



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Facultat de Ciències

Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia



IRTA (Recerca i Tecnologia Agroalimentàries)

Centre de Cabriels, departament de Protecció Vegetal

**CARACTERITZACIÓ, QUANTIFICACIÓ I PERSISTÈNCIA EN
PLANTACIÓ DEL FONG ECTOMICORRÍZIC COMESTIBLE
Lactarius deliciosus EN SISTEMES DE PRODUCCIÓ
CONTROLADA**

Tesi doctoral

Sara Hortal Botifoll

*Memòria presentada per optar al grau de Doctor en Biologia
amb el vist-i-plau de:*

Dr. Xavier Parladé Izquierdo
Director de tesi, IRTA

Dr. Sergi Santamaria del Campo
Tutor, UAB

Març 2008

AGRAÏMENTS

Aquesta tesi representa la culminació de quatre anys de treball que han significat per a mi una gran experiència a nivell professional i personal. Una experiència que m'ha permès gaudir de la feina, aprendre i assumir nous reptes. Una història també d'amistat i creixement personal. Per tot plegat, deixar enrere aquesta fase s'està convertint en una tasca realment difícil... toca però mirar endavant i afrontar el futur carregada d'aquesta energia positiva. M'agradaria aprofitar l'oportunitat per donar les gràcies a la gent que ha fet possible que arribés fins aquí i, sobretot, que gaudís tant del camí.

Molt especialment al Dr. Xavier Parladé, director d'aquesta tesi, per la supervisió del treball, per la seva disponibilitat, per la implicació, per la confiança, per l'entusiasme i, no menys important, per l'excel·lent tracte personal i els bons moments compartits. El director ideal!

Al Dr. Joan Pera, investigador del grup d'ectomicorrizes, per la seva implicació en aquest treball, per tots els suggeriments, pels mostrejos compartits i per tots els cops que hem rigut plegats recordant anècdotes.

Al Dr. Josep Girbal i al Dr. Sergi Santamaria (tutor de la tesi), professors i micòlegs de la Unitat de Botànica, pel suport rebut en tot moment i per l'interès mostrat.

Al Departament d'Educació i Universitats de la Generalitat de Catalunya i al Fons Social Europeu pel finançament de l'ajut FI que m'ha permès dur a terme aquesta tesi.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) pel finançament del projecte RTA04-029 que ha permès el desenvolupament de la tesi.

Al Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), institució on s'ha desenvolupat aquest treball i als directors del centre de Cabriels, Dr. Joan Juli Bonet i Dr. Pere Arús. A la cap del departament de Protecció Vegetal, Dra. Soledad Verdejo Lucas, pel suport rebut durant aquesta fase. Al personal del centre i, especialment, del departament per l'excel·lent acollida i les experiències compartides.

Al Dr. Luis Galipienso pel suport inicial en l'aplicació de tècniques moleculars.

Al Dr. Jordi Luque per haver començat, en certa manera, aquesta història. Saps d'algun postdoc? Al Dr. Jose Aramburu pels moments d'oci entre PCR i PCR, amb qui discutiràs ara?

Al personal de suport Victòria Barnés, Olga Jurado, Montse Prat i Anna Barba pel suport en el laboratori i en el manteniment de tants i tants pins, pel bon ambient de treball i per tots els cops que hem rigut. Qui us embussarà ara la pica?

Al Dr. Thomas D. Bruns i al Dr. Peter G. Kennedy de la University of California at Berkeley per acollir-me al seu grup de recerca i convertir la meva estada en una

experiència tan summament interessant, profitosa i alhora divertida. A la resta de membres i amics del Bruns lab per la seva originalitat i per fer que fos una gran experiència també a nivell personal, en especial a la Val Wong, Shannon Peters, Nicole Hynson, Kabir Peay, Sarah Bergemann, Primrose Boynton, Else Vellinga, Tim Szaro, Nick Rosenstock, Tasha Teutsch Hausmann i Martha Palomino.

Al personal de la Unitat de Genòmica dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona, Ramon Seminago, Amaya Amador, Berta Fusté i Agustí Arasanz, pel tracte rebut i pel seu suport en tasques de seqüenciació i PCR en temps real.

Al Sr. Joan Botey, propietari forestal, per l'interès mostrat en el projecte, per permetre l'establiment de parcel·les experimentals en els seus terrenys de Fitor i per acollir-nos a casa seva.

Al personal de la Unitat de Botànica de la UAB per haver-me donat l'oportunitat d'entrar en aquest món, pel tracte rebut i per donar-me el seu suport en la decisió de realitzar la tesi a l'IRTA.

Al Dr. Anselm Rodrigo de la Unitat d'Ecologia de la UAB, primer contacte amb la recerca, pel seu entusiasme, per assumir el paper de conseller i per encoratjar-me a emprendre aquesta aventura.

Als companys del projecte Arboletus, Fernando Martínez Peña, Ana María de Miguel, Beatriz Águeda, Marina Fernández Toirán, Oscar Cisneros i Pilar Modrego, pels coneixements i experiències compartides.

A tots els que han sacrificat un deliciós rovelló a la brasa per poder ampliar la col·lecció de fongs ectomicorrízics de l'IRTA.

Als companys d'organització de l'exposició de bolets d'Andorra, Josep Girbal, Manel Niell, Marta Domènech, Roger Caritg, Gemma Raduán i Laia Ribas, per tantes bones estones i coneixements compartits. Al Dr. Jaume Llistosella per la determinació d'alguns exemplars de *Lactarius* spp. recol·lectats a Andorra.

Als companys i amics de carrera i dels meus inicis a botànica (Anna, Manel, David, Marta, Laies, Gemma...) per compartir l'experiència.

Als col·lectius D-Recerca i Precarios per l'esforç de reivindicació d'una carrera investigadora digna, especialment en la seva fase inicial.

Als que han fet d'aquesta una experiència única i són ara causa important de que em costi tant deixar enrere aquesta fase... Per la intensitat de l'amistat, per compartir tantes rialles, moments mítics i inoblidables però també plors, emocions o dubtes. Als companys que ocupen o han passat per la gran caseta de doctorands: Sole (el meu gran altre jo), Rafa (¡qué grande eres!), Amaia (la reina de la caseta), Laura (grans frases per la història), Marta Busquets (la bondat feta persona!), Ana (la gran i vital del Cueto, et trobem a faltar!), Nati (transmeto felicitat!), Katherine (¡cuéntame todo

cuando me vaya!), Lorena (nou impuls per la caseta), Cris (que ja ets mama!), Sònia (la reina de les duatlons), Meri (energia positiva), Amparo (nos cambiaste por unos animales!) i Miguel (l'enyorat company masculí del Rafa). A tota la resta de companys amb qui hem compartit grans moments i farres, especialment a la Rosa (com hem rigut! I plorat!), Job (el nostre rústic man), Jordi Sabaté (o les mil anècdotes), Llum (no paro!), Mireia (o la pubilla del Bages), Mimar (descobrint el món plegades), Olga (amb qui cantaré ara?), Pitet (que jo vull fer la tesi!), Óscar (esos dancings!), Pons (o el clan de les germanes), Chelo (no et perdis pels camps de Kansas!) i Victor (cántame!)

Als que, tot i no jugar-hi un paper directe, han fet possible aquesta tesi. Als meus pares pel seu suport incondicional, per compartir amb intensitat cada decisió, espera, neguit o alegria. A la família per fer-me costat i per l'esforç d'entendre què faig, especialment a les iaies, exemple de vitalitat, al meu germà Iban per ser-hi sempre, al sector jove i femení, Patri, Heba i Nàdia, per la complicitat i al petit Omar, l'alegria de la casa! A la Mercè per alegrar-se amb cada pas i patir amb cada entrebanc.

A tots els amics i amigues per fer que mai perdi de vista les coses realment importants de la vida i per permetre que pugui expressar-me tal i com sóc. A les nenes, Laia, Àstrid, Laura i Anna, per tantes emocions i bons moments compartits, pel grau de complicitat a què hem arribat, per complementar-nos en una combinació ben original. A la colla d'amics, que corre el risc de ser considerada una secta, Montse, Meri, Marc, Quim, Eva, Iolanda, Víctor, Albert, Laia, Xavi, Lluís, Raquel i els petits que van augmentant aquesta gran família, per haver compartit experiències que ningú més entendria, per les bones converses, per la ironia, pel punt de bogeria, per les filosofades virtuals, per viure intensament.

Finalment, al Miquel, per fer-me costat incondicionalment, per fer que les coses semblin més senzilles, per respectar totes les decisions, per tot el que hem viscut plegats i el que ens queda per endavant, pel que riem, per compartir una vida feliç.

SUMARI

RESUM	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
INTRODUCCIÓ GENERAL	15
I. AVALUACIÓ <i>in vitro</i> DEL POTENCIAL MICORRÍZIC DE DIFERENTS SOQUES DE <i>Lactarius deliciosus</i>	27
1.1. HIPÒTESI DE TREBALL	28
1.2. OBJECTIUS	28
1.3. INTRODUCCIÓ	28
1.4. MATERIAL I MÈTODES	30
1.4.1. Aïllament en cultiu pur de <i>L. deliciosus</i>	30
1.4.2. Síntesi de micorrizes en cultiu pur	31
1.4.3. Lectura i anàlisi de resultats	32
1.5. RESULTATS	33
1.6. DISCUSSIÓ	37
II. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR I IDENTIFICACIÓ DE MICORRIZES I MICELI EXTRARADICAL DE <i>Lactarius deliciosus</i>	41
2.1. HIPÒTESI DE TREBALL	42
2.2. OBJECTIUS	42
2.3. INTRODUCCIÓ	42
2.4. MATERIAL I MÈTODES	45
2.4.1. Obtenció de material fúngic en diferents fases de la simbiosi	45
2.4.2. Tècniques moleculars aplicades	46
2.4.2.1. <i>Extracció de DNA</i>	46
2.4.2.2. <i>Caracterització específica</i>	47
2.4.2.2.1. <i>Amplificació de la regió ITS del rDNA per PCR</i>	47

2.4.2.2.2.	<i>Seqüenciació i disseny d'encebadors específics</i>	48
2.4.2.2.3.	<i>PCR específica</i>	49
2.4.2.3.	<i>Caracterització intraespecífica</i>	49
2.4.2.3.1.	<i>Anàlisi SSCP de la regió ITS</i>	49
2.4.2.3.2.	<i>Microsatellite-primed PCR</i>	50
2.5.	RESULTATS	51
2.5.1.	<i>Caracterització específica</i>	51
2.5.1.1.	<i>Seqüenciació i disseny d'encebadors específics</i>	51
2.5.1.2.	<i>PCR específica</i>	52
2.5.2.	<i>Caracterització intraespecífica</i>	54
2.5.2.1.	<i>Anàlisi SSCP de la regió ITS</i>	54
2.5.2.2.	<i>Microsatellite-primed PCR</i>	58
2.6.	DISCUSSIÓ	59

III. ESTABLIMENT DE PLANTACIONS EXPERIMENTALS EN CAMP.

SEGUIMENT DE LA COLONITZACIÓ RADICAL I EXTRARADICAL DE

<i>Lactarius deliciosus</i>	65	
3.1.	HIPÒTESI DE TREBALL	66
3.2.	OBJECTIUS	66
3.3.	INTRODUCCIÓ	66
3.4.	MATERIAL I MÈTODES	70
3.4.1.	<i>Producció d'inòcul miceliar de <i>L. deliciosus</i></i>	70
3.4.2.	<i>Inoculació de la planta</i>	71
3.4.3.	<i>Establiment de parcel·les i disseny experimental</i>	74
3.4.4.	<i>Seguiment de la colonització de <i>L. deliciosus</i></i>	82
3.4.4.1.	<i>Colonització radical</i>	82
3.4.4.2.	<i>Colonització extraradical</i>	82
3.4.5.	<i>Creixement</i>	84
3.4.6.	<i>Anàlisis estadístiques</i>	85
3.5.	RESULTATS	85
3.5.1.	<i>Influència del nivell inicial de colonització de <i>L. deliciosus</i> en la seva persistència en camp</i>	85
3.5.1.1.	<i>Can Badia 2 (2 nivells de colonització inicial)</i>	85
3.5.1.1.1.	<i>Colonització radical i extraradical</i>	86
3.5.1.1.2.	<i>Creixement</i>	87

3.5.1.2.	<i>Micro 05 (2 nivells de colonització inicial)</i>	89
3.5.1.2.1.	<i>Colonització radical i extraradical</i>	89
3.5.1.2.2.	<i>Creixement</i>	90
3.5.2.	<i>Influència del factor soca inoculada en la persistència en camp de L. deliciosus</i>	91
3.5.2.1.	<i>Can Badia 1 (2 soques de L. deliciosus)</i>	91
3.5.2.1.1.	<i>Colonització radical i extraradical</i>	91
3.5.2.1.2.	<i>Creixement</i>	92
3.5.2.2.	<i>Micro 06 (5 soques de L. deliciosus)</i>	94
3.5.2.2.1.	<i>Colonització radical i extraradical</i>	94
3.5.2.2.2.	<i>Creixement</i>	96
3.5.2.3.	<i>Micro 07 Cabrils (4 soques de L. deliciosus)</i>	97
3.5.2.3.1.	<i>Colonització radical i extraradical</i>	97
3.5.2.3.2.	<i>Creixement</i>	98
3.5.2.4.	<i>Micro 07 La Bisbal (5 soques de L. deliciosus)</i>	98
3.5.2.4.1.	<i>Colonització radical i extraradical</i>	98
3.5.2.4.2.	<i>Creixement</i>	101
3.5.2.5.	<i>Comparació de resultats entre localitats</i>	102
3.5.2.5.1.	<i>Colonització radical i extraradical</i>	102
3.5.2.5.2.	<i>Creixement</i>	103
3.5.2.6.	<i>Resum de resultats dels diferents experiments</i>	105
3.5.2.6.1.	<i>Colonització radical i extraradical</i>	105
3.5.2.6.2.	<i>Creixement</i>	105
3.6.	DISCUSSIÓ	106

IV. AVALUACIÓ DE LA CAPACITAT COMPETITIVA DE *Lactarius*

***deliciosus* DAVANT DE *Rhizopogon* spp.** 115

4.1. HIPÒTESI DE TREBALL 116

4.2. OBJECTIUS 116

4.3. INTRODUCCIÓ 116

Fase 1: Persistència del fong *L. deliciosus* en competència amb *R. roseolus* en test utilitzant dos sòls diferents 117

4.4. MATERIAL I MÈTODES 117

4.4.1. Inoculacions 117

4.4.2. Disseny experimental 118

4.4.3. Quantificació de la colonització fúngica (micorrizes i miceli extraradical) 119

4.4.4.	Creixement	120
4.4.5.	Anàlisis estadístiques	120
4.5.	RESULTATS.....	121
4.5.1.	Colonització radical.....	121
4.5.2.	Quantificació del miceli extraradical de <i>L. deliciosus</i> mitjançant PCR en temps real	123
4.5.3.	Creixement	125
4.6.	DISCUSSIÓ	125
Fase 2: Persistència de <i>L. deliciosus</i> en competència amb <i>R. roseolus</i> i <i>R. luteolus</i> en testos i en camp en dues localitats diferents		
4.7.	MATERIAL I MÈTODES	128
4.7.1.	Inoculacions	128
4.7.2.	Disseny experimental	129
4.7.3.	Quantificació de la colonització fúngica	131
4.7.4.	Creixement	133
4.7.5.	Anàlisis estadístiques	134
4.7.6.	Competència micel·liar en placa	134
4.8.	RESULTATS.....	135
4.8.1.	Colonització radical.....	135
4.8.2.	Quantificació del miceli extraradical mitjançant PCR en temps real	138
4.8.3.	Relacions linears entre paràmetres de colonització fúngica (camp).....	141
4.8.4.	Creixement	143
4.8.5.	Competència micel·liar en placa	144
4.9.	DISCUSSIÓ	146
V.	CONCLUSIONS	151
	BIBLIOGRAFIA	155
	ANNEXOS.....	173
	ANNEX 1. DADES DE LES SOQUES UTILITZADES	174
	ANNEX 2. ALINEAMENT DE SEQÜÈNCIES DE LA REGIÓ ITS DE <i>Lactarius</i> spp.	176
	ANNEX 3: PUBLICACIONS I CONTRIBUCIONS A CONGRESSOS RELACIONADES AMB AQUESTA TESI	188

RESUM

El projecte de tesi doctoral s'emmarca en la producció de plantes inoculades amb soques seleccionades del fong ectomicorrízic comestible *Lactarius deliciosus* i en el seguiment de la seva persistència un cop establert en camp. S'ha avaluat la capacitat colonitzadora de 25 soques de *L. deliciosus* en síntesi en cultiu pur amb *Pinus pinaster*. Els resultats han mostrat que les soques provades presenten diferent potencial colonitzador. La capacitat de formació de micorrizes s'ha relacionat de manera negativa amb el temps des de l'aïllament del cultiu i, de manera positiva, amb la capacitat de formació de rizomorfs. S'han posat a punt diferents tècniques moleculars per a la caracterització específica i intraespecífica de *L. deliciosus* i s'ha comprovat la seva efectivitat en la identificació en camp del fong en les fases críptiques de la simbiosi (micorriza i miceli extraradical present en el sòl). L'encebador LDITS2R, dissenyat a la regió ITS del rDNA de *L. deliciosus*, en combinació amb l'encebador universal ITS1 ha permès l'amplificació específica d'aquest fong mitjançant PCR a partir de DNA extret directament de mostres de camp. L'anàlisi *single strain conformation polymorphisms* (SSCP) dels productes específics amplificats ha permès distingir fins a nou patrons diferents entre les 18 soques de *L. deliciosus* analitzades que permeten la identificació intraespecífica de la soca seleccionada introduïda en camp. S'ha produït planta micorrizada amb *L. deliciosus* en hivernacle i s'ha posat a punt un sistema de quantificació individualitzada i no destructiva de la colonització radical inicial mitjançant l'anàlisi de fotografies digitals. La planta produïda s'ha establert en plantacions experimentals i s'ha avaluat la persistència del fong inoculat a diferents temps per recompte del percentatge de micorrizes i quantificació del miceli extraradical mitjançant PCR en temps real. S'ha conclòs que la persistència de les micorrizes i l'extensió del miceli en el sòl es veuen afectades per les condicions de la localitat d'establiment de la plantació i per la soca inoculada. En canvi, el nivell inicial de colonització no ha tingut un efecte significatiu, en les condicions assajades, en la persistència de *L. deliciosus*. Per últim, s'ha avaluat la persistència de *L. deliciosus* enfront a dues espècies de *Rhizopogon* potencialment competidores que poden desplaçar el fong introduït. S'ha detectat un efecte negatiu de *R. roseolus* en la persistència de *L. deliciosus*. Els resultats suggereixen que la competència entre aquests dos fongs té lloc a nivell del sistema radical per la colonització de les arrels lliures mentre que no s'ha detectat interacció negativa a nivell de miceli extraradical. La correlació entre el percentatge de micorrizes i la quantitat de miceli present en el sòl ha estat positiva per a les tres espècies estudiades. En conseqüència, la quantificació de miceli extraradical pot ser un bon indicador del grau de colonització radical de la planta i permetre un seguiment no destructiu del fong en camp.

RESUMEN

El proyecto de tesis doctoral se enmarca en la producción de plantas inoculadas con cepas seleccionadas del hongo ectomicorrícico comestible *Lactarius deliciosus* y en el seguimiento de su persistencia una vez establecido en campo. Se ha evaluado la capacidad colonizadora de 25 cepas de *L. deliciosus* en síntesis en cultivo puro con *Pinus pinaster*. Los resultados han mostrado que las cepas probadas presentan diferente potencial colonizador. La capacidad de formación de micorrizas se ha relacionado de manera negativa con el tiempo desde el aislamiento del cultivo y, de manera positiva, con la capacidad de formación de rizomorfos. Se han puesto a punto diferentes técnicas moleculares para la caracterización específica e intraespecífica de *L. deliciosus* y se ha comprobado su efectividad en la identificación del hongo en campo en las fases crípticas de la simbiosis (micorriza y micelio extraradical presente en el suelo). El cebador LDITS2R, diseñado en la región ITS del rDNA de *L. deliciosus*, en combinación con el cebador universal ITS1 ha permitido la amplificación específica de este hongo mediante PCR a partir de DNA extraído directamente de muestras de campo. El análisis *single strain conformation polymorphisms* (SSCP) de los productos específicos amplificados ha permitido distinguir hasta nueve patrones diferentes entre las 18 cepas de *L. deliciosus* analizadas que permiten la identificación intraespecífica de la cepa seleccionada introducida en campo. Se ha producido planta micorrizada con *L. deliciosus* en invernadero y se ha puesto a punto un sistema de cuantificación individualizada y no destructiva de la colonización radical inicial mediante el análisis de fotografías digitales. La planta producida se ha establecido en plantaciones experimentales y se ha evaluado la persistencia del hongo inoculado a distintos tiempos mediante el recuento del porcentaje de micorrizas y la cuantificación del micelio extraradical mediante PCR en tiempo real. Se ha concluido que la persistencia de las micorrizas y la extensión del micelio en el suelo se ven afectadas por las condiciones de la localidad de establecimiento de la plantación y por la cepa inoculada. En cambio, el nivel inicial de colonización no ha tenido efecto significativo, en las condiciones ensayadas, en la persistencia de *L. deliciosus*. Por último, se ha evaluado la persistencia de *L. deliciosus* frente a dos especies de *Rhizopogon* potencialmente competidoras que pueden desplazar al hongo introducido. Se ha detectado un efecto negativo de *R. roseolus* en la persistencia de *L. deliciosus*. Los resultados sugieren que la competencia entre estos dos hongos tiene lugar a nivel del sistema radical por la colonización de raíces libres mientras que no existe interacción negativa a nivel de micelio extraradical. La correlación entre el porcentaje de micorrizas y la cantidad de micelio presente en el suelo ha sido positiva para las tres especies estudiadas. En consecuencia, la cuantificación de micelio extraradical puede ser un buen indicador del grado de colonización radical de la planta y permitir un seguimiento no destructivo del hongo en campo.

ABSTRACT

The main objective of the thesis project is the production of inoculated plants with selected strains of the edible ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus* and tracking its persistence once established in field plantations. The colonization ability of 25 strains of *L. deliciosus* has been evaluated in pure culture synthesis with *Pinus pinaster*. The results have shown differences in root colonization level of the evaluated strains. The formation of mycorrhizas has been negatively related to the age of the fungal culture and positively to the formation of rhizomorphs. Different molecular techniques have been optimized for specific and intraspecific characterization of *L. deliciosus* and evaluated for their effectivity in field identification of the fungus in the cryptic phases of the symbiosis (mycorrhizas and extraradical mycelium present in the soil). The design of the primer named LDITS2R in the ITS region of the rDNA of *L. deliciosus* combined with the universal primer ITS1 has allowed specific amplification of this fungus by PCR from DNA extracted from field samples. Single strain conformation polymorphisms (SSCP) analysis of the specific amplified products has provided nine different patterns among the 18 *L. deliciosus* analyzed strains which allowed for the intraspecific identification of the selected inoculated strain. Plants mycorrhizal with *L. deliciosus* have been produced in the nursery and initial radical colonization has been individually quantified in a non-destructive way by analysis of digital photographs. Experimental plantations have been established with the inoculated plants. Fungal persistence has been evaluated at different times by determining the percentage of mycorrhizas and the production of extraradical soil mycelium by real time PCR. The site and the inoculated strain significantly affected the persistence of mycorrhizas and the extension of the extraradical soil mycelium whereas no effect of the initial colonization level was observed under the experimental conditions tested. Finally, the persistence of *L. deliciosus* against two *Rhizopogon* species identified as potential competitors has been evaluated. The presence of *R. roseolus* in the field site affected negatively the persistence of *L. deliciosus*. The results obtained suggest that competition between these two fungi takes place at the root system level for colonization of the available roots. No negative interaction between extraradical mycelia of both species was observed. Linear correlations between the percentage of mycorrhizas and soil mycelium biomass were significant and positive for the three fungal species studied. Consequently, the quantification of extraradical mycelium could be a good indicator of the root colonization level of the plant allowing for non-destructive tracking of the fungus in the field.

INTRODUCCIÓ GENERAL

Els fongs comestibles se situen entre els productes forestals no llenyosos de major valor econòmic i potencial d'expansió (Arnolds 1995, Boa 2004). La majoria de les espècies comestibles més apreciades són produïdes per fongs ectomicorrízics, que s'associen simbiòticament a arrels de plantes. Aquests fongs, en comparació amb els fongs sapròfits, només representen un 5 % del mercat total però, en canvi, produeixen aproximadament la meitat dels beneficis derivats del comerç de bolets (Hall i Wang 1996, Hall i Wang 2001).

Les micorrizes són associacions simbiòtiques mutualístiques entre determinats fongs del sòl i arrels de plantes vasculars en què la planta rep aigua i nutrients minerals i el fong compostos orgànics derivats de la fotosíntesi (Brundrett et al. 1996, Harley i Smith 1983). S'estima que al voltant del 95% de les espècies de plantes vasculars actuals pertanyen a famílies que formen micorrizes (Trappe 1977, 1987). Es coneixen almenys set tipus d'associacions micorríziques en funció dels organismes implicats i la morfologia de l'associació (Harley i Smith 1983). D'aquests tipus, els més importants són, d'una banda, les micorrizes arbusculars i, de l'altra, les ectomicorrizes. En les primeres, fongs de la divisió glomeromicets (Schübler et al. 2001) formen hifes, arbuscles i vesícules dins i entre les cèl·lules corticals de l'arrel en gran part de les famílies de plantes vasculars (Brundrett et al. 1996, Harley i Smith 1983). En les ectomicorrizes, en canvi, els fongs implicats (ascomicets i especialment basidiomicets) formen un embolcall d'hifes al voltant de l'arrel (d'arbres o arbustos) anomenat mantell que s'estén cap al seu interior formant un reticle anomenat xarxa de Hartig que ocupa els espais intercel·lulars de l'epidermis i el còrtex. És en aquest reticle d'hifes intercel·lular on es produeix l'intercanvi d'aigua i nutrients entre els dos organismes (Brundrett et al. 1996). A més a més, el mantell també pot emetre hifes o cordons miceliars cap al sòl (miceli extraradical) estenent l'àrea d'influència de l'arrel (Agerer 2006).

La relació de simbiosi entre aquests dos organismes afavoreix l'adquisició d'aigua i nutrients per part de la planta i juga un important paper ecològic en els ecosistemes forestals (Read i Perez-Moreno 2003, Smith i Read 1997). Aquests fongs, apart de proporcionar a la planta nutrients minerals, són també capaços de mobilitzar nitrogen i fòsfor d'origen orgànic (Read i Perez-Moreno 2003). Poden, a més a més, aportar a la planta beneficis no nutricionals com ara minimitzar l'efecte tòxic de metalls pesats (Wilkinson i Dickinson 1995), reduir l'estrès per sequera (Parke et al. 1983), protegir les plàntules de la infecció per part de patògens de l'arrel (Chakravarty i Unestam 1987) o establir connexions entre plantes mitjançant el miceli extraradical permetent la

transferència de diferents compostos entre plantes, de la mateixa o diferent espècie (Bownlee et al. 1983, Plamboeck et al. 2007, Read et al. 1985, Simard i Durall 2004). En conclusió, els fongs ectomicorrízics, per la seva fisiologia i localització, constitueixen un element clau en el funcionament i la productivitat dels ecosistemes forestals (Smith i Read 1997).

Entre els fongs ectomicorrízics comestibles es troben ascomicets tan apreciats com les diferents espècies de tòfones (*Tuber* spp.) o turmes (gèneres *Terfezia*, *Tirmania* i *Picoa*) i basidiomicets com els ceps (*Boletus* spp.), els rossinyols (*Cantharellus cibarius* Fr.) o els pinetells i rovellons (*Lactarius* spp.), entre molts d'altres. El gènere *Lactarius* agrupa diferents espècies totes elles formadores d'ectomicorrizes (Hutchison 1999, Singer 1986). Les espècies d'aquest gènere tenen un paper important en un ampli rang d'ecosistemes com a colonitzadors d'arrels de plantes llenyoses en estats madurs de la successió vegetal (Hutchison 1999, Trappe 1962). Dins del gènere, el grup d'espècies comestibles (en la secció Dapetes) s'associa bàsicament a plantes de la família de les pinàcies. Es considera un gènere propi d'estadis avançats en la successió perquè generalment s'observen esporocarps en boscos madurs (Hutchison 1999) però també s'han trobat, de manera regular, fructificacions de *L. deliciosus* (L.) Gray en plantacions de pins joves (Bonet 2001). Per al fong, l'establiment d'aquesta simbiosi amb l'arrel de la planta és imprescindible ja que la planta constitueix la seva principal font de carboni (generalment és incapaç de degradar compostos com cel·lulosa o lignina) (Hutchison 1999). Per tant, la fructificació del fong també depèn de l'establiment de l'associació entre els dos organismes. En el cas del gènere *Lactarius*, hi ha poques dades en quant a la capacitat del fong per proporcionar nutrients a la planta i sembla que el seu paper a l'hora de protegir-la dels efectes dels metalls pesats o de l'estrès hídric és reduït (Hutchison 1999). En canvi, sí que podria jugar un paper important en la protecció de l'arrel enfront a patògens del sòl (Hutchison 1999). Segons Guerin-Laguette et al. (2000, 2003) sembla que *L. deliciosus* té un efecte beneficiós en el creixement i fisiologia de la planta hoste sota determinades condicions experimentals.

En aquest estudi es treballa amb l'espècie *L. deliciosus*, que es troba associada a plantes de la família de les pinàcies (Hutchison 1999). L'interès d'aquesta espècie rau en el fet que produeix bolets comestibles molt apreciats, coneguts popularment amb el nom de rovellons o pinetells. Als mercats d'arreu de Catalunya, així com en d'altres àrees d'Espanya, Europa, Àsia o nord d'Àfrica, anualment es comercialitzen grans quantitats de carpòfors tant de *L. deliciosus* com de l'espècie propera *L. sanguifluus*

(Paulet) Fr. (Boa 2004, Singer 1986) proporcionant una font d'ingressos molt important (figura 1). Tot i que els beneficis obtinguts amb aquest recurs estan clarament limitats per la seva disponibilitat estacional (Hall i Wang 1998), la producció d'aquests bolets representa una activitat econòmica interessant en àrees forestals mediterrànies de recursos limitats, que es podria sumar als beneficis obtinguts de l'agricultura o silvicultura tradicional en un sistema productiu diversificat.



Figura 1. Parades ambulants i mercats de venda de rovellons

En les darreres dècades, els beneficis derivats de la comercialització de la fusta han disminuït mentre que la demanda de fongs comestibles ha augmentat fent que l'explotació d'aquests recursos micològics hagi esdevingut una activitat força important. Tot i l'opacitat del comerç de bolets comestibles, l'any 2005 la producció de fongs comestibles a Espanya es va valorar en 15 milions d'euros, 13 dels quals correspongueren a Catalunya, una de les regions amb més tradició micològica (Anuari d'Estadística Forestal, MMA 2005). Aquest valor se situà per sota de la mitjana corresponent als darrers 10 anys (28 ± 4 milions €, mitjana \pm error estàndard) però, tot i així, els beneficis derivats de la producció de fongs comestibles superaren en l'àmbit espanyol els d'altres productes forestals com resina, glans, castanyes o pinyons i, concretament a Catalunya, també els del suro i els de la llenya utilitzada com a combustible (MMA 2005). De fet, els beneficis obtinguts amb el comerç de bolets comestibles poden superar els derivats de la producció de fusta en explotacions forestals de baixa productivitat (Álvarez et al. 2000, Oria de Rueda 1989). A més a més, les dades dels Anuaris d'Estadística Agroalimentària i Forestal (Ministerio de Agricultura, Ramadería y Pesca –MAPA 1991-2004- i Ministerio de Medio Ambiente –MMA 2005-) mostren que, tot i la variabilitat anual, la producció total de bolets a Espanya s'ha mantingut més o menys constant en els darrers 15 anys, amb una mitjana de 10 ± 2 tones.

Donat que els fongs simbiòtics depenen de l'arbre per fructificar, el seu cultiu és difícil i la via més típica d'obtenció d'aquest recurs és la recol·lecció en camp de fongs silvestres (Wang i Hall 2004). Tot i tractar-se de recursos renovables es desconeix exactament quin efecte pot tenir una elevada pressió en la recol·lecció de determinades espècies fúngiques comestibles. S'ha demostrat que el nombre d'exemplars recol·lectats d'algunes espècies clau de bolets comestibles ectomicorrízics ha disminuït al llarg del segle passat (Arnolds 1995, Hall et al. 2003, Wang i Hall 2004). En aquest sentit, s'ha observat una disminució significativa de la producció de tòfones en els darrers 15 anys a Espanya (Anuaris d'Estadística Agroalimentària i Forestal, MAPA 1991-2004 i MMA 2005) i, a més llarg termini, en els darrers 100 anys a França (Hall et al. 2003).

En d'altres països, l'augment en la recol·lecció de determinats fongs comestibles ha dut a una disminució significativa de la producció (Molina et al. 1993). Així, per exemple, l'exportació de *Tricholoma matsutake* (S. Ito et Imai) Singer al Japó ha implicat un augment de la recol·lecció d'aquest bolet als Estats Units fent perillar la sostenibilitat del procés si no es prenen mesures per controlar la recol·lecció i protegir l'hàbitat forestal (Hosford et al. 1997). Pilz i Molina (2002) per la seva banda van concloure que la producció d'esporecarps pot disminuir quan s'utilitzen determinats sistemes de recol·lecció comercial que afecten les capes superiors del sòl. En canvi, Egli et al. (2006) en un estudi a llarg termini dut a terme a Suïssa, van concloure que la recol·lecció sistemàtica no redueix ni la producció futura de cossos fructífers ni la riquesa natural d'espècies fúngiques, independentment de la tècnica utilitzada. Tot i així, els resultats mostraren que el constant trepig del sòl forestal sí que redueix el nombre de carpòfors produïts. Es pot concloure per tant que per a una gestió adequada dels recursos fúngics cal considerar diferents factors que podrien estar relacionats amb aquesta disminució: degradació de l'hàbitat forestal associada a una recol·lecció intensiva, pèrdua gradual de determinats recursos fúngics per sobreexplotació i efectes que el mode de recol·lecció i les pràctiques forestals puguin tenir sobre la futura productivitat (Egli et al. 2006, Hall et al. 2003, Molina et al. 2001, Pilz i Molina 2002, Pilz et al. 2006).

Molts dels fongs comestibles que es recol·lecten i que, per tant, poden estar sotmesos a sobreexplotació són ectomicorrízics. Per tal d'assegurar la sostenibilitat de la recol·lecció de fongs ectomicorrízics amb un elevat valor comercial, actualment es treballa en dues línies d'investigació: la primera es basa en l'estudi dels factors que controlen la fructificació en condicions naturals i en les seves possibilitats de

manipulació mitjançant l'aplicació de determinades pràctiques forestals (Arnolds 1995, Egli i Ayer 1997, Olivier et al. 1997, Pilz i Molina 2002, Pilz et al. 2006). La segona se centra en posar a punt mètodes de micorrizació controlada, és a dir, de producció en viver de planta inoculada amb soques preseleccionades d'un determinat fong ectomicorríctic i posterior establiment en plantacions productives (Chevalier i Frochot 1997, Danell 1997, Hall i Wang 1998, Honrubia et al. 2007, Olivier et al. 1997).

L'establiment de la simbiosi entre el fong i la planta mitjançant el procés de micorrizació controlada és el primer pas per al maneig de la producció d'esporeocarpes de fongs ectomicorríctics. S'han desenvolupat diferents tècniques de producció i aplicació de l'inòcul fúngic per micorrizar plantes de viver (Brundrett et al. 1996, Marx 1980, Marx i Kenney 1982). Aquestes inoculacions han anat principalment dirigides a millorar la supervivència i creixement de plantes utilitzades en reforestació, aprofitant el paper beneficiós de les micorrizes en el desenvolupament de la planta (Castellano 1996, Castellano i Molina 1989, Garbaye 1991, Kropp i Langlois 1990, Marx i Ruehle 1989, Trappe 1977). La micorrizació controlada amb fongs comestibles consisteix en afavorir un procés natural per tal d'optimitzar i regularitzar la producció d'esporeocarpes del fong introduït, millorant així la rendibilitat de les plantacions forestals de manera sostenible.

Tot i les dificultats que comporta, el cultiu d'alguns fongs ectomicorríctics comestibles mitjançant la inoculació de plantes en condicions controlades s'ha convertit en una alternativa interessant de cara a satisfer la creixent demanda i promoure la conservació de les poblacions i ecosistemes naturals (Wang i Hall 2004). La producció de plantes inoculades amb *Tuber* spp. ha rebut una atenció especial degut a l'elevat valor econòmic dels seus carpòfors (tòfones). En aquest cas, el procés de micorrizació controlada s'ha desenvolupat a escala comercial, determinant quin és el millor procés d'inoculació de les plantes i quins són els requeriments edafoclimàtics i silvícoles necessaris per assegurar la fructificació del fong (Chevalier i Frochot 1997). També per a *Terfezia* spp. s'han posat a punt sistemes de producció controlada (Honrubia et al. 2007, Morte et al. 1994). En canvi, altres espècies ectomicorríctiques com *Amanita caesarea* (Scop.) Pers., *Boletus edulis* Bull., *Cantharellus cibarius*, *Lactarius deliciosus* o *L. sanguifluus* també d'interès comercial i amb una forta demanda han estat molt menys estudiades (Danell 1997, Hall i Wang 1998, Olivier et al. 1997). Tot i així, s'han dut a terme intents de producció de plantes micorrizades amb espècies comestibles com *Lactarius* sp., *Boletus* sp., *Cantharellus* sp. i *Tricholoma* sp. amb un èxit variable (revisat a Hall et al. 2003). Les dificultats en el maneig de l'inòcul fúngic i en la

producció de planta micorrizada en viver han limitat el desenvolupament de les inoculacions controlades (Hall et al. 2003, Hutchison 1999).

En el cas de *L. deliciosus*, Guerin-Laguet et al. (2000) van optimitzar les condicions de micorrizació de plantes de *Pinus sylvestris* L. amb aquest fong i de manera ocasional van aconseguir la seva fructificació en plantes de 20 mesos (18 mesos després de la inoculació). Parladé et al. (2004b) van avaluar l'eficàcia de diferents mètodes d'inoculació de *L. deliciosus* en plantes de *P. pinaster* Ait. i *P. sylvestris* en viver. Els millors resultats de micorrizació van ser obtinguts amb inòcul vegetatiu (miceliar) produït en una matriu de torba i vermiculita, tècnica que també va ser utilitzada a Rincón et al. (1999) per a la producció de micorrizes de *L. deliciosus* en plantes de *P. pinea* L. D'altra banda, Carrillo et al. (2004) van optimitzar la producció en bioreactors de miceli de *L. deliciosus* en cultiu líquid mitjançant la quantificació del contingut d'ergosterol en diferents condicions experimentals. L'establiment de plantacions experimentals amb arbres inoculats amb el fong *L. deliciosus* suposa una alternativa prometedora per a l'explotació sostenible de terrenys agrícoles abandonats o de baixa productivitat. En aquest sentit, Poitou et al. (1984) van establir plantacions amb plàntules de *P. pinaster* inoculades amb *Lactarius* spp. Guinberteau et al. (1989) van fer el seguiment d'aquestes parcel·les i van observar que hi havia producció d'esporecarps després de tres anys en camp. Wang i Hall (2002) van registrar l'aparició de carpòfors de *L. deliciosus* en una plantació de *P. radiata* D. Don 18 mesos després del seu establiment. Un any més tard, la plantació produïa 50 kg d'esporecarps per hectàrea (Wang et al. 2003). Apart d'aquestes dues plantacions, no hi ha més dades contrastades referents a experiments en camp.

Donat el temps que pot passar des de l'establiment d'una plantació fins a l'obtenció d'esporecarps és important poder fer un seguiment periòdic de la persistència a nivell vegetatiu del fong introduït, tant en forma d'ectomicorrizes com de miceli extraradical. La persistència del fong no podrà assegurar una producció regular d'esporecarps però sí que és un factor imprescindible perquè en condicions adequades es pugui donar la fructificació. D'entre els nombrosos factors que poden influir en el manteniment de les micorrizes en camp, destaquen el nivell inicial de colonització radical i la pressió competitiva de la micoflora autòctona (Perrin et al. 1996). Tradicionalment, el seguiment de la persistència del fong en camp s'ha dut a terme mitjançant identificació morfològica i recompte de les micorrizes presents a l'arrel per diferents mètodes (Brundrett et al. 1996, Parladé et al. 1996). Tot i l'important esforç de caracterització morfològica i descripció dels diferents tipus de micorrizes (revisat a Agerer 2006, de

Roman et al. 2005), sovint els caràcters morfològics de les micorrizes no permeten la seva identificació a nivell d'espècie. En aquest sentit, l'aplicació de tècniques moleculars basades en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) ha de facilitar la caracterització i el seguiment del fong en aquestes fases críptiques de la simbiosi. Nombrosos estudis posen de manifest la importància de l'aplicació de tècniques moleculars en la identificació de micorrizes (Di Battista et al. 2002, Gardes i Bruns 1993, Gardes et al. 1991, Henrion et al. 1992, Horton i Bruns 2001, Selosse et al. 1998, Weber et al. 2002) i l'estudi de les comunitats ectomicorríziques (Anderson i Cairney 2004, Martin 2007). La caracterització molecular de les micorrizes presents en els diferents horitzons del sòl ha permès per exemple estudis de la distribució espacial de fongs ectomicorrízics (Rosling et al. 2003). Un pas encara més important seria la identificació i localització del miceli extraradical, que constitueix la fase metabòlicament més activa de la micorriza (Smith i Read 1997) i que no es pot distingir morfològicament.

La capacitat de cada fong ectomicorrízic per absorbir, transportar i transferir aigua i nutrients ve, en gran part, determinada per les característiques del seu miceli extraradical, que juga un paper clau tant en l'absorció d'aigua i nutrients com en la seva transferència entre plantes (Guidot et al. 2003, Landeweert et al. 2003a, 2003b, Simard i Durall 2004, Simard et al. 2002). Malgrat el destacat paper funcional del miceli, hi ha molt poques dades sobre la distribució i abundància del miceli en el sòl i segueix sent la fase més desconeguda de la simbiosi (Horton i Bruns 2001, Leake et al. 2004, Read 1992). Aquest fet s'explica perquè la seva identificació i quantificació ha estat més problemàtica que la de les micorrizes (Landeweert et al. 2003a). És probable que l'estudi del miceli, respecte al de les micorrizes o esporocarps, proporcioni una visió diferent de l'estructura i funció de la comunitat ectomicorrízica (Anderson i Cairney 2007, Horton i Bruns 2001). Cal per tant aprofundir en l'estudi del miceli en el sòl i augmentar el coneixement relatiu a la seva distribució, dinàmica i funcionament en camp (Anderson i Cairney 2007, Cairney 2005).

Els sistemes miceliars de fongs micorrízics o sapròfits són difícils de detectar en el sòl mitjançant tècniques observacionals. Leake et al. (2004) han revisat diversos sistemes innovadors dissenyats per estudiar l'estructura i funció del miceli micorrízic extraradical com ara mètodes bioquímics o basats en marcadors moleculars, tècniques d'observació *in vitro* i en el sòl o compartimentació en sistemes lliures d'arrels. S'han dut a terme estimacions de la biomassa miceliana mitjançant la quantificació de determinats marcadors bioquímics (ergosterol, fosfolípids -PLFA-). Donat que aquests

marcadors no són específics de fongs ectomicorrízics, ha calgut utilitzar sistemes lliures d'arrels per tal d'estimar la quantitat de miceli corresponent a fongs sapròfits i corregir els resultats totals (Hendricks et al. 2006, Nilsson i Wallander 2003, Wallander et al. 2001). Aquest sistema segueix sent el més directe per estimar la biomassa miceliana total en camp (Anderson i Cairney 2007) tot i que les mesures puguin sobrestimar la quantitat real (Wallander 2006).

Les tècniques d'identificació molecular, en canvi, han permès el desenvolupament d'estudis més específics sobre la diversitat fúngica i l'estructura espacial del miceli de fongs ectomicorrízics en el sòl (Chen i Cairney 2002, Dickie et al. 2002, Genney et al. 2006, Koide et al. 2005b, Landeweert et al. 2003a, 2003b, 2005, Smit et al. 2003, Suz et al. 2006). Els mètodes moleculars s'han utilitzat també per a la quantificació específica de determinats fongs ectomicorrízics en el sòl amb l'objectiu d'avaluar l'impacte ecològic i funcional d'una determinada espècie en el seu ambient natural. Guidot et al. (2002, 2003) quantificaren el miceli de *Hebeloma cylindrosporum* Romagn. en extractes de DNA obtinguts a partir de sòls forestals mitjançant la tècnica PCR competitiva que es basa en incloure una quantitat coneguda d'una seqüència competidora que s'amplifica amb els mateixos encebadors que la seqüència diana però que difereix d'aquesta en el tamany. La proporció final dels dos tipus de productes formats en la reacció permet estimar la quantitat inicial de DNA diana. La majoria però d'estudis recents de quantificació de DNA apliquen la tècnica de PCR en temps real (*real-time PCR*) basada en la detecció i quantificació d'un senyal fluorescent que incrementa a mesura que augmenta la quantitat de producte de PCR generat en la reacció (Heid et al. 1996, Schena et al. 2004, Schild 1996). Aquesta tècnica permet detectar i quantificar el miceli i, per tant, pot ser una eina molt important de cara a estudis de seguiment espacial i temporal del fong en el sòl. Tot i així, és una tècnica d'aparició molt recent que, en l'estudi de miceli extraradical de fongs ectomicorrízics, només s'ha aplicat en condicions controlades a Landeweert et al. 2003a, Schubert et al. 2003 i en treballs derivats d'aquesta tesi (Hortal et al. 2008, Parladé et al. 2007). En qualsevol cas, sembla que l'aplicació generalitzada de tècniques moleculars en l'estudi del miceli extraradical dependrà en gran part de la capacitat d'extracció de DNA fúngic a partir de mostres de diferents tipus de sòl (Anderson i Cairney 2004, Schubert et al. 2003).

La producció de planta inoculada amb *L. deliciosus* està en una fase molt poc desenvolupada i, tot i que ja es pot obtenir planta inoculada en condicions controlades i, fins i tot en alguns casos, fructificació d'esperocarps, encara és difícilment

transferible a escala pràctica. Malgrat això, i a causa de l'augment de la demanda, alguns viveristes ofereixen planta inoculada que sovint no ofereix les garanties de qualitat morfològica i fisiològica necessàries per a la comercialització de planta forestal. La certificació de la planta inoculada hauria de garantir la presència d'un determinat nivell de colonització radical per part de la espècie introduïda i, preferiblement, l'absència d'altres fongs competidors. Posteriorment, un cop establerta a camp, és necessari un seguiment de la persistència del fong per tal de seguir la seva evolució en el temps i, eventualment, la seva fructificació. En el marc de la producció controlada de *L. deliciosus*, en aquest treball pretenem seleccionar soques amb diferent capacitat colonitzadora, posar a punt tècniques moleculars per a la seva caracterització, identificació i quantificació en camp, fer el seguiment del fong en fase vegetativa en plantacions establertes amb planta inoculada i avaluar la importància de diferents paràmetres en la persistència del fong en camp. S'ha escollit l'espècie *Pinus pinea* com a planta simbiot per la seva adaptabilitat a les àrees en què es pretén establir les plantacions i pel valor afegit d'aquest pi en termes d'aprofitament. En aquest sentit, els beneficis derivats de la producció de pinyons, fusta, llenya i resina complementarien els derivats de la producció de carpòfors de *L. deliciosus* en sistemes de producció integrada.

En concret, els objectius que s'abordaran en els diferents capítols d'aquesta tesi són:

- Establir una col·lecció de soques de *Lactarius deliciosus* a partir d'esporecarps de diferents localitats, espècies associades i anys de recol·lecció (capítol I)
- Determinar la capacitat colonitzadora potencial de diferents soques de *L. deliciosus* amb *Pinus pinaster* mitjançant síntesi d'ectomicorrizes en cultiu pur (capítol I)
- Avaluar l'efectivitat de tècniques moleculars basades en la PCR i l'anàlisi SSCP del DNA en la identificació específica i intraespecífica de *L. deliciosus* en diferents fases de la simbiosi (aïllaments d'esporecarps, micorrizes i miceli extraradical present en el sòl, capítol II)
- Inocular planta de *P. pinea* amb inòcul vegetatiu de diferents soques preseleccionades de *L. deliciosus*. Quantificar el nivell de colonització radical de les plantes prèviament al seu trasplantament a camp (capítol III)

- Determinar la persistència en camp del fong inoculat mitjançant tècniques d'identificació morfològica i molecular a nivell d'ectomicorrizes i de miceli extraradical (capítol III)
- Determinar la capacitat competitiva a nivell de micorrizes i de miceli extraradical de diferents soques de *L. deliciosus* enfront a fongs del gènere *Rhizopogon* en diferents condicions experimentals (capítol IV)

**I. AVALUACIÓ *in vitro* DEL POTENCIAL MICORRÍZIC
DE DIFERENTS SOQUES DE *Lactarius deliciosus***

1.1. HIPÒTESI DE TREBALL

- Diferents soques de *L. deliciosus* tenen diferent capacitat colonitzadora *in vitro*.

1.2. OBJECTIUS

- Establir una col·lecció de soques de *L. deliciosus* a partir d'esperocarps de diferents localitats, espècies associades i anys de recol·lecció.
- Determinar la capacitat colonitzadora potencial de diferents soques de *L. deliciosus* amb *Pinus pinaster* mitjançant síntesi d'ectomicorrizes en cultiu pur.

1.3. INTRODUCCIÓ

L'objectiu d'aquest estudi és determinar la capacitat simbiòtica *in vitro* de diferents soques de *L. deliciosus* obtingudes a partir d'esperocarps recollits en diferents localitats, anys i associats a diferents espècies de *Pinus*. Prenent com a hipòtesi que diferents soques poden presentar un potencial micorrízic diferent, la informació obtinguda en aquest experiment ha de permetre seleccionar aquelles soques potencialment capaces de formar un elevat nombre de micorrizes. Tenint en compte que la capacitat de colonització d'un fong és un criteri de selecció en els programes d'inoculació amb fongs micorrízics (Rincón et al. 1999, Trappe 1977), les soques seleccionades a partir d'aquest experiment podran ser posteriorment utilitzades en inoculacions controlades i en l'establiment de les plantes inoculades en plantacions experimentals. Les hipòtesis que una major capacitat colonitzadora *in vitro* es traduirà en una major capacitat colonitzadora en viver i en una major competitivitat i persistència en camp es contrastaran en propers capítols d'aquesta tesi.

Dos aspectes a tenir en compte en la selecció de fongs ectomicorrízics per a inoculacions controlades són la seva capacitat de creixement en cultiu pur i la de formar micorrizes amb l'espècie arbòria escollida (Marx 1980, Trappe 1977). Existeix una gran variabilitat entre diferents espècies fúngiques en quant al creixement en cultiu pur (Molina i Palmer 1982). D'altra banda, la capacitat colonitzadora d'un determinat fong ectomicorrízic es pot avaluar quantificant, en diferents intervals de temps, el

nombre de micorrizes formades pel fong introduït amb una determinada planta hoste utilitzant la tècnica de síntesi d'ectomicorrizes en cultiu pur.

La tècnica de síntesi d'ectomicorrizes en cultiu pur fou inicialment desenvolupada per Melin (1921, 1922, citats a Molina i Palmer 1982) per tal de demostrar experimentalment la capacitat d'alguns aïllaments fúngics de formar ectomicorrizes amb determinades plantes. Des de llavors, aquesta tècnica s'ha utilitzat per complementar la informació sobre les associacions fong-planta derivada de les observacions en camp i per estudiar la fisiologia de la simbiosi micorrízica en condicions controlades. En aquest sentit, s'ha utilitzat, per exemple, en estudis sobre la captació d'aigua i nutrients per part del fong i la seva translocació a la planta (Duddridge et al. 1980, Melin i Nilsson 1950, 1958), la translocació dels productes de fotosíntesi de la planta al fong (Melin i Nilsson 1957), la transferència de carbohidrats entre plantes a través de les hifes del fong (Reid i Woods 1969), la protecció contra organismes patògens de l'arrel (Marx i Davey 1969) o la compatibilitat i especificitat entre fong i planta (Duñabeitia et al. 1996, Flores et al. 2005, Molina 1981, Molina i Trappe 1982, 1994, Parladé et al. 1996, Pera i Álvarez 1995, Torres i Honrubia 1994).

El sistema desenvolupat per Melin (1921) consistia bàsicament en recipients de sorra estèril amb solució nutritiva on s'introduïa un cultiu fúngic i una plàntula produïda en condicions axèniques. Hacskaylo (1953) perfeccionà el mètode utilitzant vermiculita com a substrat, que presenta una major capacitat d'aireació i de retenció d'aigua que la sorra. Posteriorment, Marx i Zak (1965) estabilitzaren el pH del sistema amb l'addició de torba. Trappe (1967) utilitzà recipients que mantenien la part aèria de la planta en contacte amb l'aire i l'arrel en condicions asèptiques per tal de no limitar la disponibilitat de CO₂. Piché i Fortin (1982) utilitzaren bosses de plàstic que contenien paper assecant (sobre el qual es desenvolupava el sistema radical) i solució nutritiva en condicions no axèniques. Duddridge (1986) i Stenström i Unestam (1987) introduïren algunes variacions, utilitzant plaques de Petri amb substrat i solució nutritiva. Aquests últims mètodes afavoreixen l'intercanvi gasós ja que permeten que la part aèria de la planta estigui en contacte amb l'aire però, en canvi, no hi ha cap control sobre possibles organismes contaminants. Altres autors han utilitzat contenidors de vidre amb medi nutritiu agarificat on creixen fong i planta (Mason 1980). Un mètode àmpliament utilitzat per a la síntesi d'ectomicorrizes i que ha donat bons resultats és el descrit per Molina (1979). En aquest mètode s'utilitzen tubs de vidre en els quals s'afegeix un substrat a base de torba i vermiculita i medi nutritiu líquid. El conjunt es tapa amb un vas de vidre i s'autoclava permetent que el líquid sigui absorbit

pel substrat, mantenint la seva aireació i afavorint el creixement del fong inoculat. En aquests tubs se sembra una plàntula pre-germinada en condicions estèrils i s'inocula el cultiu fúngic que es vol provar. Els tubs es mantenen en condicions controlades d'il·luminació i temperatura, evitant un escalfament excessiu del sistema radical. El sistema de síntesi en cultiu pur utilitzat en aquest treball s'ha basat en el mètode de Molina (1979). A l'hora d'extrapolar els resultats obtinguts s'ha de tenir en compte que es treballa en condicions artificials i que la prova s'utilitza per avaluar les diferències entre soques, descartar les que tenen una escassa capacitat colonitzadora i fer així una primera selecció.

Tot i que en aquest treball s'utilitza *P. pinea* com a espècie vegetal per a les inoculacions en viver, l'experiment de síntesi en cultiu pur es durà a terme amb una espècie alternativa, *P. pinaster*. Aquest canvi està motivat per la baixa taxa de germinació de les llavors de *P. pinea* en condicions axèniques, la dificultat d'esterilitzar-les en superfície i l'escàs desenvolupament radical de les plàntules en condicions de síntesi. En el seu lloc s'ha escollit *P. pinaster*, una espècie amb una àrea de distribució molt semblant a la de *P. pinea*, de fàcil desinfecció i germinació de les llavors, amb un correcte desenvolupament de les plàntules en els tubs de síntesi (Pera 1992) i receptiva a un ampli rang de fongs, entre ells diferents espècies de *Lactarius* (Pera i Álvarez 1995). A més a més, Molina et al. (1992) han apuntat que la compatibilitat i especificitat dels diferents fongs ectomicorrízics en les espècies de *Pinus* poden ser considerades a nivell genèric.

1.4. MATERIAL I MÈTODES

1.4.1. Aïllament en cultiu pur de *L. deliciosus*

Es recolliren esporocarps de *L. deliciosus* en diferents localitats i s'anotà la data i el lloc de recol·lecció així com l'espècie vegetal associada (annex 1, pàgina 174). L'aïllament del fong es dugué a terme a partir de teixit de l'esporocarp seguint la tècnica descrita per Molina i Palmer (1982) consistent en la neteja superficial del cos fructífer i la transferència d'un fragment de teixit intern, no exposat, a medi de cultiu en plaques de Petri amb agar nutritiu (figura 1). S'utilitzà el medi semisintètic BAF reconegut com el més indicat per al creixement del gènere *Lactarius* (Oort 1981). Les plaques s'incubaren a 25°C durant 15-30 dies, en funció del creixement de cada soca. Els cultius purs aïllats a partir d'aquests esporocarps s'inclogueren a la col·lecció de

cultius de fongs ectomicorrízics de l'IRTA. Els números de cultiu assignats i les referències d'herbari dels esporocarps corresponents dessecats es mostren a la taula de l'annex 1 (pàgina 174). Les soques en col·lecció es mantenen en tubs amb medi BAF a 4°C i els cultius es repiquen cada tres mesos per transferència a medi BAF fresc i incubació a 25°C durant 15 dies.



Figura 1. Procés d'aïllament del fong en cultiu pur. Recol·lecció de l'esporocarp (esquerra), presa d'un fragment de teixit intern (centre) i transferència a una placa amb medi BAF (dreta).

1.4.2. Síntesi de micorrizes en cultiu pur

Per a la inoculació de plàntules de *P. pinaster* amb diferents soques de *L. deliciosus* en condicions axèniques, s'utilitzaren tubs de síntesi de vidre de 40 mm de diàmetre i 300 mm d'alçada amb tap de vidre, dissenyats segons Molina (1979). S'emplenaren amb 110 cm³ de vermiculita de grau 3 (Asfaltex, Barcelona, Espanya), 10 cm³ de torba Floratorf (Floragard, Oldenburg, Alemanya) i 70 ml de medi BAF líquid (modificat amb 15 g glucosa/l). El conjunt s'autoclavà durant 40 minuts a 120°C. Les llavors de *P. pinaster* (lot A11300299 Llevant, collita 1999, del Banc de Llavors Forestals de la Generalitat Valenciana) es rentaren amb aigua corrent durant 24 hores. Seguidament, s'esterilitzaren superficialment submergint-les 45 minuts en H₂O₂ al 30%, es rentaren amb aigua destil·lada estèril i es col·locaren en plaques de Petri amb medi PDA Difco™ (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, EEUU) on es mantingueren entre set i 15 dies a 4°C. Passat aquest temps, s'incubaren a 25°C per induir-ne la germinació i descartar les llavors contaminades. Les llavors germinades amb radícules de 2 a 3 cm es transferiren als tubs en condicions d'esterilitat. Posteriorment, s'afegí el fong en el tub en forma de suspensió de miceli que es preparà a partir de 100-150 ml d'aigua destil·lada estèril i quatre colònies de 30 dies triturades durant 10 segons en un una batedora 'Waring' amb contenidor d'acer inoxidable prèviament autoclavat. A cada tub s'afegiren, aproximadament, uns 5 ml de suspensió equivalents a 30 mg de miceli (pes sec). L'espai entre el tub i el tap se segellà amb una tira de Parafilm M® (Alcan Packaging, Neenah, WI, EEUU), que permet l'intercanvi gasós però evita l'entrada de contaminants. Els tubs s'incubaren a

25°C en una cambra de cultiu amb llum fluorescent a una intensitat de 135 $\mu\text{mol/s/m}^2$ i un fotoperíode de 16 hores mantenint la part radical a la foscor tal i com es descriu a Parladé et al. (2004b) i es mostra a la figura 2. Es prepararen 18 tubs de síntesi per a cadascuna de les 25 soques avaluades (en diferents tandes).

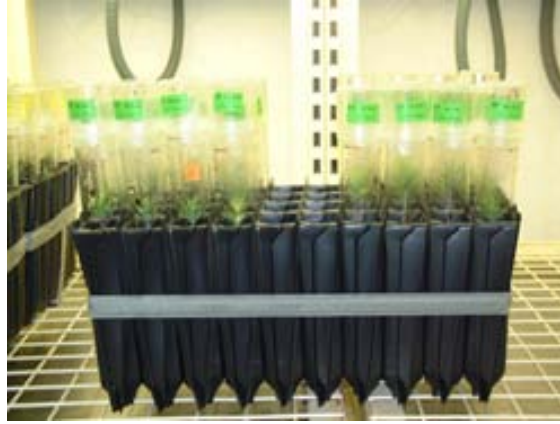


Figura 2. Disposició dels tubs de síntesi a la cambra de cultiu

1.4.3. Lectura i anàlisi de resultats

Es desmuntaren sis tubs corresponents a cadascuna de les soques en tres temps diferents: 30, 45 i 60 dies després de la inoculació (fent un total de 18 tubs per soca). Les plàntules es mesuraren en alçada (des de la base de les primeres acícules fins al seu extrem superior) i diàmetre (sota la inserció de les primeres acícules). Es rentà amb aigua corrent el sistema radical de cada planta i es comptà el nombre total d'arrels fines micorrizades amb *L. deliciosus*. Per a cada soca, es recolliren micorrizes i es congelaren a -20°C per a posteriors anàlisis moleculars. Es prengueren també fotografies de les micorrizes amb una càmera digital SONY DKC-CM30 (Sony España, Barcelona) acoblada a una lupa Zeiss Stemi 2000-C (Carl Zeiss Inc., EEUU) amb llum freda Schott KL 1500.

Les dades obtingudes per al nombre de micorrizes formades s'analitzaren mitjançant ANOVA amb soca inoculada (25 nivells) i temps des de la inoculació (3 nivells) com a factors. El nombre de micorrizes als 60 dies s'analitzà també mitjançant ANOVA d'un factor avaluant els efectes de la presència de rizomorfs en el tub (veure figura 3), de la pigmentació de la colònia en placa (taronja, com en el cas de les colònies de la figura 1, o no) o de l'espècie de *Pinus* associada al fong quan es recollí en camp (annex 1, pàgina 174). Les diferències entre grups s'analitzaren amb el test de Tukey. La correlació lineal entre el nombre de micorrizes i el temps transcorregut des de l'aïllament del cultiu s'analitzà mitjançant el coeficient de correlació de Pearson. Les

variables es transformaren quan fou necessari. En tots els casos, els resultats es consideraren significatius amb un valor de $P < 0,05$. Les anàlisis es dugueren a terme amb el programa SAS[®] Enterprise Guide v 2.0.0.417 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EEUU).

1.5. RESULTATS

Les plàntules de *P. pinaster* presentaren, als 30 i 60 dies respectivament, una alçada mitjana de $4,32 \pm 0,06$ cm (mitjana \pm error estàndard) i $5,97 \pm 0,11$ cm i un diàmetre mitjà de $1,43 \pm 0,02$ mm i $1,51 \pm 0,02$ mm.

L'inòcul miceliar de pràcticament totes les soques permeté la formació de micorrizes de *L. deliciosus* en algun dels tubs. Els tubs amb algun fong contaminant es descartaren. A la figura 3 es mostren alguns exemples d'arrels micorrizades amb *L. deliciosus* (vistes a través de la paret del tub) així com miceli i rizomorfs que emanen d'aquestes. La figura és una mostra de la variabilitat existent entre soques en quant a la coloració i ramificació de les micorrizes i a la presència o no de rizomorfs.

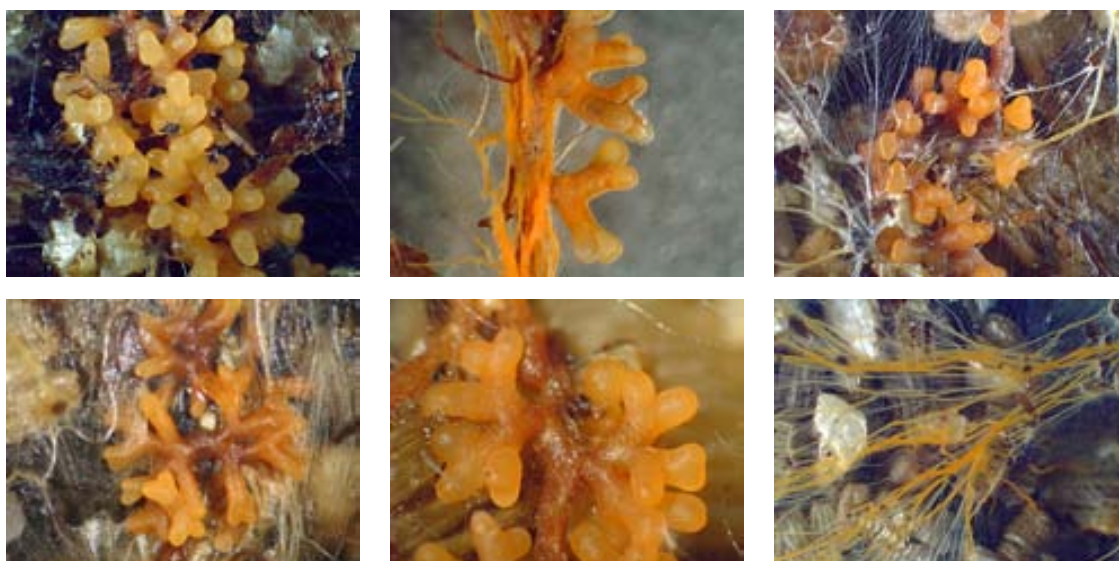


Figura 3. Arrels micorrizades amb *L. deliciosus* vistes a través del vidre del tub de síntesi corresponents, d'esquerra a dreta i de dalt a baix, a les soques 178, 330, 337, 347 i 312. A baix a la dreta, rizomorfs corresponents a la soca 337.

A la figura 4 es mostren gràficament els resultats per a la mitjana del nombre de micorrizes formats per cada soca als 30, 45 i 60 dies de la inoculació dels tubs. Cal tenir en compte que en el cas de la soca 178 el darrer recompte es dugué a terme als 75 dies de la inoculació en comptes de 60.

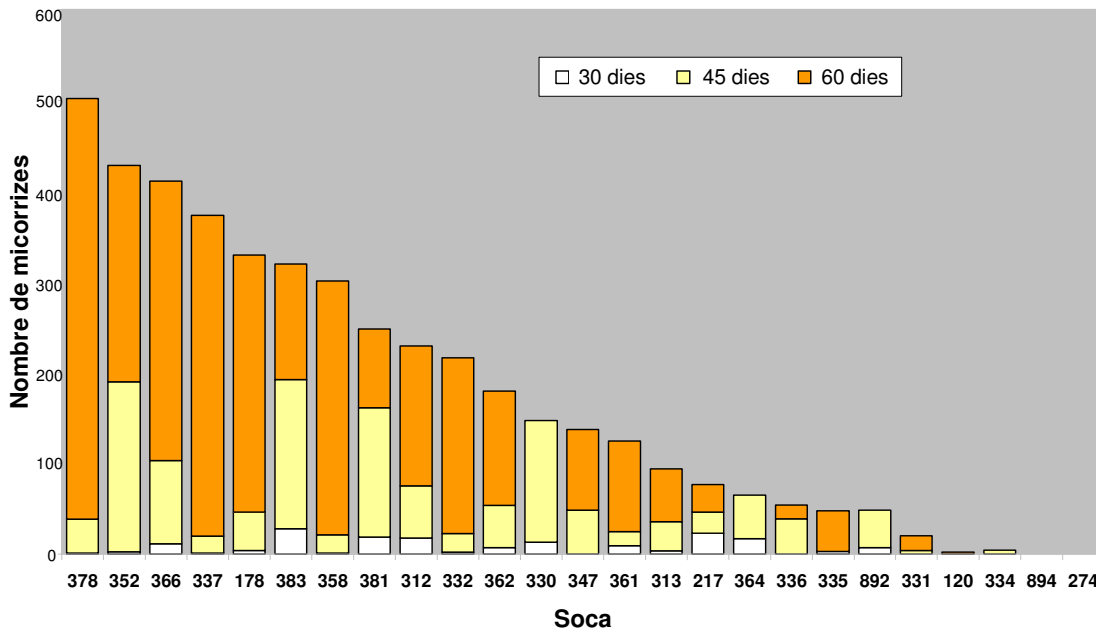


Figura 4. Representació gràfica de les mitjanes del nombre de micorrizes format per cadascuna de les soques als 30 (color blanc), 45 (groc) i 60 (taronja) dies des de la inoculació (valor mitjà de 6 tubs per cada mostreig i soca).

L'ANOVA per al nombre de micorrizes mostrà diferències significatives per al factor soca i per al factor temps des de la inoculació, així com interacció entre aquests dos factors (taula 1).

Taula 1. Resultats per a l'anàlisi ANOVA de dos factors del nombre total de micorrizes de *L. deliciosus* en les plàntules de *P. pinaster* inoculades amb diferents soques (25) d'aquest fong als 30, 45 i 60 dies després de la inoculació. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatius, $P < 0,05$), DF (graus de llibertat). Les dades se sotmeteren a transformació logarítmica prèviament a la seva anàlisi.

Factor (font)	Valor P
Soca	<0,0001
Temps en tub	<0,0001
Interacció	<0,0001
	DF
Model	73
Error	280
Total corregit	353

La presència d'interacció ens indica que, tot i que en la majoria de soques el nombre de micorrizes augmentà amb el temps, en algunes soques aquesta tendència no se

segueix. L'existència d'interacció entre factors féu que es dugués a terme una anàlisi de cada factor per separat, és a dir, avaluant l'efecte del temps de mostreig en cadascuna de les soques i l'efecte de la soca a cada temps de mostreig per separat. El factor temps tingué un efecte significatiu en algunes soques mentre que en d'altres no (taula 2). La soca inoculada tingué un efecte significatiu en els tres temps de mostreig. Les anàlisis a posteriori mostraren que en els tres temps existeixen diferències entre soques en el nombre de micorrizes formades. A la taula 3 es mostren els resultats per a l'anàlisi als 60 dies, resultats que considerem com a mesura del potencial colonitzador de cada soca.

Taula 2. Efecte del factor temps en cada soca. += efecte positiu (augment del nombre de micorrizes amb l'augment del temps des de la inoculació), no= sense efecte

Soca	Efecte temps
120	+
178	+
217	+
274	no
312	+
313	+
330	+
331	no
332	+
334	no
335	no
336	+
337	+
347	+
352	+
358	+
361	+
362	+
364	+
366	+
378	+
381	+
383	+
892	+
894	no

Taula 3. Diferències entre mitjanes del nombre de micorrizes per al factor soca 60 dies després de la inoculació segons el test de Tukey. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre tractaments ($P < 0,05$)

Soca	N	Mitjana	Tukey
378	6	501,67	A
352	4	428,50	AB
366	5	410,80	AB
337	4	373,25	AB
178	6	329,50	ABC
383	4	319,50	ABC
358	4	300,75	ABC
381	4	248,00	ABC
312	6	229,17	ABC
332	4	216,00	ABC
362	6	179,67	ABCD
330	5	134,00	ABCDE
361	4	124,25	ABCDE
347	5	137,00	ABCDE
313	5	93,60	ABCDE
217	5	76,60	ABCDE
364	5	63,80	BCDEF
892	5	45,20	CDEF
336	6	54,17	DEFG
335	4	47,50	EFG
331	5	20,20	FGH
120	2	2,00	GH
334	2	0,00	H
274	6	0,00	H
894	5	0,00	H

Les soques s'agruparen en diferents categories en funció dels resultats obtinguts en el test de Tukey segons la seva capacitat de formar micorrizes amb *P. pinaster* 60 dies després de la inoculació del fong (taula 4). La classificació de les soques als 30 i 45 dies no coincidí amb l'obtinguda en el mostreig als 60 dies. Els resultats obtinguts al primer mostreig mostraren que les soques més ràpides (les que formen més micorrizes als 30 dies) són la 383, 217, 381, 312, 364, 330, 361 i 366 (dades no mostrades)

Taula 4. Proposta de classificació de les 25 soques avaluades en quatre categories en funció de la seva capacitat de colonització de les arrels de *P. pinaster* 60 dies després de la inoculació del fong.

Categoria	Soques
Colonització alta	378, 352, 366, 337, 178, 383, 358, 381, 312, 332
Colonització mitjana	362, 330, 361, 347, 313, 217
Colonització baixa	364, 892, 336, 335, 331, 120
Colonització nul·la	334, 274, 894

Es detectà una correlació negativa entre el nombre de micorrizes als 60 dies i l'edat del cultiu (número de mesos en col·lecció) amb $R = -0,2725$; $P = 0,0030$ i $N = 117$. Prèviament a l'anàlisi, les dades (nombre de micorrizes i nombre de mesos) se sotmeteren a transformació logarítmica.

L'ANOVA del nombre de micorrizes als 60 dies en funció de la presència o no de rizomorfs en el tub fou significatiu ($P = 0,0005$) i el test de Tukey mostrà que el nombre de micorrizes era més elevat en els tubs que presentaven rizomorfs que en els que no (mitjanes = 241,73 i 122,76, respectivament). En canvi, l'ANOVA del nombre de micorrizes als 60 dies en funció de la pigmentació (taronja o no) del cultiu en placa corresponent a cada soca no fou significatiu.

L'ANOVA del nombre de micorrizes en funció de l'espècie vegetal associada a cada soca (cinc espècies de *Pinus* diferents) fou no significatiu i no mostrà per tant diferències en el potencial de colonització de *P. pinaster* en funció de l'espècie a què hagués estat associada el fong originalment.

1.6. DISCUSSIÓ

Es detectaren diferències significatives entre les diferents soques de *L. deliciosus* en quant a la capacitat de colonització de les arrels de *P. pinaster* en síntesi en cultiu pur. Aquest resultat concorda amb l'obtingut en l'estudi de Pera i Álvarez (1995), en el qual s'observaren diferències entre espècies però també dins d'una mateixa espècie, com en el cas per exemple de *Amanita pantherina* (DC.) Krombh., *Paxillus involutus* (Batsch.) Fr., *Rhizopogon luteolus* Fr. et Nordholm o també *L. deliciosus*. Els resultats obtinguts permeten una selecció de les soques teòricament més agressives de cara a les inoculacions controlades en viver. Tot i que cal tenir en compte les limitacions de la tècnica, duta a terme en condicions artificials, Massicotte et al. (1994) trobaren una

elevada similitud entre els patrons d'especificitat en cultiu pur i en experiments en viver per a fongs del gènere *Rhizopogon*. A més a més, tot i que els resultats negatius no són conclusius de què no es pugui establir la simbiosi, sí que suggereixen que la relació és improbable (Brundrett et al. 1996, Molina i Palmer 1982). La classificació de les soques en funció de la seva agressivitat ens permet, per tant, fer una primera selecció de cara als programes d'inoculació.

La correlació negativa entre la capacitat de formar micorrizes i l'edat del cultiu indica que com més temps fa que es va aïllar el cultiu menys capacitat colonitzadora té. Aquest resultat suggereix una pèrdua de la capacitat de formar micorrizes amb el pas del temps, que podria ser resultat del repicat reiteratiu del fong en cultiu pur per al seu manteniment en col·lecció, fenomen que ja ha estat descrit per diversos autors (Giltrap 1981, Laiho 1970, Marx 1980, Marx i Daniel 1976, Thomson et al. 1993). Aquesta pèrdua de potencial micorrízic podria ser deguda a modificacions en l'expressió o en l'organització dels gens (Battista et al. 1996). Marx (1980) apunta que la pèrdua de la capacitat colonitzadora podria explicar-se per canvis en els sistemes enzimàtics derivats del creixement vegetatiu continuat en medi sintètic. Alguns estudis (Laiho 1970, Marx 1980, Thomson et al. 1993) demostren que el potencial micorrízic d'una soca es pot recuperar mitjançant el reaïllament del fong a partir de micorrizes (inoculant un hoste i reaïllant el fong a partir de teixit colonitzat). En aquest sentit, Marx (1980) proposa repetir el reaïllament cada quatre anys per mantenir la capacitat colonitzadora de l'aïllat. Thomson et al. (1993) proposen escurçar aquest temps i apunten que el manteniment de la capacitat dels fongs ectomicorrízics per expressar els gens implicats en la formació i funcionament de les micorrizes podria requerir una interacció contínua amb la planta hoste. Tot i així, a Battista et al. (1996) el pas per l'hoste i posterior reaïllament no permet recuperar el potencial micorrízic dels fongs avaluats. Caldria estudiar si el reaïllament del fong a partir de micorrizes de nova formació obtingudes per síntesi en cultiu pur permetria recuperar la capacitat colonitzadora de la soca en el cas de *L. deliciosus*. Una altra possibilitat a tenir en compte per minimitzar la pèrdua de potencial micorrízic seria la de mantenir la col·lecció de cultius en tubs amb aigua destil·lada estèril en comptes de medi BAF. En aquest sentit, Marx i Daniel (1976) demostraren que cultius mantinguts en aigua durant tres anys mantenien la seva capacitat colonitzadora. Marx (1980) suggereix que el manteniment del fong en un estat fisiològic de dormició reduiria els canvis en els sistemes enzimàtics. Apunta però que aquest sistema no funciona en tots els fongs, caldria per tant avaluar-ne l'efectivitat per a cultius de *L. deliciosus*. Apart de les diferències en l'edat del cultiu, les diferències en l'espècie vegetal associada no

semblen explicar la variabilitat observada en la capacitat colonitzadora de les diferents soques, reforçant la teoria de l'especificitat genèrica de *L. deliciosus* amb les espècies del gènere *Pinus*.

La correlació positiva entre la presència de rizomorfs i la capacitat colonitzadora podria explicar-se perquè els rizomorfs actuarien com a estructures exploratòries i ajudarien en la colonització secundària de noves arrels (revisat a Agerer 2001). Aquesta correlació suggereix que la formació de rizomorfs en una determinada soca podria utilitzar-se com a indicatiu de que serà bona colonitzadora. Aquesta característica però només es pot observar en els tubs de síntesi i és difícil de relacionar amb cap paràmetre del creixement del cultiu en placa, fet que facilitaria la selecció d'aïllats. En aquest sentit, la pigmentació taronja de les colònies podria ser un paràmetre més interessant però, tot i que a Marx (1980) la pèrdua de pigmentació s'associa al pas del temps i a un repicat del cultiu poc freqüent, en aquest cas no sembla estar relacionada amb la capacitat de la soca per formar micorrizes. De totes maneres, la formació de rizomorfs ocorre també quan el miceli es fa créixer en pots de substrat destinats a la producció d'inòcul vegetatiu. En el cas de *L. deliciosus*, es podria per tant considerar la possibilitat de realitzar la selecció de soques en dues fases, una primera en base a la formació de rizomorfs en substrat de torba i vermiculita i una segona per recompte de micorrizes en síntesi en cultiu pur.

Es detectà també que, en la majoria de soques, el nombre de micorrizes augmenta amb el temps des de la inoculació del fong però de manera diferent en funció de cada soca. Això fa que la classificació de les soques en funció de la seva capacitat colonitzadora canviï a cada temps de mostreig. En aquest sentit, hem observat que en el recompte als 30 dies hi havia molts resultats negatius, fet que s'explica tant per la lentitud de creixement del miceli de *L. deliciosus* com pel reduït desenvolupament radical de les plàntules de *P. pinaster* en aquest primer mostreig. En canvi, considerem la mesura obtinguda als 60 dies de la inoculació com a indicadora del potencial micorrízic de cada soca ja que mantenir els tubs gaire més temps implicaria problemes de creixement tant de la planta com del fong, per esgotament de nutrients i per manca d'espai físic. El mostreig als 60 dies és considerat per tant en aquest treball com a indicador de la capacitat colonitzadora final de la soca però cal no oblidar que els mostresos realitzats als 30 i 45 dies ens aporten informació interessant relativa a la velocitat de colonització de cada soca, paràmetre que podria jugar un paper important en camp i determinar diferències en la capacitat competitiva de cadascuna d'elles.

**II. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR I IDENTIFICACIÓ
DE MICORRIZES I MICELI EXTRARADICAL DE
*Lactarius deliciosus***

2.1. HIPÒTESI DE TREBALL

- Els marcadors moleculars són una eina útil d'identificació específica i intraespecífica en fases críptiques del desenvolupament de fongs ectomicorrízics (micorriza i miceli extraradical)

2.2. OBJECTIUS

- Avaluar l'efectivitat de tècniques moleculars basades en la PCR i l'anàlisi SSCP del DNA en la identificació específica i intraespecífica de *L. deliciosus* en diferents fases de la simbiosi (aïllaments d'esporecarps, micorrizes i miceli extraradical present en el sòl)

2.3. INTRODUCCIÓ

El seguiment de la persistència i competitivitat d'un fong introduït en plantació amb plàntules prèviament inoculades requereix la seva caracterització a nivell d'espècie i de soca (Selosse et al. 1998). Tradicionalment, el seguiment del fong introduït s'ha fet per identificació morfològica, a diferents temps, de les micorrizes i els cossos fructífers produïts (Le Tacon et al. 1992, Villeneuve et al. 1991). Tot i així, la taxonomia de fongs superiors es basa en caràcters de l'esporecarp de manera que les estructures vegetatives com les micorrizes són difícils d'identificar (Amicucci et al. 2001, Gardes et al. 1991, Horton i Bruns 2001). Tot i els significatius avenços assolits en estudis de caracterització morfològica de micorrizes formades per diferents espècies (revisat a Agerer 2006, de Román et al. 2005) sovint és difícil fer un seguiment del fong en els diferents estadis de desenvolupament de la simbiosi (especialment, micorriza i miceli extraradical) i avaluar l'eficàcia de la micorrizació controlada.

Les tècniques moleculars basades en l'amplificació de determinats fragments d'àcid desoxiribonucleic (DNA) mitjançant la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) permeten la identificació d'espècies fúngiques, especialment en casos en què els trets morfològics són insuficients (Gardes et al. 1991, Gardes i Bruns 1993, Henrion et al. 1992, Lanfranco et al. 1998a, Selosse et al. 1998). L'aplicació d'aquesta tècnica per a la identificació ha representat l'avenç metodològic més important en l'estudi de les

comunitats de fongs ectomicorrízics (Horton i Bruns 2001, Martin 2007). Per tal que la PCR sigui útil per identificar espècies fúngiques cal que la regió de DNA que s'amplifiqui compleixi una sèrie de requisits: que estigui present en tots els fongs, que sigui fàcil d'amplificar a partir de fongs en presència de DNA de la planta (especialment en el cas de les ectomicorrizes) i que sigui suficientment variable per permetre el disseny d'encebadors (*primers*) per a diferents categories taxonòmiques (família, gènere, espècie) (Bruns i Gardes 1993).

Una regió que satisfà en gran part aquests criteris i que ha estat àmpliament analitzada és la dels gens que codifiquen el RNA ribosòmic (rDNA) (Lanfranco et al. 1998b). En el cas dels fongs, el rDNA s'organitza en unitats que es repeteixen en tàndem. Cada unitat conté tres gens rDNA (18S, 5.8S i 28S) separats per dos separadors interns (*internal transcribed spacers*: ITS1 i ITS2). Alhora, cada unitat se separa de la següent per uns altres separadors (*intergenic spacers*: IGS) (Edel 1998), que en la majoria dels basidiomicets conté la regió codificadora del gen 5S rDNA (figura 1). Els avantatges d'aquesta regió són, d'una banda, que n'hi ha múltiples còpies i, de l'altra, que combina regions altament conservades (gens rRNA) en què es poden dissenyar els encebadors, amb regions variables no codificadores (separadors) que són les que s'amplifiquen i permeten comparar i discriminar fongs a diferents nivells taxonòmics (Edel 1998, Gardes i Bruns 1993, Horton i Bruns 2001, Martin i Rygiewicz 2005).

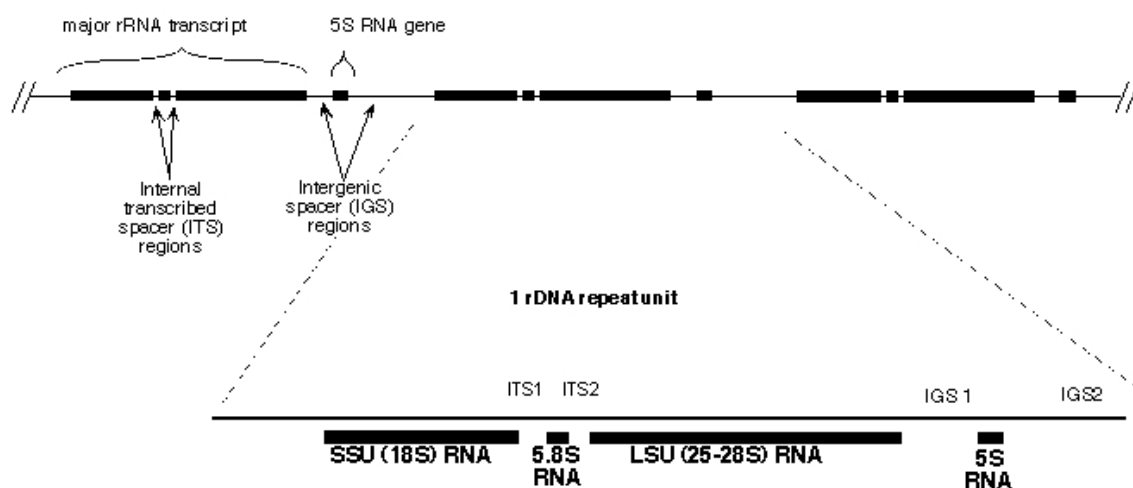


Figura 1. Esquema de la regió corresponent al rDNA.

La majoria d'estudis moleculars en ecologia de fongs ectomicorrízics s'han centrat en la regió ITS (fragment d'entre 650 i 900 parells de bases -pb- que inclou l'ITS1, el gen

5.8S rDNA i l'ITS2) (Horton i Bruns 2001, Martin i Rygiewicz 2005). L'elevat nombre de còpies presents al mateix genoma i el fet que es puguin dissenyar encebadors en regions conservades fan que sigui un fragment fàcil d'amplificar, fins i tot a partir de poc material (Bruns i Shefferson 2004). L'interès de la regió ITS també ve reforçat per l'elevat i creixent nombre de seqüències corresponents a aquesta regió dipositades a la base de dades GenBank de l'NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Bruns i Shefferson 2004). S'han dissenyat parelles d'encebadors universals per amplificar aquest fragment (ITS1-ITS4) (White et al. 1990) així com encebadors específics de fongs i de basidiomicets (ITS1F-ITS4 i ITS1F-ITS4B, respectivament) (Gardes i Bruns 1993). Els encebadors universals permeten amplificar DNA fúngic a partir de micorrizes però existeix la possibilitat d'amplificar també DNA de la planta o d'altres fongs associats a la micorriza de manera que, en determinats estudis, pot ser útil dissenyar encebadors específics del fong d'interès (Gardes et al. 1991). En aquest sentit, més recentment Martin i Rygiewicz (2005) han dissenyat encebadors específics pensats per ser utilitzats en la detecció de fongs en mostres de camp, especialment en presència de DNA de planta.

L'amplificació per PCR de la regió ITS revela diferències interespecífiques (Bruns et al. 1991, Gomes et al. 2002, Martin et al. 1998a) però la variabilitat intraespecífica és en general baixa (Gardes i Bruns 1993). Tot i que s'han realitzat pocs estudis, sembla que la regió IGS podria ser útil per identificar genotips ja que sol ser més variable que la ITS (Lanfranco et al. 1998b, Martin et al. 1998a). La identificació i seguiment d'un determinat individu és essencial per tal de comprendre la diversitat, estructura i dinàmica de les poblacions de fongs ectomicorrízics (Martin et al. 1998b). La detecció i caracterització intraespecífica es pot dur a terme mitjançant la seqüenciació dels productes amplificats i posterior comparació de les seqüències de nucleòtids per a diferents soques. Existeixen però tècniques que permeten detectar variabilitat intraespecífica en fongs sense necessitat de seqüenciar. Tècniques com la RAPD (random amplification of polymorphic DNA) o l'amplificació de microsatèl·lits (seqüències curtes repetitives) poden originar patrons únics per a una determinada soca (Edel 1998, Lanfranco et al. 1998a, Perotto et al. 1996). Dos exemples més són l'anàlisi SSCP (*single strand conformation polymorphisms*) i la tècnica *microsatellite-primed PCR*.

La tècnica SSCP es basa en el principi que canvis en la composició de nucleòtids d'un fragment de DNA poden originar diferències en la conformació espacial de les cadenes simples de DNA que provoquen variacions en la mobilitat electroforètica de les

cadena en gels de poliacrilamida (Humphries et al. 1997, Lessa i Applebaum 1993, Orita et al. 1989, Savov et al. 1992). Aquest fenomen s'explica perquè la inestabilitat de les cadenes simples del DNA fa que s'estableixin aparellaments de bases interns i que es formi una estructura espacial única. Així, un sol canvi nucleotídic pot alterar els aparellaments interns, modificar l'estructura tridimensional resultant i canviar dràsticament la mobilitat de la cadena en el gel. Tot i que la sensibilitat de la tècnica disminueix a mesura que augmenta la longitud del fragment analitzat, l'anàlisi SSCP ha permès detectar el 99 % de les mutacions puntuals en fragments d'entre 100 i 300 pb i el 89 % en fragments d'entre 300 i 450 pb (Hayashi 1992, Mohabeer et al. 1991, Orita et al. 1989). La seva simplicitat, sensibilitat i rapidesa fan que aquesta tècnica sigui una de les més àmpliament utilitzades en la identificació de mutacions puntuals (Hayashi 1991, 1992, Orita et al. 1989, Nair et al. 2002). El fet que es pugui per tant utilitzar en la identificació intraespecífica fa que pugui ser molt útil en estudis de poblacions de fongs ectomicorrízics. Tot i així, apart d'en el treball derivat d'aquesta tesi (Hortal et al. 2006) només ha estat utilitzada per Bonello et al. (1998) en estudis poblacionals de *Suillus pungens* Thiers et A. H. Sm.

D'altra banda, la tècnica *microsatellite-primed PCR* (descrita per Meyer et al. 1993) utilitza oligonucleòtids complementaris a microsatèl·lits (seqüències de poques bases repetitives i disperses en el genoma eucariota) com a encebadors per amplificar les regions situades entre els microsatèl·lits (Martin et al. 1998b). Amb aquesta tècnica es generen patrons de múltiples bandes (corresponents a fragments de diferents mides) que permeten detectar polimorfismes en l'àmbit interespecífic i intraespecífic (Stenlid et al. 1994). Entre diferents encebadors utilitzats, l'oligonucleòtid (GTG)₅ ha mostrat un elevat polimorfisme en els productes de PCR obtinguts per a diferents espècies de fongs simbiotes (Amicucci et al. 2001, Martin et al. 1998b).

2.4. MATERIAL I MÈTODES

2.4.1. Obtenció de material fúngic en diferents fases de la simbiosi

Per a la caracterització molecular específica i intraespecífica del fong *L. deliciosus* es treballà amb miceli en cultiu pur, obtingut tal i com s'ha descrit en el capítol 1 per a les diferents soques de *Lactarius* aïllades en col·lecció (annex 1, pàgina 174) així com per a altres espècies de fongs ectomicorrízics (*Thelephora terrestris* Ehrh.,

Sphaerosporella brunnea (Alb. et Schwein.) Svrcek et Kubicka, *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke, *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Quéf. i *Boletus edulis*).

Es recolliren micorrizes i sòl rizosfèric (on es pretén detectar el miceli extraradical del fong) per tal d'avaluar l'aplicabilitat de les tècniques posades a punt amb miceli en cultiu pur per a la identificació específica i intraespecífica del fong en les diferents fases de la simbiosi. S'obtingueren arrels de *P. pinaster* micorrizades amb diferents soques de *L. deliciosus* produïdes per síntesi en cultiu pur tal i com s'ha descrit al capítol 1. Es recolliren també micorrizes de *L. deliciosus* en plantes de *P. pinea* inoculades en viver i trasplantades a camp o a testos per dur a terme els diferents experiments que formen part d'aquesta tesi (veure capítol següent per detalls sobre aquest procés). D'altra banda, es recollí sòl rizosfèric adherit al sistema radical de plantes de dos anys mantingudes en plantació (Cabriels, Barcelona) després de ser inoculades en viver amb les soques 312 i 178. El sòl rizosfèric s'obtingué sacsejant lleugerament el sistema radical de les plantes un cop arrencades.

Com a controls negatius es recolliren també arrels no micorríziques i sòl rizosfèric adherit a plantes no inoculades. Les mostres recollides (micorrizes i sòl rizosfèric) es conservaren en sec a -20°C fins a la seva anàlisi.

2.4.2. Tècniques moleculars aplicades

2.4.2.1. Extracció de DNA

L'extracció de DNA a partir de miceli en cultiu pur i de micorrizes es dugué a terme amb el kit comercial DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanya), seguint el protocol establert pel fabricant. Per a l'extracció de DNA a partir de miceli es prengué un fragment d'aproximadament 10 mg (pes fresc) del marge de la colònia fúngica evitant recollir agar en excés. L'extracció de micorrizes es realitzà a partir d'una punta (preferentment ramificada) prèviament submergida 30 segons en H₂O₂ al 30% i rentada a continuació en aigua destil·lada.

L'extracció de DNA a partir de mostres de sòl es realitzà amb el kit comercial PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EEUU) seguint el protocol establert pel fabricant. L'extracció es realitzà a partir de 0,25 g de sòl prèviament tamisat amb un sedàs de 2 mm de diàmetre de porus per descartar la presència d'arrels (amb comprovació sota la lupa binocular en cas de dubte). Es dugueren a terme també extraccions de sòl recollit en plantes no inoculades amb

miceli afegit de *L. deliciosus* per utilitzar-les com a controls positius de la presència de miceli en el sòl. En aquest cas, als 0,25 g de sòl s'hi afegiren 6 mg de miceli fresc que s'obtingué de colònies creixent en un disc de cel·lofana col·locat sobre el medi BAF de la placa (porció aproximadament equivalent a la quantitat de miceli utilitzada en les extraccions de cultiu pur però sense gens d'agar).

2.4.2.2. Caracterització específica

2.4.2.2.1. Amplificació de la regió ITS del rDNA per PCR

S'amplificà la regió ITS del rDNA dels cultius purs detallats a l'annex 1 (pàgina 174). Les reaccions d'amplificació de la regió ITS es prepararen en tubs Eppendorf de 0,2 ml cadascun amb la mescla següent:

- 20 µl de la solució Eppendorf® Master Mix 2,5x (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanya) que conté la Taq DNA polimerasa (0,0625U/µl), 125 mM KCl, 75 mM Tris-HCl pH 8,3, 3,75 mM MgCl₂, 0,25% Nonidet®-P40, 500 µM de cada desoxiribonucleòtid trifosfat (dNTP) i estabilitzants.
- 2 µl de solució 10 µM d'encebadors ITS1 i ITS4 (concentració final=400 nM)
- 24 µl d'aigua High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Scharlau-Chemie, Barcelona, Espanya)
- 2 µl de l'extracte de DNA (10-20 ng DNA/µl extracte)

Els encebadors universals ITS1-ITS4 dissenyats per White et al. (1990) permeten amplificar la regió ITS de la majoria de fongs. Les seves seqüències nucleotídiques són 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' per a l'encebador ITS1 i 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' per a l'ITS4.

Les reaccions d'amplificació es dugueren a terme en un termociclador GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Les condicions de la reacció de PCR utilitzades foren les següents:

- pas inicial de desnaturalització del DNA de 3 minuts a 95°C
- 35 cicles d'amplificació del DNA (40 en el cas dels extractes de sòl) cadascun dels quals amb un pas de desnaturalització de 20 segons a 95°C, un pas

d'acoblament d'encebadors de 30 segons a 55°C i un pas d'extensió de la cadena de DNA de 40 segons a 72°C

- pas final d'extensió de la cadena de DNA de cinc minuts a 72°C

Els tubs es mantingueren en fred fins a la lectura de resultats per electroforesi. Els productes amplificats se separaren en funció de la seva mida mitjançant electroforesi en gels d'agarosa al 2% en tampó TBE 0,5x (TBE 1x=Tris-borat 89 mM, EDTA 2 mM pH 8,0). Les electroforesis es realitzaren a un voltatge d'aproximadament 100 V (per a gels d'uns 20 cm de longitud) durant 30-40 minuts. El marcador de pes molecular utilitzat fou el GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas International Inc., Ontario, Canadà). Els gels es tenyiren en bromur d'etidi durant 20 minuts (150 µl de bromur d'etidi en 300 ml d'aigua destil·lada), posteriorment se submergiren cinc minuts en aigua destil·lada per rentar l'excés de bromur i les bandes corresponents als productes de PCR es visualitzaren en un transil·luminador UV.

En tots els experiments de PCR s'incloué un control negatiu (amb tots els reactius i sense DNA) per detectar falsos positius i un control positiu (mostra de DNA que sabem que s'amplifica) per identificar possibles problemes en la reacció de PCR.

2.4.2.2. Seqüenciació i disseny d'encebadors específics

Els productes de PCR obtinguts per als diferents aïllaments en cultiu pur assenyalats en l'annex 1 (pàgina 174) es purificaren amb el kit Roche® High Pure PCR Product Purification (Roche Applied Science, Mannheim, Alemanya) i se seqüenciaren en els dos sentits utilitzant l'aparell 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Les seqüències s'analitzaren utilitzant el programa BioEdit versió 5.0.9 (Hall 1999) i s'incloueren a la base de dades GenBank de l'NCBI (National Center for Biotechnology Information). Les seqüències per a les diferents soques s'alinearen i es compararen entre elles, utilitzant el programa BioEdit, amb l'objectiu de detectar diferències interespecífiques i intraespecífiques. Es determinaren els percentatges de similitud entre seqüències mitjançant matrius d'identitat definides pel mateix programa informàtic.

Es clonaren els productes de PCR de la regió ITS de les soques que presentaren problemes en la definició de la seqüència consens. Aquests problemes s'atribuïren al fet de treballar amb organismes dicariòtics que podrien tenir una seqüència diferent a cada nucli de manera que el clonatge hauria de permetre la separació de les dues

variants. S'inserí el producte de PCR obtingut amb els encebadors ITS1-ITS4 en un plàsmid per un procés de lligació utilitzant el sistema pGEM[®]-T Easy Vector (Promega Corporation, Madison, WI, EEUU) i es clonà mitjançant transformació de cèl·lules competents del bacteri *Escherichia coli* JM109 (Promega Corporation) seguint el protocol estàndard (Sambrook et al. 1989). Se seleccionaren 14 clons a l'atzar que haguessin incorporat el fragment ITS (per canvis en la coloració de les colònies bacterianes) i s'amplificaren per PCR amb els encebadors ITS1-ITS4. Els productes de PCR s'analitzaren per SSCP, tal i com es descriu a l'apartat següent, per identificar les dues úniques variants possibles (una per a cada nucli) i seqüenciar-les per separat.

A partir de l'anàlisi de polimorfismes en les seqüències alineades de la regió ITS de diferents espècies de *Lactarius* es dissenyà un encebador que s'anomenà LDITS2R i que, en combinació amb l'encebador universal ITS1, hauria de permetre amplificar únicament l'espècie *L. deliciosus*. Per al disseny de l'encebador específic s'utilitzà el programa Primer Express[™] 2.0 (Applied Biosystems).

2.4.2.2.3. PCR específica

Les reaccions de PCR amb la parella d'encebadors ITS1-LDITS2R i la visualització dels productes formats es dugueren a terme en les mateixes condicions que en el cas de la reacció universal. L'única diferència fou que la temperatura per a la fase d'acoblament es fixà a 62°C en comptes de 55°C (temperatura utilitzada habitualment per als encebadors universals) per augmentar-ne l'especificitat.

L'especificitat de la parella ITS1-LDITS2R s'avaluà mitjançant PCR d'extractes de DNA obtinguts a partir de miceli en cultiu pur de diferents espècies de *Lactarius* i altres fongs ectomicorrízics comuns en el sòl. Per descartar resultats negatius deguts a problemes en l'extracció, les mostres s'amplificaren també per PCR amb els encebadors universals (ITS1-ITS4) i la formació de producte s'utilitzà com a control positiu. S'avaluà també l'aplicabilitat de la PCR amb els encebadors ITS1-LDITS2R per a la identificació específica del fong *L. deliciosus* a partir de mostres de micorrizes o sòl rizosfèric.

2.4.2.3. Caracterització intraespecífica

2.4.2.3.1. Anàlisi SSCP de la regió ITS

La tècnica SSCP s'utilitzà per analitzar els productes de PCR específics obtinguts a partir d'extraccions de miceli de 18 soques de *L. deliciosus*, així com de micorrizes i sòl rizosfèric obtinguts tal i com s'ha descrit a l'apartat 1. Es compararen els patrons de SSCP obtinguts per a cada soca a partir dels diferents tipus d'extraccions.

Per a l'anàlisi SSCP, es desnaturalitzaren 2 µl de cada producte de PCR en 8 µl de solució de formamida (950 µl/ml formamida, 25 mM EDTA i blau de bromofenol) durant cinc minuts a 95°C i seguidament el producte desnaturalitzat es refredà durant cinc minuts en gel. Les mostres es resolgueren en gels de poliacrilamida al 10% mitjançant electroforesi amb TBE 1x a 250 V durant 2 hores i 30 minuts i a 4°C. Els gels es tenyiren en nitrats de plata, es revelaren en solució de Na₂CO₃ 3% i formaldehid (Beidler et al. 1982) i les bandes es visualitzaren amb un transil·luminador.

Cada gel es preparà a partir de la mescla següent:

- 1,8 ml TBE5x
- 3 ml acrilamida: bisacrilamida 30:0,75
- 3,1 ml H₂O MiQ
- 1 ml TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) al 1%
- 100 µl de persulfat amònic 10 %

2.4.2.3.2. *Microsatellite-primed PCR*

La tècnica *microsatellite-primed PCR* amb l'encebador (GTG)₅ s'utilitzà per caracteritzar diferents soques de *Lactarius* spp. a partir d'extraccions de miceli en cultiu pur així com extraccions d'arrel i micorrizes de *L. deliciosus*.

La reacció es dugué a terme en tubs de 0,2 ml amb la mescla següent:

- 20 µl de la solució Eppendorf® Master Mix 2,5x (Eppendorf AG)
- 4 µl de solució stock 10 µM de l'encebador (GTG)₅ (concentració final=800nM)
- 24 µl d'aigua HPLC (Scharlau-Chemie)
- 2 µl d'extracte de DNA (10-20 ng DNA/µl extracte)

Les condicions de PCR foren les mateixes que amb els encebadors ITS1-ITS4 i la reacció es realitzà també en un termociclador GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems).

Les mostres es resolgueren en gels d'agarosa al 2% amb TBE 0,5x mitjançant electroforesi a 120 V durant 2 hores i 30 minuts i es visualitzaren tal i com ja s'ha descrit.

2.5. RESULTATS

2.5.1. Caracterització específica

2.5.1.1. Seqüenciació i disseny d'encebadors específics

Se seqüenciaren en els dos sentits els productes de PCR obtinguts amb els encebadors ITS1-ITS4, corresponents a la regió que comprèn l'ITS1, el gen 5,8S i l'ITS2, de les soques de *Lactarius* spp. de l'annex 1 (pàgina 174). En alguns casos no fou possible obtenir una seqüència neta. Per a la resta es definí la seqüència consens (comparant les seqüències en els dos sentits) utilitzant el programa BioEdit i s'introduí a la base de dades GenBank amb els codis que figuren a l'annex 1 (pàgina 174). Per a les soques 274, 352, 355, 358, 381, 382 i 385 s'observà superposició de senyals a partir d'una determinada base provocant l'aparició de nombroses indeterminacions en els cromatogrames. S'escollí la soca 274 com a exemple i es clonà el producte de PCR corresponent. El clonatge i posterior anàlisi SSCP dels diferents clons obtinguts per aquesta soca permeté distingir dos patrons de SSCP diferents corresponents a dues seqüències diferents per al mateix producte, que s'anomenaren 274a i 274b. Se seqüenciaren clons de cada tipus i es detectà l'existència de dues mutacions de tipus indel (inserció-deleció) d'una base "T" a les posicions 16 i 187 (en la seqüència publicada al GenBank). La resta de seqüències consens per a soques heterozigòtiques mostraren canvis nucleotídics puntuals (canvis de base o insercions) localitzats a les regions ITS1 i ITS2, clarament identificables en el cromatograma i indicats com a indeterminacions en l'alineament de seqüències de l'annex 2 (identificades com a Y, R, S, K o W segons els codis d'indeterminacions definits a l'annex, pàgina 176).

L'alineament i comparació de seqüències de la regió ITS del rDNA definides per a les diverses soques de *Lactarius* spp. mostrà diferències de composició de bases entre espècies, consistents bàsicament en canvis, insercions i delecions d'uns quants nucleòtids i localitzades a les regions ITS1 i ITS2 (annex 2, pàgina 176). El percentatge de similitud entre soques de *L. deliciosus* per a la regió analitzada se situà

entre el 99 i el 100 %, amb canvis nucleotídics puntuals en les regions ITS1 i ITS2. Els percentatges de similitud entre seqüències de la regió ITS de soques de *L. deliciosus* i soques d'altres espècies de *Lactarius* spp. foren d'un 92% entre *L. deliciosus* i *L. sanguifluus* o *L. semisanguifluus* R. Heim et Leclair, i per sota del 90 % per a la resta d'espècies de *Lactarius* analitzades. Es detectà una deleció de 11-12 nucleòtids a la regió ITS1 i una inserció d'entre 8-11 nucleòtids rics en CT a la regió ITS2 en les seqüències de *L. sanguifluus* respecte a les de *L. deliciosus*. La variabilitat entre espècies de *Lactarius* en aquesta àrea de la ITS2 permeté dissenyar un encebador anomenat LDITS2R que, en combinació amb l'encebador ITS1, hauria de permetre l'amplificació específica de *L. deliciosus*. La seqüència de nucleòtids de l'encebador dissenyat és 5'-AGA GGA GCT GGG TCT AAG-3'. Es dugué a terme una cerca de seqüències curtes idèntiques al encebador específic en la base de dades del GenBank i es comprovà que només coincidia al 100 % amb seqüències corresponents a *L. deliciosus*.

2.5.1.2. PCR específica

La PCR amb l'encebador universal ITS1 i l'encebador específic dissenyat per a *L. deliciosus* LDITS2R permeté obtenir un producte de PCR de la mida esperada (uns 510 pb) per a tots els extractes de les soques corresponents a *L. deliciosus*. En canvi, no hi hagué amplificació per als extractes d'altres espècies de *Lactarius*, d'altres fongs ectomicorrízics comuns (*T. terrestris*, *S. brunnea*, *La. laccata*, *H. crustuliniforme* i *B. edulis*) o d'arrels (figura 2). En la PCR amb els encebadors universals ITS1-ITS4 (control positiu) s'obtingué un producte de PCR de la longitud esperada (entre 600 i 700 pb) per a tots els extractes fúngics i d'arrels (figura 3). Es confirmà d'aquesta manera que l'ús de l'encebador dissenyat (LDITS2R) en combinació amb l'encebador universal ITS1 permet detectar específicament miceli de *L. deliciosus*. La seva especificitat es confirmà per a tots els cultius de *Lactarius* que s'enumeren a l'annex 1 (pàgina 174), tot i que només es mostren els gels per a alguns d'ells.

La PCR amb els encebadors específics (ITS1-LDITS2R) permeté obtenir un producte de PCR de la mida esperada a partir d'extractes de micorrizes de diferents soques de *L. deliciosus* en associació amb diferents espècies de *Pinus* així com d'extractes de sòl rizosfèric de plantes inoculades establertes en camp durant dos anys (que en el moment del mostreig de sòl presentaven un percentatge de micorrizes entre el 25 i el 60 %) (figura 4). Es pogué per tant detectar específicament el fong present a la micorriza i en la rizosfera de plantes micorrizades en forma de miceli extraradical.

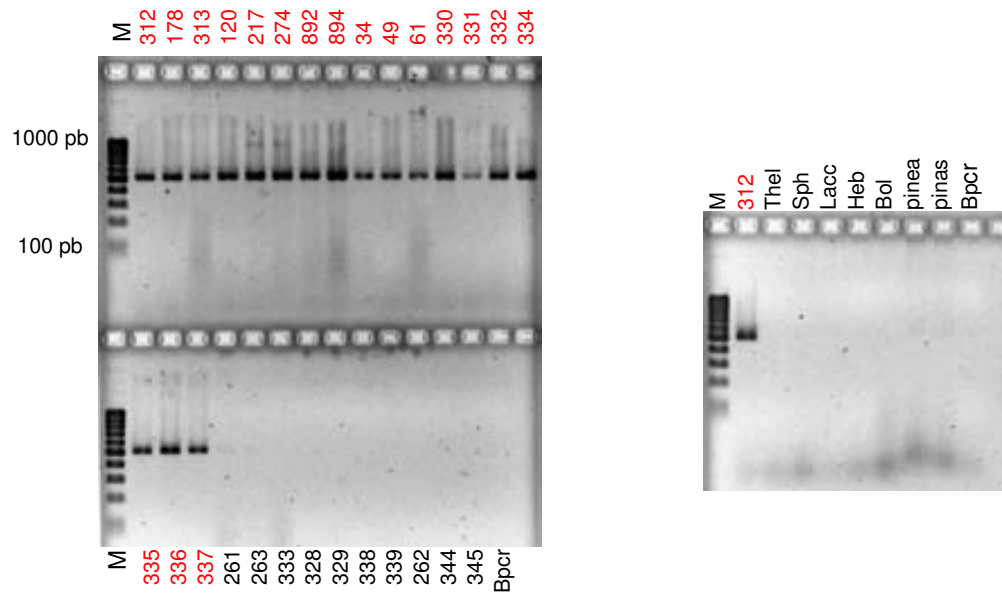


Figura 2. Productes de PCR específics obtinguts amb els encebadors ITS1-LDITS2R (específics per a *L. deliciosus*) per a cultius purs de diferents fongs. Els números corresponen als cultius de *Lactarius* spp. enumerats a l'annex 1 (pàgina 174), en vermell els corresponents a *L. deliciosus*. Thel = *Thelephora terrestris*, Sph = *Sphaerospora brunnea*, Lacc = *Laccaria laccata*, Heb = *Hebeloma crustuliniforme*, Bol = *Boletus edulis*, pinea = *Pinus pinea*, pinas = *Pinus pinaster*, Bpccr = control negatiu de PCR. Marcador (M)=GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (10 bandes de 1000 a 100 pb separades per 100 pb l'una de l'altra). En el primer gel, a l'esquerra del patró de bandes del marcador s'indica la mida de la primera i l'última banda, 1000 i 100 pb respectivament

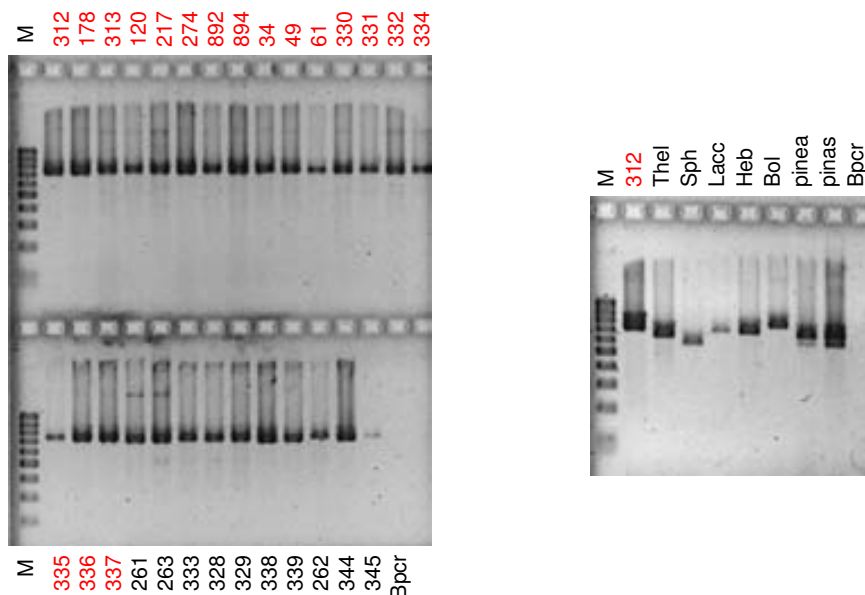


Figura 3. Productes de PCR obtinguts amb els encebadors ITS1-ITS4 (universals per a fongs) per a cultius purs de diferents fongs (els mateixos que a la figura 2). Els números corresponen als cultius de *Lactarius* spp. enumerats a l'annex 1 (pàgina 174), en vermell els corresponents a *L. deliciosus*. Abreviatures com en la figura anterior. Marcador (M)=GeneRuler™ 100bp DNA Ladder

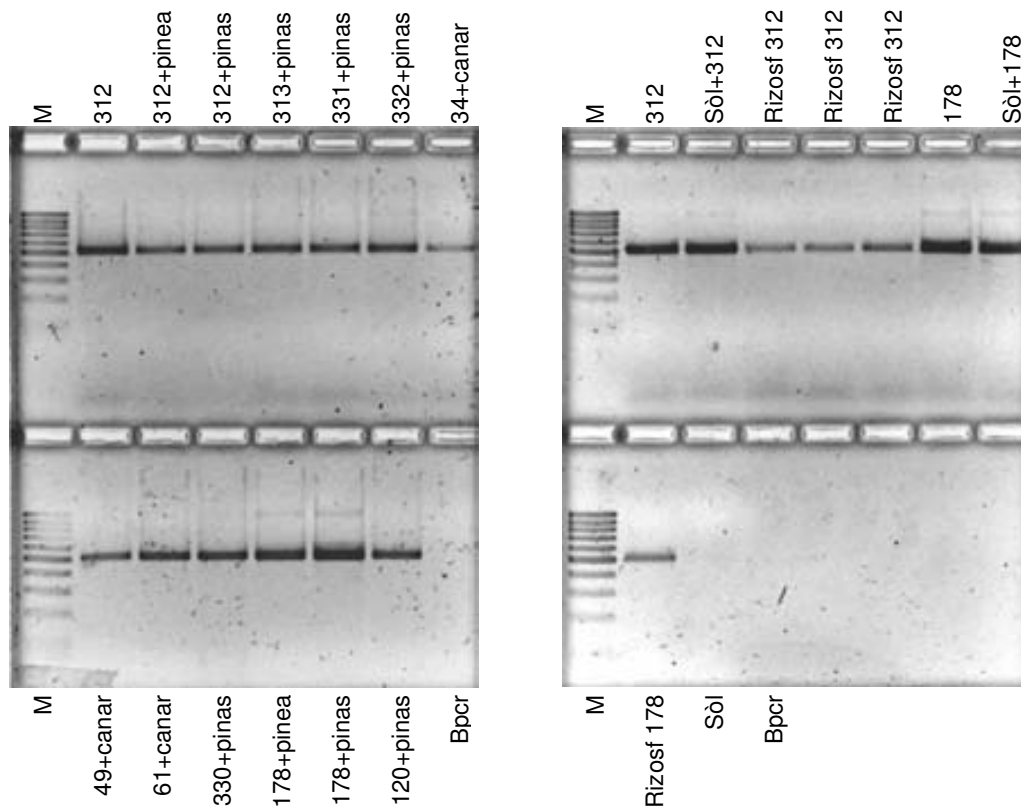


Figura 4. Productes de PCR específics obtinguts amb els encebadors ITS1-LDITS2R en diferents estadis de la simbiosi: mostres de micorrizes al gel de l'esquerra (número de soca + espècie vegetal) i mostres de sòl rizosfèric al gel de la dreta (Rizosf seguit del número de soca inoculada). Els controls positius foren cultius purs (número de soca) i mostres de sòl amb miceli afegit (sòl + número de soca). Com a control negatiu s'utilitzà sòl rizosfèric de plantes no inoculades (sòl). *pinea* = *P. pinea*, *pinas* = *P. pinaster*, *canar* = *P. canariensis*, Bpcc=control negatiu de PCR. Marcador (M)= GeneRuler™ 100bp DNA Ladder

2.5.2.1. Anàlisi SSCP de la regió ITS

Tot i que les diferències nucleotídiques entre les diferents soques de *L. deliciosus* per al fragment de DNA analitzat són mínimes, l'anàlisi SSCP dels productes de PCR específics obtinguts per a 18 soques de *L. deliciosus* en cultiu pur originà patrons de SSCP d'entre dues i quatre bandes amb clars polimorfismes (figura 5). L'agrupament de patrons de bandes similars permeté diferenciar fins a nou grups entre les 18 soques de *L. deliciosus*: I) 312, 274 i 334; II) 178; III) 313, 330 i 336; IV) 120 i 331; V) 332; VI) 217; VII) 894, 892 i 337; VIII) 335 i IX) 34AYA, 49AYA i 61AYA.

Els patrons idèntics agruparen soques amb la mateixa seqüència per al fragment analitzat (grup III) o soques que diferien en un nucleòtid (grups IV, VIII i IX) o més (grup I). Els patrons diferents mostraren almenys un canvi nucleotídic. L'alineament de les seqüències de les 18 soques per al fragment analitzat permeté identificar fins a vuit canvis nucleotídics (*single-nucleotide polymorphisms* o SNPs). La comparació de seqüències per als parells de soques amb només un canvi nucleotídic i amb diferent patró SSCP permeté detectar quatre posicions relacionades amb els canvis conformacionals (taula 1).

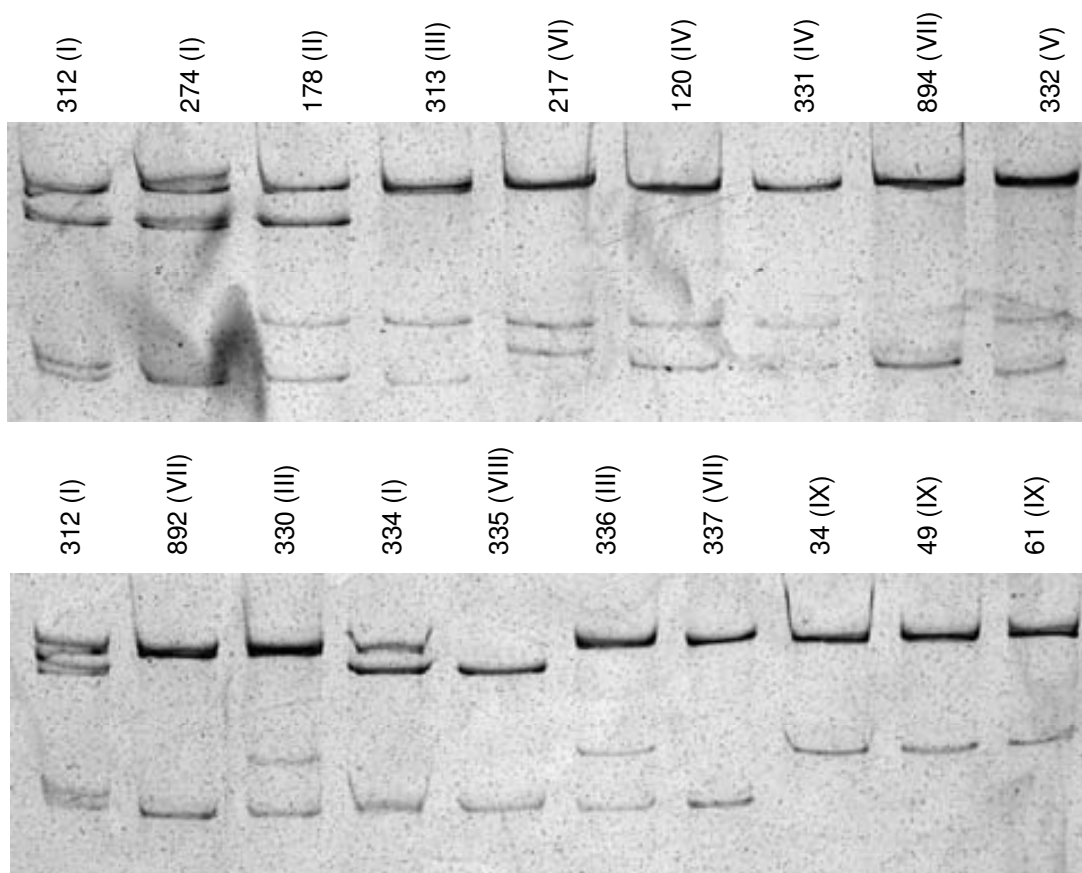


Figura 5. Polimorfismes SSCP per als productes de PCR específics obtinguts amb els encebadors ITS1-LDITS2R a partir de cultius purs de diferents soques de *L. deliciosus*. Els números corresponen als cultius que s'enumeren a l'annex 1 (pàgina 174). Els números romans indiquen la classificació en grups en funció del patró de bandes (veure text).

Taula 1. Polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs) que generen diferències en els patrons SSCP del fragment ITS amplificat amb els encebadors ITS1-LDITS2R per a 18 soques de *L. deliciosus*.

Soques comparades	Posició en el fragment ⁽¹⁾	Tipus de SNP	Nucleòtids implicats ⁽²⁾	Nombre de bandes
120/894	46	Canvi de base	Y/T	3/2
120/49	46	Canvi de base	Y/C	3/2
120/61	46	Canvi de base	Y/C	3/2
894/49	46	Canvi de base	T/C	2/2
894/61	46	Canvi de base	T/C	2/2
894/331	46	Canvi de base	T/Y	2/3
331/49	46	Canvi de base	Y/C	3/2
331/61	46	Canvi de base	Y/C	3/2
336/120	92	Canvi de base	Y/C	3/3
336/331	92	Canvi de base	Y/C	3/3
120/330	92	Canvi de base	C/Y	3/3
120/313	92	Canvi de base	C/Y	3/3
313/331	92	Canvi de base	Y/C	3/3
331/330	92	Canvi de base	C/Y	3/3
336/217	107	Canvi de base	G/R	3/3
313/217	107	Canvi de base	G/R	3/3
217/330	107	Canvi de base	R/G	3/3
120/178	217	Inserció	-/T	3/4
331/178	217	Inserció	-/T	3/4

⁽¹⁾: en el fragment amplificat de 510 pb, 30 bases menys que en les seqüències publicades al GenBank (annex 2, pàgina 176)

⁽²⁾: Y= C/T; R= G/C

L'anàlisi SSCP dels productes específics obtinguts a partir de micorrizes de *L. deliciosus* mostrà patrons idèntics als corresponents cultius purs, independentment de l'espècie vegetal associada (figura 6). De la mateixa manera, els productes específics obtinguts a partir del miceli extraradical present en el sòl rizosfèric de plantes micorrizades mostraren un patró idèntic al del cultiu pur amb el qual es dugueren a terme les inoculacions (figura 7).

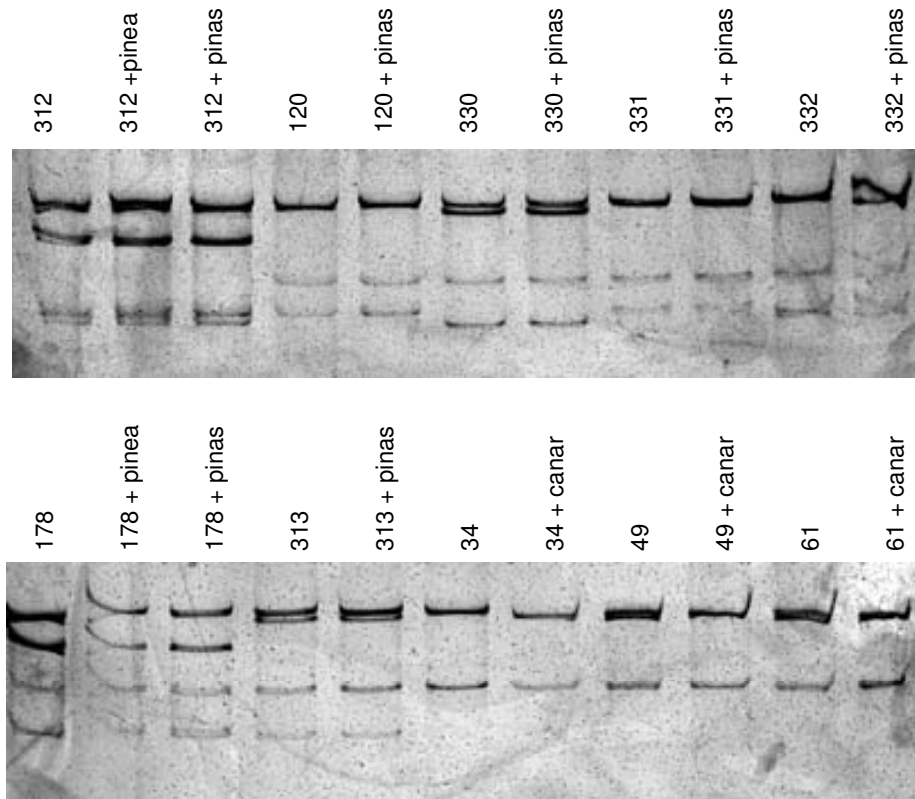


Figura 6. Polimorfismes SSCP per als productes de PCR específics obtinguts amb els encebadors ITS1-LDITS2R a partir de cultius purs de diferents soques de *L. deliciosus* i les seves corresponents micorrizes (número de soca + espècie vegetal). Els números corresponen als cultius que s'enumeren a l'annex 1 (pàgina 174). pinea = *P. pinea*, pinas= *P. pinaster*, canar = *P. canariensis*

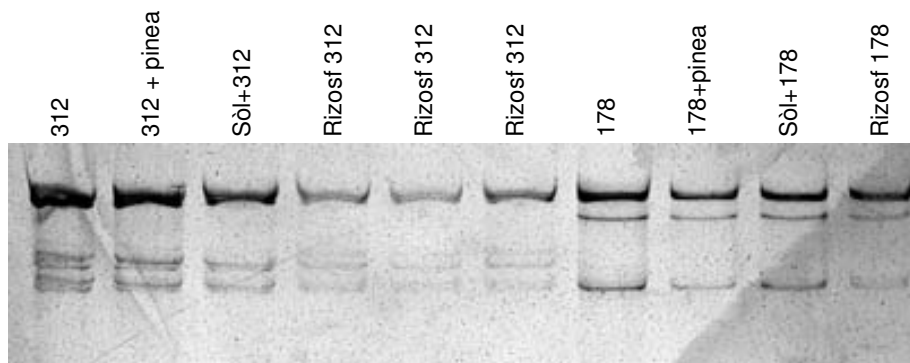


Figura 7. Polimorfismes SSCP per als productes de PCR específics obtinguts amb els encebadors ITS1-LDITS2R a partir de diferents tipus de mostra: miceli en cultiu pur (número de soca), micorrizes (número de soca + espècie vegetal), sòl amb miceli afegit (sòl + número de soca) i sòl rizosfèric (Rizosf seguit del número de soca amb què s'inoculà la planta corresponent). Els números corresponen als cultius que s'enumeren a l'annex 1 (pàgina 174). pinea = *P. pinea*, pinas= *P. pinaster*, canar = *P. canariensis*

2.5.2.2. Microsatellite-primed PCR

El microsatèl·lit (GTG)₅ utilitzat com a encebador originà un nombre variable de productes de PCR de longitud entre 400 i 1200 pb (figura 8). Els patrons obtinguts revelaren un elevat polimorfisme entre soques en les seqüències situades entre microsatèl·lits. S'observaren patrons similars però no idèntics entre cultius purs i les seves respectives micorrizes. Es detectà amplificació del DNA de la planta en les mostres corresponents a arrels de *Pinus* spp. no colonitzades.

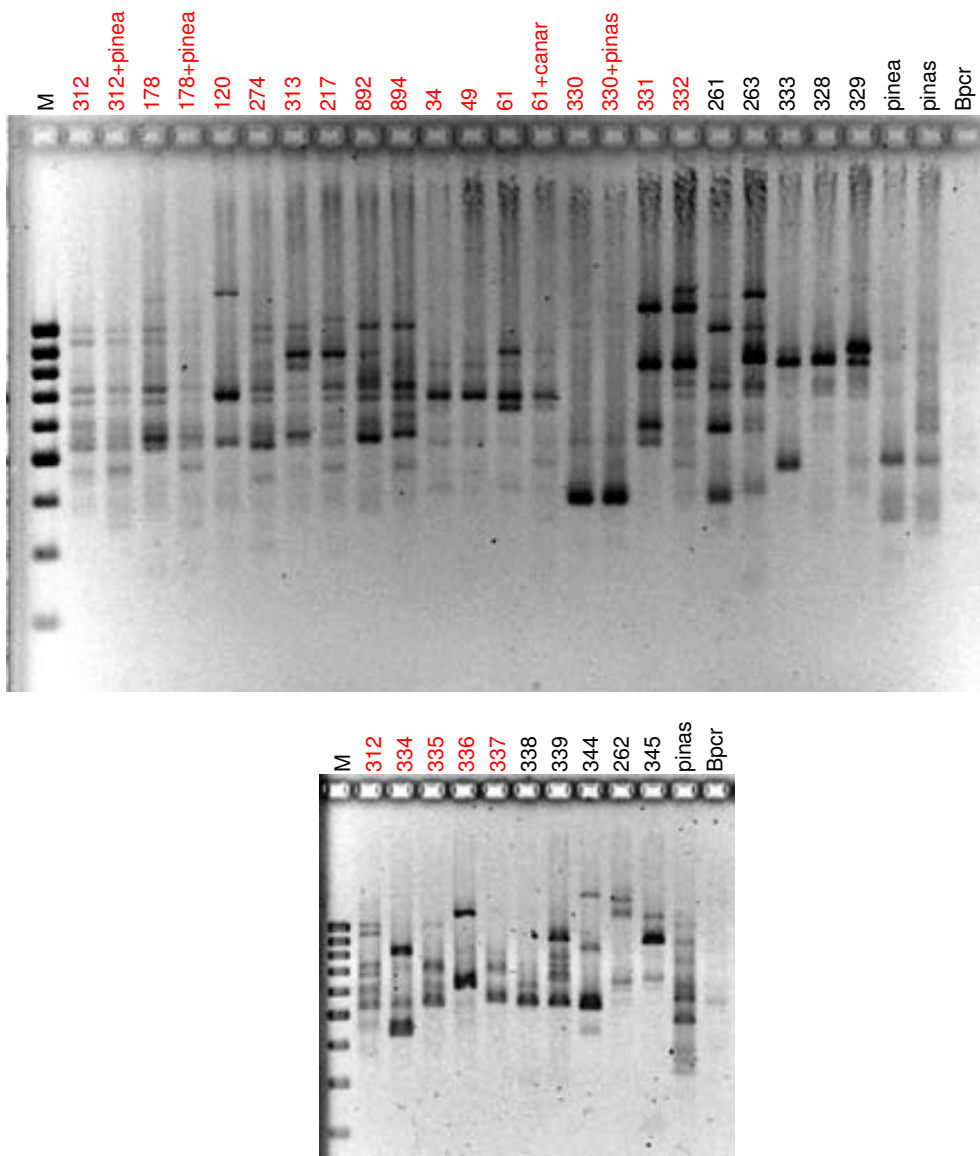


Figura 8. Polimorfismes en els productes de PCR obtinguts per amplificació del DNA genòmic amb l'encebador (GTG)₅ a partir de diferents mostres: cultius purs de *Lactarius* spp., micorrizes (número de soca + espècie vegetal) i arrels de *Pinus* spp. Els números corresponen als cultius de *Lactarius* spp. enumerats a l'annex 1 (pàgina 174), en vermell els corresponents a aïllaments de *L. deliciosus*. pinea = *P. pinea*, pinas = *P. pinaster*, Bpcr=control negatiu de PCR. Marcador (M)= GeneRuler™ 100bp DNA Ladder

2.6. DISCUSSIÓ

La comparació de les seqüències ITS del rDNA obtingudes per a les diferents soques de *Lactarius* confirmà la baixa variabilitat intraespecífica d'aquesta regió, descrita ja per a fongs micorrízics (Gardes i Bruns 1991, Gardes et al. 1991), fongs patògens (Anderson i Stasovski 1992, Chen et al. 1992, Lee i Taylor 1992) i plantes (Baldwin 1992, Baldwin et al. 1995). Els alineaments interespecífics permeten dissenyar un encebador (LDITS2R) que, en combinació amb l'universal ITS1, permet la identificació específica per PCR de *L. deliciosus* en diferents estadis de la simbiosi (miceli aïllat d'esporec, micorrizes i miceli extraradical present en el sòl). Així, tot i la presència de DNA de la planta o d'altres organismes en les extraccions de DNA total, s'han pogut identificar les estructures simbiòtiques i vegetatives del fong, que morfològicament no es poden distingir a nivell d'espècie (Amicucci et al. 2001, Horton i Bruns 2001).

La identificació del simbiont fúngic en la majoria d'estudis recents sobre comunitats ectomicorríziques s'ha basat en tècniques d'anàlisi del DNA (Leake et al. 2004, Martin 2007, Rosling et al. 2003), generalment consistents en extracció del DNA total, ampliació de la regió ITS i anàlisi RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) o seqüenciació, tant a partir de micorrizes (Guerin-Laguette et al. 2003, Murat et al. 2005, Rosling et al. 2003) com de miceli en el sòl (Chen i Cairney 2002, Landeweert et al. 2003a, 2003b, Wallander et al. 2003). La detecció del fong en el sòl suposa un avenç metodològic important ja que la PCR a partir de mostres de sòl és una tècnica que no s'ha pogut aplicar extensivament a causa de la presència d'inhibidors d'aquesta reacció en les extraccions (Vázquez-Marrufo et al. 2002, Volossiuk et al. 1995, Yeates et al. 1998).

L'aplicació de tècniques moleculars en l'avaluació de la persistència en camp d'una determinada espècie o soca fúngica ha estat útil en programes de micorrizació controlada, especialment per a aquelles espècies obtingudes després d'un procés de selecció i establertes en experiments de camp a llarg termini. Selosse et al. (1998, 1999, 2001) seguiren la persistència en camp d'espècies i genets (individus genèticament idèntics) de *Laccaria* (*L. bicolor* (Maire) P.D. Orton i *L. laccata*) mitjançant anàlisi del rDNA i RAPD (*random amplification of polymorphic DNA*) fins a 10 anys després de l'establiment de les plantes inoculades. A més a més, també s'han dissenyat encebadors específics per a l'amplificació selectiva d'espècies fúngiques econòmicament valuoses

com *B. edulis* (Leonardi et al. 2005) o *Tuber* spp. (Amicucci et al. 1998, Mabru et al. 2001, 2004, Mello et al. 1999, Séjalon Delmas et al. 2000).

L'anàlisi dels productes de la regió ITS de *L. deliciosus* obtinguts per PCR específica amb els encebadors ITS1-LDITS2R permeté distingir fins a nou patrons SSCP diferents entre les 18 soques avaluades. Tenint en compte que les bandes corresponen a cadenes desnaturalitzades de DNA i que *L. deliciosus* és un organisme dicariòtic, els patrons de dues bandes correspondrien a individus homozigòtics en aquesta regió mentre que els de tres i quatre bandes pertanyen a individus heterozigòtics (Bonello et al. 1998, Humphries et al. 1997). En una seqüència heterozigòtica, un canvi nucleotídic pot afectar la conformació espacial de les cadenes simples en els dos sentits (5'-3' i 3'-5') obtenint així un patró de quatre bandes o només en un dels sentits generant un patró de tres bandes (Amersham Biosciences 2005). Els patrons de dues bandes corresponen a seqüències homozigòtiques en aquesta regió o a canvis nucleotídics que no impliquen una variació en la conformació de les cadenes. En aquest sentit, Rubio et al. (1996) indiquen que les divergències en la seqüència de nucleòtids no sempre estan correlacionades amb les diferències en la mobilitat electroforètica de les cadenes de DNA.

Tot i que no és possible predir *a priori* quins canvis nucleotídics provocaran una variació en la conformació i mobilitat de la cadena (Amersham Biosciences 2005, Welsh et al. 1997), l'alineament dels fragments amplificats per a les soques analitzades mostrà l'existència de fins a vuit polimorfismes nucleotídics simples (SNPs) que podrien ser potencialment responsables de la variabilitat en els patrons SSCP. D'aquests, s'identificaren quatre punts en els quals si es dóna una mutació puntual (normalment un canvi de base) provoca un canvi en la conformació i mobilitat de les cadenes simples i, conseqüentment, en el patró de bandes. Tot i que treballem amb una font de variació baixa (regió ITS), la variabilitat detectada en el nombre i el patró de bandes fa que aquesta tècnica pugui ser molt útil en el seguiment de la persistència d'una determinada soca. A més a més, les mostres de micorrizes i sòl rizosfèric mostraren patrons idèntics als obtinguts a partir de les soques inoculades. Aquest és el primer cop en què la tècnica SSCP s'aplica per identificar micorrizes i miceli extraradical de fongs ectomicorrízics a nivell de soca.

S'ha demostrat que la sensibilitat de la SSCP disminueix a mesura que augmenta la longitud del fragment de PCR (Humphries et al. 1997, Nair et al. 2002) sent la mida òptima per detectar mutacions puntuals entre 150 i 200 pb (Humphries et al. 1997,

Savov et al. 1992) mentre que amb fragments majors de 400 pb l'habilitat de la tècnica per detectar mutacions disminueix (Hayashi 1991, Hongyo et al. 1993). En el nostre cas, la necessitat d'especificitat i d'incloure la regió amb variabilitat intraespecífica ha fet que haguéssim de treballar amb un fragment considerablement més gran (al voltant dels 500 pb). Tot i així, la tècnica mantingué la seva sensibilitat i la majoria de canvis d'una sola base originaren patrons diferents i distingibles entre ells.

La mobilitat de les cadenes en l'anàlisi SSCP és molt sensible a les condicions d'electroforesi com la temperatura, el voltatge o el tipus de gel (Humphries et al. 1997, Orita et al. 1989, Rubio et al. 1996, Savov et al. 1992). Diferents gels de poliàcrilamida mostraren patrons variables per a una soca determinada però els patrons en el mateix gel són comparables i les diferències entre grups es mantenen. Les variacions entre gels es detectaren també a Welsh et al. (1997), que proposaren incloure a cada gel un control positiu que serveixi de referència i amb el qual es puguin comparar la resta, evitant les comparacions entre electroforesis diferents. En aquest sentit, en l'anàlisi SSCP dels productes de PCR obtinguts a partir d'extraccions de micorriza o de sòl rizosfèric, hem inclòs sempre una mostra corresponent al cultiu pur de la soca amb què inicialment vam inocular la planta per poder comparar el patró i establir si la soca que hi ha en camp té el mateix patró que la soca que vam introduir. D'altra banda, el desdoblament observat en algunes bandes podria explicar-se perquè la temperatura d'electroforesi no es manté constant i la conformació de la cadena canvia lleugerament (Hongyo et al. 1993, Welsh et al. 1997) o bé per problemes d'acoblament de les cadenes simples entre elles o amb els encebadors per un excés de DNA o d'encebadors, fet que es podria resoldre diluint els productes de PCR (Hongyo et al. 1993, Humphries et al. 1997, Welsh et al. 1997).

La *microsatellite-primed PCR* utilitzant l'encebador (GTG)₅ mostrà polimorfismes reproduïbles entre soques de *L. deliciosus*, així com amb d'altres fongs ectomicorrízics. Aquesta tècnica ha estat prèviament utilitzada per a la caracterització intraespecífica de *Laccaria amethystina* Cooke, espècies de *Tirmania* i *Terfezia* (Martin et al. 1998b), *Tuber borchii* Vittad. (Lanfranco et al. 1998a) i diferents espècies de *Tuber* (Amicucci et al. 2001). En el nostre cas, el fet que algunes soques comparteixin bandes entre elles (com les procedents de les Illes Canàries o les de Sòria) suggereix una relació entre els patrons de bandes i l'origen geogràfic. Aquest fet ha estat també indicat per Martin et al. (1998b) per als patrons obtinguts en el cas de *Terfezia*.

Amb la tècnica *microsatellite-primed PCR*, les mostres corresponents a micorrizes mostraren un patró de bandes diferent al cultiu pur corresponent, probablement per la presència de productes amplificats corresponents al DNA de la planta hoste. La inespecificitat de la tècnica suposa una limitació en la identificació intraespecífica del fong en forma de micorriza o de miceli extraradical en el sòl, on podria amplificar DNA d'altres organismes alterant així el patró corresponent a *L. deliciosus*. Aquesta tècnica per tant només seria útil en el cas de caracterització molecular de cultius purs, tal com també s'apunta a Amicucci et al. (2001), o en estudis poblacionals d'esporecarps (Martin et al. 1998b). Com a crítica a la tècnica, Weising et al. (1995) observaren que les condicions de PCR (especialment la temperatura d'acoblament) influïen en l'aparició de bandes inesperades al amplificar DNA del bacteri *Escherichia coli* i suggeriren que la majoria de bandes eren produïdes per unions inespecífiques dels encebadors al DNA diana. Mitjançant la tècnica SSCP, en canvi, es pot treballar a partir de productes de PCR específics de *L. deliciosus* de manera que no hi ha interferències per part del DNA de la planta o d'altres organismes i es pot per tant aplicar en extraccions de DNA total a partir de micorrizes o miceli extraradical.

Les tècniques d'identificació molecular obren una nova via en els estudis a petita escala de la distribució espacial i temporal de les comunitats micorríziques en el sòl. Treballs recents suggereixen que la visió de la comunitat ectomicorrízica des del punt de vista miceliar serà diferent de la derivada dels estudis dels esporecarps o micorrizes (Horton i Bruns 2001, Kjølner 2006, Koide et al. 2005b, Landeweert et al. 2005, Peintner et al. 2007). Dels resultats obtinguts en aquest treball, es desprèn que el seguiment del fong simbiònt en plantes inoculades amb *L. deliciosus* en diferents estadis de la simbiosi és viable amb tècniques moleculars relativament simples, tant a nivell específic com intraespecífic.

L'anàlisi SSCP del fragment ITS específic representa una tècnica eficient i relativament barata, comparada amb la seqüenciació, amb un gran potencial en estudis de la persistència de soques de *L. deliciosus* introduïdes en camp, especialment en forma de miceli extraradical. Tot i l'elevada informació relativa a la regió ITS en fongs ectomicorrízics, la baixa variabilitat d'aquesta zona i la manca d'informació relativa a la base molecular de la tècnica SSCP (Welsh et al. 1997) fan difícil predir l'èxit de la tècnica proposada en la caracterització intraespecífica d'altres espècies fúngiques. Cal tenir en compte que algunes soques de *L. deliciosus* no s'han pogut distingir mitjançant aquesta tècnica perquè són idèntiques en la regió analitzada. Per aquest motiu proposem dur a terme estudis en regions alternatives que puguin ser més polimòrfiques com per exemple

la IGS. Resultats de proves preliminars han mostrat que la regió IGS 1 (abans del gen 5S rRNA en sentit 5'-3') és poc prometedora en aquest sentit ja que el fragment amplificat per a cinc soques de *L. deliciosus* i una de *L. sanguifluus* és idèntic (dades no mostrades), de manera semblant als resultats de baix polimorfisme d'aquesta regió obtinguts per a *Hebeloma cylindrosporum* a Guidot et al. (1999). Proposem per tant avaluar la variabilitat de la regió IGS 2 (després del gen 5S rRNA en 5'-3') en la línia de treballs com els de Albee et al. (1996), Gryta et al. (1997, 2000), Guidot et al. (1999, 2001) o Selosse et al. (1996, 1998), tenint però en compte que es tracta d'un fragment de milers de parells de bases i que aquest fet en dificulta tant el procés d'amplificació com el de seqüenciació.

**III. ESTABLIMENT DE PLANTACIONS EXPERIMENTALS
EN CAMP. SEGUIMENT DE LA COLONITZACIÓ
RADICAL I EXTRARADICAL DE *Lactarius deliciosus***

3.1. HIPÒTESI DE TREBALL

- La persistència en el temps del fong introduït en camp depèn del nivell de colonització radical en el moment del trasplantament i de la soca considerada.

3.2. OBJECTIUS

- Inocular planta de *P. pinea* amb inòcul vegetatiu de diferents soques preseleccionades de *L. deliciosus*. Quantificar el nivell de colonització radical de les plantes prèviament al seu trasplantament a camp.
- Determinar la persistència en camp del fong inoculat mitjançant tècniques d'identificació morfològica i molecular a nivell d'ectomicorrizes i de miceli extraradical.

3.3. INTRODUCCIÓ

El procés de micorrizació controlada amb fongs comestibles passa per la producció d'inòcul de l'espècie a introduir, la inoculació de la planta i l'establiment de plantacions productives. En el cas de *L. deliciosus*, la producció de planta inoculada en condicions controlades s'ha descrit a Guerin-Laguette et al. (2000) i Parladé et al. (2004b). Els únics estudis publicats que es coneixen sobre l'establiment de plantacions productives d'aquesta espècie fúngica són els de Poitou et al. (1984) i Guinberteau et al. (1989), que van observar producció d'esperocarps tres anys després del trasplantament a camp, i els de Wang i Hall (2002) i Wang et al. (2003) que van detectar l'aparició d'esperocarps després de 18 mesos en camp. En aquest treball ens proposem establir diferents plantacions experimentals en camp i monitoritzar la persistència del fong introduït en forma de micorrizes i de miceli extraradical, abans de l'eventual producció d'esperocarps. La persistència del fong en forma vegetativa no podrà assegurar una producció regular d'esperocarps però sí que és un factor imprescindible perquè en condicions adequades es pugui donar la fructificació.

Existeixen nombrosos factors que poden influir en el manteniment del fong en la planta inoculada establerta en camp, entre els quals destaquen el nivell inicial de colonització radical i la pressió competitiva de la micoflora autòctona (Perrin *et al.* 1996). En aquest

capítol, es pretén avaluar, en primer lloc, l'efecte del nivell de colonització radical al moment del trasplantament a camp i determinar si una major colonització inicial implica una major persistència del fong en camp. En segon lloc, es pretén avaluar la importància de la soca de *L. deliciosus* utilitzada per a la inoculació de les plantes i determinar si existeixen diferències entre soques en la seva persistència en camp (degudes a una major capacitat colonitzadora o a una millor adaptació i capacitat de supervivència).

Amb aquests objectius es dissenyaran diferents experiments en parcel·les experimentals i microparcel·les. En el primer cas s'establiran plantacions amb un marc de plantació final de, com a mínim, 2 x 2 m dissenyades per dur a terme un mostreig periòdic de plantes i avaluar la persistència del fong durant un període més o menys llarg i, eventualment, arribar a fer un seguiment de la producció d'esporecarps. En el cas de les microparcel·les, s'establiran plantacions amb menys plantes disposades en un marc de plantació més petit (de fins a 1 x 1 m) en què es duu a terme un mostreig més continu però per un període més curt de temps. En aquest cas, podem treballar en condicions més controlades, amb una major homogeneïtat de les condicions, control individualitzat de les plantes i manteniment de la plantació més senzill. Per contra, però, perdem les determinacions a llarg termini ja que les plantes estan molt juntes i això en dificultaria el seu desenvolupament.

Per al seguiment del fong en fase vegetativa es combinarà la metodologia tradicional, basada en el recompte de micorrizes presents al sistema radical, amb la tècnica PCR en temps real (*real time PCR*), que es pretén posar a punt per a la identificació i quantificació del miceli extraradical present en el sòl de la plantació. La PCR en temps real s'ha desenvolupat per quantificar el nombre de còpies de DNA diana que es formen a la reacció de PCR de manera acurada, reproducible i evitant els processos post-PCR (Heid et al. 1996, Schena et al. 2004). Per a la detecció del producte, s'utilitzen molècules fluorescents que s'hibriden amb el DNA diana, directament o a través d'una sonda. Les emissions de fluorescència a cada cicle (proporcionals al número de còpies generades, veure més avall per detalls dels processos bioquímics) es registren en un ordinador connectat al termociclador i es genera una corba d'amplificació del DNA per a cada mostra. La corba d'amplificació és sigmoïdal, és a dir, existeix una fase de creixement exponencial del nombre de còpies fins que s'arriba a una fase plateau o de saturació a causa de factors com l'esgotament de reactius o la inhibició per un excés de producte.

En la PCR convencional la detecció del producte té lloc en la fase final de manera que mostres amb diferent quantitat de DNA de partida poden donar una intensitat de banda molt similar perquè totes han arribat a la fase de saturació. L'efecte plateau fa que la quantificació a punt final no sigui possible de manera que en la PCR a temps real es quantifica en la fase exponencial de l'amplificació, fase en què l'eficiència de la reacció és constant. En aquesta fase, l'emissió de fluorescència augmenta de manera proporcional a l'acumulació de producte de PCR de manera que com més gran sigui el nombre inicial de còpies de DNA diana abans es detectarà un increment significatiu de la fluorescència (Applied Biosystems 2004, Schena et al. 2004). La possibilitat de determinar el punt en què es dona aquest increment (llindar de fluorescència) ens permet quantificar la mostra problema, interpolant a partir d'una recta patró (quantificació absoluta).

La recta patró es crea a partir de les corbes d'amplificació d'una mostra amb una quantitat coneguda de DNA i successives dilucions d'aquesta. Per definir la recta es relaciona el número de cicle en què comencem a detectar producte amplificat (cicle llindar o Ct) per a cada corba amb la quantitat de material de partida (a més DNA inicial abans es detecta la formació de producte de PCR). El pendent de la recta ens defineix l'eficiència de la reacció i el valor òptim és de -3,32 (Qiagen 2004). Tot i que l'eficiència entre experiments en les mateixes condicions és més o menys constant, cal que cada experiment de PCR tingui la seva pròpia recta patró ja que l'estabilitat dels reactius pot variar. A partir d'aquesta recta patró podem determinar la quantitat inicial de la mostra problema, sempre i quan el seu Ct entri dins el rang de la recta (figura 1).

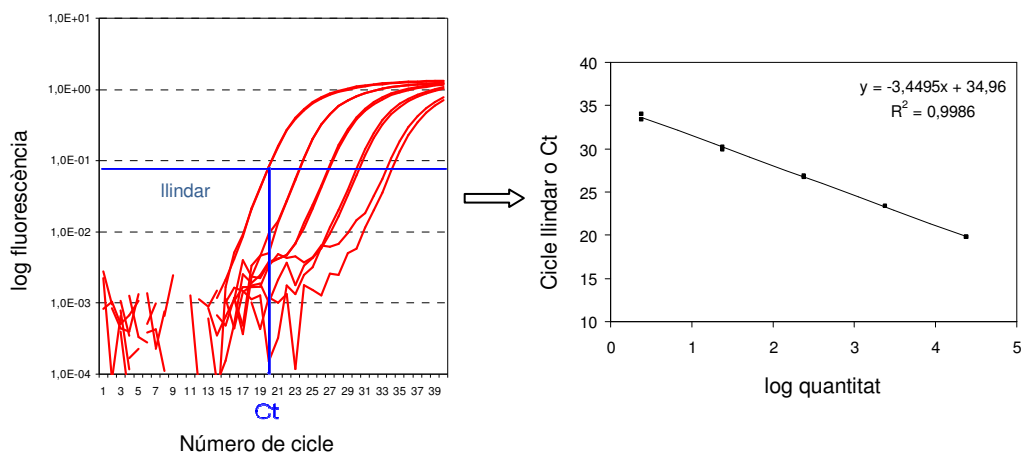


Figura 1. Corbes d'amplificació obtingudes per a quantitats conegudes de DNA (gràfic de l'esquerra, en escala logarítmica). Definició d'una recta patró a partir dels valors Ct obtinguts per a aquestes quantitats conegudes.

De les diferents modalitats de PCR en temps real destaquem l'ús de la molècula SYBR® Green i de les sondes TaqMan®. La molècula SYBR® Green emet fluorescència quan s'uneix al DNA de doble cadena de manera que l'augment de fluorescència és proporcional a l'increment de producte de PCR. La limitació del sistema és que no és específic, és a dir, que la molècula també es pot unir a DNA contaminant o dímers (associació entre encebadors) que emetran senyal fluorescent i es quantificaran. Tot i l'important esforç d'optimització, el principal avantatge de la tècnica és el baix cost dels reactius. L'amplificació no específica es pot detectar generant una corba de dissociació (o de *melting*) per a cada mostra. El mètode consisteix en sotmetre els productes a un nou cicle en què la temperatura augmenta progressivament de 60°C a 95°C produint la seva desnaturalització i per tant una disminució de la fluorescència emesa. La derivació de la corba de fluorescència genera un pic a una temperatura anomenada de fusió o de *melting* en què el 50% del DNA està en cadena simple. El producte específic genera un pic a una temperatura de fusió al voltant dels 80°C mentre que si existeixen productes inespecífics o dímers generaran un altre pic generalment per sota d'aquesta temperatura.

L'ús de sondes TaqMan® permet, en canvi, una detecció específica del DNA d'interès. La sonda és un oligonucleòtid que es dissenya de manera que tingui una seqüència complementària a una regió específica de l'organisme que volem detectar i que ens permeti distingir-lo d'organismes propers. Aquest oligonucleòtid porta dues molècules fluorescentes als extrems, el *reporter* al 5' i el *quencher* al 3', i té una temperatura d'anellament alta per mantenir una elevada especificitat amb el DNA diana complementari. En el cas de les sondes TaqMan® MGB el *quencher* és una molècula no fluorescent i a més a més la sonda incorpora una fracció MGB (*minor groove binder*) que incrementa la temperatura d'anellament de manera que puguem treballar amb sondes més curtes igualment específiques. En qualsevol cas, amb la sonda intacta el *quencher* suprimeix l'emissió de fluorescència per part del *reporter* pel fenomen de Förster o *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) (Applied Biosystems 2002, Förster 1948, Lakowicz 1983). En canvi, en el moment que la sonda s'hidrolitza per l'activitat de la Taq polimerasa (veure més avall), el *reporter* s'allibera i emet fluorescència, tal com es descriu a Holland et al. (1991). A cada cicle de la reacció de PCR, el DNA es desnaturalitza, els encebadors i la sonda s'acoblen a la cadena simple de DNA i la Taq polimerasa comença la polimerització de la cadena complementària. En el moment que es troba amb la sonda, l'hidrolitza per poder seguir afegint nucleòtids a la cadena (gràcies a la seva activitat 5'-exonucleasa) de manera que el *reporter* s'allibera i emet fluorescència (Applied Biosystems 2002).

Segons Schubert et al. (2003) l'aplicació d'aquesta tècnica en estudis de camp dependrà en gran part de la capacitat d'extracció de DNA fúngic a partir de mostres de diferents tipus de sòl. El principal problema de l'extracció de DNA directament del sòl és la dificultat d'eliminar els àcids húmics, que interfereixen en la reacció de la PCR (Vázquez-Marrufo et al. 2002, Yeates et al. 1998). Això fa que molts dels protocols d'extracció de DNA del sòl requereixin nombrosos passos de purificació i que, malgrat la laboriositat del procés, s'obtingui un DNA poc pur. Les dificultats d'estudi del miceli extraradical fan que aquesta fase segueixi sent la menys entesa tot i jugar un paper clau en la simbiosi (Guidot et al. 2003, Horton and Bruns 2001, Landeweert et al. 2003a, 2003b, Leake et al. 2004, Read 1992, Simard et al. 2002). En aquest treball pretenem posar a punt un sistema de detecció i quantificació del miceli extraradical de *L. deliciosus* present en el sòl i augmentar així el coneixement relatiu a aquesta fase, estudiar-ne la seva relació amb la fase micorrízica i avaluar les possibilitats d'ús d'aquesta metodologia per al seguiment del fong en plantació.

3.4. MATERIAL I MÈTODES

3.4.1. Producció d'inòcul miceliar de *L. deliciosus*

L'inòcul de *L. deliciosus* es produïu en pots de vidre de 2 l amb tapa metàl·lica foradada en què s'ajustà hermèticament una premsaestopa a l'interior de la qual es col·locà un tros de cotó fluix estèril per permetre l'intercanvi gasós (figura 2). Els pots s'emplenaren amb 1100 cm³ de vermiculita grau 3, 100 cm³ de torba Floratorf i 600 ml de medi BAF líquid (amb 15 g glucosa/l), seguint el protocol de Marx i Bryan (1975) lleugerament modificat (Parladé *et al.* 2004b). El substrat s'autoclavà 60 minuts a 120°C i s'afegiren a cada pot 25 ml d'una suspensió miceliar preparada a partir d'entre cinc i set colònies de *L. deliciosus* d'un mes d'edat triturades en 100 ml d'aigua destil·lada estèril mitjançant una batedora 'Waring' provista amb un contenidor d'acer inoxidable autoclavat.

Els pots amb inòcul s'incubaren a 25°C durant dos o tres mesos per permetre el creixement del miceli en tot el substrat. Abans d'inocular les plantes es comprovà la viabilitat de l'inòcul produït col·locant fragments de substrat en plaques de medi BAF i verificant el creixement de miceli de *L. deliciosus* i la no proliferació de fongs o bacteris contaminants (figura 2)

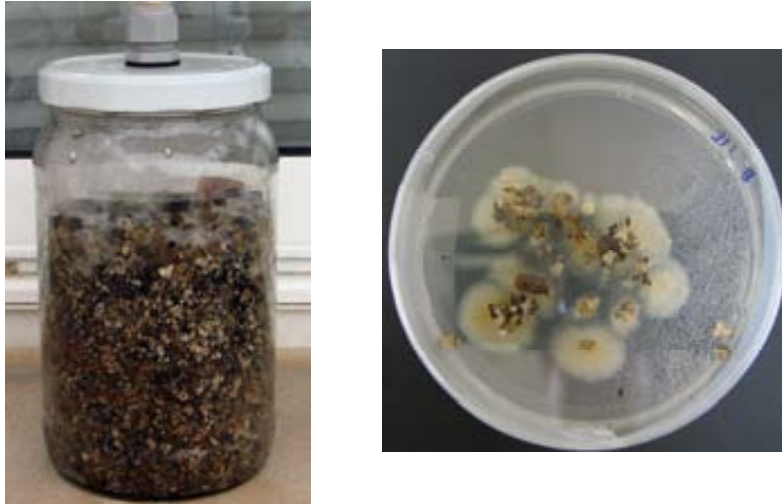


Figura 2. Producció d'inòcul vegetatiu de *L. deliciosus* en pots de vidre (esquerra) i comprovació de la viabilitat de l'inòcul produït en plaques de medi BAF (dreta).

3.4.2. Inoculació de la planta

L'inòcul miceliar es mesclà a una proporció 1:10 (v:v) amb substrat de creixement autoclavat (60 min, 120°C) consistent en volums iguals de torba Floratorf (Floragard, Oldenburg, Alemanya) i vermiculita grau 2 (Asfaltex, Barcelona). El substrat inoculat s'utilitzà per omplir safates Forest Pot (Vivers La Fageda, Sant Pau, Girona) de 50 cel·les amb capacitat de 300 cm³ cadascuna. A cada cel·la se sembraren dues llavors de *P. pinea* (lot 1581 origen ES06 Catalunya litoral, Ministerio de Medio Ambiente D.G. Biodiversidad, any de recol·lecció 1994-95) prèviament submergides 24 hores en aigua i mantingudes a 4°C fins al moment de la sembra (7-15 dies). Després de la germinació es deixà una planta per contenidor.

Les plantes es mantingueren en un ombracle amb sostre de plàstic i recobert de malla blanca (figura 3) on es regaren diàriament i es fertilitzaren cada 15 dies amb solució nutritiva Universol NPK 18+11+18+2,1 MgO (Scotts, Heerlen, Holanda) i micronutrients (Fetrilon 13 i Hortrilon; Compo, Barcelona, Espanya) de manera que cada planta rebia en cada fertilització 3,24 mg N, 1,98 mg P, 3,24 mg K, 0,38 mg Mg, 0,35 mg Fe, 0,06 mg Mn, 0,06 mg Cu, 0,01 mg Zn, 0,01 mg B i 0,01 mg Mo. El procés d'inoculació de les plantes es dugué a terme entre els mesos de març i maig en cada any de producció.



Figura 3. Producció i manteniment en ombracle de planta de *P. pinea* inoculada amb *L. deliciosus* en safates de 50 cel·les

Entre octubre i desembre del mateix any, s'avaluà l'eficiència de la inoculació determinant el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* en 10 plantes preses a l'atzar de cada lot d'inoculació i calculant el percentatge mitjà del lot. Aquest procés es dugué a terme rentant el sistema radical de cada planta, submergint-lo en aigua i comptant sota la lupa binocular el nombre de puntes micorrizades amb *L. deliciosus*. El nombre de puntes micorrizades amb *L. deliciosus* respecte el total de puntes avaluades (un mínim de 200) permeté calcular el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* en cada cas, tal i com es descriu a Parladé et al. (1996)

A més a més, es posà a punt un sistema no destructiu per tal de caracteritzar cada planta individualment sense haver de rentar el sistema radical (fet que dificulta la supervivència de la planta si després la volem trasplantar a camp). El sistema proposat consisteix en fotografiar amb una càmera digital la cara aparentment més colonitzada de l'ortoedre que forma el pa d'arrel de la planta inoculada amb *L. deliciosus* i determinar-ne el que hem anomenat cobertura micorrízica inicial. Aquest paràmetre es determina mitjançant l'anàlisi de la imatge digital obtinguda amb el programari Adobe Photoshop Elements 2.0 (Adobe Systems Inc., San José, California, EEUU). Amb l'eina vareta màgica (*magic wand* en la versió anglesa) es tria un color taronja que correspongui a les micorrizes madures de *L. deliciosus* i se seleccionen les àrees no contigües de la foto que presenten aquest color, corresponents a les micorrizes de *L. deliciosus*. El codi de color i la tolerància de l'eina vareta màgica s'ha d'ajustar en cada experiment en funció de l'aspecte de les micorrizes en el moment de la presa de fotografies (variable en funció del seu grau de maduresa, de la humitat del substrat o de la llum). Les àrees seleccionades es pinten d'un color fàcilment distingible a l'histograma de la foto (en el nostre cas el verd, codi 5FE530), tal i com es mostra a la

figura 4, i la cobertura micorrízica es determina dividint el nombre de píxels d'aquest color pel total de píxels de la foto (dades obtingudes amb la funció histograma del mateix programa informàtic).

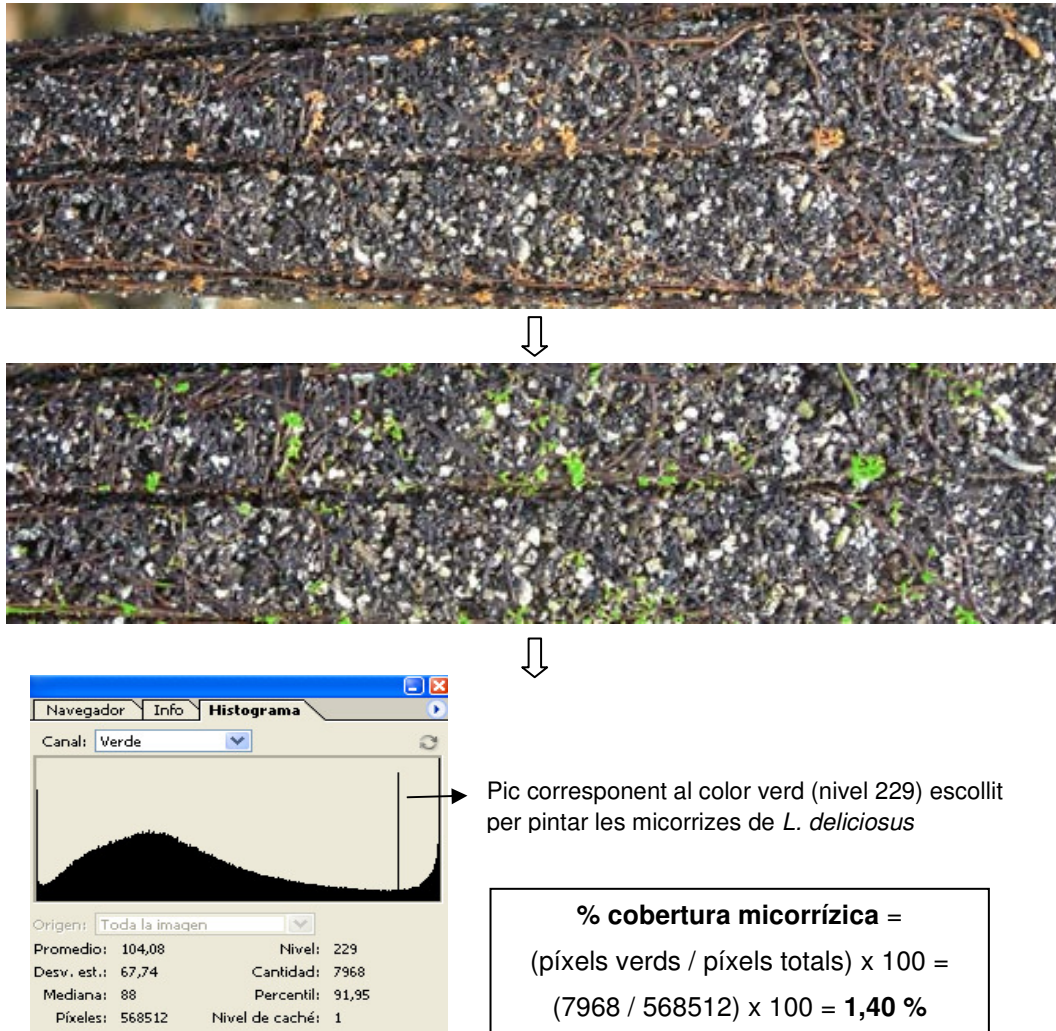


Figura 4. Procés d'anàlisi d'imatges per determinar la cobertura micorrízica inicial de les plantes abans de ser trasplantades a camp. Veure explicació en el text.

Per comprovar la validesa de la metodologia proposada, es relacionaren els valors de cobertura micorrízica de 40 plantes amb el percentatge real de micorrizes de les mateixes 40 plantes determinat per recompte de puntes micorríziques després de rentar el sistema radical. La correlació entre els dos paràmetres fou significativa ($R=0,6998$; $P<0,0001$) de manera que la variable cobertura micorrízica es pot utilitzar com a mesura de la colonització inicial de les plantes trasplantades a camp (figura 5). A més a més, es descrigué l'equació que relaciona les dues variables ($y=14,40x+39,52$) i que ens permet estimar el percentatge real de micorrizes (y) d'una planta trasplantada a camp a partir del valor de cobertura micorrízica (x). S'analitza

només la imatge de la cara aparentment més colonitzada perquè prèviament hem comprovat que els resultats són equivalents a analitzar les quatre cares i calcular la cobertura mitjana.

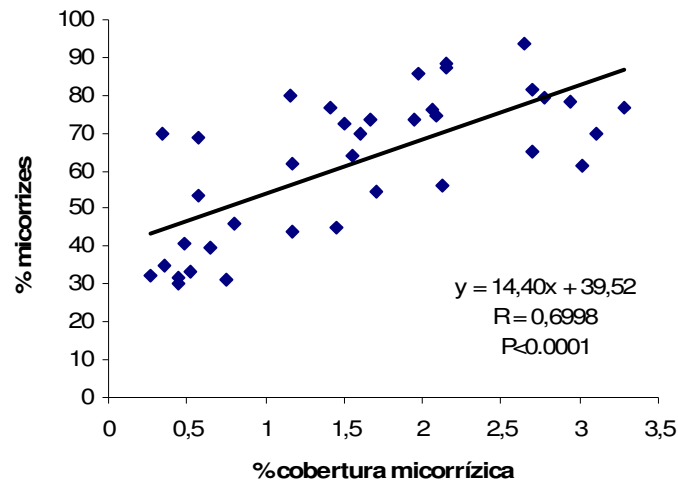


Figura 5. Correlació lineal entre la cobertura micorrízica, determinada per anàlisi d'imatges digital, i el percentatge real de micorrizes, establert per recompte de puntes micorríziques presents a l'arrel

3.4.3. Establiment de parcel·les i disseny experimental

Les plantacions en camp s'establiren en tots els casos amb plantes d'aproximadament un any produïdes a l'ombracle tal i com s'ha descrit a l'apartat anterior. Totes les parcel·les se situaren en terreny pla. L'establiment es dugué a terme en dues localitats diferents, Cabrils (Maresme, Barcelona) i La Bisbal d'Empordà (Baix Empordà, Girona). La localitat de Cabrils es troba a 82 m d'alçada i està situada a 41,518° de latitud i 2,378° de longitud. La temperatura mitjana anual i precipitació total són de 16,4°C i 524,78 mm, respectivament (mitjana dels 5 darrers anys, període des que s'hi va establir la primera plantació, Xarxa Agrometeorològica de Catalunya, Servei Meteorològic de Catalunya). Les característiques del sòl on s'establiren les plantacions són: textura franco-arenosa, pH 8,1; CE 0,15 dS/m; MO 1,09%; N (níttric) 6 ppm; P Olsen 28 ppm; K 51 ppm; Mg 107 ppm; Ca 2107 ppm; Na 43 ppm; CIC 6,2 meq/100 g. La localitat de La Bisbal d'Empordà, per la seva banda, es troba a 28 m d'alçada i està situada a 41,973° de latitud i 3,035° de longitud. La temperatura mitjana anual i la precipitació total per al 2007 (període en què s'establí l'única plantació en aquesta localitat) són de 15°C i 472,6 mm, respectivament. El sòl de La Bisbal es caracteritza per: textura franco-argilosa, pH 7,7; CE 0,1 dS/m; MO 1,45%; N (níttric) 5 ppm; P Olsen 8 ppm; K 72 ppm; Mg 137 ppm; Ca 1083 ppm; Na 37 ppm; CIC 6,9 meq/100 g.

A la taula 1 es mostra el resum de les dades relatives als diferents experiments establerts en camp:

Taula 1. Resum dels experiments establerts en camp

Denominació experiment	Tipus plantació	Data establiment	Localització	Nivells de colonització	Nombre de soques
Can Badia 1	Parcel·la	Desembre 02	Cabrils	1	2
Can Badia 2	Parcel·la	Desembre 04	Cabrils	2	1
Micro 05	Microparcel·la	Maig 05	Cabrils	2	1
Micro 06	Microparcel·la	Abril 06	Cabrils	1	5
Micro 07 Cabrils	Microparcel·la	Abril 07	Cabrils	1	4
Micro 07 Bisbal	Microparcel·la	Març 07	La Bisbal	1	5

Periòdicament s'avaluà la supervivència i creixement de les plantes així com la colonització per part de *L. deliciosus* (micorrizes i miceli extraradical), tal i com es descriu als propers apartats d'aquesta secció de material i mètodes. Es dugueren a terme dos tipus de mostreig, extracció de planta (per al recompte de micorrizes) i recollida de sòl. En relació al mostreig de sòl, es distingí entre sòl recollit amb sonda en quatre punts equidistants al voltant del tronc (utilitzant una sonda metàl·lica cilíndrica) i sòl rizosfèric, directament adherit al sistema radical i que se'n desprèn en sacsejar lleugerament l'arrel un cop arrencada la planta (figura 6)

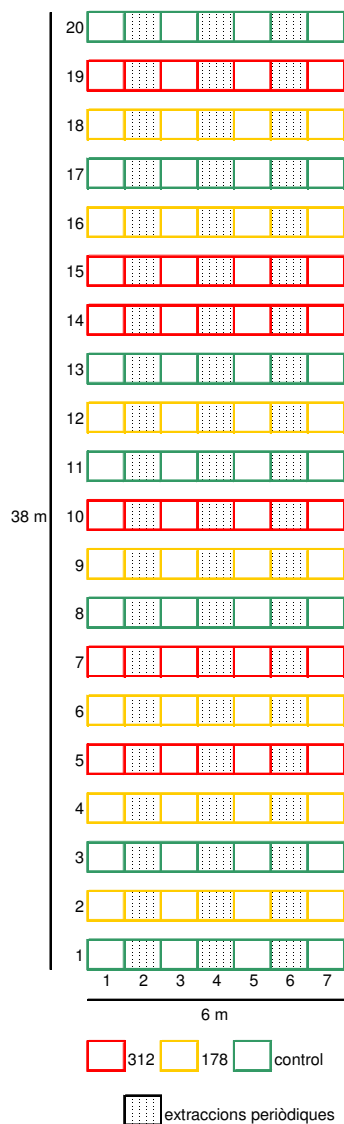


Figura 6. Extracció de planta per al recompte de micorrizes i recollida de sòl rizosfèric (esquerra) i mostreig de sòl al voltant del tronc amb sonda metàl·lica cilíndrica (dreta)

A continuació es detalla el disseny experimental, calendari i tipus de mostrejos per a cadascuna de les plantacions de la taula 1. S'indiquen també, a mode descriptiu, les dades meteorològiques corresponents als diferents períodes (el primer des de l'establiment de la plantació fins al primer mostreig i els següents entre mostrejos) incloent la temperatura mitjana del període ($T_{mitjana}$), la temperatura mínima mitjana ($T_{mín}$), la temperatura màxima mitjana ($T_{màx}$), la precipitació acumulada (P_{acum}) i el nombre de dies de pluja (dades de la Xarxa Agrometeorològica de Catalunya)

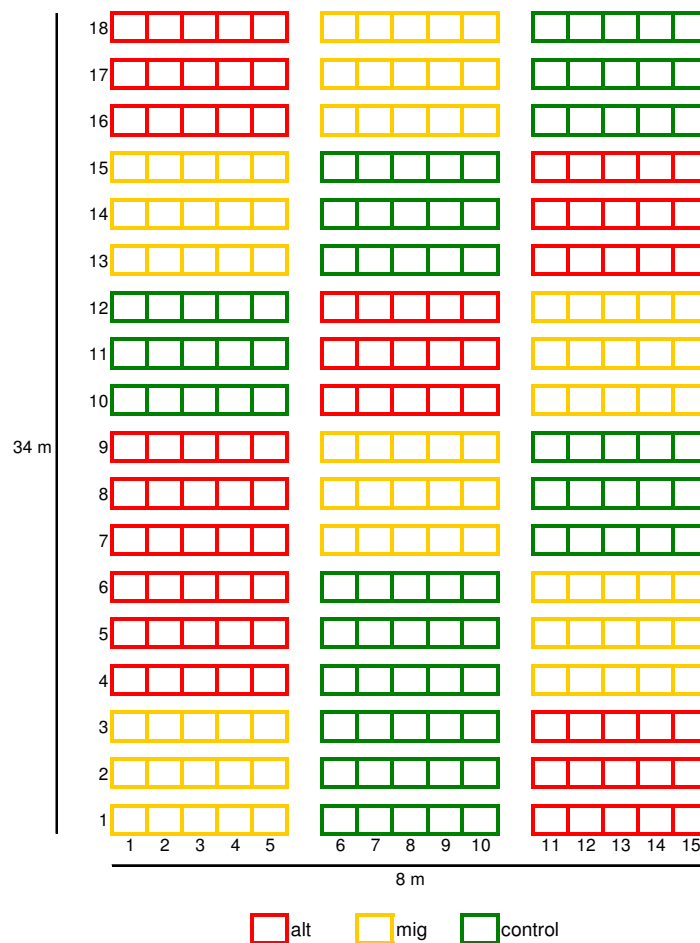
Can Badia 1:

- Lloc i data d'establiment: Can Badia (Cabriels), desembre 2002
- Tractaments d'inoculació: soques 312, 178 (*L. deliciosus*) i control (no inoculat). 49 plantes/tractament (42 per a la soca 312)
- Marc de plantació: 1x2 m (separació entre columnes x separació entre files)
- Distribució de files a l'atzar
- Colonització radical inicial determinada per càlcul del percentatge mitjà de micorrizes del lot
- Mostreig:
 - 2 extraccions de planta per al seguiment de la colonització radical
 - Recollida de sòl rizosfèric i amb sonda a 10 i 20 cm del tronc
 - Dates: març 04 (5 plantes/tractament), gener 05 (9 plantes/tractament -5 controls- i sòl)
- Dades meteorològiques:
 - període 1 (487 dies): Tmitjana=15,1°C; Tmín=11,5°C; Tmàx=18,8°C; Pacum=968,2 mm; dies pluja=136
 - període 2 (301 dies): Tmitjana= 17,0°C; Tmín=13,3°C; Tmàx=20,6°C; Pacum=396,3 mm; dies pluja=76
- Plànol Can Badia 1:



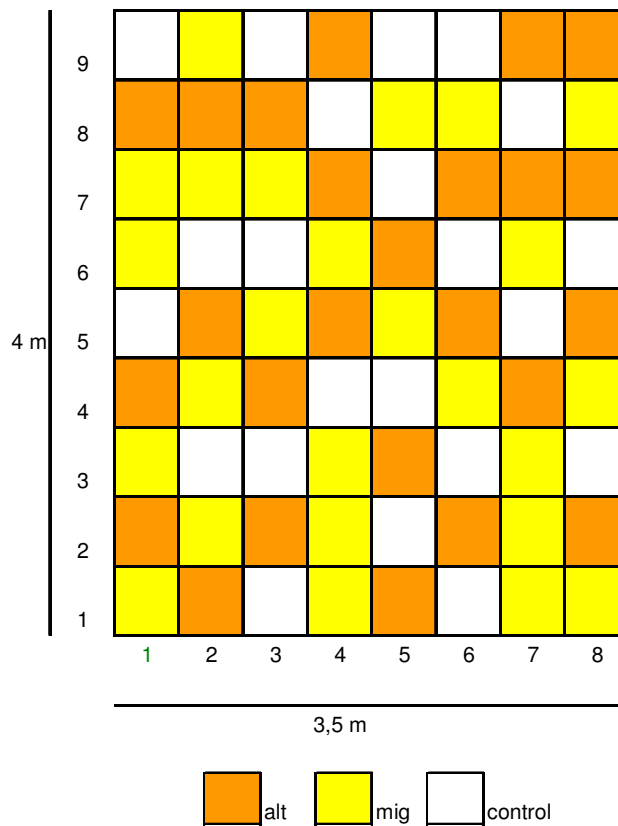
Can Badia 2:

- Lloc i data d'establiment: Can Badia (Cabriels), desembre 2004
- Tractaments d'inoculació (soca 312): nivell alt, mig i control (no inoculat).
- Marc de plantació: separació entre columnes = 50 cm entre plantes del mateix bloc i 1 m entre blocs. Separació entre files = 2 m
- Disseny en blocs distribuïts a l'atzar
- Colonització radical inicial determinada per càlcul del percentatge mitjà de micorrizes del lot
- Mostreig:
 - 2 extraccions de planta per al seguiment de la colonització radical
 - Recollida de sòl rizosfèric i amb sonda a 10 cm del tronc
 - Dates: gener 06 (9 plantes/tractament i sòl), gener 07 (6 plantes/tractament i sòl), novembre 07 (sòl: 6 mostres corresponents a plantes de nivell alt)
- Dades meteorològiques:
 - període 1 (427 dies): Tmitjana=14,8°C; Tmín=11,2°C; Tmàx=18,5°C; Pacum=742,8 mm; dies pluja=109
 - període 2 (365 dies): Tmitjana= 17,1°C; Tmín=13,4°C; Tmàx=20,8°C; Pacum=274,4 mm; dies pluja=64
 - període 3 (303 dies): Tmitjana= 18,1°C; Tmín=14,0°C; Tmàx=22,6°C; Pacum=343,7 mm; dies pluja=71
- Plànol Can Badia 2:



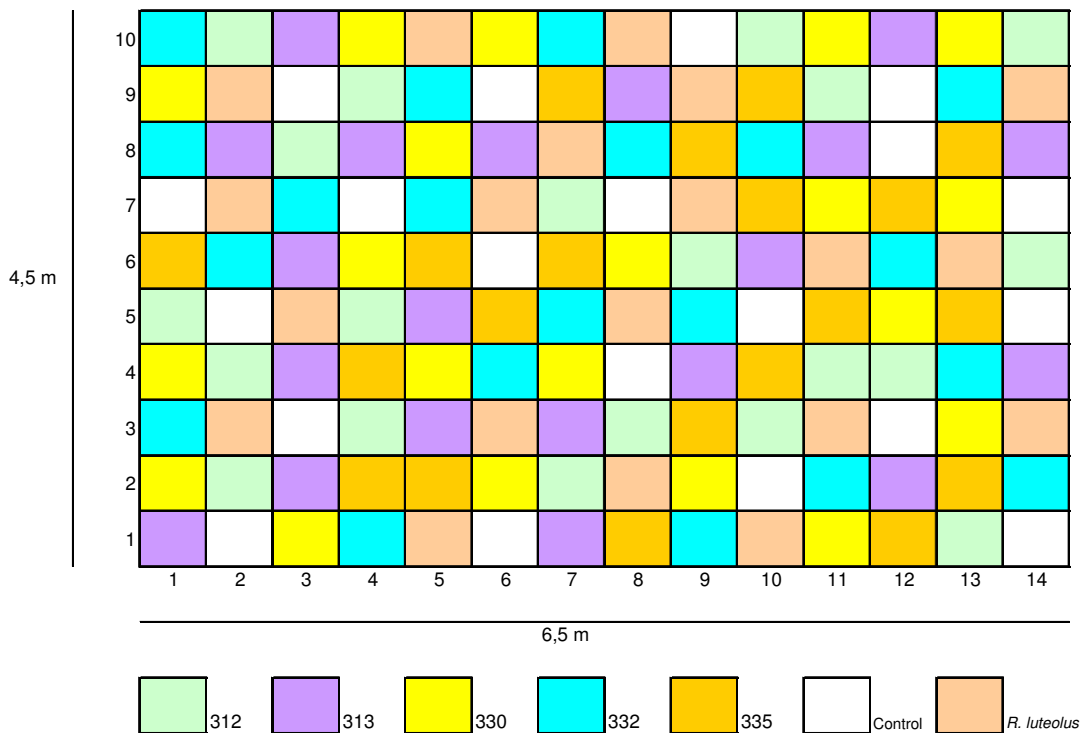
Micro 05:

- Lloc i data d'establiment: Can Badia (Cabrls), maig 2005
- Tractaments d'inoculació (soca 312): nivell alt, mig i control (no inoculat). 25 plantes/tractament (22 controls)
- Marc de plantació: 50x50 cm
- Disseny completament aleatoritzat
- Colonització radical inicial caracteritzada individualment per a cada planta mitjançant anàlisi fotogràfica i determinació de la cobertura micorrízica
- Mostreig:
 - 3 extraccions de planta per al seguiment de la colonització radical
 - Dates: febrer 06 (7 plantes/tractament), desembre 06 (6 plantes/tractament), maig 07 (7 plantes/tractament)
- Dades meteorològiques:
 - període 1 (304 dies): Tmitjana=16,6°C; Tmín=13,1°C; Tmàx=20,2°C; Pacum=604,9 mm; dies pluja=78
 - període 2 (306 dies): Tmitjana= 18,4°C; Tmín=14,8°C; Tmàx=22,1°C; Pacum=254,8 mm; dies pluja=57
 - període 3 (151 dies): Tmitjana= 14,0°C; Tmín=9,9°C; Tmàx=18,8°C; Pacum=129,6 mm; dies pluja=37
- Plànol micro 05:



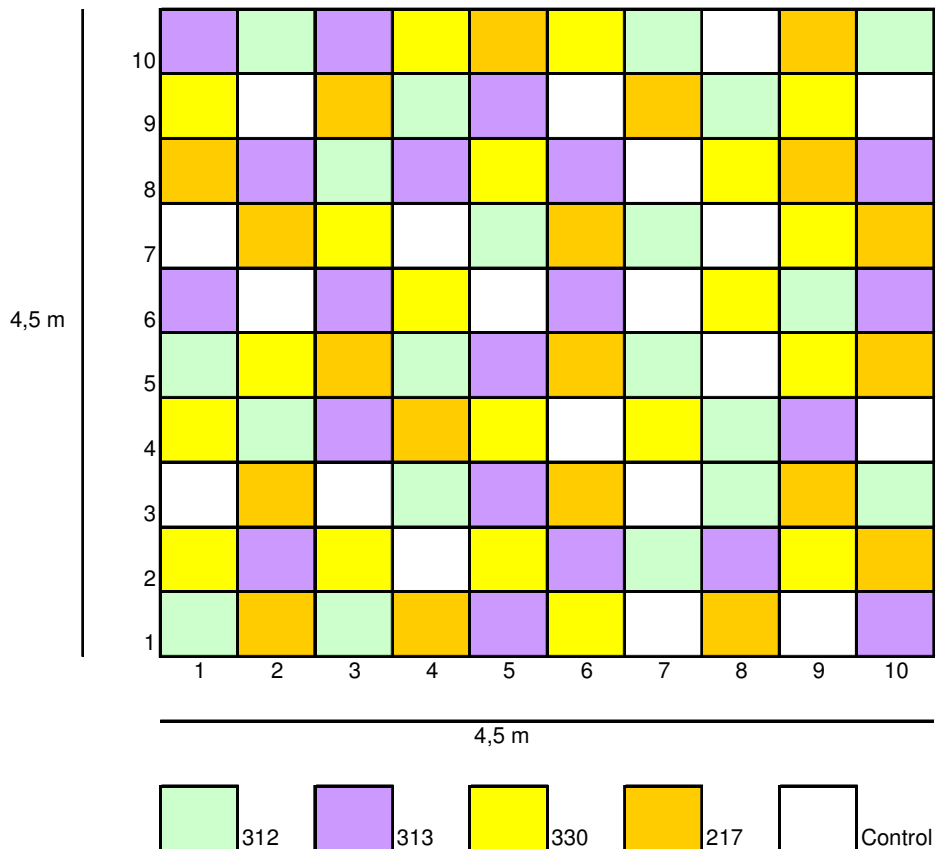
Micro 06:

- Lloc i data d'establiment: Can Badia (Cabriels), abril 2006
- Tractaments d'inoculació: soques 312, 313, 330, 332, 335 (*L. deliciosus*), *R. luteolus* i control (no inoculat). 20 plantes/tractament. El fong *R. luteolus* s'incloué en l'experiment per estudiar la persistència en camp d'una espècie ectomicorrízica diferent i comparar-la amb la del fong d'interès, *L. deliciosus*.
- Marc de plantació: 50x50 cm
- Disseny completament aleatoritzat
- Colonització radical inicial caracteritzada individualment per a cada planta inoculada amb *L. deliciosus* mitjançant anàlisi fotogràfica i determinació de la cobertura micorrízica
- Mostreig:
 - 2 extraccions de planta per al seguiment de la colonització radical
 - Recollida de sòl rizosfèric i amb sonda a 10 cm del tronc
 - Dates: desembre 06 (6 plantes/tractament i sòl), juny 07 (6 plantes/tractament i sòl)
- Dades meteorològiques:
 - període 1 (275 dies): Tmitjana=19,1°C; Tmín=15,5°C; Tmàx=22,7°C; Pacum=241,7 mm; dies pluja=49
 - període 2 (181 dies): Tmitjana= 15,4°C; Tmín=11,2°C; Tmàx=20,0°C; Pacum=130,0 mm; dies pluja=39
 - període 3 (153 dies): Tmitjana= 19,8°C; Tmín=15,9°C; Tmàx=24,2°C; Pacum=218,3 mm; dies pluja=34
- Plànol micro 06:



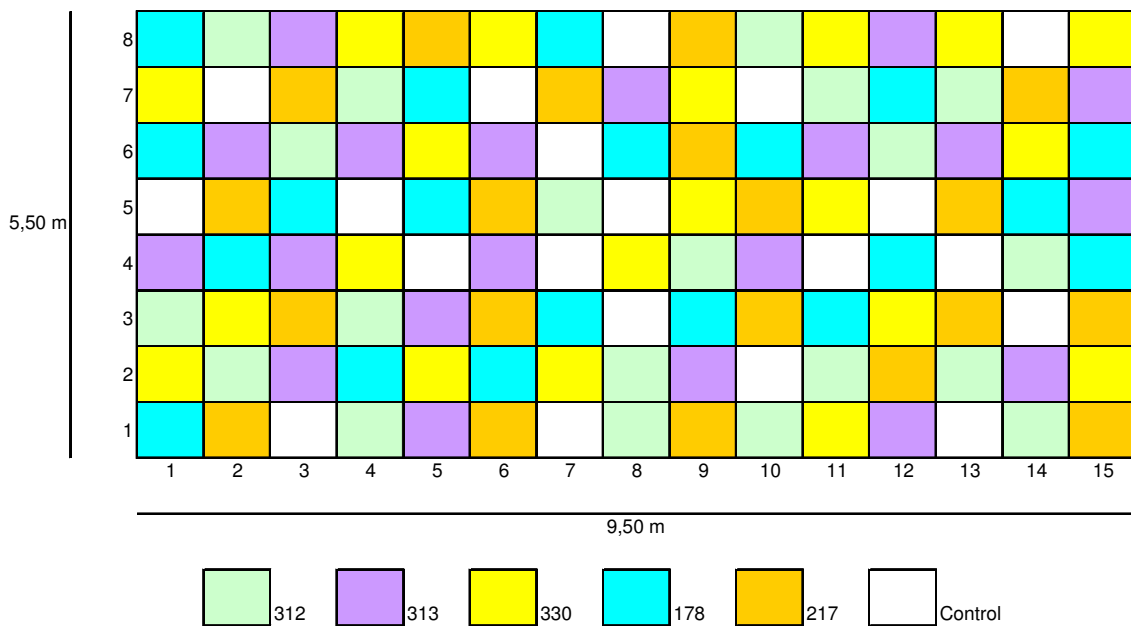
Micro 07 Cabriels:

- Lloc i data d'establiment: Can Badia (Cabriels), abril 2007
- Tractaments d'inoculació: soques 312, 313, 330, 217 (*L. deliciosus*) i control (no inoculat). 20 plantes/tractament.
- Marc de plantació: 50x50 cm
- Disseny completament aleatoritzat
- Colonització radical inicial caracteritzada individualment per a cada planta mitjançant anàlisi fotogràfica i determinació de la cobertura micorrízica
- Mostreig:
 - 1 extracció de planta per al seguiment de la colonització radical
 - Data: octubre 07 (6 plantes/tractament)
- Dades meteorològiques:
 - període 1 (214 dies): Tmitjana=20,4°C; Tmín=16,4°C; Tmàx=24,7°C; Pacum=299,6 mm; dies pluja=55
- Plànol micro 07 Cabriels:



Micro 07 La Bisbal:

- Lloc i data d'establiment: Fitor (La Bisbal d'Empordà), març 2007
- Tractaments d'inoculació: soques 312, 313, 330, 178, 217 (*L. deliciosus*) i control (no inoculat). 20 plantes/tractament.
- Marc de plantació: 50x50 cm
- Disseny completament aleatoritzat
- Colonització radical inicial caracteritzada individualment per a cada planta mitjançant anàlisi fotogràfica i determinació de la cobertura micorrízica
- Mostreig:
 - 1 extracció de planta per al seguiment de la colonització radical
 - recollida de sòl amb sonda a 10 cm del tronc
 - Data: octubre 07 (6 plantes/tractament, sòl)
- Dades meteorològiques:
 - període 1 (214 dies): Tmitjana=19,3°C; Tmín=8,9°C; Tmàx=16,8°C; Pacum=269,6 mm; dies pluja=44
- Plànol micro 07 La Bisbal:



3.4.4. Seguiment de la colonització de *L. deliciosus*

3.4.4.1. Colonització radical

Es determinà el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* de plantes preses a l'atzar segons el disseny descrit per a cada experiment a la secció anterior. El mostreig de l'arrel es dugué a terme arrencant la planta sencera, netejant-ne el sistema radical i avaluant-ne la colonització micorrízica. El percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* es determinà segons s'ha descrit prèviament (secció 3.4.2 del material i mètodes, pàgina 71). La identitat de les micorrizes es comprovà mitjançant PCR específica amb la parella d'encebadors ITS1-LDITS2R (veure capítol 2). Es quantificà també la presència al sistema radical d'altres fongs ectomicorrízics que s'identificaren morfològicament i amb tècniques moleculars. La identificació molecular es dugué a terme mitjançant extracció de DNA, PCR de la regió ITS del rDNA amb encebadors universals, seqüenciació i cerca de seqüències similars a la base de dades del GenBank.

3.4.4.2. Colonització extraradical

La quantitat de miceli extraradical de *L. deliciosus* present en el sòl es determinà mitjançant la tècnica PCR en temps real a partir de les mostres de sòl preses en els diferents experiments segons s'ha descrit a la secció anterior. S'utilitzà el programa informàtic Primer Express™ 2.0 (Applied Biosystems) per dissenyar dos encebadors i una sonda TaqMan® MGB específics de *L. deliciosus* (taula 2) que amplifiquen un fragment de 101 pb de la regió ITS1 de *L. deliciosus*. El disseny dels oligonucleòtids es realitzà a partir de l'alineament de les seqüències de la regió ITS obtingudes per a diferents espècies del gènere *Lactarius* (capítol 2) procurant que el fragment amplificat fos específic de *L. deliciosus* i que tingués una longitud d'entre 50 i 150 pb (longitud òptima per a aquesta tècnica). Es realitzà una cerca de seqüències similars a les dels oligonucleòtids dissenyats a la base de dades del GenBank per comprovar la seva especificitat per *L. deliciosus*.

Taula 2. Seqüències nucleotídiques dels encebadors i sonda dissenyats per a la seva utilització en PCR en temps real

Nom	Seqüència d'oligonucleòtids
FWDLdel (encebador)	5'-TTGACGCAAAAGTCGTGCAC-3'
RVSLdel (encebador)	5'-ATCGGTTTCGATCCCCAAAAGG-3'
STQLdel (sonda TaqMan® MGB)	VIC-TCTCGCATAAAATCCA-MGB

Es realitzaren assajos de PCR en temps real utilitzant la metodologia de SYBR[®] Green i la de sondes TaqMan[®] MGB utilitzant extraccions de sòl amb una quantitat coneguda de miceli afegit. L'ús de SYBR[®] Green es desestimà ja que l'eficiència de la reacció se situà bastant distant a l'òptima (pendent de la recta patró de -2,73, respecte l'òptim de -3,32) probablement a causa de la formació de productes de PCR inespecífics (detectats en les corbes de dissociació) provocant que la quantitat de miceli estimada amb aquest sistema fos inferior a la real. En el cas de l'ús de sonda TaqMan[®] MGB, les reaccions es dugueren a terme en plaques òptiques de 96 pous cobertes amb film adhesiu òptic (Applied Biosystems) utilitzant el kit TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). En la posada a punt de la tècnica s'ajustaren les concentracions d'encebadors (entre 50 i 900 nM) i sonda (50-250 nM) i es fixaren les concentracions de treball a 800 nM d'encebadors i 100 nM de sonda, resultant en la mescla de reacció següent (per a un volum total de 25 µl):

- 12,5 µl Master Mix, que conté AmpliTaq Gold[®], AmpErase[®] UNG, dNTPs, ROX i tampó de reacció
- 2 µl de cada un dels dos encebadors 10 µM (concentració final = 800 nM)
- 0,5 µl de sonda 5 µM (concentració final = 100 nM)
- 3 µl d'aigua HPLC
- 5 µl dilució 1/5 de l'extracte de DNA (10-20 ng DNA/µl extracte)

Les reaccions es dugueren a terme en un termociclador ABI PRISM[®] 7700 o 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). S'utilitzaren les condicions de PCR universals, recomanades pel fabricant:

- 2 minuts a 50°C
- 10 minuts a 95°C
- 40 cicles de repetició de dues fases: 15 segons a 95°C i 1 minut a 60°C

En la posada a punt, s'avaluà el grau de replicabilitat de la tècnica comparant les corbes d'amplificació obtingudes per a cinc extraccions independents de mostres de sòl amb la mateixa quantitat de miceli afegit. Els resultats indicaren que els processos d'extracció de DNA i PCR eren reproduïbles. Es compararen també les corbes d'amplificació d'extraccions de sòl amb la mateixa quantitat de miceli afegit però obtingut de colònies de diferent edat, sis mesos en placa (a 4°C) o 17 dies (en creixement actiu). En aquest cas, s'observà que les corbes corresponents al miceli vell

estaven desplaçades aproximadament dos cicles a la dreta de les de miceli jove indicant que es recupera menys DNA de les colònies velles. Les estimacions de quantitat de miceli extraradical en camp s'han fet per tant a partir de rectes patró establertes amb miceli jove (en creixement actiu) per evitar sobreestimar la quantitat de miceli present en el sòl i perquè és d'esperar que en condicions naturals el miceli vell es degradi ràpidament.

Les mostres de sòl recollides en camp s'homogeneïtzaren, s'assecaren a l'estufa a 30°C per eliminar l'excés d'aigua i es tamisaren amb un sedàs de 2 mm de diàmetre de porus per evitar la presència d'arrels. En el cas de les mostres recollides amb sonda, el sòl dels quatre punts es mesclà i es treballà amb una sola mostra per planta. L'extracció de DNA es dugué a terme amb el PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc.) a partir de 0,25 g de mostra seguint les instruccions del fabricant. La PCR en temps real es dugué a terme per triplicat a partir de l'extracte de DNA obtingut de cada mostra. Per a la quantificació absoluta del miceli extraradical present en les mostres recollides en camp es construïren rectes patró a partir de quantitats conegudes de miceli. Per tal que les condicions d'extracció i amplificació fossin les mateixes per als estàndards i les mostres problema, s'afegiren 6 mg de miceli de *L. deliciosus* (pes fresc, establert amb balança de precisió de 0,0001 g), obtingut a partir de colònies crescudes en medi BAF sobre un disc de cel·lofana, a 0,244 g de sòl corresponent a l'àrea en què es recolliren les mostres i lliure d'inòcul de *L. deliciosus*. L'extracció de DNA es realitzà amb el PowerSoil™ DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc.) i la PCR en temps real es dugué a terme a partir de dilucions 1/10 seriades de l'extracte original, amb 3 rèpliques per a cada concentració. La recta patró es generà enfrontant els valors Ct obtinguts per a cada dilució (número de cicle en què la fluorescència emesa supera un llindar prèviament establert a la part exponencial de la corba d'amplificació) amb el logaritme de la quantitat de miceli corresponent a cadascuna d'elles. La quantitat de miceli extraradical present a les mostres problema es determinà per interpolació del valor Ct obtingut per a la mostra en la recta patró corresponent.

3.4.5. Creixement

Les plantes (inoculades amb *L. deliciosus* o controls) es mesuraren en alçada i diàmetre al inici i al final de l'experiment i es calculà el volum inicial i final per a cada planta segons la fórmula $V=1/3$ àrea basal x alçada. En aquest treball, s'utilitza el

volum com a mesura del creixement considerant-lo com un paràmetre integrador i que pot estar més correlacionat amb la biomassa que l'alçada o el diàmetre per si sols.

3.4.6. Anàlisis estadístiques

Les dades de colonització i de creixement s'analitzaren mitjançant ANOVA multifactorial amb tractament i temps en camp com a factors. En el cas de la colonització, s'incloué la cobertura micorrízica com a covariable en els casos en què es disposava d'aquestes dades. Per a les anàlisis de creixement s'incloueren les mesures inicials al trasplantament com a covariable. Les diferències entre grups s'analitzaren amb el test de Tukey. Les relacions linears entre variables s'analitzaren mitjançant el coeficient de correlació de Pearson. Les variables es transformaren quan fou necessari. En tots els casos, els resultats es consideraren significatius amb un valor de $P < 0,05$. Les anàlisis es dugueren a terme amb el programa SAS[®] Enterprise Guide v 2.0.0.417 (SAS Institute Inc.)

3.5. RESULTATS

En tots els experiments s'observà la presència de diferents fongs ectomicorrízics nadius en algunes de les plantes mostrejades. La presència de micorrizes de *Rhizopogon roseolus* (Corda) Th. Fr. fou especialment destacable, tant per la freqüència d'aparició com per la seva abundància en les plantes que colonitzà, compartint arrel amb *L. deliciosus* o desplaçant-lo totalment. El paper destacat d'aquest fong com a contaminant de l'arrel feu que, en els mostrejos de les microparcel·les 06 i 07, a més a més de quantificar la persistència de *L. deliciosus* es determinés també el percentatge de micorrizes de *R. roseolus*. Els resultats s'inclouen en l'apartat corresponent a aquestes plantacions. En menor freqüència s'observaren també micorrizes de *Thelephora terrestris*, *Sphaerospora brunnea* o *Hebeloma* sp. La identitat de les micorrizes contaminants es determinà morfològicament, confirmant la determinació amb tècniques moleculars per seqüenciació de la regió ITS del rDNA.

3.5.1. Influència del nivell inicial de colonització de *L. deliciosus* en la seva persistència en camp

3.5.1.1. Can Badia 2 (2 nivells de colonització inicial)

3.5.1.1.1. Colonització radical i extraradical

En el moment del trasplantament, les diferències entre el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* en les plantes de nivell de colonització mig (determinat per recompte d'arrels micorríziques en 10 plantes del lot) i el percentatge en les plantes de nivell alt foren significatives ($P < 0,0001$), amb una mitjana de 36,22 % en les plantes incloses en la categoria nivell mig i del 68,99 % en les plantes de nivell alt.

Ni el nivell inicial de colonització (mig o alt) ni el temps que les plantes estigueren en plantació (13 o 25 mesos) afectaren significativament el percentatge final de micorrizes de les plantes establertes en camp, segons es desprèn dels resultats de l'ANOVA corresponent. El percentatge mitjà de micorrizes de *L. deliciosus*, independentment del nivell inicial o el temps en camp, fou de $21,79 \pm 3,91$ % (mitjana \pm error estàndard). El factor nivell de colonització fou però quasi significatiu ($P = 0,0810$), suggerint un major percentatge de micorrizes en les plantes inicialment de nivell alt que en les de nivell mig.

Únicament es detectà miceli de *L. deliciosus* en les mostres corresponents a sòl rizosfèric però no en les recollides amb sonda al voltant del tronc. A la figura 7 es mostra la recta patró definida per a la quantificació del miceli per PCR en temps real en el mostreig als 25 mesos (la corresponent als 13 mesos fou molt similar i no es mostra). Cap dels factors analitzats afectà significativament la quantitat de miceli extraradical de *L. deliciosus* present en rizosfera, tot i que la interacció entre ells fou quasi significativa ($P = 0,0567$), suggerint una tendència a la disminució de la quantitat de miceli amb el temps en les plantes de nivell mig i una tendència a l'augment en les de nivell alt. La quantitat mitjana de miceli extraradical detectat fou de $69,82 \pm 16,92$ μg miceli/g sòl. Als 35 mesos de l'establiment de la plantació es dugué a terme un mostreig de sòl en diagonal dirigint la sonda cap al tronc de la planta per tal de recollir sòl proper a l'arrel en 6 plantes de la categoria nivell alt. No es detectà miceli extraradical en cap de les mostres. Es detectà una correlació positiva entre el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* i la quantitat de miceli extraradical als dos temps de mostreig, als 13 mesos ($R = 0,9196$; $P < 0,0001$) i als 25 ($R = 0,8666$; $P = 0,0003$).

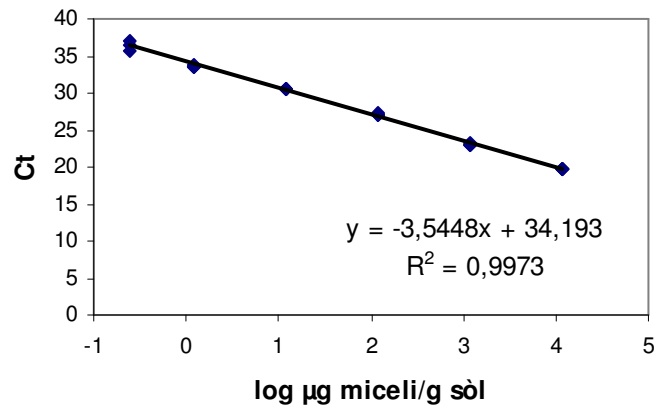


Figura 7. Recta patró establerta per a la quantificació per PCR en temps real de les mostres de sòl recollides a Can Badia 2. Veure material i mètodes per a l'explicació de la definició de la recta.

3.5.1.1.2. Creixement

A la figura 8 es mostren dues imatges de la plantació a diferents temps.



Figura 8. Aspecte de la plantació Can Badia 2 a octubre de 2005 (imatge superior) i a octubre de 2006 (imatge inferior), 10 i 22 mesos després del seu establiment, respectivament.

No es detectaren diferències en el volum inicial de les plantes trasplantades a camp, amb una mitjana de $0,64 \pm 0,03 \text{ cm}^3$ (diàmetre de 0,33 cm i alçada de 21,95 cm).

L'ANCOVA per al volum final mostrà un efecte significatiu del temps en camp mentre que ni el nivell inicial de colonització (mig, alt o control) ni el volum inicial tingueren efecte, tal i com es mostra a la taula 3. Es detectà també l'existència d'interacció entre la covariable volum inicial i el factor temps. Els resultats per a les anàlisis d'alçada i diàmetre finals foren els mateixos que els obtinguts per al volum.

Taula 3. Resultats per a l'ANCOVA de dos factors del volum final de les plantes de *P. pinea* amb un nivell inicial de colonització de *L. deliciosus* mig, alt o sense inocular (control) als 13 i 25 mesos del seu establiment en camp. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatius, $P < 0,05$), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per als diferents nivells de cada factor. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre nivells segons el test de Tukey ($P < 0,05$). Les dades se sotmeteren a transformació logarítmica prèviament a la seva anàlisi. N=44

Factor (font)	Valor P	Nivells	V final (cm^3)
Nivell de colonització	0,5171	alt	37,64 A
		mig	33,20 A
		control	36,39 A
Temps en camp	<0,0001	13 mesos	9,12 B
		25 mesos	74,05 A
Volum inicial (covariable)	0,6319		
Volum inicial*temps	0,0054		
Altres interaccions	n.s.		
	DF		
Model	11		
Error	32		
Total corregit	43		

La correlació entre el volum final i el volum inicial de les plantes fou positiva després de 13 mesos en camp ($R = 0,4411$, $P = 0,0241$) però negativa als 25 mesos ($R = -0,5281$; $P = 0,0243$), fet que explica la interacció entre el volum inicial i el temps en camp detectada en l'ANCOVA anterior. No es detectà correlació entre el volum final de les plantes i el seu percentatge de micorrizes o la quantitat de miceli extraradical de *L. deliciosus* en cap dels dos mostrejos.

3.5.1.2. Micro 05 (2 nivells de colonització inicial)

3.5.1.2.1. Colonització radical i extraradical

En el moment del trasplantament, la cobertura micorrízica inicial fou similar en totes les plantes, independentment de si havien estat classificades visualment com a plantes amb un nivell de colonització mig o alt, tal i com es desprèn de l'ANOVA corresponent. Els valors se situaren en un rang des de 0,24 % fins a 0,93 %, corresponent a percentatges estimats de micorrizes d'entre el 42,98 % i el 52,91 %. La cobertura mitjana fou de $0,53 \pm 0,03$ %, equivalent a un percentatge de micorrizes inferit de 47,15 %, segons la recta de regressió definida a la secció 3.4.2 de l'apartat de material i mètodes (pàgina 74).

L'ANOVA per al percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* mostrà un efecte significatiu del factor temps en camp, mentre que el nivell inicial de colonització no tingué efecte en la persistència de les micorrizes (taula 4). Els resultats del test de Tukey mostren que el percentatge de micorrizes fou més alt als nou mesos de l'establiment de la plantació que en els mostrejos posteriors (taula 4). La cobertura no s'incloué en l'anàlisi ja que aquest paràmetre és equivalent al factor nivell de colonització inicial. Els valors de cobertura s'utilitzaren a posteriori per tornar a classificar les plantes en noves categories de nivell mig (amb cobertura $\leq 0,53$ %) i nivell alt. L'ANOVA de la cobertura inicial en funció dels dos nous grups mostrà diferències significatives entre aquests ($P < 0,0001$), amb una cobertura superior en les plantes de la nova categoria nivell alt (0,67 %, equivalent a un percentatge de micorrizes inferit del 49 % segons la recta de regressió) que en les de nivell mig (0,39 %, equivalent a un percentatge inferit de 45 %). Els resultats però per a l'ANOVA del percentatge final de micorrizes en funció d'aquestes noves categories de nivell inicial de colonització foren equivalents als obtinguts amb els grups originals i no mostraren diferències entre nivells. No es detectà correlació entre la cobertura micorrízica inicial i el percentatge final de micorrizes en cap dels mostrejos.

Els baixos percentatges de micorrizes obtinguts ja des del primer mostreig feren que no es quantifiqués el miceli present en el sòl, suposant que la quantitat seria pràcticament nul·la en totes les mostres.

Taula 4. Resultats per a l'ANOVA de dos factors del percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* en les plantes de *P. pinea* amb un nivell inicial de colonització mig o alt als 9, 19 i 24 mesos del seu establiment en camp. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatiu, $P < 0,05$), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per als diferents nivells de cada factor. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre nivells segons el test de Tukey ($P < 0,05$). Les dades se sotmeteren a transformació angular prèviament a la seva anàlisi. $N=45$

Factor (font)	Valor P	Nivells	% micorrizes
Nivell colonització	0,9247	alt	8,65 A
		mig	8,90 A
Temps en camp	<0,0001	9 mesos	19,20 A
		19 mesos	3,51 B
		24 mesos	2,56 B
Interacció	0,7165		
DF			
Model	5		
Error	39		
Total corregit	44		

3.5.1.2.2. Creixement

Al moment del trasplantament totes les plantes presentaven un volum inicial similar, amb una mitjana de $1,93 \pm 0,06 \text{ cm}^3$ (corresponent a un diàmetre inicial de 0,50 cm i una alçada de 29,25 cm). Per a l'anàlisi del volum final s'utilitzaren les noves categories definides per al nivell de colonització en funció dels valors de cobertura ja que aquestes categories reflectiren diferències inicials entre nivells de colonització mentre que les categories originals no. L'ANOVA per al volum final mostrà diferències significatives en funció del temps en camp i del volum inicial de cada planta, mentre que no s'observà efecte del nivell de colonització inicial (taula 5). L'anàlisi per separat dels paràmetres alçada i diàmetre mostrà els mateixos resultats per a les dues variables.

Es detectà correlació positiva entre el volum inicial de les plantes i el seu volum final als nou mesos ($R = 0,6476$; $P = 0,0011$) i als 19 ($R = 0,5571$; $P = 0,0087$), mentre que en l'últim mostreig la correlació no fou significativa. D'altra banda, el volum final de les plantes (excloent els controls) es correlacionà negativament amb el seu percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* després de 9 mesos en camp ($R = -0,5805$; $P = 0,0184$), mentre que en la resta de mostrejors no es detectà correlació entre aquests dos paràmetres. No es detectà correlació entre volum final i cobertura micorrízica inicial.

Taula 5. Resultats per a l'ANCOVA de dos factors del volum final de les plantes de *P. pinea* amb un nivell inicial de colonització de *L. deliciosus* mig, alt o sense inocular (control) als 9, 19 i 24 mesos del seu establiment en camp. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatius, $P < 0,05$), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per als diferents nivells de cada factor. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre nivells segons el test de Tukey ($P < 0,05$). Les dades se sotmeteren a transformació logarítmica prèviament a la seva anàlisi. N=64

Factor (font)	Valor P	Nivells	V final (cm ³)
Nivell colonització	0,4940	alt	23,58 A
		mig	31,18 A
		control	20,72 A
Temps en camp	<0,0001	9 mesos	3,54 C
		19 mesos	17,95 B
		24 mesos	57,02 A
Volum inicial (covariable)	<0,0001		
Interaccions	n.s.		
DF			
Model	17		
Error	46		
Total corregit	63		

3.5.2. Influència del factor soca inoculada en la persistència en camp de *L. deliciosus*

3.5.2.1. Can Badia 1 (2 soques de *L. deliciosus*)

3.5.2.1.1. Colonització radical i extraradical

Abans del trasplantament a camp, el percentatge mitjà de micorrizes de *L. deliciosus* era del $36,91 \pm 5,26$ % en les plantes inoculades amb la soca 178 i del $48,80 \pm 1,37$ % en les inoculades amb la soca 312. No es detectaren micorrizes de *L. deliciosus* en les plantes inoculades amb la soca 178 en cap dels mostrejos realitzats mentre que el fong sí que es mantingué en les plantes inoculades amb la soca 312. El factor fong inoculat s'excloué per tant de l'anàlisi estadística i s'avaluà l'efecte del temps de mostreig en la colonització radical de les plantes inoculades amb la soca 312. L'ANOVA per al percentatge de micorrizes de la soca 312 de *L. deliciosus* en funció del temps en camp fou no significatiu. El percentatge mitjà de micorrizes per aquesta

soca fou de $18,14 \pm 7,23$ %, independentment del temps passat en camp (15 o 25 mesos).

La quantificació del miceli en el sòl es dugué a terme únicament 25 mesos després de l'establiment de la plantació. A la figura 9 es mostra la recta patró definida per a la quantificació de les mostres amb la tècnica PCR en temps real. Es detectà miceli extraradical de *L. deliciosus* en les mostres corresponents al sòl rizosfèric (directament adherit a l'arrel) de plantes inoculades amb la soca 312 (mitjana= $169,89 \pm 137,18$ µg miceli/ g sòl) mentre que no se'n detectà en les inoculades amb la soca 178. Tampoc hi hagué detecció de miceli en les mostres recollides amb sonda a una determinada distància del tronc (10 o 20 cm) per a cap de les dues soques. Les variables percentatge de micorrizes i quantitat de miceli extraradical per a la soca 312 es correlacionaren positivament ($R= 0,8841$; $P= 0,0016$).

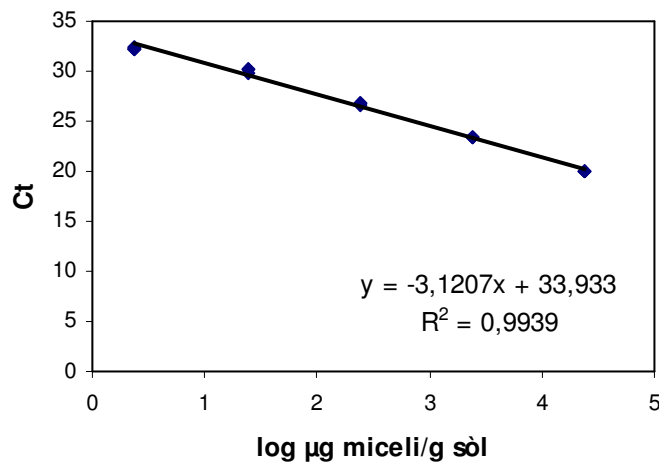


Figura 9. Recta patró establerta per a la quantificació per PCR en temps real de les mostres de sòl recollides a Can Badia. Veure material i mètodes per a detalls de la definició de la recta.

3.5.2.1.2. Creixement

Abans del trasplantament a camp totes les plantes presentaven un volum inicial similar, segons mostrà l'ANOVA corresponent. El volum inicial mitjà de les plantes fou de $1,52 \pm 0,06$ cm³ (corresponent a un diàmetre mitjà de 0,42 cm i una alçada de 32,08 cm)

El volum final fou significativament més gran en les plantes que portaven més temps en camp i no es veié afectat ni pel tractament d'inoculació (tot i que aquest factor fou quasi significatiu, suggerint un major creixement de les plantes inoculades amb la soca 312) ni pel volum inicial de la planta (covariable), tal i com s'observa a la taula 6. L'anàlisi per separat d'alçada i diàmetre mostrà els mateixos resultats.

Taula 6. Resultats per a l'ANCOVA de dos factors del volum final de les plantes de *P. pinea* inoculades amb les soques 178, 312 de *L. deliciosus* o no inoculades (controls) als 15 i 25 mesos del seu establiment en camp. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatius, $P < 0,05$), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per als diferents nivells de cada factor. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre nivells segons el test de Tukey ($P < 0,05$). Les dades se sotmeteren a transformació logarítmica prèviament a la seva anàlisi. $N=37$

Factor (font)	Valor P	Nivells	V final (cm ³)
Fong inoculat	0,0673	178	26,83 A
		312	40,57 A
		control	28,21 A
Temps en camp	<0,0001	15 mesos	5,04 B
		25 mesos	51,06 A
Volum inicial (covariable)	0,1249		
Interaccions	n.s.		
DF			
Model	11		
Error	25		
Total corregit	36		

El volum final i l'inicial no es correlacionaren significativament en cap dels dos mostrejos. Es detectà una correlació positiva entre el volum final i el percentatge de micorrizes ($R= 0,7817$; $P= 0,0128$) o la quantitat de miceli extraradical ($R= 0,7653$; $P= 0,0162$) després de 25 mesos en camp en les plantes inoculades amb la soca 312.

A la figura 10 es mostra l'aspecte de la plantació després de quasi tres anys en camp.



Figura 10. Aspecte de la plantació Can Badia 1 a octubre de 2005 (2 anys i 10 mesos del seu establiment)

3.5.2.2. *Micro 06 (5 soques de L. deliciosus)*

3.5.2.2.1. *Colonització radical i extraradical*

El percentatge de cobertura micorrízica abans de l'establiment de les plantes en camp fou diferent entre soques inoculades tal i com es desprèn de l'ANOVA i el test de Tukey corresponents (taula 7). Es mostren també els valors de percentatge de micorrizes inferit per a cada mitjana de cobertura segons la recta de regressió definida a la secció 3.4.2 de l'apartat de material i mètodes (pàgina 74)

Taula 7. Resultats per a l'ANOVA de la cobertura micorrízica de *L. deliciosus* en les plantes de *P. pinea* inoculades amb les soques 312, 313, 330, 332 i 335 abans del seu trasplantament a camp. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatius, $P < 0,05$), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per als diferents nivells de cada factor així com el percentatge de micorrizes estimat. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre nivells segons el test de Tukey ($P < 0,05$). Les dades se sotmeteren a transformació logarítmica prèviament a la seva anàlisi. N=60

Factor (font)	Valor P	Nivells	% Cobertura	% micorrizes estimat
Fong inoculat	<0,0001	312	1,69 A	63,86
		313	0,98 B	53,63
		330	1,05 B	54,64
		332	0,64 BC	48,74
		335	0,32 C	44,13
DF				
Model	4			
Error	55			
Total corregit	59			

Els resultats per a la colonització radical mostraren la pèrdua del fong en el mostreig realitzat als 14 mesos per a totes les soques inoculades. El factor temps de mostreig s'exclougué per tant de l'anàlisi i aquesta es dugué a terme únicament amb les dades del mostreig als vuit mesos. La persistència de les micorrizes de *L. deliciosus* després de vuit mesos en camp fou significativament diferent entre soques (312, 313, 330, 332, 335) tal i com es mostra a la taula 8. La interacció entre cobertura i fong inoculat fou quasi significativa reflectint que la soca amb una major colonització inicial (312) no fou la que més persistí en camp mentre que les plantes inoculades amb la 332, inicialment poc colonitzades, mantingueren la micorrizació en camp.

Concretament, la correlació entre la colonització inicial i final fou negativa per a la soca 312 (R= -0,8372; P=0,0376) i positiva per a la 332 (R= 0,9022; P=0,0139). D'altra banda, el percentatge final de micorrizes de *R. luteolus* fou clarament superior al de qualsevol de les soques de *L. deliciosus* però també es detectà una disminució significativa amb el temps en camp (P= 0,0203), amb un percentatge de micorrizes mitjà de 63,18 % als vuit mesos en camp i de 25,17 % als 14 mesos.

La pèrdua o disminució dels fongs inoculats amb el temps en camp coincidí amb l'augment del percentatge d'arrels micorrizades amb *R. roseolus*, present en el sòl de manera natural. El nombre de plantes colonitzades per aquest fong fou similar en els dos mostrejors (aproximadament un terç del total) però el percentatge de micorrizes en les plantes que colonitzà fou significativament més alt (P<0,0001) després de 14 mesos en camp (percentatge mitjà de 78,51 %) que després de vuit (36,65 %)

Taula 8. Resultats per a l'ANCOVA del percentatge de micorrizes en les plantes de *P. pinea* inoculades amb les soques 312, 313, 330, 332, 335 de *L. deliciosus* als 8 mesos del seu establiment en camp. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatiu, P<0,05), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per als diferents nivells de cada factor. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre nivells segons el test de Tukey (P<0,05). Les dades se sotmeteren a transformació angular prèviament a la seva anàlisi. N=30

Factor (font)	Valor P	Nivells	% micorrizes
Fong inoculat	0,0024	312	3,70 B
		313	27,92 A
		330	0,00 B
		332	5,33 AB
		335	1,13 B
Cobertura inicial (covariable)	0,9226		
Interacció	0,0784		
	DF		
Model	9		
Error	20		
Total corregit	29		

Es detectà miceli extraradical de *L. deliciosus* en les mostres de sòl rizosfèric recollides en el mostreig realitzat després de vuit mesos en camp. No hi hagué detecció en el mostreig dels 14 mesos ni tampoc en les mostres recollides amb sonda a 10 cm del tronc. A la figura 11 es mostra la recta patró definida per a la quantificació per PCR en temps real de les mostres corresponents al mostreig realitzat als vuit

mesos en camp. L'anàlisi de la quantitat de miceli es dugué a terme amb les dades corresponents a les mostres de sòl rizosfèric del mostreig corresponent als vuit mesos, excloent el factor temps de l'anàlisi. Aquesta anàlisi mostrà que no hi ha diferències significatives entre soques en la quantitat de miceli detectada en el sòl rizosfèric ni efecte significatiu de la cobertura micorrízica inicial (covariable). La quantitat de miceli detectada fou, en tots casos, molt baixa, amb una mitjana de $0,29 \pm 0,16 \mu\text{g}$ miceli/g sòl, independentment de la soca.

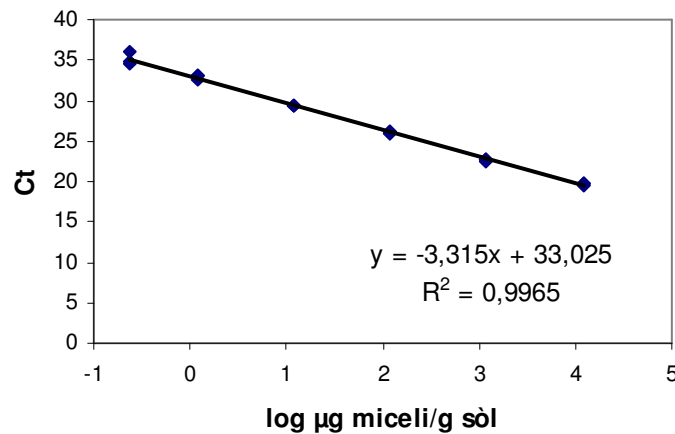


Figura 11. Recta patró establerta per a la quantificació per PCR en temps real de les mostres de sòl recollides a la microparcel·la 06. Veure material i mètodes per a l'explicació de la definició de la recta.

Després de vuit mesos en camp, es detectà una correlació positiva entre el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* i la quantitat de miceli extraradical present en el sòl de la planta corresponent ($R= 0,3776$; $P= 0,0397$). No es detectà correlació entre la cobertura micorrízica inicial i el percentatge final de micorrizes o la quantitat de miceli rizosfèric.

3.5.2.2.2. Creixement

A la figura 12 es mostra l'aspecte de la microparcel·la després de sis mesos en camp.

No es detectaren diferències en el volum inicial de les plantes trasplantades a camp, excepte per a les plantes inoculades amb *R. luteolus* que presentaren un volum significativament inferior a la resta ($P=0,0142$), amb unes mitjanes de $2,27 \text{ cm}^3$ per a les plantes inoculades amb *L. deliciosus* o no inoculades (corresponent a un diàmetre mitjà de $0,49 \text{ cm}$ i una alçada de $35,83 \text{ cm}$) i de $1,85 \text{ cm}^3$ per a les plantes inoculades amb *R. luteolus* (diàmetre mitjà de $0,46 \text{ cm}$ i alçada de $33,00 \text{ cm}$)

A causa de la pèrdua del fong, el factor temps de mostreig s'exclougué també de l'anàlisi de creixement i aquesta es dugué a terme únicament amb les dades del mostreig als vuit mesos. L'ANOVA per al volum final mostrà un efecte significatiu del volum inicial ($P= 0,0462$), mentre que el tractament d'inoculació no tingué cap efecte ($P= 0,3184$). El volum mitjà de les plantes després de vuit mesos en camp fou de $15,51 \pm 0,98 \text{ cm}^3$, independentment del tractament d'inoculació (soques 312, 313, 330, 332, 335 de *L. deliciosus*, *R. luteolus* o plantes no inoculades). Tampoc es detectaren diferències per al diàmetre però sí per a l'alçada, que fou superior en les plantes inoculades amb les soques 332 o 330, intermitja en les inoculades amb la soca 313, 335 o no inoculades i baixa per a les inoculades amb *R. luteolus* o la soca 312.

Es detectà una correlació positiva entre el volum inicial de les plantes i el seu volum final als vuit mesos de l'establiment de les plantes en camp ($R= 0,3147$; $P= 0,0424$). No s'observà correlació entre el volum final i el percentatge de micorrizes o la quantitat de miceli extraradical de *L. deliciosus* després de vuit mesos en camp. El volum final tampoc es correlacionà amb el percentatge de micorrizes de *R. luteolus* en cap dels dos mostrejos.



Figura 12. Aspecte de la microparcel·la 06 a octubre de 2006 (6 mesos en camp)

3.5.2.3. Micro 07 Cabrils (4 soques de *L. deliciosus*)

3.5.2.3.1. Colonització radical i extraradical

La mortalitat en aquesta microparcel·la fou molt elevada, probablement a causa d'algun problema en l'establiment de la plantació que feu que les plantes no arrellessin correctament i morissin als pocs mesos. Als sis mesos es recolliren per tant totes les plantes que quedaven vives, dues inoculades amb la soca 217, tres amb la soca 312, sis amb la 313, sis amb la 330 i sis plantes no inoculades (controls)

La presència de micorrizes a l'arrel (de *L. deliciosus* o fongs contaminants) fou baixa. El percentatge mitjà de micorrizes de *L. deliciosus* després de sis mesos en camp fou de $4,71 \pm 2,03$ % i no es detectaren diferències significatives en funció de la soca inoculada. Degut als problemes de supervivència de les plantes i de pèrdua del fong, no es calcularen els valors de cobertura micorrízica inicial mitjançant l'anàlisi de les fotografies digitals preses abans del trasplantament a camp. Tot i així, les plantes pertanyien al mateix lot d'inoculació que les trasplantades a la microparcel·la 07 de La Bisbal de manera que els valors de cobertura serien equivalents als d'aquestes plantes i és de suposar que la baixa incidència de *L. deliciosus* no es deuria a un problema de baixa colonització inicial. No es detectà miceli extraradical de *L. deliciosus* en el sòl rizosfèric de cap de les plantes mostrejades.

3.5.2.3.2. Creixement

Totes les plantes presentaren al trasplantament un volum inicial similar, amb una mitjana de $2,11 \pm 0,14$ cm³ (corresponent a un diàmetre inicial de 0,49 cm i a una alçada de 33,09 cm). L'ANOVA per al volum final mostrà un efecte significatiu del volum inicial de cada planta ($P < 0,0001$) mentre que no es detectà cap efecte del tractament d'inoculació. El volum mitjà de les plantes després de sis mesos en camp fou de $2,35 \pm 0,13$ cm³, independentment del tractament inicial d'inoculació. En les anàlisis d'alçada i diàmetre per separat, no es detectaren diferències per al diàmetre però sí per a l'alçada, que fou inferior en les plantes inoculades amb la soca 312 de *L. deliciosus*.

Les variables volum final i volum inicial es correlacionaren positivament ($R = 0,8470$; $P < 0,0001$) mentre que no es detectà correlació entre el volum final i el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus*.

3.5.2.4. Micro 07 La Bisbal (5 soques de *L. deliciosus*)

3.5.2.4.1. Colonització radical i extraradical

L'ANOVA per a la cobertura micorrízica inicial mostrà diferències en funció de la soca de *L. deliciosus* inoculada i el test de Tukey revelà que la soca 330 presentava a l'inici una cobertura micorrízica superior a la de la resta de soques (taula 9). Es mostren també els valors de percentatge de micorrizes inferit per a cada mitjana de cobertura segons la recta de regressió definida a la secció 3.4.2 de l'apartat de material i mètodes (pàgina 74)

Taula 9. Resultats per a l'ANOVA de la cobertura micorrízica de *L. deliciosus* en les plantes de *P. pinea* inoculades amb les soques 178, 217, 312, 313 i 330 abans del seu trasplantament a camp. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatius, $P < 0,05$), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per als diferents nivells de cada factor així com el percentatge de micorrizes estimat. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre nivells segons el test de Tukey ($P < 0,05$). Les dades se sotmeteren a transformació logarítmica prèviament a la seva anàlisi. N=30

Factor (font)	Valor P	Nivells	% Cobertura	% micorrizes estimat
Fong inoculat	<0,0001	178	0,45 B	46,00
		217	0,83 B	51,47
		312	0,53 B	47,15
		313	0,90 B	52,48
		330	2,07 A	69,33
DF				
Model	4			
Error	25			
Total corregit	29			

La persistència de les micorrizes als sis mesos de l'establiment de la plantació fou diferent entre soques inoculades, tal i com es desprèn de l'ANOVA corresponent (taula 10), sent inferior en les plantes inoculades amb les soques 178 o 312 de *L. deliciosus*. El percentatge de micorrizes del fong contaminant *R. roseolus* (present en el sòl de manera natural) també fou significativament diferent ($P=0,0118$) entre tractaments (incloent en l'anàlisi les plantes inoculades amb les cinc soques de *L. deliciosus* així com les plantes no inoculades). El test de Tukey revelà que la incidència d'aquest fong fou alta en les plantes control (percentatge del 33,66 %), mitjana en les plantes inoculades amb les soques 178, 312 i 330 (14,92 %) i baixa en les inoculades amb les soques 217 i 313 (6,36 %). Es detectà una correlació negativa entre el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* de les plantes trasplantades a camp i el seu percentatge de micorrizes de *R. roseolus* ($R = -0,4384$; $P = 0,0075$)

Taula 10. Resultats per a l'ANCOVA del percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* en les plantes de *P. pinea* inoculades amb les soques 178, 217, 312, 313 o 330 als 6 mesos del seu establiment en camp. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatius, $P < 0,05$), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per als diferents nivells de cada factor. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre nivells segons el test de Tukey ($P < 0,05$). Les dades se sotmeteren a transformació angular prèviament a la seva anàlisi. $N=30$

Factor (font)	Valor P	Nivells	% micorrizes
Fong inoculat	0,0006	178	1,41 B
		217	42,44 A
		312	21,72 AB
		313	53,94 A
		330	79,36 A
Cobertura inicial (covariable)	0,6408		
Interacció	0,9953		
DF			
Model	9		
Error	20		
Total corregit	29		

Es detectà miceli extraradical de *L. deliciosus* en les mostres de sòl recollides amb sonda a 10 cm del tronc (no es recollí sòl rizosfèric). La quantitat de miceli present en el sòl de les mostres avaluades s'establí segons la recta patró definida a la figura 13. La biomassa miceliar no es veié afectada ni per la soca amb què s'inoculà la planta ($P=0,0797$) ni per la seva cobertura inicial ($P=0,2365$), segons l'ANOVA corresponent. La quantitat mitjana fou de 2,43 μg miceli/g sòl. El factor soca inoculada fou quasi significatiu i el test de Tukey corresponent suggerí una major detecció de miceli per a la soca 312, mitjana per a les soques 217, 313 i 330 i baixa per a la soca 178.

Es detectà una correlació positiva entre la cobertura micorrízica inicial i el percentatge final de micorrizes de *L. deliciosus* ($R=0,4166$; $P=0,0220$). La correlació entre la quantitat de miceli detectada a 10 cm del sòl i el percentatge final de micorrizes no fou significativa ($R=0,2548$; $P=0,1742$). Tampoc ho fou la correlació entre la quantitat de miceli i la cobertura micorrízica inicial de les plantes ($R=0,2147$; $P=0,2544$)

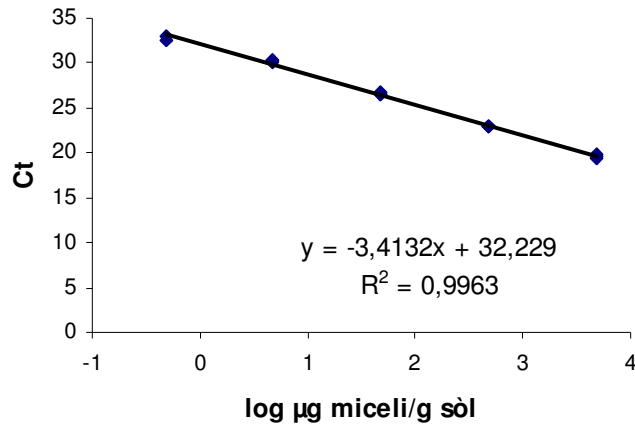


Figura 13. Recta patró establerta per a la quantificació per PCR en temps real de les mostres de sòl recollides a la microparcel·la 07 de La Bisbal. Veure material i mètodes per a l'explicació de la definició de la recta.

3.5.2.4.2. Creixement

A la figura 14 es mostra l'aspecte de la microparcel·la al moment del seu establiment.



Figura 14. Aspecte de la microparcel·la 07 de La Bisbal al seu establiment (març 2007)

Al moment del trasplantament a camp, les plantes presentaven un volum inicial similar. El volum inicial mitjà fou de $1,70 \pm 0,08 \text{ cm}^3$ (corresponent a un diàmetre inicial de 0,45 cm i a una alçada de 31,28 cm).

L'ANCOVA per al volum final mostrà un efecte significatiu del volum inicial ($P < 0,0001$), mentre que no es detectà cap efecte del tractament d'inoculació. El volum mitjà de les plantes després de sis mesos en camp fou de $3,24 \pm 0,12 \text{ cm}^3$, independentment del tractament inicial d'inoculació. L'ANOVA per separat de l'alçada i el diàmetre mostrà el

mateix resultat per a l'alçada mentre que no es detectà cap efecte significatiu per al diàmetre.

Les variables volum inicial i volum final es correlacionaren de manera positiva ($R=0,6778$; $P<0,0001$) mentre que no es detectà correlació entre el volum final i el percentatge de micorrizes, la cobertura inicial o la quantitat de miceli extraradical.

3.5.2.5. Comparació de resultats entre localitats

3.5.2.5.1. Colonització radical i extraradical

Donat que la microparcel·la 07 de Cabriels va presentar problemes d'elevada mortalitat s'han comparat les dades de la microparcel·la 07 de La Bisbal amb les de la microparcel·la 06 de Cabriels per a les tres soques que tenien en comú. El mostreig de les plantes va tenir lloc als sis mesos en la microparcel·la de La Bisbal i als vuit en la de Cabriels. Prenem com a supòsit, que aquest fet no afectarà significativament els resultats de colonització. Caldrà, en canvi, tenir-ho en compte en la interpretació dels resultats de creixement. Tot i així, els mesos de diferència són novembre i desembre, mesos en què suposadament les plantes creixen poc.

L'ANOVA per a la cobertura micorrízica inicial de les plantes mostrarà un efecte significatiu del tractament d'inoculació (soca, $P= 0,0034$) així com interacció entre el tractament i la localitat ($P<0,0001$). El test de Tukey es dugué per tant a terme per separat per als dos factors, analitzant les diferències entre soques a cada localitat (taula 11)

Taula 11. Cobertura micorrízica inicial i percentatge de micorrizes estimat per a cada fong (soques 312, 313, 330) en cada localitat (La Bisbal i Cabriels). Diferents lletres indiquen diferències significatives entre fongs segons el test de Tukey ($P<0,05$). Les dades se sotmeteren a transformació logarítmica prèviament a la seva anàlisi. $N=18$ a cada localitat.

Fong inoculat	Localitat			
	La Bisbal		Cabriels	
	% cobertura	% micorrizes	% cobertura	% micorrizes
312	0,54 B	47,30	1,84 A	66,02
313	0,90 B	52,48	1,01 B	54,06
330	2,07 A	69,33	1,11 B	55,50

El percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* després d'un temps en camp es veié significativament afectat per la localitat i pel tractament d'inoculació, amb percentatges superiors a La Bisbal i per a la soca 313, tal i com es mostra a la taula 12.

Taula 12. Resultats per a l'ANOVA del percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* en les plantes de *P. pinea* inoculades amb les soques 312, 313 o 330 trasplantades a Cabriels o a La Bisbal. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatius, $P < 0,05$), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per als diferents nivells de cada factor. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre nivells segons el test de Tukey ($P < 0,05$). Les dades se sotmeteren a transformació angular prèviament a la seva anàlisi. $N=36$

Factor (font)	Valor P	Nivells	% micorrizes
Fong inoculat	0,0017	312	12,71 B
		313	40,93 A
		330	23,86 B
Localitat	<0,0001	Cabriels	10,54 B
		Bisbal	41,13 A
Cobertura inicial (covariable)	0,3590		
Interaccions	n.s.		
	DF		
Model	5		
Error	30		
Total corregit	35		

No es pogué dur a terme l'ANOVA per a la quantitat de miceli extraradical de *L. deliciosus* present en el sòl recollit a 10 cm del tronc ja que la seva detecció a la microparcel·la de Cabriels fou nul·la.

3.5.2.5.2. Creixement

El volum inicial de les plantes al moment del trasplantament fou significativament superior ($P < 0,0001$) per a les plantes trasplantades a Cabriels, amb una mitjana de 2,31 cm^3 (corresponent a un diàmetre de 0,49 cm i a una alçada de 35,75 cm) respecte als 1,63 cm^3 de les plantes trasplantades a La Bisbal (corresponent a un diàmetre de 0,44 cm i a una alçada de 31,96 cm)

L'ANOVA per al volum final de les plantes mostrà un efecte significatiu de la localitat (tot i que cal tenir en compte que les plantes de Cabrils van romandre dos mesos més en camp) i del volum inicial, tal i com s'observa a la taula 13.

Taula 13. Resultats per a l'ANCOVA del volum final de les plantes de *P. pinea* inoculades amb la soca 312, 313 o 330 de *L. deliciosus* trasplantades a Cabrils o a La Bisbal. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatiu, $P < 0,05$), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per als diferents nivells de cada factor. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre nivells segons el test de Tukey ($P < 0,05$). Les dades se sotmeteren a transformació logarítmica prèviament a la seva anàlisi. $N=48$

Factor (font)	Valor P	Nivells	V final (cm ³)
Fong inoculat	0,8496	312	8,35 A
		313	8,75 A
		330	9,81 A
		control	9,88 A
Localitat	<0,0001	Cabrils	15,13 A
		Bisbal	3,26 B
Volum inicial (covariable)	<0,0001		
Interaccions	n.s.		
DF			
Model	15		
Error	32		
Total corregit	47		

Es detectà correlació positiva entre volum final i inicial amb totes les dades agrupades ($R = 0,6153$; $P < 0,0001$). No es calculà la correlació entre volum final i percentatge de micorrizes o quantitat de miceli de *L. deliciosus* perquè els valors baixos d'abundància del fong corresponen a les mostres de Cabrils i suposem que el factor localitat té molt més pes a l'hora de determinar les diferències en volum que no pas l'efecte que pugui tenir el fong.

3.5.2.6. Resum de resultats dels diferents experiments

3.5.2.6.1. Colonització radical i extraradical

A la taula 14 es mostra el resum dels resultats obtinguts per a la colonització radical i extraradical de *L. deliciosus* en els diferents experiments duts a terme en el marc d'aquesta tesi.

Taula 14. Taula-resum dels resultats obtinguts en els experiments de persistència vegetativa de *L. deliciosus* en camp. S'indica si els factors analitzats tingueren o no efecte en el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* o la seva quantitat de miceli extraradical segons l'ANOVA corresponent així com la correlació entre aquests dos paràmetres. Per al factor nivell de colonització es consideren tres categories diferents (alt, mig o control). Per al factor soca inoculada es consideren les soques utilitzades en cada experiment més el tractament control. Les dades de la microparcel·la 07 Cabriels no es tingueren en compte pels problemes que presentà aquesta plantació. Ø = no avaluat; sí = amb efecte; no = sense efecte o correlació, + = correlació positiva; - = correlació negativa

	Efecte en % micorrizes		Efecte en quantitat miceli		Correlació ⁽¹⁾
	nivell colonització	Soca inoculada	Nivell colonització	Soca inoculada	micorrizes/miceli rizosfèric
Can Badia 2	no	Ø	no	Ø	+
Micro 05	no	Ø	Ø	Ø	Ø
Can Badia 1	Ø	sí	Ø	sí	+
Micro 06	Ø	sí	Ø	no	+
Micro 07 Bisbal	Ø	sí	Ø	no	no ⁽²⁾

⁽¹⁾ determinació de la correlació: Can Badia 2: 13 i 25 mesos; Can Badia 1: 25; microparcel·la 06: vuit; microparcel·la 07 La Bisbal: sis.

⁽²⁾ miceli recollit a 10 cm del tronc.

3.5.2.6.2. Creixement

A la taula 15 es mostra el resum dels resultats obtinguts per al creixement de les plantes de *P. pinea* en els diferents experiments duts a terme en el marc d'aquesta tesi.

Taula 15. Taula-resum dels resultats obtinguts per als paràmetres de creixement en les diferents plantacions establertes amb planta inoculada amb *L. deliciosus* o sense inocular. S'indica si els factors analitzats tingueren o no efecte en el volum final de les plantes segons l'ANOVA corresponent així com les correlacions d'aquest paràmetre amb el volum inicial, el percentatge de micorrizes o la quantitat de miceli de *L. deliciosus*. Per al factor nivell de colonització es consideren tres categories diferents (alt, mig o control). Per al factor soca inoculada es consideren les soques utilitzades en cada experiment més el tractament control. Les dades de la microparcel·la 07 Cabrils no es tingueren en compte pels problemes que presentà aquesta plantació. Ø = no avaluat; sí = amb efecte; no = sense efecte o correlació, + = correlació positiva; - = correlació negativa

	Efecte en volum final		Correlacions ⁽¹⁾ de volum final amb		
	nivell colonització	Soca inoculada	volum inicial	percentatge micorrizes	miceli rizosfèric
Can Badia 2	no	Ø	+/-	no	no
Micro 05	no	Ø	+	-	Ø
Can Badia 1	Ø	no	no	+	+
Micro 06	Ø	no	+	no	no
Micro 07 Bisbal	Ø	no	+	no	no ⁽²⁾

⁽¹⁾ determinació correlacions: Can Badia 2: 13 i 25 mesos; microparcel·la 05: nou, 19 i 24 (només als nou mesos per a les micorrizes); Can Badia 1: 13 i 25 (només als 25 per al miceli); microparcel·la 06: vuit i 14 (vuit per a micorrizes i miceli); microparcel·la 07 La Bisbal: sis.

⁽²⁾ miceli recollit a 10 cm del tronc.

3.6. DISCUSSIÓ

La determinació de la cobertura micorrízica mitjançant l'anàlisi de fotografies digitals permeté una caracterització ràpida i acurada de la colonització radical de *L. deliciosus*. Proposem aquest sistema com a mètode no destructiu per al seguiment individualitzat de plantes micorrizades amb aquesta espècie fúngica. El color de les micorrizes pot variar en funció de l'edat i el grau d'humitat. Igualment, el color obtingut en la fotografia dependrà de la configuració de la càmera i de les condicions lumíniques. Per aquestes raons, en cada experiment caldrà seleccionar el color i el rang de variació tolerable que permetin la detecció acurada de les micorrizes de *L. deliciosus* de manera que puguem obtenir resultats comparables entre experiments. En qualsevol cas, l'eficàcia d'aquest sistema per a l'avaluació de la colonització radical d'altres espècies

ectomicorríziques dependrà de la possibilitat de distingir-ne les micorrizes pel seu color en la matriu del sòl o substrat de creixement.

La tècnica PCR en temps real permeté detectar específicament i quantificar el miceli extraradical de *L. deliciosus* en els dos sòls avaluats, el de Cabrils i el de La Bisbal, amb una elevada sensibilitat (límit de detecció de 2 µg miceli/ g sòl). Prèviament a aquest treball, Landeweert et al. (2003b) posaren a punt la tècnica PCR en temps real per a la quantificació dels fongs *Suillus bovinus* (Pers.) Roussel i *Paxillus involutus* i Schubert et al. (2003) per al fong *Piloderma croceum* Erikss. et Hjortstam (creixent en cultiu pur i en rizotron). En aquests estudis, a diferència d'aquest treball, els resultats de la PCR en temps real s'expressaren en unitats de quantitat de DNA (pmols DNA/g sòl o nombre de còpies ITS, respectivament). Raidl et al. (2005) determinaren la relació entre el nombre de còpies ITS obtinguts per PCR en temps real i la biomassa miceliar de *P. croceum* determinant que 10⁹ còpies ITS corresponen a 0,79 mg d'hifes de *P. croceum* (pes sec). Donat que la regió ITS té moltes còpies en el genoma fúngic i el nombre de còpies pot variar entre espècies (Gardes i Bruns 1993), és necessària una calibració i conversió de quantitat de còpies ITS a biomassa absoluta per a cada espècie amb què vulguem treballar.

Els estudis de Schubert et al. (2003) i Raidl et al. (2005) ressalten les dificultats en mesurar la longitud hifal de diferents mostres així com la manca de protocols d'extracció de DNA lliure d'inhibidors de la PCR a partir de mostres de sòl. En aquest treball, hem aconseguit superar el problema de l'extracció i purificació de DNA a partir de mostres de sòl mitjançant l'ús del kit PowerSoil™, dissenyat per ser utilitzat amb mostres de camp amb un elevat contingut d'àcids húmics, coneguts inhibidors de la PCR. D'altra banda, els estàndards per definir la recta patró es prepararen per extracció directa de DNA a partir d'una mescla d'una quantitat coneguda de miceli fresc amb sòl, establint així una relació directa entre els valors de fluorescència obtinguts i la biomassa miceliar inicial. El mètode proposat en aquest treball permet per tant la quantificació del miceli sense la necessitat d'establir una correlació entre la biomassa miceliar i el nombre de còpies ITS, evitant així els problemes de conversió quan es desconeix el nombre de còpies de la regió ITS en el genoma. Amb aquest sistema s'evita també haver de buscar gens amb un nombre de còpies conegut com a alternativa a la regió ITS tal i com proposen Landeweert et al. (2003b).

La quantitat de DNA extret a partir de diferents mescles de cadascun dels dos sòls amb la mateixa quantitat afegida de miceli fou similar i les subsegüents dilucions

seriades mostraren valors Ct també similars i reproduïbles. A més a més, també s'obtingueren rectes patró similars al realitzar diferents extraccions de DNA a partir de mescles de sòl amb una quantitat de miceli decreixent (10 vegades menys en cada extracció, dades no mostrades). Tot i així, en la posada a punt de la tècnica observarem que en utilitzar colònies de sis mesos d'edat per a l'extracció de DNA amb miceli afegit en comptes de colònies en creixement actiu, les corbes d'amplificació es desplaçaren consistentment dos cicles a la dreta indicant una disminució en la quantitat de DNA recuperada per µg de miceli d'aproximadament quatre vegades (dos per cicle). Aquest fet s'ha de tenir en compte en la quantificació absoluta del miceli ja que la quantitat total de miceli serà subestimada a mesura que augmenti la proporció d'hifes senescents en la mostra. Si prenem com a hipòtesi que el miceli vell en el sòl es degrada ràpidament, la recuperació de DNA per unitat de biomassa micel·lar en el procés d'extracció de mostres de camp hauria de ser similar a la que s'obté a partir de colònies en creixement actiu (de fins a un mes d'edat en el cas de *L. deliciosus*). Caldrien estudis per comprovar la validesa de la hipòtesi formulada però, tot i així, en aquest treball les dades de quantitat de miceli s'utilitzen per comparar els resultats obtinguts en diferents tractaments de manera que els valors absoluts són poc importants.

Els resultats obtinguts en els diferents experiments en camp indiquen que la persistència de les micorrizes de *L. deliciosus* i l'extensió del seu miceli extraradical en el sòl és diferent en les dues localitats estudiades. En aquest sentit, la plantació de La Bisbal ha mostrat ser molt més favorable a la persistència d'aquest fong. Per raons de disponibilitat, manteniment i proximitat al centre on s'ha desenvolupat aquesta tesi, la majoria d'experiments de camp s'han dut a terme a Cabrils mentre que per a La Bisbal només disposem de les dades d'un mostreig en una microparcel·la establerta l'any 2007. Tot i així, les dades dels experiments de competència del proper capítol reforcen aquest resultat. En els dos experiments que es compararen per avaluar l'efecte de la localitat, els percentatges inicials de micorrizes de *L. deliciosus*, inferits per anàlisi d'imatges de les plantes inoculades amb aquest fong, se situaren entre el 45 % i el 70 %, percentatges clarament superiors al 33 %. Aquest valor ha estat suggerit com a mínim acceptable per al trasplantament a camp per alguns autors (Wang i Hall 2004). Sota aquestes condicions teòricament idònies per a l'establiment del fong en camp, la persistència de micorrizes i l'expansió del miceli extraradical de *L. deliciosus* foren significativament diferents entre localitats. Tenint en compte que les condicions climàtiques i el nivell dels principals fongs ectomicorrízics nadius presents en el sòl

foren similars, atribuïm les diferències entre localitats majoritàriament a diferències en el tipus de sòl.

En l'experiment de La Bisbal es detectà miceli extraradical de *L. deliciosus* en les mostres de sòl recollides a 10 cm del tronc mentre que no fou així en cap dels experiments duts a terme a Cabriels. La presència d'inhibidors de la PCR en el sòl de Cabriels es descartà ja que les mostres d'aquest sòl amb miceli afegit utilitzades per construir la recta patró s'amplificaren sense problemes. De fet, mentre que alguns gèneres de fongs com *Rhizopogon* o *Suillus* produeixen extensius sistemes miceliars (Leake et al. 2004), el miceli extraradical dels fongs del gènere *Lactarius* sembla estar confinat a la micorriza (Agerer 2001) de manera que la detecció de miceli extraradical de *L. deliciosus* en el sòl de La Bisbal constitueix un resultat poc esperat. Tot i així, diversos estudis han detectat miceli de *Russula* sp. i *Lactarius* sp. en el sòl mitjançant tècniques moleculars (Chen and Cairney 2002, Dickie et al. 2002, Genney et al. 2006, Koide et al. 2005a, Landeweert et al. 2003a, 2005, Smit et al. 2003). La distinció entre el DNA d'espores i de miceli present en els extractes de sòl no és possible, tal i com ja s'ha apuntat en diversos estudis (Dickie et al. 2002, Guidot et al. 2003, Kennedy and Bruns 2005, Koide et al. 2005a, 2005b, Landeweert et al. 2005). En aquest treball, podem descartar l'amplificació de DNA procedent d'espores de *L. deliciosus* ja que aquestes dues espècies no es detectaren en les mostres de sòl corresponents al tractament control (plantes no inoculades)

Genney et al. (2006) van dur a terme un estudi de la distribució d'ectomicorrizes i miceli extraradical en el sòl i van trobar més miceli de *Lactarius rufus* (Scop.) Fr. del que correspondria a un fong amb micorrizes llises o d'exploració per contacte, que és la categoria on s'inclouen els fongs del gènere *Lactarius* segons la classificació a Agerer (2001). Tot i així, no van detectar miceli extraradical en moltes mostres de sòl que sí presentaven micorrizes, de manera semblant als resultats obtinguts en aquest treball en el sòl de Cabriels. Els resultats obtinguts en camp suggereixen per tant que el patró de distribució i la persistència del miceli extraradical per a una mateixa espècie pot variar depenent de les característiques del sòl o les condicions. En aquest sentit, Genney et al. (2006) apuntaren que les condicions particulars d'un lloc són importants a l'hora de determinar la distribució de les micorrizes i el miceli extraradical dels fongs ectomicorrízics en el sòl.

En la interpretació dels resultats de persistència vegetativa del fong *L. deliciosus*, cal tenir present que la majoria d'experiments s'han dut a terme a Cabriels, que és un lloc

poc favorable a l'establiment d'aquest fong on, amb el pas del temps, s'acaba perdent o es manté a un nivell de colonització baix. En qualsevol cas, els resultats obtinguts en camp suggereixen que la persistència de les micorrizes de *L. deliciosus* canvia en funció de la soca introduïda mentre que els nivells de colonització inicial assajats per a una determinada soca no afecten la seva capacitat de persistència en un determinat sòl. En tots els experiments en què s'ha avaluat l'efecte de la soca inoculada s'han detectat diferències entre soques en el percentatge de micorrizes passat un determinat temps en camp (no tenim en compte la microparcel·la 07 de Cabriels pels problemes de supervivència que va presentar). La soca 178 ha mostrat una baixa capacitat de persistència en els dos sòls estudiats, desapareixent ràpidament en la majoria de casos. De les altres tres soques que s'han estudiat en les dues localitats, la 313 és la que ha donat millors resultats en totes dues, la 312 ha mostrat una persistència significativament més baixa a l'anterior en tots dos sòls mentre que la soca 330 ha donat excel·lents resultats a La Bisbal però, en canvi, s'ha perdut a Cabriels. La soca 178 fou caracteritzada com a soca amb capacitat de colonització alta segons el seu potencial *in vitro* (capítol 1) però tot i així, les dades de cobertura inicial mostren que presentava un nivell de colonització similar a la resta abans de l'establiment en camp. La resta de soques s'inclogueren en les categories de colonització alta o mitjana. Cal considerar també que tant la soca 312 com la 330 foren de les més ràpides en colonitzar l'arrel en els assajos *in vitro* del capítol 1 (de les que presentaven més micorrizes als 30 dies de la inoculació). Aquest fet suggereix que, a més a més de la capacitat final de colonitzar l'arrel, la rapidesa de colonització podria ser un factor important a tenir en compte a l'hora de determinar la persistència del fong en camp. Caldria estudiar el comportament en camp d'altres soques incloses a la categoria de capacitat de colonització alta ja que, en realitat, de les soques avaluades la que donà millors resultats *in vitro* fou la soca 178 però cal tenir en compte que les plantes inoculades amb aquesta soca es van mantenir en els tubs més temps que la resta i per tant potser caldria revisar aquesta dada (capítol 1). L'existència de diferències entre soques reforcen la importància de la selecció de la soca a l'hora de dur a terme les inoculacions controlades i produir planta inoculada per ser trasplantada a camp (Rincón et al. 1999, Trappe 1977)

L'efecte del nivell inicial de colonització per a una determinada soca s'avaluà en la microparcel·la 05 i a Can Badia 2. En el primer cas, els resultats per a les dues categories de colonització en quant a la persistència de les micorrizes en camp foren similars però cal tenir en compte que en realitat les plantes de les dues categories presentaven una colonització inicial molt similar. L'estret marge de variació del

percentatge inicial de micorrizes (entre el 43 i el 53 %), inferit a partir de les dades de cobertura, no permeté detectar cap correlació entre la colonització inicial i la final de les plantes trasplantades a camp. En el cas de Can Badia 2, els resultats obtinguts suggereixen una major persistència de les micorrizes en les plantes que presentaven un nivell inicial de colonització més alt, tot i que aquesta diferència no arriba a ser significativa. De totes maneres, sembla que el percentatge de micorrizes de les plantes de nivell mig (36 %) podria ser suficient per assegurar la persistència del fong en la plantació. En aquest sentit, en els experiments en què es determinà la cobertura micorrízica inicial de les plantes per al seu seguiment individualitzat (microparcel·les), no es detectà relació significativa entre la colonització radical inicial i la colonització final o la quantitat de miceli en el sòl indicant que, en les condicions experimentals assajades, la persistència del fong no estigué relacionada amb el nivell de colonització inicial. Aquesta no correlació s'explica probablement perquè totes les plàntules presentaven un nivell de colonització relativament elevat i uniforme a l'inici de l'experiment. En canvi, en l'únic cas en què s'observà una correlació positiva entre colonització inicial i final fou a la microparcel·la 07 de La Bisbal, en què les diferències de colonització inicials entre soques foren significatives i el rang de cobertura, per tant, més ampli.

Aquests resultats, tot i preliminars, podrien a més a més suggerir que si el sòl és favorable al manteniment del fong (com en el cas de La Bisbal), una major colonització inicial podria implicar una major persistència de les micorrizes. En canvi, en un sòl poc favorable com el de Cabrils, el fong s'acabaria perdent independentment del nivell inicial de colonització. Així, a la microparcel·la 06 (Cabrils) una major colonització inicial de les plantes inoculades amb la soca 312 no es tradueix en una major persistència del fong. L'establiment de nivells de colonització mínims (necessaris per assegurar la persistència d'un fong en camp) a partir d'estudis amb diferents nivells de colonització inicial s'ha dut a terme per alguns fongs ectomicorrízics com *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker et Couch (Marx et al. 1991). En qualsevol cas, sembla que caldria tenir en compte, entre altres, el factor sòl a l'hora d'establir nivells mínims de colonització inicial.

Els resultats per a la incidència del fong contaminant *R. roseolus*, present en el sòl de les dues localitats de manera natural, semblen indicar que els percentatges més alts de micorrizes d'aquest fong estarien relacionats amb baixos o nuls percentatges de *L. deliciosus* en la mateixa arrel. En aquest sentit, la pèrdua amb el pas del temps de *L. deliciosus* en les plantes de la microparcel·la 06 ha coincidit amb un augment del

percentatge de micorrizes de *R. roseolus* en aquestes mateixes plantes. D'altra banda, a la microparcel·la 07 de La Bisbal la correlació entre els percentatges de micorrizes dels dos fongs ha estat negativa i els percentatges més elevats de micorrizes de *R. roseolus* s'han donat, en general, en plantes no inoculades o amb un baix percentatge de micorrizes de *L. deliciosus*. La relació entre aquests dos fongs s'estudiarà en detall al proper capítol.

Els resultats obtinguts en quant a quantitat de miceli suggereixen que l'extensió del miceli extraradical en el sòl podria variar en funció de la soca, tot i que disposem de poques dades perquè el miceli a Cabrils s'estén poc. Tot i així, a Can Badia 1 només es detectà miceli en rizosfera per a la soca 312 mentre que la detecció fou nul·la per a la soca 178. A la microparcel·la 07 de La Bisbal les diferències no són significatives en el primer mostreig però els resultats semblen indicar que es podrien detectar diferències en la formació de miceli entre soques en mostres successius, novament amb una detecció inferior per a la soca 178. Els resultats per a la microparcel·la 06 no els tenim en compte perquè la quantitat de miceli detectada fou molt baixa en tots els casos i en el segon mostreig el fong ja es perdé.

Per al seguiment no destructiu del fong en camp, seria necessària la detecció del fong en les mostres de sòl preses amb sonda a una certa distància del tronc però, a Cabrils, només es detecta miceli en el sòl adherit a l'arrel per a la qual cosa cal arrencar la planta igualment. Com a alternativa, es podria recollir sòl rizosfèric amb una sonda inserida en diagonal en direcció al tronc. Aquesta metodologia s'ha utilitzat en el darrer mostreig a Can Badia 2 (després de tres anys en camp) sense obtenir resultats positius, fet que podria explicar-se perquè el sistema no és útil per recollir sòl directament adherit a l'arrel o bé perquè el fong ja hauria desaparegut del sòl, hipòtesis que no es poden comprovar perquè les plantes són ja massa grans per arrencar-les. Caldria avaluar la validesa de la metodologia proposada en un sistema en què puguem recollir també sòl rizosfèric arrencant la planta i comparar els resultats obtinguts mitjançant les dues metodologies.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, a La Bisbal sí que es detecta miceli a 10 cm del tronc però la correlació entre la quantitat de miceli i el percentatge de micorrizes no és significativa. Cal tenir en compte que només disposem de dades d'un mostreig realitzat als sis mesos de l'establiment de la plantació, temps que podria ser insuficient per a l'extensió del miceli extraradical en el sòl. Cal considerar també que el miceli es distribueix en taques degut a la heterogeneïtat del sòl, particularment com a resposta a

la distribució en taques dels nutrients (Cairney 2005). El mostreig de sòl s'ha realitzat en quatre punts diferents per augmentar les possibilitats de detecció del miceli però el fet de mesclar aquest sòl i treballar amb una sola mostra per planta pot estar ocasionant una variabilitat en la quantitat total de miceli que podria alterar els resultats. En qualsevol cas, el sistema de mostreig de sòl per a la quantificació del miceli extraradical és un tema complex que requereix una major investigació.

D'altra banda, també podria ser que la informació que ens puguin aportar les determinacions de micorrizes i miceli extraradical sigui diferent, tal com suggereixen Horton i Bruns (2001) o Koide et al. (2005b). Diversos treballs reflecteixen que la visió de la comunitat ectomicorrízica obtinguda a partir de l'estudi de les micorrizes o del miceli en el sòl pot ser diferent (Kjøller 2006, Koide et al. 2005b, Peintner et al 2007). Concretament, Kjøller (2006) detectà *Lactarius* spp. en l'anàlisi de les micorrizes però no en la del miceli present en el sòl. En canvi, Landeweert et al. (2005) trobaren una elevada correspondència entre els resultats derivats dels dos tipus d'anàlisi. En qualsevol cas, Koide et al. (2005b) suggereixen combinar les dues aproximacions a l'hora de caracteritzar la comunitat ectomicorrízica. Els resultats de quantificació de miceli a la microparcel·la de La Bisbal indiquen que la formació de miceli extraradical és superior per a la soca 312 mentre que les plantes inoculades amb aquesta soca presenten un percentatge de micorrizes mitjà, inferior al de les soques 330, 313 o 217.

En tots els experiments, el creixement de les plantes augmentà amb el temps en camp independentment del tractament d'inoculació (nivell de colonització o soca inoculada). Es detectà un creixement promig de les plantes superior a Cabriels que a La Bisbal, tot i que la precipitació en aquest segon lloc fou lleugerament superior i la temperatura mitjana molt similar. Tot i així, les temperatures mínima i màxima foren inferiors a les registrades a Cabriels. Les plantes d'aquesta localitat romangueren dos mesos més en camp que les de La Bisbal però foren mesos hivernals en què suposem que les plantes creixeren poc així que podria haver-hi un efecte del tipus de sòl en el creixement. En general, es detectà una correlació positiva entre el volum final de les plantes i el seu volum inicial, de manera que una planta inicialment més gran assoliria un volum més gran a la llarga. En el segon mostreig de Can Badia 2 es detectà però una correlació negativa entre aquestes dues variables, fet que podria explicar-se perquè les plantes patissin un període de sequera de manera que les més grans transpiressin més i tinguessin un creixement inferior. Les dades meteorològiques mostren que, efectivament, les mitjanes de temperatura foren 2°C superiors a les del període previ i la precipitació gairebé tres vegades inferior. També podria explicar-se

per les ferides observades en el tronc de les plantes ocasionades puntualment durant les tasques de manteniment i neteja de la parcel·la (eliminació de males herbes). En general, no s'ha observat una relació clara entre el creixement de les plantes i la colonització per part de *L. deliciosus* (percentatge de micorrizes o quantitat de miceli extraradical present en el sòl) i quan es dona pot ser positiva o negativa depenent de les condicions ambientals.

En conclusió, els resultats indiquen que la localitat d'establiment de la plantació juga un paper important en la persistència del fong *L. deliciosus* i que, per tant, la idoneïtat del lloc és un factor crític a tenir en compte a l'hora d'establir noves plantacions. Tot i així, en sòls poc favorables com el de Cabriels i malgrat la presència de fongs competidors, hem vist que dos anys després de l'establiment de la plantació el fong encara pot mantenir-se en camp. Els resultats mostren també que la soca seleccionada per a la inoculació de les plantes pot jugar un paper clau en l'èxit de la plantació mentre que el nivell inicial de colonització, tot i que ser un factor important en la determinació de la qualitat de la planta inoculada amb *L. deliciosus* produïda en viver, no ha estat un factor significatiu en la persistència del fong en camp. En qualsevol cas, caldria realitzar experiments amb nivells de colonització més diferenciats per establir el llindar mínim en unes determinades condicions ambientals. Per últim, podem concloure que la posada a punt de la tècnica PCR en temps real per a la quantificació del miceli extraradical de *L. deliciosus* ha permès fer un seguiment de la persistència del fong en el sòl de manera acurada i amb una elevada sensibilitat. Les possibilitats d'utilització de la metodologia proposada per al seguiment no destructiu del fong en camp dependran de la capacitat d'extensió del miceli en el sòl en què s'estableixi la plantació.

IV. AVALUACIÓ DE LA CAPACITAT COMPETITIVA DE
***Lactarius deliciosus* DAVANT DE *Rhizopogon* spp.**

4.1. HIPÒTESI DE TREBALL

- La capacitat competitiva de *Lactarius deliciosus* enfront a fongs simbiòtics nadius condiciona la seva persistència en el sòl de plantació.

4.2. OBJECTIUS

- Determinar la capacitat competitiva a nivell de micorrizes i de miceli extraradical de diferents soques de *L. deliciosus* enfront a fongs del gènere *Rhizopogon* en diferents condicions experimentals.

4.3. INTRODUCCIÓ

La supervivència i expansió d'un fong introduït en una plantació experimental pot estar afectada tant per factors abiòtics (revisat a Erland i Taylor 2002) com biòtics (Hall et al. 2003). Entre aquests últims, les interaccions amb fongs ectomicorrízics nadius, presents en el sòl de manera natural, podrien jugar un paper clau ja que la possibilitat d'encontres entre micelis de diferents taxa és elevada (Cairney 2005). La colonització radical de plàntules inoculades en condicions controlades per part de fongs ectomicorrízics nadius després del seu establiment en camp s'ha descrit en diversos estudis (Bledsoe et al. 1982, McAfee i Fortin 1985, Meotto et al. 1999, Villeneuve et al. 1991). Tot i així, els estudis de competència són escassos a la literatura, probablement a causa de la manca de mètodes d'identificació directes i apropiats (Wu et al. 1999). Darrerament, diferents estudis que apliquen tècniques moleculars han suggerit que la competència podria ser un factor important a l'hora de determinar l'estructura de la comunitat ectomicorrízica (Kennedy i Bruns 2005, Kennedy et al. 2007a, 2007b, Koide et al. 2005a, Landeweert et al. 2003b, Lilleskov i Bruns 2003, Mahmood 2003, Wu et al. 1999).

Com s'ha proposat a la introducció general, l'establiment de plantacions experimentals amb arbres inoculats amb *L. deliciosus* és una alternativa prometedora per a l'explotació sostenible de terres agrícoles abandonades. Els fongs de les espècies de *Rhizopogon* es troben sovint de manera natural en aquests sòls alterats i amb poca diversitat de fongs ectomicorrízics (McAfee i Fortin 1985) i podrien jugar un paper competitiu important gràcies a la capacitat d'expansió del seu miceli (Agerer 2001,

Leake et al. 2004). *Rhizopogon* és el gènere més nombrós de fongs ectomicorrízics hipogeus, amb més de 160 espècies descrites (Massicotte et al. 1999), 22 d'elles amb distribució europea (Martín 2001). La seva extensa distribució i importància ecològica s'ha descrit en nombrosos estudis (Massicotte et al. 1999). En aquest sentit, a les plantacions establertes en el marc del capítol 3, hem observat que *R. roseolus* és un fong abundant en els sòls on treballem i que, mentre que *L. deliciosus* sovint desapareix, *R. roseolus* colonitza el sistema radical de manera abundant i consistent. A més a més, Parladé et al. (2004a) mostraren que aquesta espècie fúngica és capaç de persistir en camp i de promoure la supervivència de plantes de *P. pinea* inoculades. Per estudiar les relacions competitives entre aquests dos fongs es planteja un estudi en dues fases.

En la primera fase, es pretén avaluar la persistència de les micorrizes i miceli extraradical de *L. deliciosus* en competència amb *R. roseolus* en testos mantinguts en ombracle amb sòl procedent de dues localitats diferents, Cabrils i La Bisbal d'Empordà (les mateixes on s'han establert les plantacions del capítol 3). En la segona fase, es pretén avaluar la persistència de micorrizes i miceli extraradical de diferents soques del fong *L. deliciosus* enfront a dues espècies de *Rhizopogon* en condicions de camp, als mateixos sòls que en la fase anterior. El mateix disseny es repetirà també en testos per tal de comparar els resultats amb els de camp i amb els de la fase anterior.

Fase 1: Persistència del fong *L. deliciosus* en competència amb *R. roseolus* en test utilitzant dos sòls diferents

4.4. MATERIAL I MÈTODES

4.4.1. Inoculacions

Es produí inòcul vegetatiu de la soca 312 de *L. deliciosus* (veure annex 1 per detalls de la soca, pàgina 174) en ampolles amb torba:vermiculita i s'utilitzà per inocular plàntules de *P. pinea* (lot A11310296, Banc de Llavors de la Generalitat Valenciana, any de recol·lecció 1996) a l'abril de 2004, seguint el procés descrit al capítol 3, seccions 3.4.1 i 3.4.2 de l'apartat de material i mètodes, pàgines 70-74). Per a les inoculacions amb *Rhizopogon roseolus* es recolliren esporocarps sota *Abies* sp. al novembre de 2003 a la serralada del Montseny (Girona) i s'assecaren a l'estufa a 30°C. Al maig de 2004 els esporocarps secs s'utilitzaren per preparar una suspensió

d'espores en aigua corrent utilitzant una batedora Waring a velocitat reduïda per tal d'alliberar les espores (Parladé et al. 1996). S'avaluà la concentració d'espores utilitzant un hemacitòmetre Newbauer i es diluï amb aigua fins a la concentració desitjada. La suspensió diluïda s'aplicà en plàntules de *P. pinea* d'un mes a una dosi de 10^7 espores per planta. També es produïren plantes control, és a dir, no inoculades. Les plàntules es mantingueren a l'ombracle d'abril de 2004 fins a març de 2005. Es regaren diàriament i fertilitzaren cada 15 dies tal i com s'ha descrit al capítol 3 (secció 3.4.2 de material i mètodes, pàgina 71).

A desembre de 2004, es determinà la colonització radical mitjana de 20 plantes per lot inoculat amb cada fong comptant el percentatge d'arrels micorríziques d'un mínim de 200 puntes per planta. A més a més, abans de l'establiment de les plantes en testos, es fotografià una de les quatre cares (l'aparentment més colonitzada) de l'ortoedre que forma el pa d'arrel de cadascuna de les plantes inoculades amb *L. deliciosus* per tal d'establir-ne la cobertura micorrízica inicial. Aquest paràmetre es determinà analitzant la imatge obtinguda amb el programari Adobe Photoshop Elements 2.0 segons la metodologia descrita al capítol 3 (secció 3.4.2 de l'apartat de material i mètodes, pàgina 71) utilitzant el codi de color FDDA85 a una tolerància del 50 %. Per estimar el percentatge real de micorrizes de cada planta a partir de les dades de cobertura micorrízica s'utilitzà la recta definida en el capítol 3 ($y=14,40x+39,52$ amb $R=0,6998$; $P<0,0001$)

4.4.2. Disseny experimental

L'experiment es dugué a terme en testos de plàstic quadrats de 4 l de capacitat que s'ompliren amb sòl recollit a La Bisbal o a Cabriels prèviament tamisat (llum tamís: 5 mm) i autoclavat 60 minuts a 120°C. Les característiques fisicoquímiques dels dos sòls s'han descrit al capítol 3 (secció 3.4.3 de l'apartat de material i mètodes, pàgina 74). Es trasplantaren dues plàntules de *P. pinea* procedents dels diferents tractaments d'inoculació (inoculades amb *L. deliciosus*, *R. roseolus* o no inoculades -control-) a cada test, mantenint una distància de 10 cm de l'una a l'altra. S'establiren les següents tres combinacions, amb sis rèpliques cadascuna en cada sòl: 1) *L. deliciosus* – control, 2) *L. deliciosus* - *R. roseolus* i 3) *R. roseolus* – control. Per tal de detectar possibles fongs ectomicorrízics contaminants presents en l'ambient, es prepararen dos testos addicionals per a cada sòl amb dues plantes control en cadascun. S'obtingué així un total de 40 testos (3 combinacions*6 rèpliques*2 sòls més 4 testos control-control) que es distribuïren a l'atzar als bancs de l'ombracle (figura 1). Quan fem referència a la

planta acompanyant volem indicar la planta situada davant la planta inoculada amb *L. deliciosus*, que pot ser inoculada amb *R. roseolus* o control.

Els testos es mantingueren a l'ombracle amb reg regular des de març fins a setembre de 2005. La temperatura mitjana fou de 18°C durant els tres primers mesos i de 22,6°C els tres últims.



Figura 1. Disseny experimental

4.4.3. Quantificació de la colonització fúngica (micorrizes i miceli extraradical)

Als tres i sis mesos després del trasplantament a testos, es prengué una mostra de sòl al centre de cada test a una profunditat de 0-10 cm i 10-20 cm utilitzant un sonda metàl·lica cilíndrica de 3 cm de diàmetre (figura 2). Les mostres de sòl s'emmagatzemaren a -20°C. Prèviament a la seva anàlisi, cada mostra s'homogeneïtzà mecànicament, s'assecà a 30°C fins a pes constant per eliminar l'excés d'aigua i es tamisà utilitzant un sedàs de 2 mm de diàmetre (per evitar agafar fragments d'arrel). Al final de l'experiment, sis mesos després de l'establiment, es determinà la colonització radical per a cada fong extraient totes les plantes i rentant el sistema radical per comptar el percentatge de micorrizes corresponents a cadascun d'ells.

L'extracció de DNA de les mostres de sòl preses als tres i sis mesos es dugué a terme amb el kit PowerSoil™ DNA Isolation (MoBio laboratories Inc.) a partir de 0,25 g de sòl per mostra seguint les instruccions del fabricant. La quantificació del miceli extraradical es determinà per PCR en temps real, reacció que es dugué a terme en un ABI

PRISM[®]7700 Sequence Detection System utilitzant el kit TaqMan[®] Universal Master Mix (Applied Biosystems). S'utilitzaren els encebadors i sonda específics de *L. deliciosus*, prèviament dissenyats (secció 3.4.4.2, material i mètodes del capítol 3, pàgina 82), a una concentració de 800 nM per als encebadors (FWDLdel i RVSLdel) i de 100 nM per a la sonda (STQLdel). A cada reacció s'afegiren 5 µl d'una dilució 1:5 de l'extracte de DNA obtingut a partir de la mostra de sòl. Les reaccions s'ajustaren a un volum final de 25 µl amb aigua HPLC. Cada reacció es dugué a terme per triplicat i es calculà el Ct mitjà per a cada mostra de sòl. La quantificació del miceli present a cada mostra es realitzà mitjançant la interpolació del Ct obtingut en la recta patrò generada per a cada tipus de sòl amb quantitats conegudes de miceli afegit tal com s'ha descrit en el capítol 3 (secció 3.4.4.2, pàgina 82)



Figura 2. Mostreig de sòl a dues profunditats (unitats en cm)

4.4.4. Creixement

A l'inici i al final de l'experiment, es mesuraren les plantes (alçada i diàmetre) i es calculà el seu volum segons la fórmula $V=1/3$ area basal x alçada.

4.4.5. Anàlisis estadístiques

El percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* i el creixement de les plantes s'analitzaren mitjançant ANOVA de dos factors fixos, amb sòl (Cabrls o La Bisbal) i competència (planta acompanyant inoculada amb *R. roseolus* o no) com a factors. Per a l'anàlisi de la quantitat de miceli extraradical, s'utilitzà un ANOVA de mesures repetides (als 3 i 6 mesos) amb sòl (Cabrls o La Bisbal), profunditat (0-10 cm o 10-20 cm) i competència (*R. roseolus* o no) com a factors. La cobertura inicial (com a estimació de la colonització radical) i el volum inicial s'inclogueren com a covariables en les anàlisis de colonització del *L. deliciosus* (micorrizes i miceli) i de volum final de les plantes, respectivament. Les diferències entre grups s'analitzaren amb el test de Tukey. Les relacions linears entre les variables de colonització fúngica s'analitzaren

mitjançant el coeficient de correlació de Pearson. Les variables es transformaren quan fou necessari. En tots els casos, els resultats es consideraren significatius amb un valor de $P < 0,05$. Les anàlisis es dugueren a terme amb el programa SAS[®] Enterprise Guide v 2.0.0.417 (SAS Institute Inc.)

4.5. RESULTATS

4.5.1. Colonització radical

El percentatge mitjà inicial de micorrizes, avaluat a desembre de 2004 per a cada lot d'inoculació, fou del $52,6 \pm 4,7$ % (mitjana \pm error estàndard) per a les plàntules de *P. pinea* inoculades amb *L. deliciosus* i de $75,2 \pm 3,3$ % per a les inoculades amb *R. roseolus*. La colonització radical de les plàntules inoculades amb *L. deliciosus* s'avaluà individualment per a cadascuna de les 24 plàntules utilitzades en l'experiment mitjançant la determinació de la cobertura micorrízica. La cobertura micorrízica mitjana per a les 24 plàntules fou de $1,33 \pm 0,11$ % equivalent a un percentatge de micorrizes de 58,67 %, segons la recta de regressió definida al capítol 3 (secció 3.4.2, pàgina 74). No es detectaren diferències significatives entre la colonització inicial de les plàntules establertes en els dos tipus de sòl o en els dos tractaments de competència.

Sis mesos després de l'establiment de l'experiment, el percentatge final de micorrizes de *L. deliciosus* fou significativament més alt en les plantes establertes en el sòl de La Bisbal que en les del sòl de Cabrils (taula 1). En canvi, no es detectaren diferències en el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* per efecte de la competència amb *R. roseolus* (taula 1), és a dir, el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* va ser equivalent independentment de si la planta acompanyant havia estat inicialment inoculada amb *R. roseolus* o no. La interacció entre els factors sòl i competència fou tot i així quasi significativa ($P=0,0586$). L'ANOVA per separat del factor competència en cadascun dels sòls mostrà un efecte quasi significatiu de la competència en els testos amb sòl de La Bisbal ($P=0,0717$), suggerint un percentatge de micorrizes més alt en absència de *R. roseolus* a la planta acompanyant. La transferència del fong *L. deliciosus* de la planta inicialment inoculada a la planta acompanyant situada davant seu es donà en sis de les 12 parelles en tots dos sòls. Tot i així, en els casos en què tingué lloc aquesta colonització creuada, el percentatge mitjà de micorrizes a la planta acompanyant fou significativament ($P=0,0467$) superior al sòl de La Bisbal (30,39 %) que al de Cabrils (4,41 %). D'altra banda, el nivell de colonització radical als sis mesos

de l'establiment de les plantes inicialment inoculades amb *R. roseolus* fou de 4,87 % en el sòl de Cabrils i de 19,60 % en el de La Bisbal, diferència que no fou significativa ($P=0,0813$). A la figura 3 es mostra l'aspecte dels testos al final de l'experiment i un detall de la colonització radical per part de cadascun dels dos fongs.

Taula 1. Resultats per a l'ANOVA de dos factors del percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* en les plàntules de *P. pinea* inoculades amb aquest fong, sis mesos després del seu trasplantament a testos. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatiu, $P<0,05$), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per a cada tractament. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre tractaments segons el test de Tukey ($P<0,05$). n.s.= no significatiu. N= 24

Factor (Font)	Valor P	Nivells	% micorrizes <i>L. deliciosus</i>
Sòl	0,0034	La Bisbal Cabrils	61,1 A 43,8 B
Competència	0,5114	<i>Rhizopogon</i> No (control)	50,7 A 54,1 A
Cobertura inicial (covariable)	0,5236		
Interaccions	n.s.		
	DF		
Model	7		
Error	16		
Total corregit	23		



Figura 3. Aspecte del sistema radical de les plantes extretes dels testos al final de l'experiment (imatges superiors) i detall de les arrels colonitzades per *L. deliciosus* (inferior esquerra) i *R. roseolus* (inferior dreta)

4.5.2. Quantificació del miceli extraradical de *L. deliciosus* mitjançant PCR en temps real

Es definiren les rectes patró per a la quantificació del miceli de *L. deliciosus* mitjançant la tècnica de PCR en temps real en els dos sòls (figura 4)

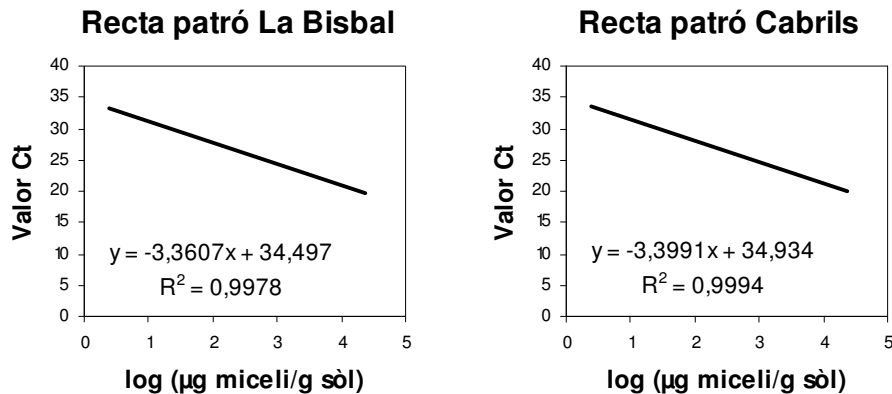


Figura 4. Rectes patró per a la quantificació de miceli extraradical de *L. deliciosus* mitjançant PCR en temps real per al sòl de La Bisbal (esquerra) i per al sòl de Cabrils (dreta) construïdes amb quantitats conegudes de miceli. Es mostra en cada cas l'equació utilitzada per a la interpolació de la quantitat de miceli de *L. deliciosus* present a les mostres problema a partir del valor de Ct obtingut.

No es detectà miceli extraradical de *L. deliciosus* en cap de les mostres de sòl corresponents als testos de Cabrils mentre que sí que es detectà i quantificà en les mostres corresponents al sòl de La Bisbal. La presència d'inhibidors de la PCR en el sòl de Cabrils es descartà ja que no hi hagué problemes en l'amplificació de les mostres d'aquest sòl amb miceli afegit utilitzades per construir la recta patró (figura 4).

El factor sòl, en conseqüència, s'excloué del model estadístic i es dugué a terme una anàlisi ANOVA de mesures repetides amb els resultats corresponents al sòl de La Bisbal. L'ANOVA mostrà diferències significatives per als factors temps de mostreig i profunditat (taula 2). En aquest sentit, el test de Tukey revelà que la biomassa de miceli extraradical detectada fou superior als tres mesos de l'establiment de l'experiment que als sis i superior també en els 10 primers cm de sòl que en la fracció dels 10 als 20 cm de profunditat. No s'observà cap efecte significatiu de la presència del competidor *R. roseolus* en la quantitat de miceli de *L. deliciosus*.

Taula 2. Resultats per a l'ANOVA de mesures repetides de la quantitat de miceli de *L. deliciosus* en les mostres de sòl de La Bisbal a dos temps de mostreig diferents i a dues profunditats. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatiu, $P < 0,05$) i les mitjanes per a cada tractament. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre tractaments segons el test de Tukey ($P < 0,05$). Les dades de biomassa miceliar i cobertura es transformaren ($\log+1$) prèviament a la seva anàlisi. n.s.= no significatiu. N= 24

Factor (Font)	Valor P	Nivells	Miceli ($\mu\text{g/g}$ sòl)
Temps de mostreig	0,0005	3 mesos	86,36 A
		6 mesos	9,41 B
Profunditat de sòl	0,0064	0-10 cm	64,54 A
		10-20cm	31,23 B
Competència	0,2614	Rhizopogon	23,34 A
		No (control)	72,43 A
Cobertura inicial (covariable)	0,3042		
Interaccions	n.s.		

Es detectà una correlació positiva significativa entre el percentatge final de micorrizes de *L. deliciosus* i la quantitat de miceli extraradical present en el sòl de La Bisbal en tots dos temps de mostreig (taula 3). En canvi, no es detectà correlació entre el miceli i la colonització inicial mesurada com a cobertura micorrizica (taula 3). Tampoc s'observà correlació entre la colonització radical final i inicial (mesurades com a percentatge de micorrizes i cobertura micorrizica, respectivament) ni a les mostres del sòl de La Bisbal ($R = -0,2576$; $P = 0,4190$) ni a les de Cabrils ($R = 0,1204$; $P = 0,7093$).

Taula 3. Correlacions entre la colonització radical de *L. deliciosus* (inicial, al trasplantament, mesurada com a cobertura micorrizica i final, sis mesos més tard, com a percentatge de micorrizes) i la biomassa de miceli extraradical (mesurada als tres i sis mesos després del trasplantament) en el sòl de La Bisbal. Es mostren els coeficients de correlació de Pearson (R) i el seu corresponent valor de significació (P). Les variables biomassa de miceli i cobertura es transformaren prèviament a l'anàlisi ($\log+1$). Els valors significatius ($P < 0,05$) es mostren en negreta.

	Miceli extraradical (La Bisbal)	
	3 mesos	6 mesos
Colonització inicial	R= -0,1774 P= 0,5812	R= -0,3473 P= 0,2686
Colonització final	R= 0,5848 P= 0,0458	R= 0,6235 P= 0,0303

4.5.3. Creixement

En el moment de l'establiment de l'experiment, les plàntules de *P. pinea* inoculades amb *L. deliciosus* presentaven una alçada mitjana de $29,6 \pm 0,5$ cm i un diàmetre de $4,7 \pm 0,07$ mm, resultant en un volum inicial mitjà de $1,7 \pm 0,06$ cm³. No es detectaren diferències en el volum inicial entre sòls o entre tractaments de competència.

Sis mesos després de l'establiment de l'experiment, el volum de les plantes establertes en els testos amb sòl de La Bisbal fou superior al de les plantes amb sòl de Cabrils, mentre que no es detectà cap efecte en el creixement en resposta a la presència de *R. roseolus* en la planta acompanyant (taula 4). No es detectà correlació entre el volum final de les plantes i el seu percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* ($R=0,2299$; $P=0,2798$)

Taula 4. Resultats de l'ANOVA de dos factors del creixement de les plàntules de *P. pinea* inoculades amb *L. deliciosus* sis mesos després del seu trasplantament a testos amb dos tipus de sòl. Es mostren els valors de P (en negreta quan significatius, $P<0,05$), DF (graus de llibertat) i les mitjanes per a cada tractament. Diferents lletres indiquen diferències significatives entre tractaments segons el test de Tukey ($P<0,05$). Les dades de volum es transformaren logarítmicament per a la seva anàlisi. n.s.= no significatiu. N=24

Factor (Font)	Valor P	Nivells	Volum final
Sòl	0,0003	La Bisbal Cabrils	9,00 A 6,16 B
Competència	0,6828	<i>Rhizopogon</i> No (control)	7,81 A 7,35 A
Volum inicial (covariable)	0,2369		
Interaccions	n.s.		
	DF		
Model	7		
Error	16		
Total corregit	23		

4.6. DISCUSSIÓ

La colonització radical de les plantes de *P. pinea* per part del fong *L. deliciosus* al final de l'experiment es va veure significativament afectada pel tipus de sòl utilitzat, amb un percentatge final de micorrizes més elevat a La Bisbal que a Cabrils, tot i que la

colonització inicial era equivalent, en consonància amb els resultats obtinguts al capítol 3. La competència amb *R. roseolus* no va tenir efecte significatiu en el percentatge final de micorrizes de *L. deliciosus* tot i que en les plantacions s'hagi observat que *R. roseolus* pot desplaçar a *L. deliciosus*. Aquest fet podria explicar-se per la forta disminució de la supervivència de *R. roseolus* en els testos, de manera que no pugui ser considerat com un competidor real en aquest experiment. Tot i així, en el sòl de La Bisbal (on la persistència de *R. roseolus* fou lleugerament més alta) la presència de *R. roseolus* en el test tingué un efecte negatiu quasi significatiu sobre el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* al final de l'experiment. La dràstica disminució del percentatge de micorrizes de *R. roseolus* en tots dos sòls fou un resultat inesperat ja que es tracta d'un fong abundant en les dues localitats on es va recollir el sòl. Aquesta disminució s'explica probablement pels problemes de compactació i entollament que es van donar en els testos, omplerts amb sòl tamisat i coberts a la base amb una reixa molt fina que no va deixar drenar l'aigua correctament. S'ha demostrat que la compactació del sòl pot afectar l'abundància d'arrels ectomicorríziques en algunes espècies de coníferes (Amaranthus et al. 1996). A més a més, la micorrizació sovint es veu inhibida en sòls amb un excés d'aigua, probablement per manca d'oxigen. Stenström (1991) va apuntar que diferents fongs ectomicorrízics tenen diferent grau de susceptibilitat a l'entollament i, en aquest sentit, Slankis (1974) va mostrar que la colonització de *Pinus radiata* amb *R. luteolus* disminuïa amb un excés d'aigua.

El miceli extraradical de *L. deliciosus* només es va detectar en el sòl de La Bisbal, tot i que el percentatge de micorrizes al final de l'experiment era relativament elevat en tots dos sòls. Novament, els resultats d'aquesta primera fase semblen indicar que el patró de distribució del miceli extraradical per a una mateixa espècie pot variar depenent de les característiques del sòl o les condicions, tal i com ja s'ha discutit al capítol 3. La disminució de la quantitat de miceli extraradical amb l'augment de la profunditat de mostreig concorda amb els resultats obtinguts per Dickie et al. (2002) i Genney et al. (2006), que van trobar més quantitat de miceli de *Lactarius* sp. en les capes superiors del sòl. La tendència a la disminució amb la profunditat podria també estar relacionada amb les condicions adverses provocades per la disminució d'oxigen cap a la base dels testos com a resultat de la compactació del sòl i l'entollament. La disminució de la biomassa de miceli dels tres als sis mesos podria estar relacionada amb l'envelliment del miceli o, novament, amb l'empitjorament de les condicions del sòl per compactació. Tot i així, les micorrizes no es van veure afectades així que aquest fet també es podria explicar per canvis estacionals en la producció de miceli com s'apunta a Wallander et al. (2001). La colonització creuada de *L. deliciosus* de la planta inoculada a

l'acompanyant en el sòl de Cabrils, tot i l'absència de miceli extraradical, podria explicar-se per contacte directe entre les arrels de les dues plantes (molt properes).

La manca d'un efecte significatiu de la competència amb *R. roseolus* en la biomassa de miceli extraradical de *L. deliciosus* a La Bisbal podria igualment explicar-se per la disminució de *R. roseolus* en els testos, tal i com hem suggerit per a la colonització radical. Tot i així, en les dades s'observa una disminució general de la quantitat de miceli extraradical de *L. deliciosus* en el sòl de La Bisbal quan competeix amb *R. roseolus*, disminució que és significativa si analitzem només les dades del mostreig als sis mesos (dades no mostrades). Per determinar si la biomassa de miceli extraradical o la persistència de les micorrizes de *L. deliciosus* es veuen realment afectades per la competència amb *R. roseolus* caldria repetir l'experiment amb una major pressió competitiva per part d'aquest fong.

La correlació significativa entre la quantitat de miceli extraradical i el percentatge final de micorrizes de *L. deliciosus* en el sòl de La Bisbal suggeriria que el primer paràmetre pot ser un bon indicador de la colonització radical en plantacions en camp en aquest sòl permetent així un mostreig no destructiu. No es detectà, en canvi, relació significativa entre la colonització radical inicial i la colonització final o la quantitat de miceli en el sòl indicant que, en aquestes condicions experimentals, la persistència del fong no va estar relacionada amb el nivell de colonització inicial. Tot i així, cal tenir en compte que totes les plàntules presentaven un nivell de colonització radical relativament elevat i uniforme a l'inici de l'experiment.

El creixement de les plàntules fou superior en els testos amb sòl de La Bisbal que amb sòl de Cabrils, tot i que les condicions de reg i ambientals foren les mateixes per a tots els testos i tot i que en camp els resultats foren oposats (capítol 3). Aquest resultat podria ser degut a l'efecte diferenciat de l'alliberament de nutrients en el procés d'autoclavat dels dos sòls. L'augment de nitrogen i fòsfor disponible després del procés d'autoclavat ha estat descrit per Serrasolsas i Khanna (1995a, 1995b). Tenint en compte que, en condicions normals, la quantitat disponible de fòsfor en el sòl de La Bisbal és inferior que en el de Cabrils (8 i 28 ppm, respectivament), l'efecte de l'augment d'aquest nutrient en el creixement podria ser més evident en les plantes que creixen en sòl de La Bisbal que en les que ho fan en sòl de Cabrils. A l'efecte de l'autoclavat també podria sumar-s'hi l'efecte d'una major proporció d'arrels micorríziques i producció de miceli extraradical en el sòl de La Bisbal, que incrementaria l'àrea d'absorció del sistema radical de les plantes (Leake et al. 2004)

En conclusió, podem dir que, en les condicions experimentals assajades, el factor sòl influeix de manera important en la persistència de les micorrizes i l'extensió del miceli extraradical de *L. deliciosus*. Per tal d'avaluar l'efecte real del competidor caldria evitar la compactació i entollament del sòl, que presumiblement haurien impedit el seu correcte desenvolupament. La segona fase de l'estudi sobre competència interespecífica es durà a terme directament en camp així com en testos però substituint la reixa de la base per grava que permeti un millor drenatge de l'aigua i amb sòl no autoclavat per poder comparar amb el sòl de plantació. De cara a aquesta segona fase, ens proposem introduir un nou competidor i utilitzar diferents soques de *L. deliciosus*. A més a més, es pretén quantificar el miceli de tots els fongs implicats (*L. deliciosus* i competidors) per obtenir una major informació i entendre millor les interrelacions entre aquests fongs.

Fase 2: Persistència de *L. deliciosus* en competència amb *R. roseolus* i *R. luteolus* en testos i en camp en dues localitats diferents

4.7. MATERIAL I MÈTODES

4.7.1. Inoculacions

Es produí inòcul vegetatiu de les soques 178, 312 i 330 de *L. deliciosus* (veure annex 1 per detalls de les seves característiques, pàgina 174) en ampolles de torba:vermiculita i s'utilitzà per inocular plàntules de *P. pinea* (lot 1581 origen ES06 Catalunya litoral, Ministerio de Medio Ambiente D.G. Biodiversidad, any de recol·lecció 1994-95), tal i com s'ha descrit al capítol 3 (seccions 3.4.1 i 3.4.2 de l'apartat de material i mètodes, pàgines 70-74). Per a les inoculacions amb *Rhizopogon* spp. s'utilitzaren espores procedents d'esporecarps recollits a l'octubre de 2004 a Tortosa (Baix Ebre, Tarragona) per a *R. roseolus* i a Massanes (La Selva, Girona) per a *R. luteolus*. Per a cada espècie, es prepararen suspensions d'espores en aigua a partir dels corresponents esporocarps secs, segons s'ha descrit a la fase 1 (secció 4.4.1 de material i mètodes, pàgina 117) i s'aplicaren en plàntules de *P. pinea* d'un mes a una dosi de 10^7 espores per planta. Totes les plantes s'inocularen al maig de 2005 i es

mantingueren a l'ombracle en les mateixes condicions de reg i fertilització que a la fase anterior. Es produïren també plàntules control, és a dir, no inoculades.

Al març de 2006, es determinà el nivell de colonització radical de *L. deliciosus* en les plantes a utilitzar mitjançant l'anàlisi de la foto corresponent, tal i com s'ha descrit al capítol 3 (secció 3.4.2 de l'apartat de material i mètodes, pàgina 71). En aquest cas, el codi de color utilitzat en el programari Adobe Photoshop Elements 2.0 fou el F29F46 amb una tolerància de 70, corresponent al color de les micorrizes madures de *L. deliciosus* en el moment en què es van prendre les fotografies. Per estimar el percentatge real de micorrizes de cada planta a partir de les dades de cobertura micorrízica s'utilitzà la recta definida en el capítol 3 ($y=14,40x+39,52$, pàgina 74). El percentatge mitjà de micorrizes en les plantes inoculades amb *Rhizopogon* spp. es determinà al març de 2006 per recompte d'un mínim de 200 puntes en 6 plantes preses a l'atzar de cada lot.

4.7.2. Disseny experimental

La fase 2 se subdividí en tres experiments, tots amb el mateix disseny i material vegetal i fúngic però en diferents condicions. El primer es dugué a terme a l'ombracle en testos, com en la fase 1 però només amb sòl de La Bisbal ja que en el sòl de Cabriels no es detectà miceli extraradical de *L. deliciosus*. En aquesta ocasió, se substituï la reixa fina de la base del test per grava (amb l'objectiu d'aconseguir un millor drenatge de l'aigua) i s'utilitzà sòl sense autoclavar. Els altres dos experiments es dugueren a terme directament en camp, en les dues localitats en què es recollí el sòl per a la primera fase, La Bisbal i Cabriels. Les característiques fisicoquímiques dels dos sòls s'han descrit al capítol 3 (secció 3.4.3 de material i mètodes, pàgina 74). El sòl es llaurà superficialment abans de l'establiment de la plantació en totes dues localitats.

El disseny de l'experiment consistí en parelles de plàntules de *P. pinea* de diferents tractaments trasplantades a una distància de 10 cm l'una de l'altra en les següents combinacions: *L. deliciosus*-*R. roseolus*, *L. deliciosus*-*R. luteolus*, *L. deliciosus*-control, control-*R. roseolus*, control-*R. luteolus*, control-control, cadascuna amb cinc rèpliques. Les combinacions inclogueren plantes inoculades amb les tres soques de *L. deliciosus* donant un total de 120 plantes (60 parelles, 12 combinacions x 5 rèpliques) trasplantades a cada sòl i als testos. Quan fem referència a la planta acompanyant

volem indicar la planta situada davant la planta inoculada amb *L. deliciosus*, que pot ser inoculada amb *R. roseolus*, *R. luteolus* o control.

Els experiments (camp i ombracle) es mantingueren durant vuit mesos, des del març fins al novembre de 2006. A les figures 5 i 6 es mostra l'establiment dels experiments en testos i en camp, respectivament. En camp, les parelles de plantes es distribuïren a l'atzar amb un marc de plantació d'1x1 m (figura 7). No es dugué a terme cap tractament de manteniment després de l'establiment de les plantacions. La precipitació acumulada i la temperatura mitjana durant el temps que les plantes van estar en camp fou de 225 mm i 19,2°C a Cabrils i de 378 mm i 19°C a La Bisbal. A l'ombracle, les plantes es regaren regularment i la temperatura mitjana fou la mateixa que la corresponent a la localitat de Cabrils.

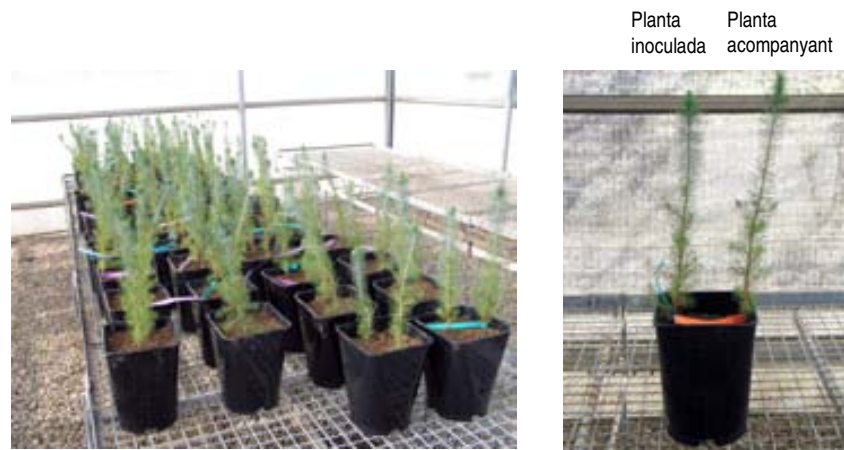


Figura 5. Disseny de l'experiment en testos



Figura 6. Establiment de l'experiment en condicions de camp a La Bisbal (esquerra) i a Cabrils (dreta)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6	312 - RI	178 - Rr	330 - C	C - C	Rr - C	330 - RI	RI - C	330 - Rr	178 - C	312 - C
5	330 - RI	312 - Rr	178 - RI	312 - C	330 - RI	178 - RI	Rr - C	312 - RI	312 - RI	RI - C
4	C - C	Rr - C	RI - C	178 - RI	312 - C	330 - Rr	178 - C	C - C	RI - C	Rr - C
3	312 - C	330 - Rr	312 - C	Rr - C	330 - C	312 - Rr	C - C	178 - Rr	178 - Rr	312 - RI
2	312 - Rr	330 - C	178 - C	RI - C	178 - Rr	178 - C	312 - Rr	178 - RI	312 - RI	330 - Rr
1	178 - C	178 - RI	330 - RI	312 - Rr	330 - Rr	330 - C	178 - Rr	330 - C	330 - RI	C - C

Figura 7. Plànol corresponent al disseny de l'experiment en camp per a les dues localitats. 312, 178, 330= plantes inoculades amb la soca corresponent de *L. deliciosus*; C= planta control, no inoculada; RI= planta inoculada amb *R. luteolus*; Rr=planta inoculada amb *R. roseolus*

4.7.3. Quantificació de la colonització fúngica

Passats vuit mesos, es determinà la colonització radical de les 120 plantes de cadascun dels tres experiments per recompte directe del percentatge d'arrels micorríziques. El miceli extraradical present en el sòl es quantificà per a cadascuna de les tres espècies fúngiques mitjançant PCR en temps real. Per realitzar el mostreig, es recolliren tres cilindres de sòl al mig de les dues plantes de cada parella utilitzant una sonda metàl·lica cilíndrica de 3 cm de diàmetre (figura 8). Per a cada parella es mesclà el sòl situat entre els 0 i 10 cm de profunditat dels tres cilindres amb l'objectiu de disminuir la variabilitat, s'assecà a l'estufa a 30°C i es tamisà a través d'un sedàs de 2 mm de diàmetre. Es prengué una submostra d'aquest sòl homogeneïtzat i s'emmagatzemà a -20°C fins al moment de processar-la.



Figura 8. Mostreig de sòl prenent 3 mostres al mig de cada parella de plantes utilitzant una sonda cilíndrica

L'extracció de DNA es dugué a terme tal i com s'ha descrit en la fase anterior. Les reaccions de PCR en temps real es dugueren a terme en un ABI PRISM[®]7900 Sequence Detection System utilitzant encebadors i sondes específics per a cadascun dels tres fongs. Per a *L. deliciosus* s'utilitzaren els encebadors i la sonda TaqMan[®]-MGB prèviament dissenyats (capítol 3, secció 3.4.4.2 de material i mètodes, pàgina 82). Per a *R. roseolus* i *R. luteolus* es dissenyaren encebadors i sondes TaqMan[®]-MGB específics a partir de l'anàlisi d'alineaments de seqüències de la regió ITS del rDNA de cadascuna de les espècies utilitzant el programa Primer Express[™] 2.0 (Applied Biosystems). L'especificitat dels oligonucleòtids dissenyats es comprovà realitzant una cerca de seqüències curtes similars (megablast) en la base de dades del GenBank. Les seqüències dels oligonucleòtids dissenyats es mostren a la taula 5.

Taula 5. Seqüències oligonucleotídiques dels encebadors i sondes dissenyats per a la detecció i quantificació de DNA de *R. roseolus* i *R. luteolus* mitjançant PCR en temps real.

	Nom	Funció	Seqüència
<i>R. roseolus</i>	FWD-Rro	encebador	TCGACTTTGCGGACAAG
	RVS-Rro	encebador	CATGCGCTTCAGCAAACG
	STQ-Rro	sonda	FAM – ATCATTATCACGCCGAAAG – MGB
<i>R. luteolus</i>	FWD-Rlu	encebador	TCTAGGATTCGAGCTCTCCTGAA
	RVS-Rlu	encebador	CCTTATCGCACAAAGTCGAAAGT
	STQ-Rlu	sonda	NED – CCCGCAAGCCAATGT – MGB

Inicialment, se seguí el protocol d'optimització de reaccions multiplex, és a dir, amb encebadors i sondes de diferents espècies en el mateix tub de reacció, per intentar detectar *L. deliciosus* i *R. roseolus* alhora en una sola reacció. Amb aquest objectiu s'escolliren fluoròfors compatibles per a les sondes TaqMan[®]-MGB (amb espectres òptics que no se solapessin) i es comprovà l'eficiència de les reaccions simplex (amb encebadors i sonda per a una sola espècie) en condicions universals. Posteriorment, es determinà la concentració limitant d'encebadors per a cada espècie, és a dir, la concentració mínima que no provoqui un canvi en el valor Ct per a una quantitat de DNA determinada. Aquest és un pas essencial per poder limitar la concentració d'encebadors per a l'espècie més abundant evitant així l'exhauriment dels reactius per a l'amplificació de l'espècie menys abundant. El darrer pas en el procés d'optimització consisteix en validar la reacció multiplex avaluant si l'eficiència d'aquesta reacció és similar a la de les respectives reaccions en simplex. La validació es fa determinant la relació entre la diferència de Ct entre la reacció duplex i la simplex (ΔCt) i la quantitat

de DNA (log µg miceli/g sòl en el nostre cas) i calculant el pendent d'aquesta recta. Si el pendent és inferior a 0,1 es considera que l'eficiència entre les dues reaccions és semblant mentre que si és superior ens indica que l'eficiència de la reacció multiplex disminueix respecte a la simplex a mesura que la quantitat de miceli és més petita. En el nostre cas però observarem que la concentració dels encebadors dissenyats per a *R. roseolus* no es pot limitar sense afectar significativament l'eficiència de l'amplificació, probablement perquè la necessitat d'especificitat va limitar l'elecció dels encebadors a una determinada zona de la ITS i el disseny proposat pel programa informàtic no fou l'òptim. El fet de no poder limitar l'amplificació de *R. roseolus* féu que en utilitzar una proporció de miceli de *R. roseolus* 100 vegades superior a la de *L. deliciosus* aquesta darrera espècie es detectés en les reaccions simplex però no en multiplex. Aquest resultat s'explica per una amplificació preferencial de *R. roseolus* i un conseqüent exhauriment de reactius per a l'amplificació de *L. deliciosus*. Tenint en compte que aquesta situació es pot donar en el nostre sistema experimental perquè *R. roseolus* és un fong molt comú en el sòl i té una estratègia d'exploració del miceli a llarga distància mentre que *L. deliciosus* pràcticament no s'estén (Agerer 2001), finalment totes les reaccions es dugueren a terme en simplex per evitar falsos negatius per a *L. deliciosus*.

Les reaccions de PCR en temps real es realitzaren amb el kit TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems). Les concentracions de treball per als oligonucleòtids foren de 800nM per als encebadors i de 100 nM per a la sonda de *L. deliciosus* i 200 nM per a les espècies de *Rhizopogon*. A cada reacció s'afegiren 5 µl d'una dilució 1:5 de l'extracte de DNA obtingut a partir de la mostra de sòl. Les reaccions s'ajustaren a un volum final de 25 µl amb aigua HPLC. Cada reacció es duqué a terme per triplicat i es calculà el Ct mitjà per a cada mostra de sòl. Es definiren rectes patró per a cadascuna de les tres espècies fúngiques en cadascun dels dos sòls utilitzant quantitats conegudes de miceli crescut en cel·lofana tal i com s'ha descrit en el capítol 3 per a *L. deliciosus* (secció 3.4.4.2 de material i mètodes, pàgina 82). La quantificació del miceli es realitzà mitjançant la interpolació del Ct obtingut per a cada mostra en la recta patró corresponent.

4.7.4. Creixement

Les plantes (inoculades amb *L. deliciosus* o controls) es mesuraren en alçada i diàmetre al inici i al final de l'experiment i es calculà el volum inicial i final per a cada

planta segons la fórmula $V=1/3$ àrea basal x alçada. Les plantes acompanyants no s'incloueren en aquesta anàlisi.

4.7.5. Anàlisis estadístiques

Els percentatges de micorrizes de les plantes inoculades amb *L. deliciosus* i la biomassa de miceli extraradical present en el sòl s'analitzaren per ANOVA de tres factors fixos amb el tipus d'experiment (Bisbal, Cabrils o testos), competència (*R. roseolus*, *R. luteolus* o control) i soca (312, 178 o 330) com a factors. La cobertura inicial s'incloué com a covariable en les anàlisis de colonització de *L. deliciosus*. Les dades del volum final de les plantes control i inoculades amb *L. deliciosus* s'analitzaren també mitjançant ANOVA amb els mateixos tres factors (incloent un nivell més per al factor soca: 312, 178, 330 o control) i amb el volum inicial com a covariable. Les diferències entre mitjanes per als factors que resultaren significatius en l'ANOVA s'analitzaren mitjançant el test de Tukey. Les relacions linears entre els percentatges de micorrizes i la biomassa de miceli per a les tres espècies fúngiques s'avaluaren mitjançant el coeficient de correlació de Pearson. Les variables es transformaren quan fou necessari. En tots els casos, els resultats es consideraren significatius amb un valor de $P < 0,05$. Les anàlisis es dugueren a terme amb el programa SAS[®] Enterprise Guide v 2.0.0.417 (SAS Institute Inc.)

4.7.6. Competència miceliar en placa

Es duqué a terme un experiment paral·lel per tal d'estudiar les relacions de creixement entre el miceli de les tres espècies fúngiques en condicions *in vitro*. Es prepararen plaques de cultiu amb 30 ml de medi BAF marcades a la base amb una línia que dividia la placa per la meitat i dues línies perpendiculars a aquesta separades per una distància de 3 cm dibuixant dues creus, tal i com es representa a la figura 9. Al centre de cada creu es col·locà un disc miceliar obtingut d'una colònia en creixement actiu establint diferents tractaments amb cinc repeticions cadascun: *L. deliciosus* – *L. deliciosus*, *R. roseolus* – *R. roseolus*, *R. luteolus* – *R. luteolus* (tractaments monoespècífics), *L. deliciosus* – *R. roseolus*, *L. deliciosus* – *R. luteolus*, *R. roseolus* – *R. luteolus* (tractaments d'interacció entre dues espècies). Es mesurà periòdicament el radi intern de les colònies, des del centre de la creu cap a la zona d'interacció amb l'altra colònia (figura 9). Els resultats de creixement s'analitzaren mitjançant ANOVA en funció de l'espècie i, per a cada espècie per separat, en funció del fong acompanyant.

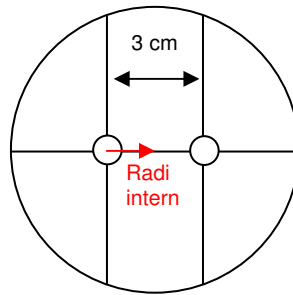


Figura 9. Esquema del disseny de les plaques per a l'experiment de competència miceliar

4.8. RESULTATS

4.8.1. Colonització radical

Es detectaren diferències significatives en la cobertura micorrízica inicial de les plantes inoculades amb *L. deliciosus* per als factors experiment i soca inoculada. En aquest sentit, el test de Tukey revelà que la cobertura micorrízica de les plantes inoculades amb la soca 178 (1,54 %) era inferior a la de les soques 312 (3,05 %) i 330 (2,63 %) i que la cobertura de les plantes utilitzades per a l'experiment de La Bisbal (1,54 %) era inferior a la de les establertes a Cabrils (2,65 %) o en testos (3,00 %). Tot i així, el percentatge inicial mitjà de micorrizes de *L. deliciosus*, inferit a partir de l'equació definida en el capítol anterior per a la correlació entre percentatge de micorrizes i cobertura micorrízica (pàgina 74), fou molt alt i se situà en tots casos entre el 62 i el 83 %. D'altra banda, el percentatge de colonització radical de les plantes inoculades amb *R. roseolus* i *R. luteolus* al trasplantament fou del $16,2 \pm 2,0$ % i de $63,5 \pm 10,1$ % respectivament.

En l'experiment establert en testos omplerts amb sòl de La Bisbal, vuit mesos després del trasplantament només es detectaren micorrizes de *L. deliciosus* en 11 de les 45 plantes inicialment inoculades amb aquest fong i en tots casos amb un percentatge de micorrizes per planta inferior al 5 %. Per a *R. luteolus*, el percentatge de micorrizes fou del $32,6 \pm 5,9$ % en les plantes acompanyants inicialment inoculades amb aquest fong i del $24,7 \pm 5,5$ % en les plantes situades davant d'aquestes (inoculades amb *L. deliciosus* o controls). Un total de 110 de les 120 plantes de l'experiment presentaren micorrizes de *R. roseolus* en el sistema radical, independentment del tractament inicial d'inoculació. Aquest fet fou atribuït a la presència d'inòcul natural de *R. roseolus* en el sòl utilitzat per omplir els testos (que en aquest experiment no estava prèviament

autoclavat). La identitat del fong nadiu contaminant es confirmà mitjançant extracció del DNA de les micorrizes, PCR de la regió ITS del rDNA, seqüenciació i posterior cerca de seqüències similars a la base de dades del GenBank. Aquest procés permeté confirmar, amb un 99 % de similitud, que la seqüència corresponia al fong *R. roseolus*. La presència de micorrizes formades per altres fongs nadius fou testimonial. El percentatge mitjà de micorrizes de *R. roseolus* (per a les 110 plantes colonitzades) fou de $39,54 \pm 1,90$ % i no es detectaren diferències significatives en funció del tractament inicial d'inoculació. Les dues espècies de *Rhizopogon* es distingiren morfològicament, tot i que la identitat de *R. luteolus* es confirmà també per extracció de DNA de puntes representatives, PCR de la regió ITS del rDNA i seqüenciació.

A la figura 10 es mostren micorrizes corresponents a les dues espècies fúngiques. Les micorrizes formades per *R. roseolus* són blanques, de superfície pubescent, es ramifiquen dicotòmicament d'una a quatre vegades i presenten rizomorfs abundants, blancs i enganxats a la base de la micorriza (Chu-Chou i Grace 1983). D'altra banda, les micorrizes corresponents a *R. luteolus* són de color crema o canyella de joves, després avellana, tenen la superfície llisa, solen ser sèssils, d'estructura coraloide i presenten rizomorfs abundants, delicats i de color beige (Chu-Chou i Grace 1983). Tenint en compte que en els testos el fong d'interès, *L. deliciosus*, pràcticament desaparegué, la quantificació del miceli present en el sòl no es dugué a terme i les dades d'aquest experiment s'excloueren de les anàlisis estadístiques globals de colonització.



Figura 10. Micorrizes corresponents al fong *R. luteolus* (esquerra) i a *R. roseolus* (dreta) en associació amb *P. pinea*.

En els experiments en camp, vuit mesos després del trasplantament el percentatge mitjà de micorrizes de *L. deliciosus* en les plantes inicialment inoculades amb aquest fong fou significativament superior en les plantes establertes a La Bisbal que en les de Cabrils (taules 6 i 7). En canvi, no es detectaren efectes significatius de la cobertura

inicial, de la soca inoculada o de la competència amb *R. roseolus* o *R. luteolus* ni interaccions (taula 6). La presència de micorrizes de *L. deliciosus* en la planta acompanyant, fruit de la colonització creuada des de la planta inoculada, es donà només en una de les parcel·les a Cabrils i en 20 a La Bisbal (del total de les 44 parcel·les que incloïen una planta inoculada amb aquest fong). El percentatge mitjà de micorrizes de *L. deliciosus* a La Bisbal fou significativament més alt ($P=0,0101$) en plantes acompanyants control (no inoculades) que en plantes acompanyants inicialment inoculades amb *R. luteolus* (12,10 % i 0,84 %, respectivament)

Les micorrizes corresponents als dos fongs competidors s'identificaren tal i com s'ha descrit per a l'experiment de testos. La presència d'inòcul natural de *R. roseolus* en les dues localitats féu que, al final de l'experiment, aproximadament el 60 % de les plantes presentessin micorrizes d'aquest fong independentment del tractament inicial d'inoculació. La identitat del fong nadiu contaminant es confirmà per tècniques moleculars tal i com s'ha descrit per als testos. El percentatge de micorrizes de *R. roseolus* en les plantes inicialment inoculades amb *L. deliciosus* fou superior a Cabrils que a La Bisbal (taules 6 i 7) mentre que no es detectaren diferències entre localitats en la colonització de *R. roseolus* per a les plantes control (percentatge mitjà= $17,9 \pm 4,6$ %)

Respecte a *R. luteolus*, no es detectaren micorrizes d'aquest fong en les plantes control de cap de les dues localitats, permetent així descartar la presència d'inòcul natural. El percentatge mitjà de micorrizes de *R. luteolus* en les plantes inicialment inoculades amb *L. deliciosus* que tenien una planta acompanyant amb micorrizes de *R. luteolus* (colonització creuada) fou significativament superior a Cabrils que a La Bisbal (taules 6 i 7). En canvi, no es detectaren diferències significatives entre localitats per al percentatge mitjà de micorrizes en les plantes acompanyants inicialment inoculades amb aquest fong (mitjana= $30,4 \pm 4,0$ %)

Taula 6. Taula ANOVA multifactorial amb els valors de P i DF (graus de llibertat) per a la colonització micorrízica de les plantes inicialment inoculades amb *L. deliciosus*, vuit mesos després del trasplantament a camp. En negreta s'assenyalen els valors de P considerats significatius ($P < 0,05$). La cobertura s'incloué com a covariable en el model d'anàlisi de la colonització de *L. deliciosus*. Prèviament a l'anàlisi, es dugué a terme una transformació angular de les dades de percentatge de micorrizes i logarítmica de la cobertura. n.s.= no significatiu

Factor (Font)	Colonització micorrízica		
	<i>L. deliciosus</i>	<i>R. roseolus</i> *	<i>R. luteolus</i>
	Valor P		
Localitat	0,0007	0,0073	0,0008
Competència	0,6615	0,2664	No avaluat**
Soca	0,1124	0,2934	0,3194
Cobertura inicial (covariable)	0,1699	---	---
Interaccions	n.s.	n.s.	n.s.
	DF		
Model	35	17	5
Error	51	69	23
Total corregit	86	86	28

*Les micorrizes corresponen al fong inoculat i al nadiu ja que no es poden distingir

** El percentatge de micorrizes de *R. luteolus* s'avaluà únicament en els casos en què la planta acompanyant estava inoculada amb *R. luteolus* (única font possible d'inòcul)

Taula 7. Percentatge mitjà de micorrizes en les plantes inicialment inoculades amb *L. deliciosus* vuit mesos després del trasplantament a camp per a aquells factors amb efecte significatiu en l'anàlisi ANOVA (veure taula 6). Les lletres diferents dins d'una determinada espècie mostren diferències significatives entre mitjanes segons el test de Tukey ($P < 0,05$)

Espècie fúngica	Localitat	% micorrizes
<i>L. deliciosus</i>	La Bisbal	37,11 A
	Cabrils	8,27 B
<i>R. roseolus</i>	La Bisbal	5,73 B
	Cabrils	20,15 A
<i>R. luteolus</i>	La Bisbal	1,78 B
	Cabrils	32,23 A

4.8.2. Quantificació del miceli extraradical mitjançant PCR en temps real

Es definiren les rectes patró per a la quantificació del miceli mitjançant PCR en temps real de cadascuna de les tres espècies fúngiques en els dos sòls (figura 11)

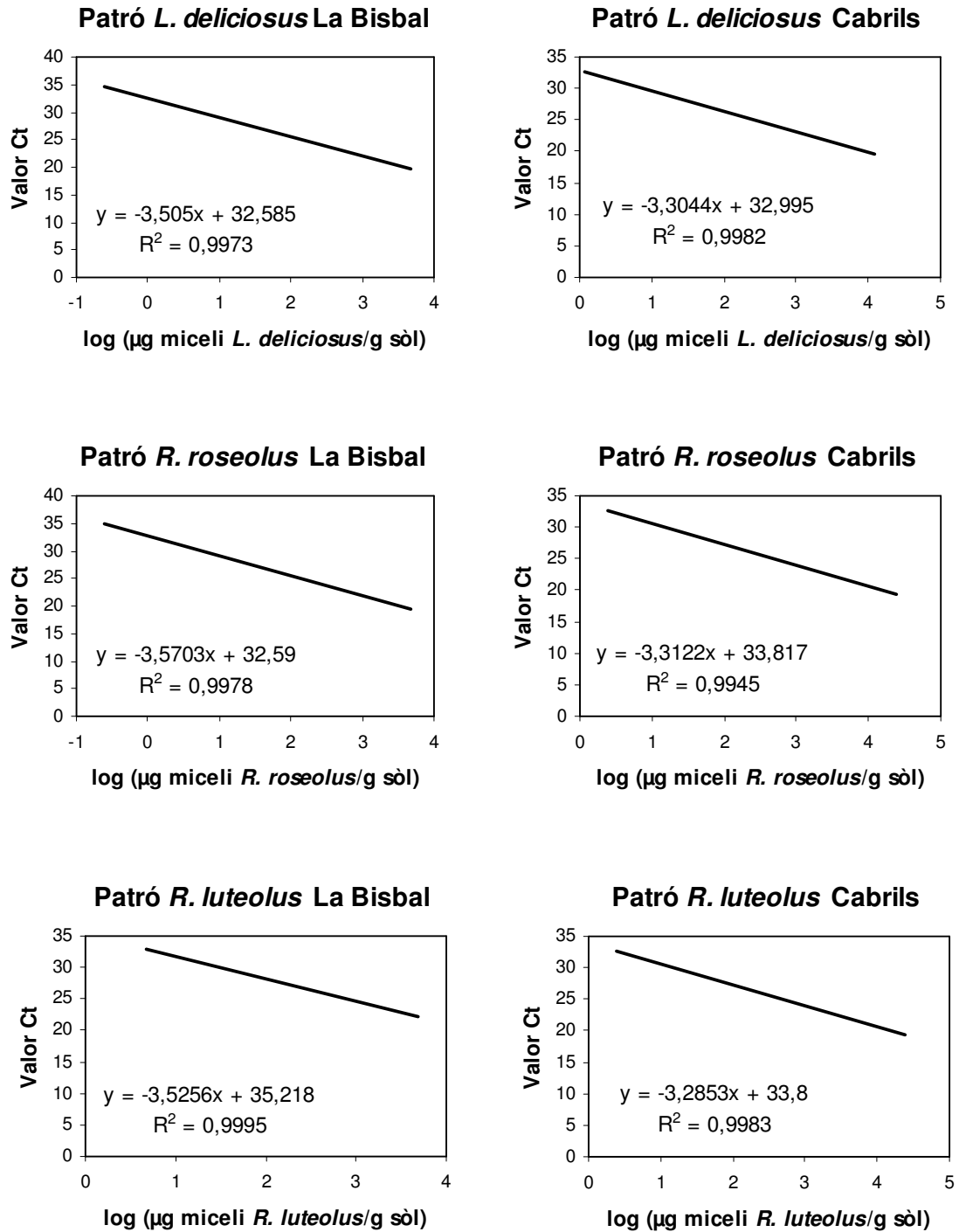


Figura 11. Rectes patró per al sòl de La Bisbal (esquerra) i per al sòl de Cabriels (dreta) construïdes per PCR en temps real a partir de quantitats conegudes de miceli per a les tres espècies fúngiques estudiades. Es mostra, en cada cas, l'equació utilitzada per a la interpolació de la quantitat de miceli present a les mostres problema a partir del valor de Ct obtingut en la reacció.

Es detectà miceli extraradical de *L. deliciosus* en 22 mostres de sòl de La Bisbal mentre que només en quatre de Cabriels. En conseqüència, el factor localitat fou exclòs del model estadístic i l'anàlisi del miceli extraradical de *L. deliciosus* es dugué a terme només amb les dades de La Bisbal. La biomassa mitjana de miceli de *L. deliciosus* a La Bisbal fou de $3,3 \pm 1,5$ µg miceli/g sòl. No es detectaren efectes significatius de la soca inoculada o de la competència amb *R. roseolus* o *R. luteolus* en la quantitat de miceli de *L. deliciosus* (taula 8). No es detectà miceli d'aquest fong en les mostres control, descartant així la presència d'inòcul natural en el sòl.

La biomassa mitjana de miceli extraradical de les espècies de *Rhizopogon* a La Bisbal fou de $42,0 \pm 20,3$ µg miceli/g sòl per a *R. roseolus* (mitjana de les 59 parelles de l'experiment) i $32,3 \pm 17,4$ µg miceli/g sòl per a *R. luteolus* (mitjana de les 19 parelles que tenien una planta inoculada amb aquest fong). La biomassa micel·liar de *Rhizopogon* spp. no es veié significativament afectada per cap dels factors analitzats (taula 8)

Taula 8. Taula ANOVA multifactorial amb els valors de P i DF (graus de llibertat) per a la biomassa micel·liar de *L. deliciosus*, *R. roseolus* i *R. luteolus* en les mostres de sòl recollides a La Bisbal, vuit mesos després del trasplantament a camp. En negreta s'assenyalen els valors de P considerats significatius ($P < 0,05$). La cobertura s'incloué com a covariable en el model d'anàlisi de la colonització de *L. deliciosus*. No es detectaren interaccions significatives. Prèviament a l'anàlisi, es dugué a terme una transformació logarítmica de les dades de biomassa i cobertura. n.s.= no significatiu

Factor (Font)	µg miceli/g sòl		
	<i>L. deliciosus</i>	<i>R. roseolus</i>	<i>R. luteolus</i>
	Valor P		
Competència	0,7258	0,2944	No avaluat*
Soca	0,6816	0,3258	0,7551
Cobertura inicial (covariable)	0,6635	---	---
Interaccions	n.s.	n.s.	n.s.
	DF		
Model	17	11	3
Error	26	47	15
Total corregit	43	58	18

* La biomassa de miceli extraradical de *R. luteolus* s'avaluà únicament en els casos en què la planta acompanyant estava inoculada amb *R. luteolus* (única font possible d'inòcul)

4.8.3. Relacions linears entre paràmetres de colonització fúngica (camp)

Les interaccions fúngiques s'analitzaren també mitjançant correlacions entre els paràmetres de colonització per a les tres espècies vuit mesos després del trasplantament, especialment pel fet que la presència de *R. roseolus* en el sòl de forma natural emmascarà l'efecte del factor competència en les anàlisis ANOVA. A les taules 9 i 10 es mostren els coeficients de Pearson per a les relacions analitzades entre espècies i dins de cada espècie, respectivament. A continuació es detallen els resultats per a les correlacions significatives.

Pel que fa a les relacions interespecífiques, es detectà una correlació negativa entre el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* i el de *R. roseolus* en les plantes inicialment inoculades amb *L. deliciosus* en les dues localitats (taula 9). A més a més, a la localitat de Cabrials el nivell de colonització micorrízica de *L. deliciosus* en les plantes inoculades amb aquest fong i el percentatge de micorrizes de *R. roseolus* en les plantes acompanyants també es correlacionaren negativament (taula 9). A La Bisbal, es detectà una correlació negativa entre la quantitat detectada de miceli extraradical de *L. deliciosus* i el percentatge de micorrizes de *R. roseolus* en la planta inicialment inoculada amb *L. deliciosus* (taula 9). No es mostren les correlacions entre *L. deliciosus* i *R. luteolus* perquè cap d'elles resultà significativa. En canvi, a la localitat de Cabrials, es detectà una correlació negativa entre els percentatges de micorrizes de *R. roseolus* i de *R. luteolus* tant en les plantes inoculades amb *L. deliciosus* com en les plantes acompanyants ($R = -0,7322$; $P = 0,0019$ i $R = -0,7964$; $P = 0,0004$, respectivament). La interpretació de les correlacions negatives entre la colonització per part de *L. deliciosus* o *R. luteolus* i la colonització per *R. roseolus* és que, en tots casos, *R. roseolus* és el fong que desplaça a l'altre.

Respecte a les correlacions dins de cada espècie, observem en primer lloc que a La Bisbal, els resultats per a la biomassa de miceli extraradical de *L. deliciosus* es correlacionaren positivament amb el percentatge de micorrizes de *L. deliciosus* en les plantes inicialment inoculades amb aquest fong (taula 10). En segon lloc, el percentatge de micorrizes de *R. roseolus* en les plantes inicialment inoculades amb *L. deliciosus* es correlacionà positivament amb el de les plantes acompanyants en totes dues localitats i amb la quantitat de miceli extraradical de *R. roseolus* en el sòl de La Bisbal (taula 10). Per últim, el percentatge de micorrizes de *R. luteolus* en les plantes acompanyants inoculades amb aquesta espècie es correlacionà positivament amb la biomassa de miceli extraradical de *R. luteolus* a La Bisbal i amb el percentatge de

micorrizes de *R. luteolus* en les plantes inicialment inoculades amb *L. deliciosus* a Cabrils (taula 10)

Taula 9. Coeficients de correlació de Pearson entre els paràmetres de colonització fúngica (% micorrizes i miceli) de *L. deliciosus* i *R. roseolus* a les dues localitats vuit mesos després del trasplantament a camp planta 1: planta inoculada amb *L. deliciosus*, planta 2: planta acompanyant). Es dugué a terme una transformació angular de les dades de percentatge de micorrizes i logarítmica per a la quantitat de miceli extraradical. Es mostren els valors significatius ($P < 0,05$). N=44 a La Bisbal i N= 43 a Cabrils. n.s. = no significatiu, - = no avaluat.

		LA BISBAL			CABRILS
		% micorrizes planta 1	% micorrizes planta 2	Quantitat miceli	% micorrizes planta 1
		<i>L. deliciosus</i>			<i>L. deliciosus</i>
% micorrizes planta 1	<i>R. ros</i>	-0.36	n.s.	-0.34	-0.46
% micorrizes planta 2		n.s.	n.s.	n.s.	-0.35
Quantitat miceli		n.s.	n.s.	n.s.	-

Taula 10. Coeficients de correlació de Pearson entre els paràmetres de colonització fúngica (micorrizes i miceli extraradical) per a cada espècie en les dues localitats vuit mesos després del trasplantament a camp (planta 1: planta inoculada amb *L. deliciosus*, planta 2: planta acompanyant). Es dugué a terme una transformació angular de les dades de percentatge de micorrizes i logarítmica per a la quantitat de miceli extraradical. Es mostren els valors significatius ($P < 0,05$). A La Bisbal, N=44 per a *L. deliciosus* i *R. roseolus*, i N=14 per a *R. luteolus*. A Cabrils, N= 43 i N= 15, respectivament. n.s. = no significatiu, - = no avaluat.

		LA BISBAL		CABRILS
		% micorrizes planta 2	Quantitat miceli	% micorrizes planta 2
		<i>L. deliciosus</i>		<i>L. deliciosus</i>
% micorrizes planta 1	<i>L. del</i>	n.s.	+0.43	-
% micorrizes planta 2		-	n.s.	-
		<i>R. roseolus</i>		<i>R. roseolus</i>
% micorrizes planta 1	<i>R. ros</i>	+0.42	+0.56	+0.82
% micorrizes planta 2		-	+0.75	-
		<i>R. luteolus</i>		<i>R. luteolus</i>
% micorrizes planta 1	<i>R. lut</i>	n.s.	n.s.	+0.74
% micorrizes planta 2		-	+0.77	-

4.8.4. Creixement

En el moment del trasplantament, les plantes control i inoculades amb *L. deliciosus* mesuraven de mitjana $35,8 \pm 0,3$ cm d'alçada i $4,4 \pm 0,03$ mm de diàmetre. No es detectaren diferències significatives en el volum inicial (mitjana= $1,8 \pm 0,03$ cm³) de les plantes per cap dels factors analitzats (experiment, soca o competència). Vuit mesos després del trasplantament, es detectaren diferències significatives en el volum final de les plantes en funció de l'experiment, tal i com es mostra a la taula 11. No es detectaren diferències significatives entre experiments per a l'alçada final però sí per al diàmetre (dades no mostrades), sent per tant aquest el paràmetre que explica les diferències en volum en aquest cas. Aquestes diferències es poden apreciar també a la figura 11. D'altra banda, s'analitzà la correlació entre volum inicial i volum final per explicar l'efecte significatiu de la covariable volum inicial. S'observà que existeix una dèbil correlació positiva entre les variables ($R=0,22$; $P=0,0028$) de manera que com més grans eren les plantes a l'inici més grans són també al final de l'experiment.

Taula 11. Valors P i DF per a l'ANOVA multifactorial del volum final de les plantes inoculades amb *L. deliciosus*, utilitzant el volum inicial com a covariable, i mitjanes per als diferents tractaments. En negreta s'assenyalen els valors de P considerats significatius ($P<0,05$). No es detectaren interaccions significatives. Les lletres diferents mostren diferències significatives entre tractaments analitzades pel test de Tukey ($P<0,05$). Les dades es transformaren prèviament a la seva anàlisi ($\log+1$)

Factor (Font)	P	Tractaments	Volum final (cm ³)
Experiment	<0,0001	Bisbal	3,45 C
		Cabrils	12,66 A
		testos	6,69 B
Competència	0,8867	<i>R. roseolus</i>	7,71 A
		<i>R. luteolus</i>	7,67 A
		Control	7,32 A
Soca	0,9394	312	6,76 A
		330	7,48 A
		178	7,48 A
		Control	8,52 A
Volum inicial (covariable)	0,0428		
Interaccions	n.s.		
	DF		
Model	71		
Error	105		
Total corregit	176		



Figura 12. Diferències de creixement de les plantes entre experiments: plantació a Cabrils (esquerra), plantació a La Bisbal (centre) i testos (dreta)

4.8.5. Competència micel·liar en placa

S'analitzaren les mesures del radi intern de les colònies als 19 dies de l'establiment de l'experiment, data en què s'observà que el creixement ja no variava. A la figura 13 es mostra l'aspecte de les plaques dels tractaments d'interacció entre dues espècies. L'ANOVA dels resultats permeté detectar diferències significatives en el radi intern de les colònies en funció de l'espècie fúngica mesurada (independentment que la colònia de davant fos de la mateixa o diferent espècie). En aquest sentit, el test de Tukey mostrà que el creixement fou superior en les colònies corresponents a les espècies de *Rhizopogon* (el màxim possible segons el disseny experimental, compartint placa amb una altra colònia) que en les corresponents a *L. deliciosus* (taula 12)



Figura 13. Creixement i aspecte de les colònies en els tractaments d'interacció entre espècies: *R. roseolus* – *L. deliciosus* (esquerra), *R. luteolus* – *L. deliciosus* (centre), *R. luteolus* – *R. roseolus* (dreta)

Taula 12. Valors P i DF per a l'ANOVA del radi intern de les colònies als 19 dies en placa en funció de l'espècie fúngica mesurada i mitjanes per als diferents tractaments (*L. deliciosus*, *R. roseolus* o *R. luteolus*). En negreta s'assenyalen els valors de P considerats significatius (P<0,05). Les lletres diferents mostren diferències significatives entre tractaments analitzades pel test de Tukey (P<0,05)

Factor (Font)	Valor P	Tractaments	Radi intern (cm)
Fong mesurat	<0,0001	<i>L. deliciosus</i>	0,81 B
		<i>R. roseolus</i>	1,57 A
		<i>R. luteolus</i>	1,57 A
DF			
Model	2		
Error	57		
Total corregit	59		

No es detectaren diferències significatives en el creixement de les colònies de *L. deliciosus* (mesurat com el radi intern als 19 dies) en funció del fong acompanyant (taules 13 i 14). En canvi, sí que es detectaren diferències per a les dues espècies de *Rhizopogon* (taula 13). El test de Tukey mostrà un creixement superior de les colònies de *Rhizopogon* al compartir la placa amb una colònia de *L. deliciosus* que amb una altra de *Rhizopogon* (taula 14)

Taula 13. Valors P i DF per a l'ANOVA del radi intern de les colònies als 19 dies en placa per a cada espècie en funció de l'espècie fúngica acompanyant. En negreta s'assenyalen els valors de P considerats significatius (P<0,05)

Factor (Font)	Fong mesurat		
	<i>L. deliciosus</i>	<i>R. roseolus</i>	<i>R. luteolus</i>
	Valor P		
Fong acompanyant	0,8416	<0,0001	<0,0001
DF			
Model	2	2	2
Error	17	17	17
Total corregit	19	19	19

Taula 14. Radi intern mitjà de les colònies per a cadascuna de les tres espècies en funció de l'espècie fúngica acompanyant 19 dies després de l'establiment de l'experiment. Les lletres diferents dins d'una determinada espècie mesurada mostren diferències significatives entre mitjanes segons el test de Tukey ($P < 0,05$)

Fong mesurat	Fong acompanyant	Radi intern (cm)
<i>L. deliciosus</i>	<i>L. deliciosus</i>	0,79 A
	<i>R. roseolus</i>	0,82 A
	<i>R. luteolus</i>	0,84 A
<i>R. roseolus</i>	<i>L. deliciosus</i>	1,97 A
	<i>R. roseolus</i>	1,45 B
	<i>R. luteolus</i>	1,39 B
<i>R. luteolus</i>	<i>L. deliciosus</i>	1,89 A
	<i>R. roseolus</i>	1,53 B
	<i>R. luteolus</i>	1,42 C

4.9. DISCUSSIÓ

La persistència de les micorrizes i l'extensió del miceli extraradical de *L. deliciosus* foren significativament diferents en els tres experiments, independentment de què els percentatges inicials de colonització foren en tots casos superiors al 60 %, percentatge clarament per sobre del 33 % suggerit com a acceptable per al trasplantament a camp segons Wang i Hall (2004). La desaparició de *L. deliciosus* en els testos amb sòl de La Bisbal contrasta amb els resultats obtinguts a la fase 1, en què sí es mantingué en el mateix sòl. Aquesta diferència s'atribueix al fet que probablement les condicions adverses d'entollament en els testos de la fase 1 crearen una situació d'anoxia que frenà l'expansió de *R. roseolus* permetent així la persistència de *L. deliciosus* (que es mostraria més tolerant a l'excés d'aigua o manca d'oxigen). En canvi, a la fase 2, el millor drenatge dels testos i la presència d'inòcul natural de *R. roseolus* afavoriren l'expansió d'aquest fong, que desplaçà totalment a *L. deliciosus*.

Pel que fa als experiments en camp, els resultats de persistència i extensió del fong *L. deliciosus* concorden amb els obtinguts en testos a la fase 1 així com amb els de les plantacions del capítol 3. El percentatge final de micorrizes de *L. deliciosus* fou més alt a La Bisbal que a Cabriels, tot i que la colonització inicial fos lleugerament inferior en les plantes trasplantades a la primera localitat. El percentatge de micorrizes de *Rhizopogon* spp. fou més alt a Cabriels que a La Bisbal en les plantes inicialment inoculades amb *L. deliciosus* però no en les plantes control. Aquests resultats

suggereixen que el nivell de colonització de *Rhizopogon* spp. depèn del nombre d'arrels disponibles sense colonitzar que quedin en les plantes inoculades amb *L. deliciosus* després de l'establiment en camp, independentment de la localitat, el tractament d'inoculació o el de competència. La persistència de micorrizes de *L. deliciosus* en el sòl de La Bisbal en condicions de camp, però no en testos, podria explicar-se també pel fet que les plantes en testos presentaven un sistema radical molt més desenvolupat (veure figura 12) amb un major nombre de puntes sense colonitzar disponibles per a *R. roseolus*, que s'estén més que *L. deliciosus*. A més a més, també podria intervenir-hi el fet que les condicions de reg permanent en l'experiment en testos podrien afavorir la ràpida expansió de *R. roseolus* en detriment de *L. deliciosus*. En aquest sentit, en altres experiències en testos, hem observat que sotmetre les plantes a sequera podria afavorir la persistència de *L. deliciosus* en l'arrel ja que, probablement, la manca d'aigua frenaria l'expansió del fong *R. roseolus*. Aquests resultats mostren la diversitat d'interpretacions que poden derivar d'experiments realitzats en condicions controlades en relació a les plantacions en camp.

L'aplicació de la PCR en temps real a partir d'extraccions de DNA de les mostres de sòl ha permès la detecció específica i quantificació del miceli de *L. deliciosus*, *R. roseolus* i *R. luteolus* en els dos sòls. El nivell de sensibilitat fou similar per a totes les rectes patró, obtenint un valor Ct en la darrera dilució al voltant de 34 per a les tres espècies fúngiques en els dos sòls (límit de detecció a 0,48 µg miceli/g sòl). En aquest treball, l'eficiència en l'extracció de DNA del sòl per a una determinada espècie fou similar entre els dos sòls analitzats, fent que les rectes patró també fossin similars. Tot i així, les diferències foren lleugerament superiors en el cas de les dues espècies de *Rhizopogon*, fet que s'explicaria per diferències en l'eficiència d'extracció dels corresponents micelis.

El miceli extraradical de les dues espècies de *Rhizopogon* es detectà en els dos sòls mentre que el de *L. deliciosus* només es detectà en el sòl de La Bisbal i la colonització creuada de la planta acompanyant només s'observà en aquest sòl. Aquests resultats de camp concorden amb els resultats obtinguts en testos a la fase 1 i en camp a les plantacions (capítol 3) i, novament, reforcen la idea que el patró de distribució del miceli extraradical per a un determinat fong pot variar depenent de les condicions del sòl, tal i com ja s'ha discutit. La colonització creuada de la planta acompanyant per part de *L. deliciosus* a La Bisbal fou més alta en plantes control que en plantes inoculades amb *R. luteolus*, probablement perquè aquestes últimes presentaven menys arrels lliures. No es detectaren diferències entre les tres soques avaluades per al percentatge

de micorrizes o l'extensió del miceli de *L. deliciosus* en el sòl de La Bisbal, probablement perquè presentaven un nivell de colonització inicial mitjà similar i elevat. Aquest resultat contrasta amb els obtinguts en les plantacions en camp (capítol 3) però cal tenir en compte que en aquest experiment de competència partíem de plantes amb uns percentatges de colonització inicial molt alts per a les tres soques avaluades.

Els resultats de correlació suggereixen que no hi ha interacció entre el miceli extraradical de les tres espècies però, de nou, sí que existeix competència per la colonització micorrízica de les arrels lliures. A La Bisbal, els paràmetres de colonització de *L. deliciosus* es correlacionaren de forma negativa amb el percentatge de micorrizes de *R. roseolus* en les plantes inicialment inoculades amb *L. deliciosus*, suggerint que la interacció negativa entre aquestes dues espècies fúngiques es dona només quan competeixen directament per arrels no colonitzades. No es detectaren relacions significatives entre els fongs *L. deliciosus* i *R. luteolus* en cap de les dues localitats. Tenint en compte que els percentatges finals de micorrizes en les plantes acompanyants eren similars per a les dues espècies de *Rhizopogon* en les dues localitats, aquests resultats suggereixen que les dues espècies exerceixen una pressió competitiva diferent sobre la persistència de *L. deliciosus*. Tot i que l'establiment en camp d'una planta inoculada amb una determinada espècie fúngica probablement augmenta la competitivitat del fong introduït respecte als fongs nadius (Selosse et al. 1998), la persistència de les micorrizes de *L. deliciosus* en aquest estudi es correlacionà negativament amb l'abundància de *R. roseolus* en totes dues localitats.

L'absència de correlacions entre el miceli extraradical de les tres espècies concorda amb els resultats de l'experiment de competència miceliar en placa, que mostraren que no hi ha inhibició del creixement entre les tres espècies. En l'estudi de Wu et al. (1999), en canvi, es detectà inhibició de l'extensió miceliar de *Pisolithus tinctorius* per part d'un fong ectomicorrízic no identificat anomenat Tanashi 01. Tot i que en el nostre cas no es detectà una inhibició directa, les diferències en la capacitat d'exploració miceliar clarament fan de *R. roseolus* un millor competidor enfront de *L. deliciosus*, de manera semblant al que se suggereix a Kennedy et al. (2007a) per a *R. salebrosus* A.H. Sm. i *R. occidentalis* Zeller et C.W. Dodge. El major creixement de les colònies de *Rhizopogon* quan comparteixen la placa amb *L. deliciosus* es pot explicar pel fet que tenen més espai disponible en la placa ja que aquest segon fong té un creixement més lent, i reforça la idea de que *Rhizopogon* pot ser millor competidor gràcies al seu ràpid i extens creixement. La coexistència de *R. roseolus* i *L. deliciosus* en forma de miceli i la seva segregació en forma de micorrizes concorda amb els resultats observats a

Genney et al. (2006) per a *Cortinarius* sp. i *Lactarius rufus*, suggerint competència per les arrels lliures entre els dos fongs.

Els patrons observats per al miceli de les tres espècies estudiades concorda en gran part amb la classificació en tipus d'exploració definida per Agerer (2001) tot i que la detecció de miceli extraradical de *L. deliciosus* en el sòl de La Bisbal pugui ser un resultat poc esperat per a un fong amb un tipus d'exploració definida per contacte i, per tant, molt limitada, tal i com ja s'ha discutit en el capítol 3. Podem descartar la sobrestimació de miceli deguda a l'amplificació de DNA procedent d'espores de *L. deliciosus* i *R. luteolus* en les dues localitats ja que aquestes dues espècies no es detectaren en les mostres de sòl corresponents al tractament control (entre dues plantes no inoculades). La presència, però, d'inòcul natural de *R. roseolus* en els dos sòls fa que no puguem excloure totalment la possibilitat d'amplificació de DNA d'espores en el cas d'aquest fong. Tot i així, el mostreig es dugué a terme quan no hi havia esporocarps. La correlació positiva entre la quantitat de miceli detectada en el sòl i el percentatge de micorrizes de l'arrel per a les tres espècies fúngiques fa que el primer paràmetre pugui ser considerat com a alternativa no destructiva per al seguiment del fong en camp. Caldrà però tenir en compte que el miceli del fong a estudiar s'extengui en el sòl on s'estableix la plantació i donar-li prou temps per fer-ho. En aquest sentit, seria d'esperar que en els propers mostrejors de la microparcel·la de La Bisbal (capítol 3) es pogués també detectar aquesta correlació per als paràmetres de colonització fúngica de *L. deliciosus*.

Pel que fa al creixement de les plantes, novament la localitat fou l'únic factor que ocasionà diferències significatives. En aquest cas però, les plantes en camp trasplantades a la parcel·la de Cabrils mostraren un volum final superior al de les trasplantades a La Bisbal, resultat contrari a l'obtingut en testos a la primera fase però en consonància amb els resultats de camp del capítol 3. El creixement de les plantes en testos amb sòl de La Bisbal presentà un creixement intermedi i, en aquesta ocasió, inferior al dels testos corresponents a la fase 1, tot i que l'experiment es va mantenir dos mesos més. Aquesta diferència entre les dues fases s'explicaria per la major disponibilitat de nutrients en els testos de la primera fase a causa del procés d'autoclavat a què es va sotmetre el sòl (Serrasolsas i Khanna 1995a, 1995b). Aquests resultats recolzen la idea que els experiments en condicions controlades no sempre reproduïen les condicions reals.

En conclusió, la persistència de les estructures vegetatives de *L. deliciosus* es veu significativament afectada per la localitat en què s'estableix l'experiment. La correlació positiva entre la biomassa miceliar i el percentatge de micorrizes observada per a les tres espècies fúngiques en el sòl de La Bisbal fa que la biomassa miceliar pugui ser considerada un bon indicador de la colonització radical d'aquestes espècies en les condicions experimentals establertes. Aquest és un resultat interessant de cara a la gestió de plantacions productives ja que permet avaluar la persistència del fong en camp mitjançant un mostreig no destructiu. D'altra banda, en aquest cas, la quantificació del miceli extraradical no constitueix una bona aproximació per estudiar les interaccions fúngiques interespecífiques ja que la competència té lloc a nivell de formació de micorrizes en el sistema radical.

V. CONCLUSIONS

1. S'ha establert i caracteritzat una col·lecció de cultius purs de *Lactarius* spp. a partir d' esporocarps recol·lectats en diferents localitats i espècies associades.
2. Les 25 soques de *L. deliciosus* provades en síntesi en cultiu pur presentaren diferent capacitat de colonització de les arrels de *P. pinaster*. El número de micorrizes formades en aquestes condicions experimentals estigué correlacionat negativament amb el temps en cultiu de la soca inoculada i positivament amb la formació de rizomorfs.
3. S'han dissenyat encebadors i sondes específics per a la identificació molecular de *L. deliciosus* mitjançant amplificació per PCR de la regió ITS del rDNA de diferents soques de *Lactarius* spp., seqüenciació dels fragments amplificats i alineament de les seqüències obtingudes.
4. L'encebador específic dissenyat LDITS2R en combinació amb l'encebador universal ITS1 ha permès la identificació específica del fong *L. deliciosus* per PCR a partir de DNA obtingut de miceli en cultiu pur, micorrizes i miceli extraradical present en el sòl.
5. L'anàlisi SSCP dels productes de PCR específics de *L. deliciosus* féu possible la caracterització de les 18 soques analitzades en nou grups diferents malgrat l'escassa variabilitat intraespecífica de la regió ITS. La tècnica s'ha aplicat amb èxit en la identificació a nivell de soca de micorrizes i miceli extraradical en plantacions establertes amb planta inoculada amb *L. deliciosus*.
6. El sistema de determinació de la cobertura micorrízica mitjançant l'anàlisi de fotografies digitals ha permès una caracterització ràpida i acurada de la colonització radical de plantes inoculades amb *L. deliciosus* de manera individualitzada i no destructiva.

7. La PCR en temps real utilitzant els encebadors i sonda dissenyats en aquest treball permeté la quantificació específica del miceli extraradical de *L. deliciosus* present a la rizosfera de plantes micorrizades establertes en dues localitats diferents. La tècnica es posà també a punt per a la quantificació de potencials competidors ectomicorrízics del gènere *Rhizopogon*, presents en la zona d'estudi.
8. La persistència en camp de les micorrizes de *L. deliciosus* i l'extensió del seu miceli extraradical en el sòl mostraren diferències significatives en les dues localitats estudiades i per a les diferents soques introduïdes, mentre que no es veieren afectades pel nivell de colonització radical inicial.
9. La persistència de les micorrizes de *L. deliciosus* en camp es veié negativament afectada per la presència de *R. roseolus* a la zona. Els resultats suggeriren que la competència entre aquests dos fongs es dona a nivell del sistema radical per la colonització de les arrels lliures mentre que no hi ha interacció negativa a nivell de miceli en el sòl.
10. La quantitat de miceli detectada en el sòl i el percentatge de micorrizes de l'arrel es correlacionaren positivament per a les tres espècies fúngiques. En les condicions en què es produeix miceli extraradical, aquest paràmetre pot ser considerat com a indicador del grau de colonització de la planta permetent un seguiment no destructiu del fong en camp.
11. L'aplicació de les tècniques posades a punt en aquest treball ha de facilitar el seguiment en camp de la persistència de soques seleccionades de *L. deliciosus* en programes de micorrizació controlada per a la producció de fongs comestibles.

BIBLIOGRAFIA

Agerer, R. (2001). Exploration types of ectomycorrhizae. A proposal to classify ectomycorrhizal mycelial systems according to their patterns to differentiation and putative ecological importance. *Mycorrhiza* 11, 107-114

Agerer, R. (2006). Fungal relationships and structural identity of their ectomycorrhizae. *Mycol Prog* 5, 67-107

Albee, S.R., Mueller, G.M., i Kropp, B.R. (1996). Polymorphisms in the large intergenic spacer of the nuclear ribosomal repeat identify *Laccaria proxima* strains. *Mycologia* 88, 970-976

Álvarez, A., Díaz, L., i Oria de Rueda, J.A. (2000). Valoración de la producción conjunta madera-setas. Aplicación al caso de la carballeda (Zamora). *Documento interno*. ETS Ingenierías Agrarias, Palencia

Amaranthus, M.P., Page-Dumroese, D., Harvey, A., Cazares, E., i Bednar, L.F. (1996). *Soil compaction and organic matter affect conifer seedling nonmycorrhizal and ectomycorrhizal root tip abundance and diversity*. Res Pap PNW-RP-494. Portland, OR, USDA For Serv, Pacific Northwest Res Stat, 12 pp.

Amersham Biosciences (GE Healthcare). (2005). *SSCP*. Recuperat abril 2005, des de www1.amershambiosciences.com

Amicucci, A., Potenza, L., Guidi, C., Rossi, I., Bertini, L., Zambonelli, A., i Stocchi, V. (2001). Molecular techniques for the identification of edible mycorrhizal mushrooms. Dins Hall, I., Wang, Y., Danell, E., i Zambonelli, A. (eds) *Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, 3-6 July, New Zealand

Amicucci, A., Zambonelli, A., Giomaro, G., Potenza, L., i Stocchi, V. (1998). Identification of ectomycorrhizal fungi of the genus *Tuber* by species-specific ITS primers. *Molecular Ecology* 7, 273-277

Anderson, I.C., i Cairney, J.W.G. (2004). Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ Microbiol* 6 (8), 769-779

Anderson, I.C., i Cairney, J.W.G. (2007). Ectomycorrhizal fungi: exploring the mycelial frontier. *FEMS Microbiol Rev* 31, 388-406

Anderson, J.B., i Stasovski, E. (1992). Molecular phylogeny of Northern Hemisphere species of *Armillaria*. *Mycologia* 84, 505-516

Applied Biosystems (2002). *TaqMan® Universal PCR Master Mix*. Protocol. Recuperat 2002, des de www.appliedbiosystems.com

Applied Biosystems (2004). *Essentials of real-time PCR*. Recuperat juny 2004, des de http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/essentials_of_real_time_pcr.pdf

- Arnolds, E. (1995). