por cada medio de cultivo de cada uno de los aislamientos, que se incubaron a 23 °C en oscuridad. En este caso se evaluó semanalmente el área de cada colonia mediante análisis de imagen hasta un total de 5 semanas, para así poder ver las diferencias entre los medios y calcular las curvas y velocidades de crecimiento para cada uno de ellos.

2.5 Síntesis de micorrizas *in vitro*

Como fuente de inóculo se han utilizado los dos aislamientos de *S.citrinum*. En este sistema de producción de inóculo se han empleado tarros de 500 ml rellenos de 250 ml de una mezcla de turba-substrato inorgánico poroso en la proporción 1:10 y 150 ml de medio de cultivo MS a un pH inicial de 5,6.

Para la mezcla de turba-substrato inorgánico poroso, utilizamos turba TSK®1, sin abonar y tamizada hasta conseguir una granulometría de entre 2 y 3 mm. Como substrato inorgánico poroso utilizamos Vermiculita o Perlita tamizada con idéntica granulometría que la turba.

Para la micorrización *in vitro* se empleó el sistema de micorrización en tarro sobre medio de cultivo en substrato ensayándose 60 inoculaciones de *S. citrinum* en abedul (la mitad de los ensayos para SCR y el resto para SCS). Se utilizaron frascos de cultivo de 250 ml rellenos de 150 ml de una mezcla de turba-substrato inorgánico poroso en la proporción 1:10 (v: v) y 75 ml de medio de cultivo MS a un pH inicial de 5,6. Para la mezcla de turba-substrato inorgánico poroso, utilizamos turba sin abonar TSK®1 tamizada hasta conseguir una granulometría de entre 2 y 3 mm. Como substrato inorgánico poroso se utilizó Vermiculita o Perlita tamizada con idéntica granulometría que la turba. La inoculación se realizó transfiriendo en condiciones asépticas, 5 discos de micelio de 1 cm de diámetro a cada tarro. El crecimiento fúngico se realizó a 23 °C en oscuridad. Cuando se observa crecimiento del hongo en el sustrato, se introducen abedules procedentes de una cadena de micropropagación y se cultivan a una temperatura de 23 °C y bajo un fotoperiodo de 16 horas durante un mes.

Una vez obtenidas las ectomicorrizas, la descripción macroscópica y microscópica se realiza siguiendo la misma metodología descrita anteriormente.

2.6 Descripción macroscópica y microscópica de los primordios

Durante la síntesis de micorrizas en tarro, se encontró la aparición de pequeñas estructuras en formación que podrían tratarse de primordios de carpóforos, por lo que se decidió la inclusión del estudio de esta estructura y se realizó una somera descripción macroscópica de la misma y una posterior descripción microscópica.

Para la descripción microscópica se realizaron cortes de entre 10 - 30 µm de espesor con un criostato Leica modelo CM1510-1. Parte de estos cortes se tiñeron colocándolos directamente en un portaobjetos sobre unas gotas de azul de algodón al 0,05% en lactoglicerol (ácido láctico, glicerina, dH₂O; en proporción 1:1:1 (V/V)), y otra parte dejándolos en azul de toluidina al 0,2% durante 20 minutos, para posteriormente lavarlos con lactoglicerol. Para la observación microscópica de estos últimos, los cortes se montaron con lactoglicerol.

2.7 Instalación en campo de *Betula celtiberica*

Los abedules inoculados se aclimataron para su posterior instalación en campo, en la localización del Terronal, Mieres. (Fig. 6).



Fig. 6. A: Antiguas instalaciones de El Terronal, **B:** Parcela dónde se plantaron los abedules

La aclimatación de las plantas micorrizadas se realiza en túnel de niebla controlando la temperatura y reduciendo paulatinamente la humedad relativa hasta alcanzar el 65%. Tras 7 días en el túnel de niebla, se retiran y se las transfiere a macetas de 32 alveolos tipo libro (volumen de 175 cm³) añadiendo tierra y substrato poroso inorgánico humedecido y en la misma proporción a la realizada anteriormente. Se mantienen durante 3 semanas más hasta su posterior traslado a campo (Fig. 7).

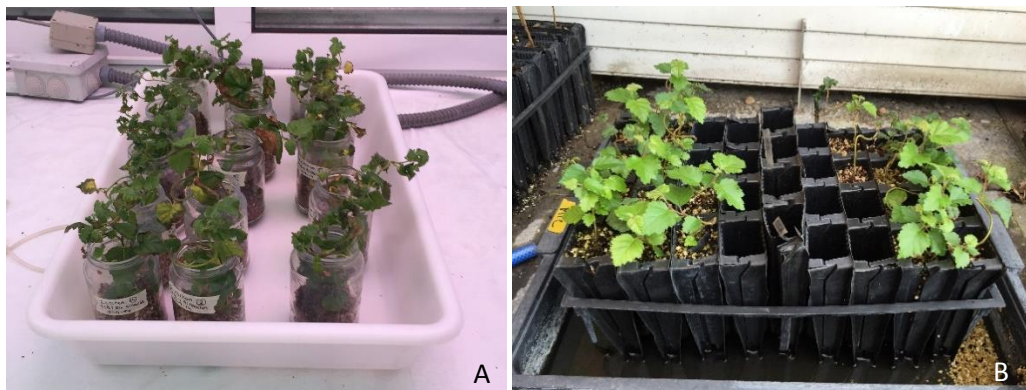


Fig.7: A: Aclimatación de *Betula* en túnel de niebla **B:** Plantas dispuestas en alveolos preparadas para trasladarse a campo.

2.8 Tratamiento estadístico

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS versión 19.0. Para determinar si los datos son normales se realizó el test no paramétrico Kruskal-Wallis. Para comprobar la homocedasticidad se realizó el test no paramétrico Levene. En este caso dado que cumplían los criterios de normalidad y homocedasticidad, los resultados se examinaron aplicando un análisis de varianza (ANOVA) y como Test a posteriori se utilizó la prueba DMS equivalente a varias pruebas t individuales entre todos los pares de grupos para un nivel de significación del 95% ($P = 0,05$).

Para el cálculo de la cinética de crecimiento se calculó la ecuación de la recta y su pendiente. Los puntos de inflexión se calculan mediante la derivación de las ecuaciones de la recta.

3. Resultados

3.1 Aislamiento fúngico a partir de carpóforo

Si atendemos a las características macroscópicas del aislamiento; el micelio es blanquecino, que torna a anaranjado pálido con el tiempo y aspecto algodonado. De crecimiento regular y relativamente lento una vez en cultivo puro (Fig. 8).

