5º CONGRESO FORESTAL ESPAÑOL

5º Congreso Forestal Español

Montes y sociedad: Saber qué hacer.

REF.: 5CFE01-120

Editores: S.E.C.F. - Junta de Castilla y León
Ávila, 21 a 25 de septiembre de 2009
ISBN: 978-84-936854-6-1
© Sociedad Española de Ciencias Forestales

Síntesis de ectomicorrizas entre *Cistus* sp. y las especies del complejo *Boletus edulis*

ÁGUEDA, B.[1], PARLADÉ, J.[2], FERNÁNDEZ-TOIRÁN, L.M.[1,3], CISNEROS, Ó[1], DE MIGUEL, A.M.[4], MODREGO, M.P.[1], MARTÍNEZ-PEÑA, F.[1] y PERA, J[2]

[1] DIEF Valonsadero. Consejería de Medio Ambiente. Junta de Castilla y León. Apdo. de correos 175. 42080 Soria. Correo electrónico: aguherbe@jcyl.es
[2] IRTA. Centre de Cabrils. Ctra. Cabrils, km. 2. 08348 Cabrils. Barcelona.
[3] Escuela Universitaria de Ingenierías Agraria. Universidad de Valladolid. Campus "Duques de Soria". 42005 Soria.
[4] Universidad de Navarra. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología Vegetal. Sección Botánica. 31008 Pamplona.

Resumen
En los jarales resultantes de la reiteración de incendios forestales en el oeste de Castilla y León (León, Salamanca y Zamora) es habitual la presencia de fructificaciones de *Boletus edulis* Bull. La recolección de estos hongos micorrícicos comestibles en los jarales dominados exclusivamente por *Cistus ladanifer*, supone una oportunidad económica alternativa a los usos tradicionales para zonas con bajos ingresos procedentes del monte.
El objetivo de éste trabajo es la obtención de ectomicorrizas de las especies del complejo *B. edulis* con *Cistus* sp. bajo condiciones controladas, y las descripciones anatómicas detalladas de las mismas. La identificación de los aislados fúngicos de *Boletus aereus* Bull., *B. edulis, B. reticulatus* Schaeff. y *B. pinophilus* Pilát & Dermek fue confirmada por métodos moleculares. Se han obtenido ectomicorrizas de *Boletus aereus*, *B. edulis* y *B. reticulatus* con *Cistus albidus* L. y *C. ladanifer* en condiciones de síntesis en cultivo puro, en un substrato de turba-vermiculita estéril y solución nutritiva. Las ectomicorrizas formadas se describieron siguiendo los caracteres anatómicos y morfológicos habituales. Las tres ectomicorrizas son muy similares, de color blanco, con ramificación monopodial-pinnada, manto formado por tres capas plectenquimatosas y con rizomorfos de tipo boletoide.

Palabras clave
Síntesis de ectomicorrizas en cultivo puro, hongos ectomicorrícicos comestibles, descripción anatómica y morfológica de ectomicorrizas, ITS rDNA.

1. Introducción

Boletus Fr. es un género de hongos ectomicorrícicos ampliamente representado en las zonas templadas de todo el planeta, formado por más de 1.000 especies de fructificación epigea que viven en bosques tropicales y de latitudes medias. *Boletus* forma ectomicorrizas con un gran número de hospedantes de los siguientes órdenes y familias: Fagales – Fagaceae (*Castanea, Castanopsis, Fagus, Lithocarpus, Quercus*) y Betulaceae (*Carpinus, Corylus, Betula, Ostrya, Populus*); Malvales – Malvaceae (*Tilia*) y Cistaceae (*Cistus*); Malpighiales – Salicaceae (*Salix*); Ericales – Ericaceae (*Arctostaphylos*); y Pinales – Pinaceae (*Abies, Keteleeria, Picea, Pinus, Tsuga*) (OLIVIER et al 1997, ÁGUEDA et al 2006, MELLO et al 2006).

Las especies comestibles del complejo *B. edulis* (*B. edulis* Bull. *sensu stricto*, *B. aereus* Bull., *B. pinophilus* Pilát & Dermek y *B. reticulatus* Schaeff.) tienen una gran importancia económica (SINGER 1986, HALL et al 1998) siendo *B. edulis* uno de los hongos más comercializados en todo el mundo. Las setas que se comercializan de éstas cuatro especies provienen exclusivamente de la recolección en bosques (CANNON & KIRK 2007), no siendo posible, hasta la fecha, su cultivo en condiciones controladas.

Los hongos micorrícicos comestibles no son solamente uno de los productos gastronómicos más apreciados en la actualidad, sino que suponen una importante fuente de ingresos para sus recolectores (WANG & HALL 2004). El consumo anual del complejo *B. edulis* en todo el mundo se sitúa entre 20.000 y 100.000 toneladas (HALL et al 1998). En Castilla y León, la producción anual estimada de carpóforos del complejo *B. edulis* es de 8.500 toneladas, lo que supone un valor económico anual de unos 38 millones de euros (MARTÍNEZ-PEÑA et al 2006-2008).

En algunas zonas de las provincias de Zamora, León y Salamanca en las que se producen abundantes incendios forestales y que están dominadas exclusivamente por *C. ladanifer, B. edulis* forma carpóforos habitualmente. Las ectomicorrizas formadas en campo por ambos organismos han sido descritas y la región ITS del rDNA fúngico secuenciada para su verificación taxonómica (ÁGUEDA et al 2006). Ésta asociación es importante por el mero hecho de que las especies del género *Cistus* aparecen en lugares degradados dónde los recursos económicos para mantener a la población rural son escasos. El género *Cistus* está representado en la Península Ibérica por 12 especies de arbustos (MUÑOZ y NAVARRO 1993), que aparecen todas durante las etapas primarias de sucesión de los bosques. Las especies de Cistaceae son en general pirofíticas, y su germinación está asociada a las altas temperaturas que conllevan los abundantes incendios forestales de las áreas mediterráneas (ALONSO et al 1992). Las especies de *Cistus* forman a menudo masas puras en áreas sujetas a numerosos incendios y/o al abusivo pastoreo dada su capacidad de ser los primeros colonizadores después de una alteración.

Las especies del género *Cistus* pueden formar ectomicorrizas y micorrizas arbusculares (SMITH & READ 1997). Se han citado más de 200 especies de hongos ectomicorrícicos pertenecientes a 40 géneros asociados con *Cistus* (PUPPI & TARTAGLINI 1991, COMANDINI et al 2006). Las jaras (*Cistus* y *Helianthemum* sp.) son consideradas especies muy importantes ecológicamente debido a su capacidad para actuar como hospedantes refugio para las especies de hongos ectomicorrícicos después de cualquier alteración en las masas boscosas (TORRES et al 1995, DÍEZ 1998).

Entre los hongos micorrícicos comestibles, solamente se cultivan comercialmente *Tuber melanosporum* Vittad. y *T. uncinatum* Chatin, y se han iniciado estudios para llegar a resultados similares con: *Lactarius deliciosus* (L.) Gray, *Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo, *T. borchii* Vittad. y *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. (WANG & HALL 2004). La producción de hongos comestibles asociados a huéspedes del grupo de las Cistáceas se ha intentado para *T. melanosporum* y *Cistus* sp. (CHEVALIER et al 1975, DÍEZ et al 1994, FONTANA & GIOVANETTI 1978, GIOVANETI & FONTANA 1982, ROTH-BEJERANO et al 2003, WENKART et al 2001), y *Terfezia claveryi* Chatin y *Helianthemum* sp (MORTE et al 2004).

2. Objetivos

Los experimentos de síntesis de ectomicorrizas son útiles para determinar la compatibilidad entre hongo y hospedante (GIOMARO et al 2005). En éste trabajo, se ha utilizado ésta técnica para comprobar la capacidad de las especies del complejo *B. edulis* para formar ectomicorrizas con *Cistus* sp. en condiciones controladas, así como realizar la descripción detallada de las estructuras formadas.

3. Metodología

Aislamientos fúngicos

Los aislamientos fúngicos de *Boletus aereus, B. edulis* y *B. reticulatus* se obtuvieron de carpóforos recolectados en Castilla y León y Cataluña (Tabla 1). Los aislamientos se hicieron cultivando tejido de los carpóforos en medio MMN (MARX 1969) o BAF (OORT 1981) y manteniendolos mediante resiembra en medio fesco cada tres meses.

La identificación de las especies fúngicas se confirmó mediante análisis moleculares de la región ITS del rDNA (LEONARDI et al 2005).

Los amplicones de cada aislado fúngico, obtenidos con los cebadores ITS1/ITS4B (GARDES & BRUNS 1993), fueron purificados y secuenciados en ambas direcciones. Las secuencias ITS obtenidas fueron comparadas con otras secuencias depositadas en el GenBank para confirmar la identificación taxonómica y registradas en dicha base de datos con los números de acceso recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Aislamientos fúngicos usados en la síntesis de ectomicorrizas.

Especie	Lugar de recolección	Hospedante	Nº de cepa	Nº registro en GenBank
Boletus aereus	Osor (Cat)	*Castanea sativa*	393 IRTA	EU554663
Boletus edulis	Aràn̂ser (Cat)	*Pinus uncinata*	375 IRTA	EU554664
Boletus reticulatus	Ocenilla (CyL)	*Quercus pyrenaica*	1054 DIEFV	EU554661

Procedimiento de síntesis en cultivo puro

Las semillas de *Cistus albidus* L. y *C. ladanifer* L. se sumergieron en agua a 90ºC durante 30 min, se desinfectaron por inmersión en hipoclorito de sodio al 30% durante 10 min, y se lavaron en agua estéril. Las semillas desinfectadas se estratificaron durante 2-3 semanas a 4 ºC en placas de Petri con medio BAF . Después de dos semanas de incubación a 20-23 ºC, las semillas contaminadas se descartaron, y se recogieron les germinadas.

Las semillas germinadas asépticamente, con una raíz de 1-2 cm, se trasplantaron a tubos de síntesis de ectomicorrizas (MOLINA 1979) llenados con una mezcla de 10 ml de turba, 110 ml de vermiculita y 60 ml de solución BAF modificada reduciendo la glucosa a 20 g/l. En los tubos de síntesis se inocularon 10 ml de micelio cultivado en medio líquido BAF de *B. aereus, B. edulis* y *B. reticulatus* respectivamente. Las tres especies de hongos se inocularon con *C. albidus* y *C. ladanifer*, y se prepararon cuatro repeticiones por cada combinación hongo-planta. Las plántulas inoculadas crecieron en los tubos de síntesis durante 4-5 meses a 20-25 ºC con luz artificial (150 µmol s^{-1} m^{-2} [400-700 nm], 16 h/día). Al final del periodo de crecimiento, las plántulas se extrajeron de los tubos de síntesis y el sistema radical se lavó y examinó para detectar la formación de ectomicorrizas.

Descripción morfológica de las ectomicorrizas

Las raíces micorrizadas y los rizomorfos se extrajeron cuidadosamente bajo la lupa binocular, se fijaron en solución FAA (AGERER 1986) y se depositaron en la colección de ectomicorrizas del Dpto. Inv. Exp. For. Valonsadero (Soria). La metodología y la terminología utilizadas para la caracterización de las estructuras de las ectomicorrizas fue la descrita por AGERER (1987-2006, 1991) y por AGERER & RAMBOLD (2004-2008). Para la observación del manto fúngico, éste se separó de la raíz siguiendo la técnica descrita por AGERER (1991). Las preparaciones del manto y de los rizomorfos se fijaron en el portaobjetos con ácido láctico para su observación al microscopio.

4. Resultados

Se formaron micorrizas de *Boletus aereus, B. edulis* y *B. reticulatus* con *Cistus ladanifer* y *C. albidus* (Tabla 2).

Tabla 2. Formación de ectomicorrizas en cada combinación hongo-hospedante. Se realizaron cuatro repeticiones por cada combinación. Las cruces indican el número de repeticiones en las que se formaron ectomicorrizas. -: no hubo formación de ectomicorrizas en ninguna de las repeticiones.

Especie de hongo	Nº de cepa	Especie de jara	
		Cistus albidus	*Cistus ladanifer*
Boletus aereus	393 IRTA	++++	++++
Boletus edulis	375 IRTA	++	++++
Boletus reticulatus	1054 DIEFV	++++	++

Las estructuras de las micorrizas formadas para cada especie de hongo son idénticas en ambas especies de *Cistus*, tal y como sucede con otras combinaciones hongo-hospedante (AGERER & RAMBOLD 2004-2008). Así, solo presentamos una descripción completa para cada especies de hongo indicando la especie hospedante considerada en cada caso. Las descripciones se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Descripción de las ectomicorrizas sintetizadas.

	Boletus aereus* + *Cistus ladanifer	***Boletus edulis* + *Cistus albidus***	***Boletus reticulatus* + *Cistus albidus***
Caracteres morfológicos	Ectomicorrizas solitarias, monopodial-piramidales o irregularmente pinnadas; ápices no ramificados rectos, cilíndricos, amarillentos; superficie del manto lisa y brillante, ligeramente lanosa o reticulada (Fig. 1a). Hifas que emanan presentes, infrecuentes, sin distribución específica. Rizomorfos redondeados, blancos, ramificados frecuentemente en puntos restringidos, distribuidos de forma proximal en el ápice y que surgen de un punto determinado del manto, superficie lisa o ligeramente pelosa.	Ectomicorrizas monopodial-piramidales o irregularmente pinnadas, dicótomas; ápices no ramificados rectos, cilíndricos, blancos a amarillentos siendo más amarillos con el tiempo; superficie del manto brillante, ligeramente lanosa (Fig. 1d). Hifas que emanan presentes, abundantes, sin distribución específica. Rizomorfos redondeados, blancos, ramificados frecuentemente en puntos restringidos, que surgen de un punto determinado del manto, superficie lisa o lanosa.	Ectomicorrizas solitarias, monopodial-piramidales o coraloides; ápices no ramificados rectos o curvados, blancos a amarillentos siendo más amarillos con el tiempo; superficie del manto brillante y lisa, ligeramente verrugosa en algunas zonas (Fig. 1g). Hifas que emanan infrecuentes, sin distribución específica. Rizomorfos redondeados, blancos, ramificados frecuentemente en puntos restringidos, que surgen de un punto determinado del manto, superficie lisa.
Tipo de manto	Plectenquimatoso, transparente, con hifas sin fíbulas. Capa más externa del manto con hifas dispuestas en forma de anillo, Tipo A (Fig. 1b); capa media del manto con las hifas dispuestas sin ningún patrón especial; capa interna del manto con las hifas dispuestas en haces paralelos.	Plectenquimatoso, transparente, con hifas sin fíbulas. Capa más externa del manto con hifas dispuestas en forma de anillo, Tipo A (Fig. 1e); capa media del manto con las hifas dispuestas en forma de anillo; capa interna del manto con las hifas dispuestas en haces paralelos.	Plectenquimatoso, transparente, con hifas sin fíbulas. Capa más externa del manto con hifas irregularmente dispuestas, sin ningún patron especial (Tipo B); capa media del manto con las hifas sin disposición especial o dispuestas en forma de anillo (Fig. 1h); capa interna del manto con las hifas dispuestas en forma de anillo o en haces paralelos.
Rizomorfos	De hasta 15 mm de ancho, con hifas muy diferenciadas, de tipo boletoide, con hifas centrales muy gruesas con los septos parcial o totalmente disueltos; en los puntos de ramificación las hifas forman "nodia", hifas con fíbulas ausentes, transparentes, sin terminaciones cortas alargadas, sin fíbulas. Hifas periféricas similares a los cistidios del manto, lisas, transparentes (Fig. 1c).	Con hifas muy diferenciadas, de tipo boletoide, con hifas centrales muy gruesas con los septos parcial o totalmente disueltos; en los puntos de ramificación las hifas forman "nodia", hifas con fíbulas ausentes, transparentes, sin terminaciones cortas alargadas, sin fíbulas (Fig. 1f).	Con hifas muy diferenciadas, de tipo boletoide, con hifas centrales muy gruesas con los septos parcial o totalmente disueltos; en los puntos de ramificación las hifas forman "nodia", hifas con fíbulas ausentes, transparentes, sin terminaciones cortas alargadas, sin fíbulas. Hifas periféricas sin forma especial o redondeadas, infladas, con células cortas, lisas (Fig. 1i).
Cistidios	En forma de aguja, similares a cerdas, presentes en la capa más externa del manto y en los rizomorfos; con ramificación ausente o proximal, monopodial o bifurcada; ramificación en ramas ausente; 2-3 septos presentes, simples; superficie lisa.	Ausentes.	Dos tipos diferentes, tipo 1 presente en la capa más externa del manto y en los rizomorfos y tipo 2 presente solamente en los rizomorfos. Tipo 1 con paredes celulares finas, ligeramente estrechado, a veces similar al final de las hifas normales, ramificación ausente o proximal, monopodial o bifurcados, sin ramas en la ramificación, 1-3 septos presentes, simples, superficie lisa. Tipo 2 globular, sin ramificar, sin septos, transparentes, lisos.
Hifas que emanan	Sin fíbulas, rectas, transparentes; ramificación casi en ángulo recto, adyacente al septo, en cada ramificación se forma una sola rama; células uniformes o ligeramente estrechadas, lisas.	Sin fíbulas, onduladas a ligeramente tortuosas, transparentes; ramificación en forma de Y, adyacente al septo, en una sola rama; células ligeramente estrechadas, lisas.	Sin fíbulas, onduladas o ligeramente hinchadas, incluso en forma de cuentas; ramificación aguda o en forma de Y, adyacente al septo, en una sola rama; células uniformes o ligeramente estrechadas, lisas.
Tipo exploratorio	Larga distancia.	Larga distancia.	Larga distancia.
Reacción al agua	Hidrofóbica.	Hidrofóbica.	Hidrofóbica.

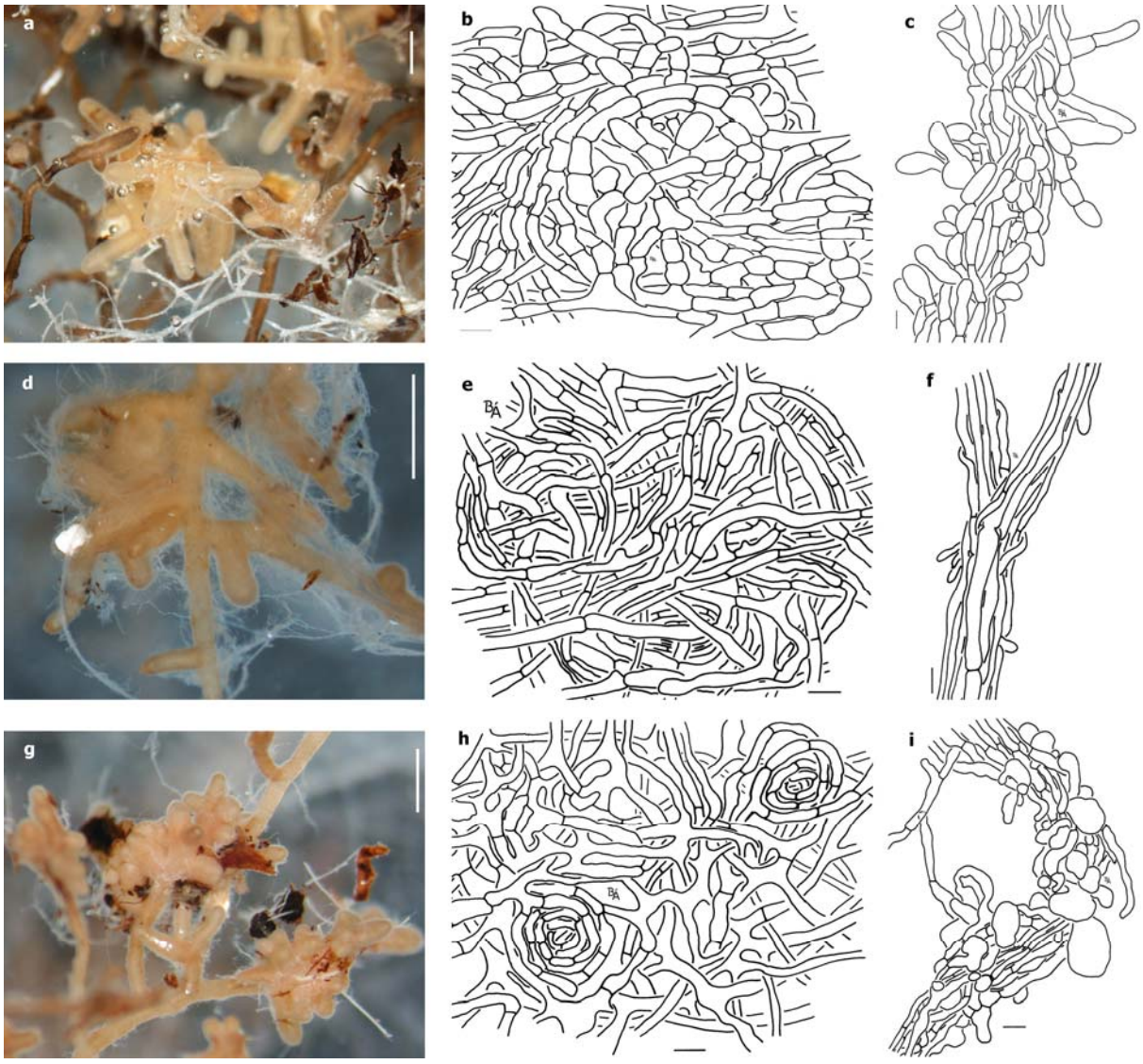

Figura 1. Características morfológicas y anatómicas de las ectomicorrizas obtenidas en síntesis en cultivo puro. (a) Ectomicorrizas y rizomorfos de Boletus aereus *y* Cistus ladanifer. *Barra = 10 mm. (b) Capa más externa del manto de* Boletus aereus *y* Cistus ladanifer. *Barra = 10 µm. (c) Superficie del rizomorfo con cistidios de* Boletus aereus *y* Cistus ladanifer. *Barra = 10 µm. (d) Ectomicorrizas y rizomorfos de* Boletus edulis *y* Cistus albidus. *Barra = 10 mm. (e) Capa más externa del manto de* Boletus edulis *y* Cistus albidus. *Barra = 10 µm. (f) Rizomorfo con hifas diferenciadas de* Boletus edulis *y* Cistus albidus. *Barra = 10 µm. (g) Ectomicorrizas y rizomorfos de* Boletus reticulatus *y* Cistus albidus. *Barra = 10 mm. (h) Capa media del manto de* Boletus reticulatus *y* Cistus albidus. *Barra = 10 µm. (i) Superficie del rizomorfo con cistidios de* Boletus reticulatus *y* Cistus albidus. *Barra = 10 µm.*

5. Discusión

Durante los últimos 40 años, se han sintetizado ectomicorrizas de las especies del complejo *Boletus edulis* con varios hospedantes. FROIDEVAUX & AMIET (1975) sintetizaron ectomicorrizas de *B. edulis* con *Pinus mugo* Turra; TOZZI et al (1980) obtuvo ectomicorrizas de *B. edulis* con *Quercus pubescens* Willd.; MOLINA & TRAPPE (1982a,b) sintetizaron ectomicorrizas entre *B. edulis* y ocho hospedantes de los géneros *Arbutus*, *Arctostaphylos*, *Larix*, *Picea*, *Pinus* y *Tsuga*; CERUTI et al (1983-84) obtuvieron ectomicorrizas de *B. aereus* con *Q. pubescens*; CERUTI et al (1985) obtuvieron micorrizas de *B. aereus* con *Castanea sativa* Mill.; POITOU et al (1982) sintetizaron ectomicorrizas en cultivo puro entre *Pinus radiata* D. Don y *B. edulis* y *B. aereus*; y DUÑABEITIA et al (1996)

obtuvieron ectomicorrizas de *B. pinophilus* inoculando plántulas de *P. radiata* con una suspensión de 10^6-10^7 esporas por planta.

A lo largo de los años, se han hecho plantaciones de árboles inoculados con *Boletus* sp. para promover el cultivo de sus carpóforos. OLIVIER et al (1997) establecieron plantaciones de *C. sativa* y *P. uncinata* Ramond ex DC. inoculados con *B. edulis* y *B. aereus*. MEOTTO et al (1999) produjeron plántulas de *C. sativa* inoculadas con micelio cultivado de *B. edulis*. Desafortunadamente, en ninguno de los dos estudios se llegó a la producción de carpóforos.

La descripción e identificación de las ectomicorrizas ha evolucionado de forma espectacular gracias a los estudios sistemáticos de AGERER (1986, 1987-2006, 1991) y a la caracterización molecular basada en el análisis del ADN (GARDES & BRUNS 1993). Aunque existen algunas descripciones de micorrizas del género *Boletus*, muchas de ellas no son detalladas (DE ROMÁN et al 2005). Las ectomicorrizas de las tres especies de *Boletus* obtenidas en éste estudio son muy similares entre sí y encajan bien en los caracteres descritos por AGERER (2006) para éste género: manto plectenquimatoso de los tipos A, B o C, rizomorfos boletoides con "nodia" y con o sin células cortas hinchadas, hifas que emanan lisas o cubiertas por cristales, ausencia de fíbulas, cistidios ausentes o con hifas que terminan como cistidios, y ectomicorrizas blancas a amarillentas hidrofóbicas. Todas ellas, *B. aereus*, *B. edulis* y *B. reticulatus*, forman ectomicorrizas blancas de ramificación monopodial-pinnada con manto plectenquimatoso de tres capas y rizomorfos boletoides. *B. aereus* forma ectomicorrizas de ramificación monopodial-piramidal con las hifas del manto externo formando anillos, y cistidios formados por dos o tres células cortas en el manto externo y en los rizomorfos. Las hifas del manto de *B. edulis* forman anillos en sus capas externa y media, sin cistidios y con rizomorfos también sin cistidios ni células globosas. Las hifas del manto interno de *B. reticulatus* forman anillos o haces paralelos, la ectomycorrhiza tiene cistidios que emanan en la capa más externa del manto y cistidios globulares y en forma de aguja en los rizomorfos.

Los cistidios de las ectomicorrizas de *B. aereus* y *B. reticulatus* son similares a los que aparecen en el himenio de los carpóforos de algunas especies de *Boletus*, como *B. reticulatus*, *B. edulis* o *B. regius* Krombh., fusiformes o formando estructuras globosas (MUÑOZ 2005). Aunque hay que tener en cuenta que la formación de éstos elementos, así como de las hifas que emanan en *B. edulis*, puede estar influenciada por las condiciones experimentales de los tubos de síntesis.

La abundancia y el tamaño de los rizomorfos formados en estos experimentos, especialmente para *B. aereus*, son acordes con los que se pueden encontrar en condiciones naturales en el campo. En condiciones naturales, el micelio de *Boletus* se concentra en rizomorfos con un alto grado de heterogeneidad espacial. De hecho, el tipo de suelo puede condicionar el alcance de los elementos exploratorios de las ectomicorrizas de *Boletus*, de sus cistidios, rizomorfos e hifas que emanan, tal y como sucede con las de *Lactarius deliciosus* (HORTAL et al 2008).

No existen descripciones previas de las micorrizas de *B. aereus*. Todas las descripciones previas de las micorrizas de *B. edulis* (CERUTI et al 1987-88, GARRIDO 1988, GRONBACH 1988, AGERER & GRONBACH 1990, FRANZ & ACKER 1995, PALFNER 2001, AGERER & RAMBOLD 2004-2008, ÁGUEDA et al 2006) encajan con la realizada en el presente trabajo. CERUTI et al (1983-84), CERUTI et al (1985), y GARRIDO

(1988) solamente describen los caracteres del manto de *B. reticulatus* en sección transversal, por lo que no es posible la comparación con la realizada aquí.

Considerando al hongo como el factor principal que determina las estructuras anatómicas de las ectomicorrizas, éstas serán idénticas para la misma especie fúngica independientemente de cual sea el hospedante. Los caracteres morfológicos, por el contrario, son determinados por el género del hospedante, aunque algunos hongos pueden controlar, al menos parcialmente, la forma final (AGERER & RAMBOLD 2004-2008). Ambos aspectos son ciertos para las tres micorrizas del complejo *Boletus edulis* descritas, que muestran las mismas estructuras al estar asociadas con *Cistus* y con otros hospedantes de las Pináceas y de las angiospermas.

La producción natural de carpóforos de *B. edulis* en asociación con *C. ladanifer* ofrece un recurso económico alternativo en áreas marginales con pocos ingresos (ÁGUEDA et al 2006). La micorrización controlada de *Cistus* con *B. edulis* y el cultivo de las plántulas inoculadas puede ser una vía esperanzadora para explotar ésta simbiosis con beneficios económicos. Para hacer posible este hecho, es necesario determinar los métodos óptimos de inoculación con cepas de *Boletus* compatibles, la persistencia de las ectomicorrizas de *Boletus* en las plantas inoculadas y los factores que inducen la producción de carpóforos.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el INIA (Ministerio de Ciencia e Innovación, Gobierno de España) dentro del proyecto RTA2006-0095-C02.

7. Bibliografía

AGERER R.; 1986. Studies on ectomycorrhizae II. Introducing remarks on characterization and identification. *Mycotaxon* 26 473-492

AGERER R. (ed); 1987-2006. Colour atlas of ectomycorrhizae. 1st-13th del, Einhorn-Verlag + Druck GmbH, Schwäbisch Gmünd

AGERER R.; 1991. Characterization of ectomycorrhiza. In: NORRIS J.R., READ D.J., VARMA A.K. (eds); Techniques for the study of mycorrhiza. Academic Press, London. Methods in Microbiology 23: 25-73

AGERER R.; 2006. Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycological Progress* 5: 67-107

AGERER R., GRONBACH E.; 1990. *Boletus edulis*. In: AGERER R. (ed): Colour atlas of ectomycorrhizae, plate 36. Einhorn-Verlag + Druck GmbH, Schwäbisch Gmünd

AGERER R., RAMBOLD G.; 2004 – 2008. [first posted on 2004-06-01; most recent update: 2007-05-02]. DEEMY – An Information System for Characterization and Determination of Ectomycorrhizae. www.deemy.de – München, Germany

ÁGUEDA B., PARLADÉ J., DE MIGUEL A.M., MARTÍNEZ-PEÑA F.; 2006. Characterization and identification of field ectomycorrhizae of *Boletus edulis* and *Cistus ladanifer*. *Mycologia* 98 23-30

ALONSO I., LUIS E., TÁRREGA R.; 1992. First phases of regeneration of *Cistus laurifolius* and *Cistus ladanifer* after burning and cutting in experimental plots. *Int J Wildland Fire* 2 7-14

CANNON P.F., KIRK P.M.; 2007. Fungal Families of the World. CABI UK Centre (Egham)

CERUTI A., CERUTI SCURTI J., TOZZI M.; 1983-84. Sintesi micorrizica tra *Boletus aereus* e *Quercus pubescens*. *Allionia* 26 5-17

CERUTI A., TOZZI M., REITANO G.; 1985. Sintesi micorrizica tra *Boletus aereus* e *Castanea sativa*. *Allionia* 27 5-9

CERUTI A., TOZZI M., REITANO G.; 1987-88. Micorrize di sintesi tra *Boletus edulis*, *Pinus sylvestris* e *Picea excelsa*. *Allionia* 28 117-124

CHEVALIER G., MOUSAIN D., COUTEAUDIER Y.; 1975. Ectomycorrhizal associations between Tuberaceae and Cistaceae. *Ann Rev Phytopathologie* 7 355-357

COMANDINI O., CONTU M., RINALDI A.C.; 2006. An overview of *Cistus* ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16 381-395

DE ROMÁN M., CLAVERÍA V., DE MIGUEL A.M.; 2005. A revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961. *Mycol Res* 109 1063-1104

DÍEZ J.; 1998. Micorrizas del bosque mediterráneo: reforestación, biotecnología forestal (micropropagación y micorrización in vitro) y ecología molecular [Doctoral dissertation]. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares

DÍEZ J., GARCÍA-MONTERO L.G., MANJÓN J.L.; 1994. Mycorrhized vitroplants of *Cistus albidus* and *C. salvifolius*: colinizers in poor soil and truffle cultivation. Abstract Book of the 4th European Symposium on Mycorrhizas

DUÑABEITIA M.K., HORMILLA S., SALCEDO I., PEÑA J.I.; 1996. Ectomycorrhizae synthesis between *Pinus radiata* and eight fungi associated with *Pinus* spp. *Mycologia* 88 897-908

FONTANA A., GIOVANETTI G.; 1978. Simbiosi micorrhizica fra *Cistus incanus* L. ssp. *incanus* e *Tuber melanosporum*. *Allionia* 23 5-12

FRANZ F., ACKER G.; 1995. Rhizomorphs of *Picea abies* ectomycorrhizae: ultrastructural aspects and elemental analysis (EELS and ESI) on hyphal inclusions. *Nova Hedwigia* 60 253-267

FROIDEVAUX L., AMIET R.; 1975. Ectendomycorrhizae of *Pinus mugo* + *Boletus edulis* subsp. *edulis* and *Pinus cembra* + *Suillus variegatus* formed in pure culture. *European Journal of Forest Pathology* 5 57-61

GARDES M., BRUNS T.D.; 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2 113-118

GARRIDO N.; 1988. Agaricales s.l. und ihre Mycorrhizen in den Nothofagus-Wäldern Mittelchiles. J. Cramer, Berlin-Stuttgart: Bibliotheca Mycologica 120

GIOVANNETTI G., FONTANA A.; 1982. Mycorrhizal synthesis between Cistaceae and Tuberaceae. *New Phytol* 92 533-537

GRONBACH E.; 1988. Charakterisierung und Identifisierung von Ektomykorrhizen in einem Fichtenbestand mit Untersuchungen zur Merkmalsvariabilität in sauer beregneten Flächen. J. Cramer, Berlin-Stuttgart: Bibliotheca Mycologica 125

GIOMARO G.M., SISTI D., ZAMBONELLI A.; 2005. Cultivation of edible ectomycorrhizal fungi by in vitro mycorrhizal synthesis. In: DECLERCK S., STRULLU D.G., FORTIN J.A. (eds): In vitro culture of mycorrhizas. Soil Biology 4 253-267

HALL I.R., LYON A.J.E., WANG Y., SINCLAIR L.; 1998. Ectomycorrhizal fungi with edible fruiting bodies. 2. *Boletus edulis*. *Econ Bot* 52 44-56

HORTAL S., PERA J., PARLADÉ J.; 2008. Tracking mycorrhizas and extraradical mycelium of the edible fungus *Lactarius deliciosus* under field competition with *Rhizopogon* spp. *Mycorrhiza* 18 69-77

LEONARDI M., PAOLOCCI F., RUBINI A., SIMONINI G., PACIONI G.; 2005. Assessment of inter- and intra-specific variability in the main species of *Boletus edulis* complex by ITS analysis. *FEMS Microbiol Lett* 243 411-416

MARTÍNEZ-PEÑA F., GÓMEZ CONEJO R., ORTEGA-MARTÍNEZ P.; 2006-2008. MICODATA – Sistema de información geográfica sobre la producción, aprovechamiento y ordenación del recurso micológico en Castilla y León. http://www.micodata.es (consultado 24-03-2008)

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

MEOTTO F., PELLEGRINO S., BOUNOUS G.; 1999. Evolution of *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Pers. and *Boletus edulis* Bull.: Fr. synthetic ectomycorrhizae on European chesnut (*Castanea sativa* Mill.) seedlings under field conditions. *Acta Horticulturae* 494 201-204

MOLINA R.; 1979. Pure culture synthesis and host specificity of red alder mycorrhizae. *Can J Bot* 57 1223-1228

MOLINA R., TRAPPE J.; 1982a. Lack of mycorrhizal specificity by the ericaceous hosts *Arbutus menziesii* and *Arctostaphylos uva-ursi*. *New Phytol* 90 495-509

MOLINA R., TRAPPE J.; 1982b. Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. *For Sci* 28 423-458

MORTE A., GUTIÉRREZ A., HONRUBIA M.; 2004. Desert truffle cultivation: a rehabilitation tool for degraded and semiarid lands. In: FAZ A., ORTIZ R., GARCÍA G. (eds): Abstract Book of the 4th International Conference on Land Degradation

MUÑOZ J.A.; 2005. *Boletus* s.l. Fungi Europaei 2, Edizioni Candusso, Alassio

MUÑOZ F., NAVARRO C. (eds); 1993. Cistaceae. En: CASTROVIEJO BOLIVAR S. (ed): Flora Ibérica. Volúmen III. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid, pp 318–436

OLIVIER J.M., GUINBERTEAU J., RONDET J., MAMOUN M.; 1997. Vers l´inoculation contrôlée des cèpes et bolets comestibles? *Rev For Fr* XLIX 222-234

OORT J.P.; 1981. Nutricional requirements of *Lactarius* species and cultural characters in relation to taxonomy. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York

PALFNER G.; 2001. Taxonomische Studien an Ektomykorrhizen aus den Nothofagus-Wäldern Mittelsüdchiles. J. Cramer, Berlin-Stuttgart: Bibliotheca Mycologica 190

POITOU N., MAMOUN M., DELMAS J.; 1982. Quelques résultats obtenus concernant la mycorhization de plantes-hôtes par les champignons mycorhiziens comestibles. Les Mycorhizes: biologie et utilization. Les Colloques de l'INRA nº13: 295-301

PUPPI G., TARTAGLINI N.; 1991. Mycorrhizal types in three Mediterranean communities affected by fire to different extents. *Acta Ecologica* 12 295-304

ROTH-BEJERANO N., SELA E., KAGAN-ZUR V.; 2003. Low soil temperature favors survival of *Cistus incanus* - *Tuber melanosporum* mycorrhizas. *Micologia e Vegetazione Mediterranea* 18 84-88

SINGER R.; 1986. The Agaricales in modern taxonomy. 4th ed, Koeltz Scientific Books, Koenigstein

SMITH S.E., READ D.J.; 1997. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd ed, Academic Press Lim, London

TORRES P., ROLDÁN A., LANSAC A.R., MARTIN A.; 1995. Ectomycorrhizal formation between *Cistus ladanifer* and *Laccaria laccata*. *Nova Hedwigia* 60 311–315

TOZZI M., SCURTI I.C., BERTA G.; 1980. Ricerche preliminari di sintesi tra *Boletus edulis* e *Quercus pubescens. Allionia* 24 5-11

WANG Y., HALL I.R.; 2004. Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Can J Bot* 82 1063-1073

WENKART S., ROTH-BEJARANO N., MILLS D., KAGAN-ZUR V.; 2001. Mycorrhizal associations between *Tuber melanosporum* mycelia and transformed roots of *Cistus incanus. Plant Cell Reports* 20 369-373