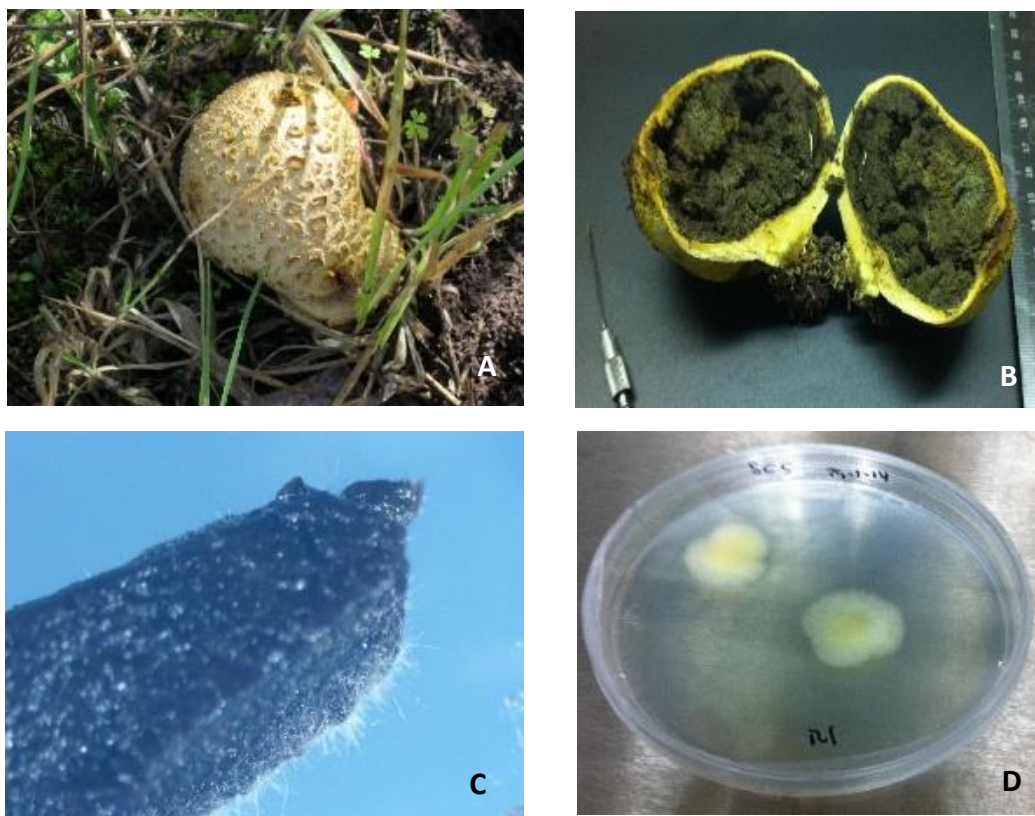


Fig 8: **A:** *S. citrinum* en campo, **B:** *S.citrinum* seccionada en laboratorio, **C:** Detalle de tejido del interior de la gleba en medio de cultivo y crecimiento activo de hifas, **D:** Cultivo puro del aislamiento *S. citrinum* a partir del carpóforo.

3.2.1 Descripción Macroscópica y microscópica de las micorrizas

Se analizaron las raíces micorrizadas y se identificó un único morfotipo por su estructura monopial pinnada con tendencia a monopodial piramidal, solitarias o agrupadas, con puntas derechas en micorrizas juveniles pasando a tortuosas. Longitud del sistema $4,63 \pm 0,44$ mm, longitud de la punta $2,23 \pm 0,21$ mm, ancho de la punta $0,62 \pm 0,05$ mm, ancho del eje mayor $0,58 \pm 0,04$ mm, ancho de la base de la punta $0,35 \pm 0,02$ mm. Puntas derechas en las juveniles pasando a ser tortuosas. De color blanco mate, presentan una textura aterciopelada (Fig. 9).

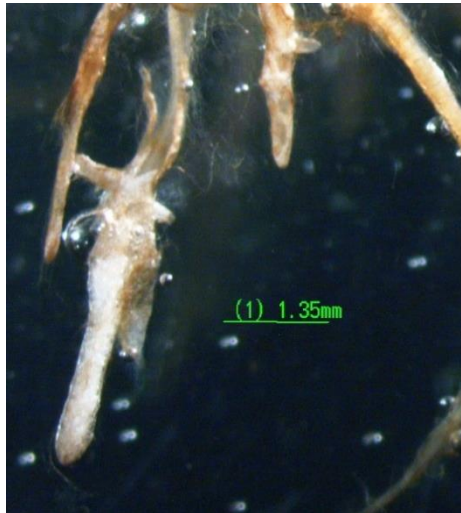


Fig 9. Micorriza en *Betula celtiberica*

El análisis microscópico describe una estructura del manto sin apenas hifas emergentes aunque abundante micelio alrededor, las existentes son tortuosas y verrugosas. El manto espesor ($50,94 \pm 3,63 \mu\text{m}$), está estructurado en 2 capas: una primera capa de pseudoparénquima en estructura de red ($30,70 \pm 2,41 \mu\text{m}$) y una segunda de pseudoparénquima irregular ($19,03 \pm 1,38 \mu\text{m}$). La longitud media de la hifa es de $47,95 \pm 8,47 \mu\text{m}$ y con abundantes fíbulas. Presentan una muy desarrollada red de Hartig que se extiende hasta la tercera capa de células corticales (Fig. 10).

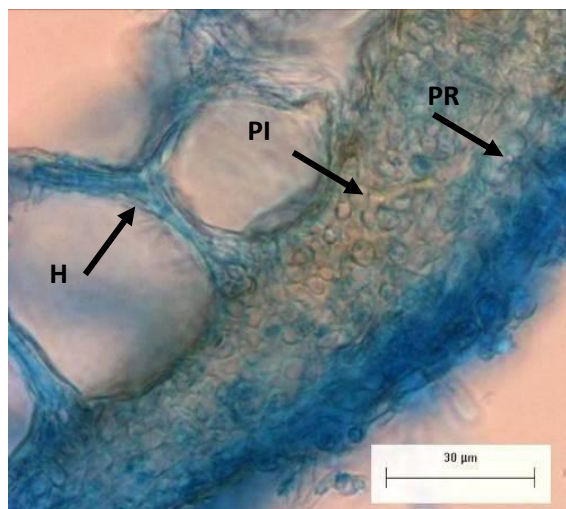


Fig 10: Corte transversal teñido con azul de algodón. H indica red de Hartig, PR indica pseudoparénquima en estructura de red, PI indica pseudoparénquima irregular.

3.2.2 Aislamiento fúngico a partir de ectomicorrizas

El aislamiento a partir de raíces de *Betula celtiberica* presentó las mismas características morfológicas de aislamiento que SCS.



Fig. 11. Aislamiento fúngico de *S.citrinum* a partir de ectomicorriza.

3.3 Análisis filogenético

Los resultados obtenidos del análisis de las secuencias completas del ITS, tanto mediante los métodos de máxima probabilidad (Fig.12) con el cálculo de la inferencia bayesiana (Fig.13), ubican a los dos aislamientos como *S. citrinum*.

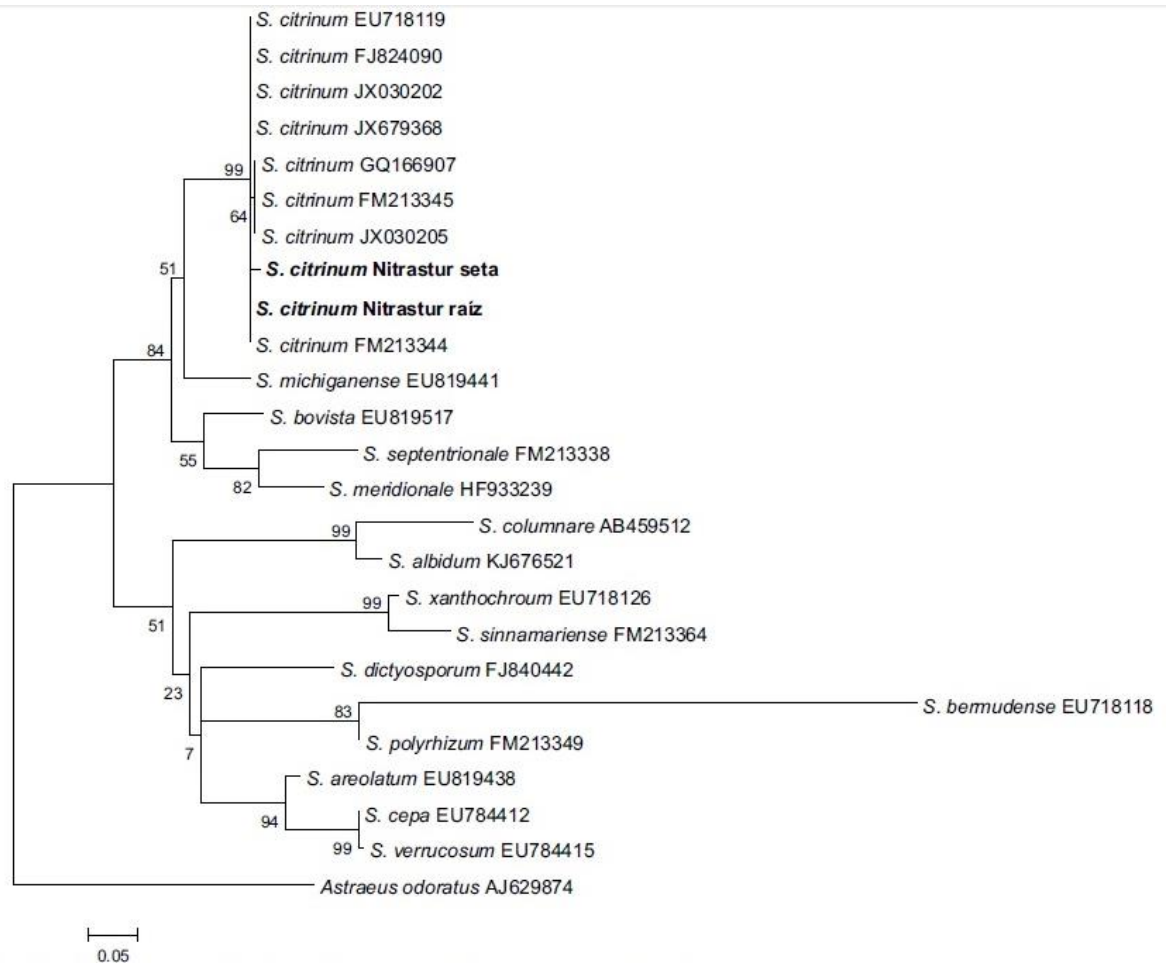


Figura 12. Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Scleroderma* mediante ML. Grupo externo *Astraeus odoratus*. Solo se indican los valores de bootstrap superiores al 50%.

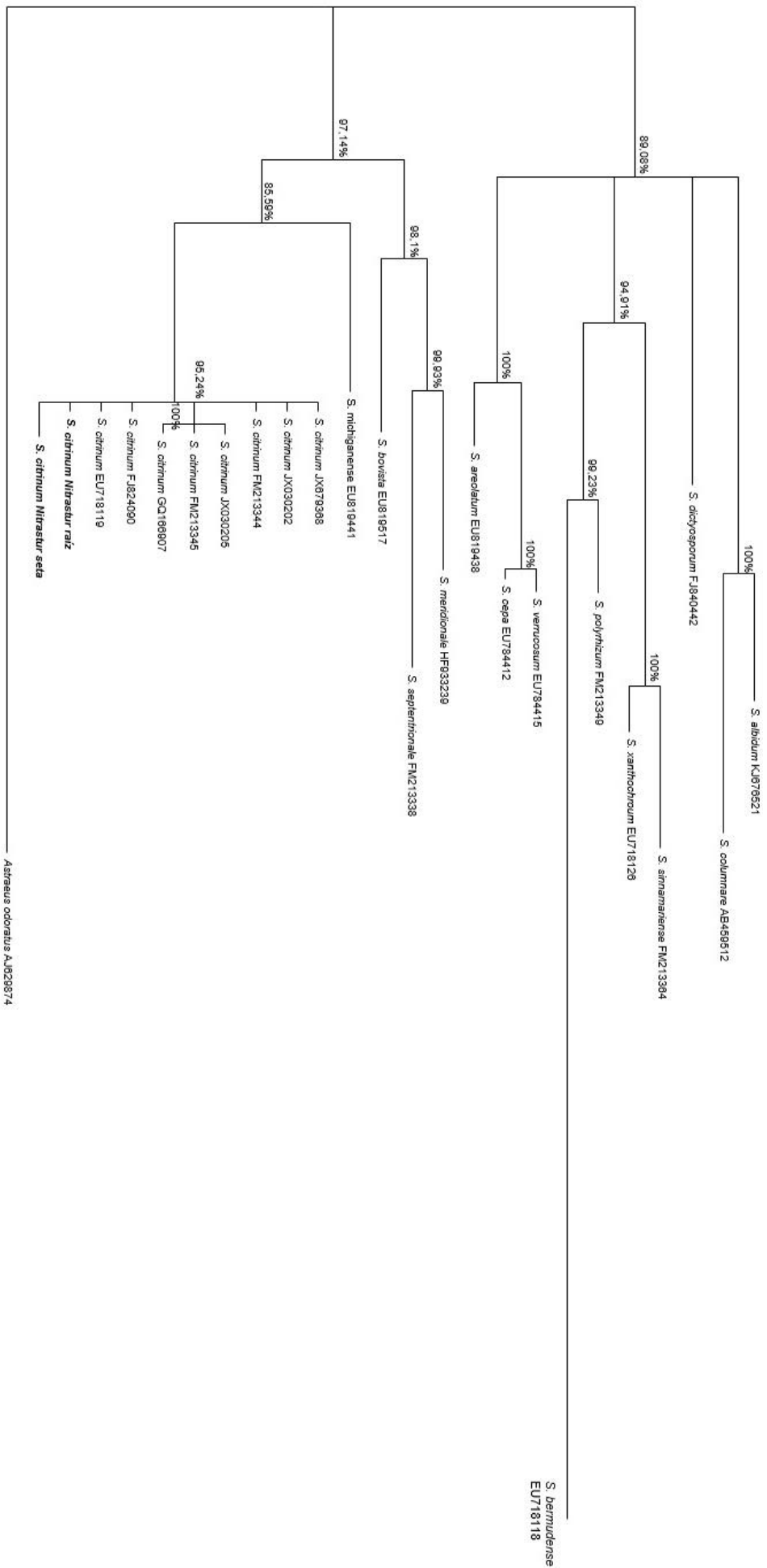


Fig. 13. Árbol derivado del análisis de secuencias ITS de muestras de *Sclerotinia* mediante Inferencia Bayesiana. Grupo externo *Astraeus odoratus*. Solo se indican los valores de probabilidad posterior bayesiana superiores al 50%.

3.4 Capacidad de crecimiento de diferentes aislamientos de *S. citrinum* en diferentes medios de cultivo

El análisis de imagen mediante el programa ImageJ® permitió evaluar independientemente de su simetría, el área de crecimiento de cada colonia a partir de imágenes digitalizadas poniendo de manifiesto la importancia que tiene en un determinado hongo, la elección del medio de cultivo adecuado. (Fig. 14).

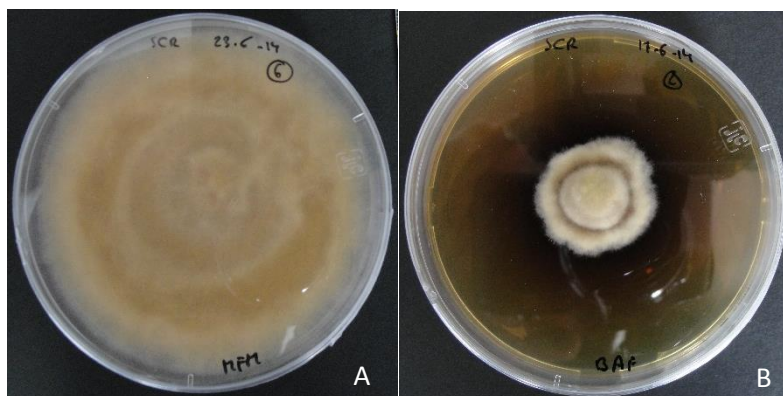


Fig. 14: Diferencia de crecimiento de SCR en medio A: MFM y B: BAF

Para conocer el comportamiento de los dos aislamientos de *S. citrinum*, se realizó el ensayo de 5 medios de cultivo durante 5 semanas, buscando semanalmente si existían diferencias significativas en el crecimiento de un mismo aislamiento en los diferentes medios en los que se mantuvo el cultivo. (Tabla 4).

Tabla 4. Medias \pm error estándar de las áreas de los dos aislamientos de *S. citrinum* expresada en cm^2 , durante 5 semanas. Letras iguales dentro de cada columna indican que no hay diferencia significativas entre medios de cultivo a un nivel $P=0,05$. (Test de mínimas diferencias significativas, DMS).

<i>S. citrinum</i> raiz					
MEDIOS DE CULTIVO	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5
MMN	3,19 \pm 0,393 ab	10,90 \pm 1,007 d	21,37 \pm 1,031 d	27,60 \pm 2,718 c	27,74 \pm 3,264 c
MS	6,79 \pm 0,607 c	16,77 \pm 1,180 a	28,77 \pm 1,504 e	38,20 \pm 4,893 a	46,56 \pm 5,555 e
BAF	1,40 \pm 0,037 b	1,66 \pm 0,088 b	3,29 \pm 0,205 b	5,54 \pm 0,673 b	8,58 \pm 1,027 b
MFM	6,94 \pm 1,161 c	29,07 \pm 4,439 c	56,74 \pm 0 c	56,74 \pm 0 c	56,74 \pm 0 a
½ MS	4,06 \pm 0,589 a	19,76 \pm 1,614 a	34,55 \pm 1,780 a	44,90 \pm 2,678 a	53,97 \pm 1,347 ae

<i>S. citrinum</i> carpóforo					
MEDIOS DE CULTIVO	SEMANA 1	SEMANA 2	SEMANA 3	SEMANA 4	SEMANA 5
MMN	1,16 \pm 0,048 b	1,64 \pm 0,134 b	3,12 \pm 0,302 b	5,74 \pm 0,598 b	8,89 \pm 0,944 b
MS	2,01 \pm 0,086 c	3,63 \pm 0,296 c	6,78 \pm 0,639 a	11,37 \pm 0,916 a	19,66 \pm 1,256 a
BAF	1,40 \pm 0,096 a	1,57 \pm 0,111 b	2,37 \pm 0,195 b	3,761 \pm 0,28 b	5,86 \pm 0,486 b
MFM	1,28 \pm 0,062 b	2,74 \pm 0,213 a	6,15 \pm 0,547 a	11,79 \pm 1,006 a	17,63 \pm 1,519 a
½ MS	1,57 \pm 0,656 a	2,85 \pm 0,147 a	6,30 \pm 0,416 a	11,60 \pm 0,954 a	18,64 \pm 1,703 a

A partir de estos datos se realizaron las curvas de crecimiento de los dos aislamientos en cada uno de los medios para ver la evolución del crecimiento y poder calcular la regresión, la pendiente de la recta y la velocidad de crecimiento semanal. (Fig. 15).

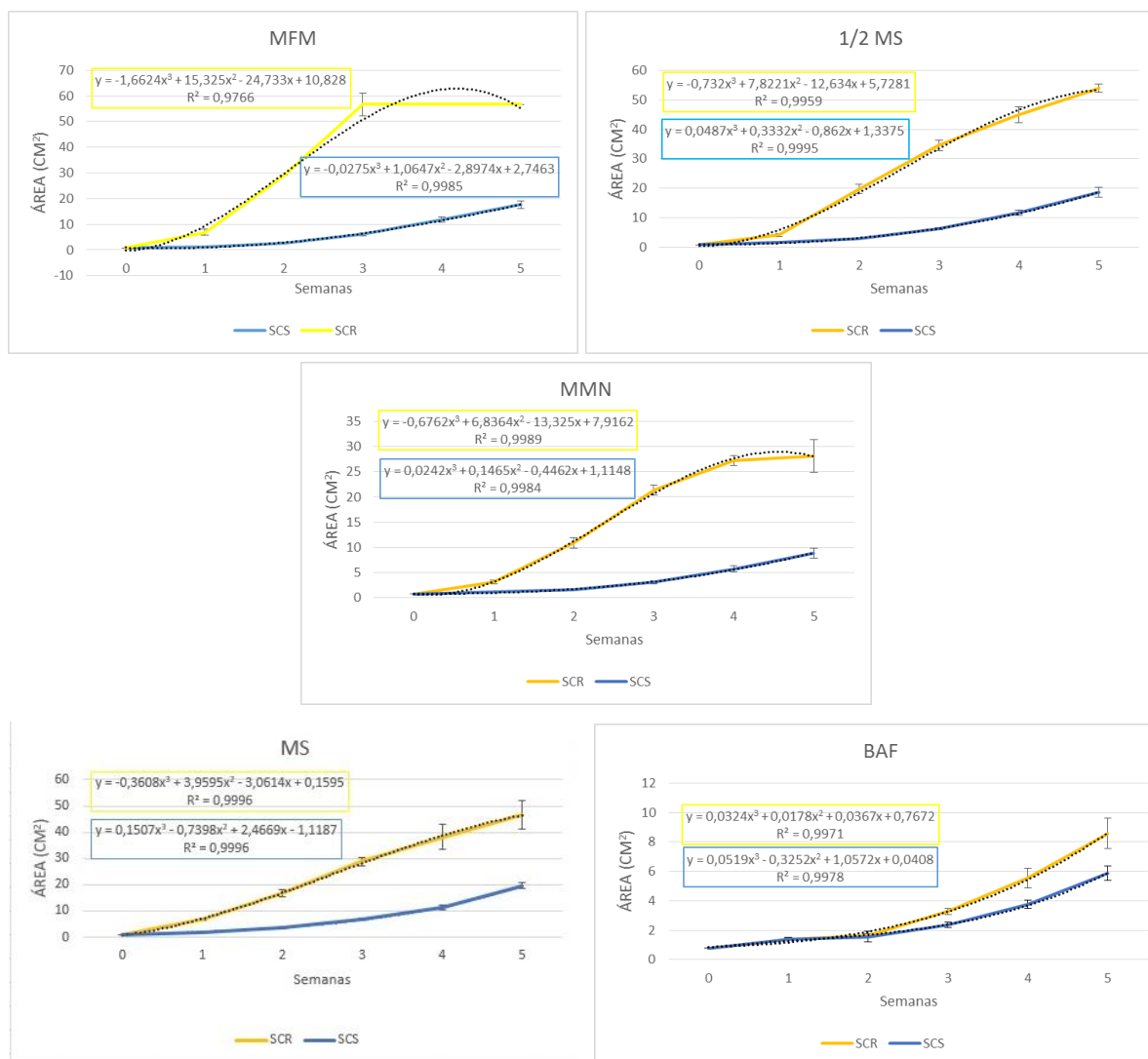


Fig. 15: Curvas de crecimiento de las medias de las áreas de las colonias fúngicas de las dos cepas de *S.citrinum* expresada en cm², durante 5 semanas.

El cálculo de los puntos de inflexión mediante la derivación de las ecuaciones de la recta resultante, obtenemos de manera matemática el punto donde el crecimiento se ralentiza. En el caso de SCR, si analizamos el medio MMN, el crecimiento se ralentiza a las 3,37 semanas, el MS a las 3,66 semanas, el medio MS modificado (1/2 MS) a las 3,56 y en el caso del medio BAF, no existe punto de inflexión dentro de las 5 semanas del estudio.

Al igual que ocurre con el medio BAF y el aislamiento SCR, si observamos las gráficas de SCS y calculamos los puntos de inflexión vemos que no se han producido durante el experimento.

3.5 Síntesis de micorrizas *in vitro*

El resultado obtenido en porcentaje para la de los dos aislamientos de *S.citrinum* fue similar relativamente. En el caso de SCR, el porcentaje de plantas micorrizadas en tarro con *B. celtiberica* fue del 87% mientras que en el caso de SCS fue ligeramente inferior, alcanzando un valor del 72%.



Fig. 16: Raíces micorrizadas de *B. celtiberica* con *S. citrinum*

3.6 Descripción macroscópica y microscópica de primordios de carpóforos

El carpóforo es de tamaño variable, de 5 a 15 mm de longitud media, de forma ligeramente globosa, un tanto imperfecta, con una superficie de color amarillo citrino u ocre amarillento. Presenta un pie prácticamente inexistente uniéndose a la raíz por una serie de cordones miceliares.

Con el tiempo el carpóforo pasa de esa estructura globosa a una estructura alargada e irregular, presentando en todos los casos una estructura redondeada más pequeña en la zona apical (Fig. 17).

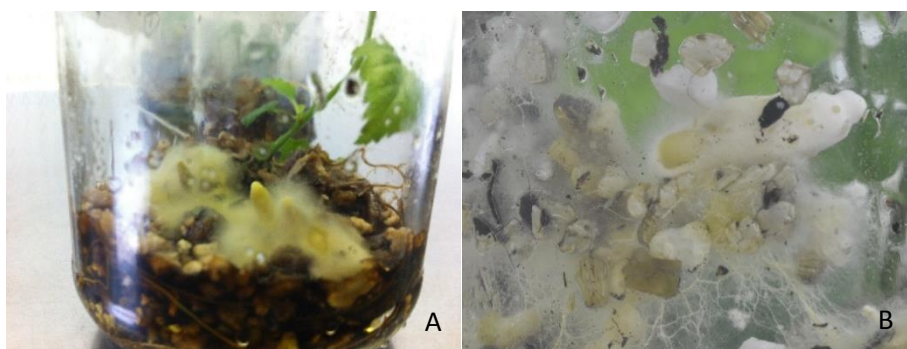


Fig. 17: **A:** Primordios de esporocarpo en formación, **B:** Primordios más envejecidos con una estructura redondeada en la zona apical.

La descripción microscópica no permite una diferenciación clara de capas que lo forman, aun así, se pudo observar una estructura compacta de hifas con numerosas fíbulas. (Fig. 18).

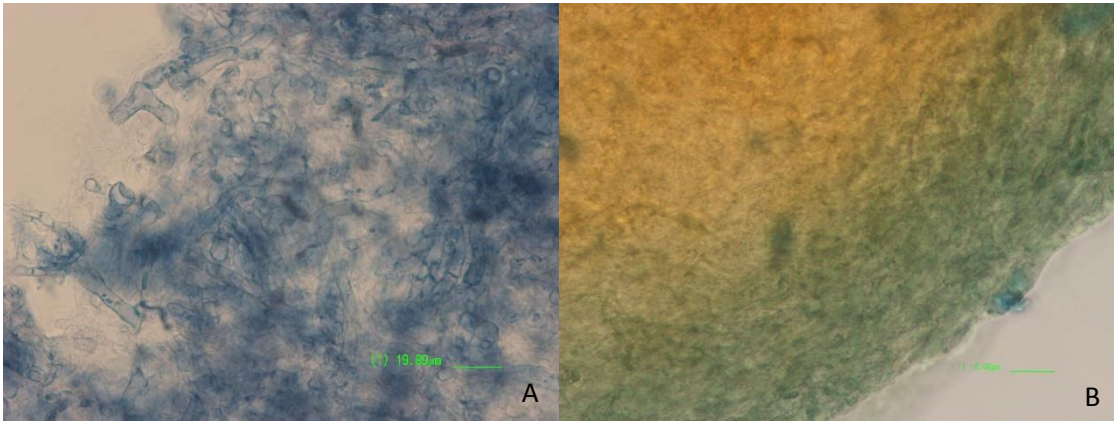


Fig. 18: **A:** Corte transversal con azul de toluidina que permiten ver una estructura de hifas, **B:** Corte transversal con azul de algodón.

3.7 Plantación de *Betula celtiberica*

La plantación se realizó en las instalaciones de El Terronal y consistió en una mezcla 2:1 de tierra de la parcela y sustrato utilizado durante la aclimatación de la planta, con el fin de mantener una cantidad suficiente de inóculo cerca de las raíces que ayude al establecimiento de la planta en el nuevo sustrato (Fig. 19).



Fig. 19: Abedul inoculado con *S.citrinum*

4. DISCUSIÓN

El éxito en programas de reforestación con plantas micorrizadas en terrenos contaminados por metales radica en una buena gestión en la selección de especies adaptadas a determinadas condiciones ambientales o ecotipos, una manipulación fácil y una alta tolerancia a los metales contaminantes. Es por ello y debido a la abundante presencia del género *Scleroderma* en un área especialmente contaminada con es Nitrastur (Fernández-Miranda, 2014) que se decidió ahondar en su estudio.

El estudio macro y microscópico de los cuerpos fructíferos nos permitió una clasificación provisional como *S. citrinum*. Sin embargo, en el caso de las raíces micorrizadas obtenidas del ejemplar de *B. celtiberica*, aunque sus características macro y microscópicas coinciden con las de otros autores (Fernández-Miranda, 2014), resulta imprescindible una identificación molecular. Esto es debido a que pueden existir grandes similitudes físicas entre morfotipos causadas por diferentes hongos o grandes variaciones entre un mismo hongo y distintos huéspedes. Además, otros factores como la edad o condiciones ambientales (Egger, 1995), hacen difícil o incluso imposible establecer una identificación fiable. Es por ello que una identificación basada en herramientas moleculares está siendo ampliamente utilizada, siendo, el estudio de la región ITS del rADN la vía que se ha utilizado más comúnmente, y de ahí que escogieramos su estudio para la correcta identificación de nuestra especie de interés.

Una vez obtenidas las secuencias, en muchas ocasiones la identificación de la especie se realiza mediante un *BLAST*, (algoritmo que busca en bases de datos disponibles, similitudes con la secuencia problema), con el objetivo de buscar la máxima semejanza de nuestra secuencia con otras que nos indiquen su afiliación taxonómica; sin embargo esto puede llevarnos a conclusiones erróneas. Diferentes autores como Ryberg *et al.* (2008) o Bidartondo *et al.* (2008) sugieren la importancia de una identificación precisa de estas secuencias subidas a las bases de datos, ya que en ocasiones contienen errores, como la incorrecta identificación de la especie o su no identificación obviando además en muchos casos su procedencia geográfica y posible hospedador. La incorrecta identificación puede llevar a numerosos problemas a la hora de repetir experimentos, optimizar condiciones de cultivo o enfrentarnos al diferente comportamiento que presentan distintas especies entre sí. Es por ello que la realización de estudios filogenéticos es fundamental para la correcta identificación de una especie. En nuestro caso nuestros resultados nos indican mediante las dos metodologías utilizadas (ML e inferencia Bayesiana) y con una topología muy similar, que ambos aislamientos procedentes de carpóforo y raíz efectivamente pertenecían a la especie *S. citrinum*.

Una vez identificados correctamente los dos aislamientos y con la pretensión de conocer si el comportamiento de ambos es idéntico o no se decidió por el estudio de su dinámica de crecimiento y micorrización.

Los dos aislamientos realizados a partir de carpóforos y raíces micorrizadas de abedul recogidas en Nitrastur, mostraron pautas diferentes de desarrollo en su producción de inóculo en cultivo puro. El aislamiento SCS mostró un crecimiento inicial rápido, para posteriormente cambiar el ritmo y volverse lento, con un micelio más blanquecino anaranjado que el aislamiento SCR, con una tonalidad más anaranjada, pero mismo aspecto pomposo. En el caso de SCR, el inicio del crecimiento se produjo igualmente rápido, si bien, el ritmo general no se ralentizó tanto, produciéndose mayores crecimientos que en el anterior aislamiento. Éstos resultados, coinciden con estudios de otros autores (Sims, 1996), al ver una dinámica de crecimiento muy similar.

Estudios realizados por Molina y Palmer (1982), proponen una elección del medio de cultivo acorde al aporte de sustancias esenciales que en condiciones naturales el hongo obtiene del hospedante en la simbiosis; por ello, nos planteamos la utilización de 5 medios de cultivo, MS, MS (modificado), MMN, MFM y BAF, que difieren en su contenido mineral, fuentes de carbono y vitaminas, para intentar optimizar el crecimiento de los dos aislamientos de *S. citrinum*.

Los resultados obtenidos, tal y como se muestra en la Tabla 4, determinan en el caso de SCR muy buen crecimiento en los medios $\frac{1}{2}$ MS y MFM, sin diferencias significativas entre ellos al final del estudio, siendo el MFM el que mejor crecimiento obtuvo de todos, por su parte, el medio MS presentó una tasa de crecimiento más moderada pero sin diferencias significativas con el medio $\frac{1}{2}$ MS. El medio MMN obtuvo un crecimiento moderado, mostrando diferencias significativas con el resto de medios. Finalmente, el medio BAF, se comportó como el peor medio de cultivo para la producción de inóculo de este aislamiento de *S.citrinum* con diferencias significativas con el resto en la tasa de crecimiento.

Si estudiamos la cinética de crecimiento enfrentando los dos aislamientos por medio de cultivo, tal como se muestra en la figura 15, observamos que SCR obtiene crecimientos muy superiores a SCS.

En el medio MFM, $\frac{1}{2}$ MS y MMN, SCR necesita de un periodo de adaptación aproximada de media semana, comenzando con una fase de aceleración.

El medio MS, prácticamente no existe periodo de adaptación, pero el crecimiento es menor.

Por último, en el medio BAF, la fase de adaptación dura 2 semanas, momento en el cual empieza la fase de aceleración pero con unos crecimientos muy bajos.

Si calculamos el punto de inflexión mediante la derivación de las ecuaciones de la recta resultante, obtenemos de manera matemática el punto donde el crecimiento se ralentiza siendo en el medio MFM a las 3,11 semanas, el MMN a las 3,37 semanas, el MS 3,66 semanas y el medio $\frac{1}{2}$ MS de 3,56 semanas. El medio BAF no tiene puntos de inflexión; si bien tiene una fase de aceleración, aún no ha llegado a ralentizarse su crecimiento.

En SCR, el medio MFM es el único en el que el micelio consigue completar por completo la placa.

Por su parte, SCS presenta fases de aceleración mucho menos pronunciadas y con fases de estabilización más contenidas.

El periodo de adaptación en los medios MMN, ½ MS, MMN y MS por término medio es de una semana.

El medio BAF produce crecimiento del medio en la primera semana, produciéndose una estabilización hasta la segunda semana y una aceleración hasta el final del experimento pero con crecimientos notablemente inferiores que en el resto de medios de cultivo.

En el caso de SCS, no aparece ningún punto de inflexión de crecimiento en los medios. Eso es debido a que el crecimiento no está optimizado, produciéndose un crecimiento activo sostenido, con crecimientos menores.

La diferencia tan clara de crecimiento entre dos aislamientos del mismo hongo podría explicarse mediante la expresión diferencial. Autores como Lafranco *et. al* (2002), proponen una modulación de la respuesta de la expresión diferencial del micelio para ofrecer protección contra metales pesados y otros tipos de estrés para los socios de la simbiosis. Ésta última hipótesis podría explicar que diferentes aislamientos del mismo hongo sometidas a diferentes ecotipos (zonas como Nitrastur muestran una heterogeneidad tremendamente alta en la dispersión de la contaminación así como de los contaminantes), puedan reaccionar diferente ante la estabilización en un cultivo puro.

La síntesis de micorrización *in vitro* se realizó inoculando plantas propagadas *in vitro* de *B. celtiberica* colocando el hongo directamente en la mezcla de substrato-vermiculita con medio de cultivo donde está creciendo la planta, de ésta manera se consiguieron tasas de micorrización del 87% en SCR, mientras que en SCS fue del 72%.

Éste sistema de micorrización ha sido utilizado por otros autores como Marx *et al.*, 1989. Resulta un sistema efectivo, y de fácil aplicación a gran escala.

Durante el proceso de micorrización, se observó la presencia de primordios de carpóforos sin llegar a conseguir en ningún caso un carpóforo maduro. Debaud *et. al*, 1986, sugiere que la producción de cuerpos fructíferos en un medio sintético se produce cuando se cultiva con su planta habitual. Un estudio más detallado muestreando compatibilidades entre interacciones planta compatible con *Scleroderma* y un aumento de los medios de cultivo utilizados con variaciones en los contenidos nutricionales que aporta a los miembros de la interacción, podría facilitar la obtención de carpóforos maduros, una opción muy interesante puesto que no existe constancia de este hecho.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha conseguido el aislamiento y crecimiento de *Scleroderma citrinum* en cultivo puro a partir de carpóforo y raíces de *Betula celtiberica* micorrizadas.
2. Mediante análisis filogenético se ha conseguido la identificación de *S. citrinum* procedentes del carpóforo y de las raíces.
3. Se ha demostrado la existencia de diferencias significativas en el crecimiento de SCR (aislamiento de *S. citrinum* a partir de raíz) y SCS (*S. citrinum* a partir de seta) dependiendo del medio de cultivo utilizado. El aislamiento SCR obtuvo mejores crecimientos en todos los medios de cultivo, siendo el que aporta mayores cantidades de inóculo el medio MFM.
4. La micorrización de *Betula celtiberica* con SCS y SCR en tarros de cristal con turba y substrato poroso, se ha demostrado como un sistema eficaz de micorrización para *Scleroderma citrinum*. En esta fase, se han obtenido primordios de carpóforos.

6. BIBLIOGRAFÍA

Agerer, R.; 2001. Exploration types of Ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial system according to their patterns of differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza*. 11:107-114.

Akaike, H.; 1974. A new look at the statistical model identification. *Automatic Control, IEEE Transactions on*. 19:716-723.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.; 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25:3389.

Bowen, G.D.; 1973. Mineral nutrition in ectomycorrhizae. In: G.C. Marks y T.T. Kozlowski (eds.). *Ectomycorrhizae, their ecology and physiology*. Academic Press. New York. pp. 151-197.

Brundrett, M.C.; 2004. Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 79:473-495.

Brundrett, M.C.; 2009. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil*. 320:37-77.

Danell, E.; 1994. *Cantharellus cibarius*: Mycorrhiza formation and Ecology. *Acta Univ. Ups.*, Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology. pp. 35-75 Uppsala. ISBN 91- 554-3273-5.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D.; 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. 9:772-772.

Debaud, J.C., Gay, G.; 1982. In vitro fruiting under controlled conditions of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* associated with pinus pinaster. *New Phytol*. 105:429-435.

Edgar, R.C.; 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 32:1792-1797.

Erland, S., Söderström, B.; 1990. Effects of liming on ectomycorrhizal fungi infecting *Pinus sylvestris* L. I. Mycorrhizal infection in limed humus in the laboratory and isolation of fungi from mycorrhizal roots. *New Phytol*. 115:675-682.

Fernández-Miranda, E.; 2014. Hongos ectomicorrícicos de plantas leñosas en terrenos degradados de Asturias por actividad minera e industrial. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.

Goodman, D.M., Durall, D.M., Trofymow, J.A, Berch, S.M.; 1996. A manual of concise descriptions of north american ectomycorrhizae. *Mycologue Publications*, and the

Canada - BC Forest Resource Development Agreement, Pacific Forestry Centre, Victoria, B.C.

Harley, J.L.; 1989. The significance of mycorrhiza. *Mycol Res.* 92:129-139.

Harley, J.L., Smith, S.E.;1983. *Mycorrhizal Symbiosis.* Academic Press, London.

Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T.A.; 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* 22:160-174.

Hedh, J., Samson, P., Erland, S., Tunlid A.; 2008. Multiple gene genealogies and species recognition in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus*. *Mycol Res.* 112:965-975.

Ingham, E.R., Molina, R.; 1991. Interactions between mycorrhizal fungi, rhizosphere organisms, and plants. *Microorganisms, Plants and Herbivores*, P. Barbosa (ed). John Wiley and Sons, NY. pp. 169-197.

Jackson, M.R., Mason, A.P.; 1984. *Mycorrhiza.* The Institute of Biology's Studies in Biology n° 159.

Jeffries, P.; 1999. *Scleroderma.* En: Cairney, J.W.G., Chambers, S.M. (Eds). *Ectomycorrhizal Fungi Key genera in profile.* pp. 187-200.

Kranabetter, J.M. y Friesen J.; 2002. Ectomycorrhizal community structure on western hemlock (*Tsuga Heterophylla*) seedlings transplanted from forests into openings. *Can J Bot.* 80:861-869.

Landis, T.D., Tinus, R.W., Mcdonald, S.E., Barnett, J.P.; 1989. The Biological Component: Nursery Pests and Mycorrhizae, 5. The Container Tree Nursery Manual. *Agric. Handbk.* Department of Agriculture, Forest Service, Washington D.C. 674:171.

Lanfranco, L., Bolchi, A., Ros, E. C., Ottonello, S., Bonfante, P.; 2002. Differential Expression of a Metallothionein Gene during the Presymbiotic versus the Symbiotic Phase of an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. *Plant Physiology.*130:58-67

Mason, P.A., Wilson, J., Last, F.T., Walker, C.; 1983. The concept of succession in relation with the spread of sheathing mycorrhizal fungi on inoculated tree seedlings growing in unsterile soil. *Plant Soil.* 71:247-256

Martin, M.P., Carrington M.; 2008. KIR Genotyping and Analysis. *Innate Immunity Methods in Molecular Biology.* 415: 49-64

Marx, D.H.; 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathol.* 59: 153-163.

Marx, D.H., Cordell, C.E.; 1989. The use of specific ectomycorrhizas to improve artificial forestation practices. Wipha, J.M.; Lumsdem, R.D. (eds.). *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Cambridge Univ. Press. Cambridge.

Miller, O.K.; 1983. Ectomycorrhizae in Agaricales and Gasteromycetes. *Can J Bot.* 61:909-916.

Molina R., Massichotel H., Trappe J.M.; 1991. Ecological role of specificity phenomena in ectomycorrhizal plant communities: Potentials for interplant linkages and guild development. Abstract of the Third European Symposium on Mycorrhizas. *Mycorrhizas in Ecosystems- Structure and Function*. Sheffield, England. p.44.

Molina, R., Palmer, J.G.; 1982. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Schenck, N.C. (ed.). Am Phytopath Soc., St. Paul, MN. pp: 115-129

Moser, M.; 1960. Die Gattung Phlegmacium. *Die Pilze Mitteleuropas* 4. J. Bad Heilbrunn. p.440.

Murashige, T., Skoog, F.; 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15:473-497.

Newton, A.C.; 1992. Towards a functional classification of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza.* 2:75-79.

Pérez, M.; 2014. Embriogénesis somática en *Quercus suber* L. Optimización de la proliferación en sistemas de inmersión temporal y regulación epigenética de la maduración. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.

Phosri, C., Martín, M.P., Watling, R., Jeppson, M., Sihanonth, P.; 2009. Molecular phylogeny and re-assessment of some *Scleroderma* spp. (Gasteromycetes). *Anales Jard Bot. Madrid.* 66:83-91.

Pinzón, A., Barreto, E., Bernal, A., Achenie, L., González-Barrios, A.F., Isea, R., Restrepo, S. 2009. Computational models in plant-pathogen interactions: the case of *Phytophthora infestans*. *Theoretical biology & medical modelling* 6: 24

Ryberg, M., Nilsson, R.H., Kristiansson, E., Töpel, M., Jacobsson, S., Larsson, E.; 2008. Mining metadata from unidentified ITS sequences in GenBank: a case study in *Inocybe* (Basidiomycota). *BMC Evol Biol.* 8:50.

Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P.; 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol.* 61:539-542.

Simard, S.W, Beiler, K.J, Bingham M.A., Deslippe, J.R.; 2012. Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal biological reviews.* 26:39-60.

Sims, K.; 1996. Growth physiology and systematics of some SE Asian ectomycorrhizal fungi, with additional reference to isomyze interpretations. PhD Thesis, University of Kent.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S.; 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28:2731-2739.

Tedersoo, L., Pätel, K., Jairus, T., Gates, G., Pöldmaa, K., Tamm, H.; 2009. Ascomycetes associated with ectomycorrhizas: molecular diversity and ecology with particular reference to the Helotiales. *Environ Microbiol.* 11:3166-3178.

Trappe, J.M.; 1962. Fungus associates of ectotropic mycorrhizae. *Bot Rev.* 28:538-606.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.; 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications.* Academic Press. 38:315-322.

Wilson, A.W., Binder, M., Hibbett, D.S.; 2011. Effects of gasteroid fruiting body morphology on diversification rates in three independent clades of fungi estimated using binary state speciation and extinction analysis. *Evolution.* 65:1305-1322.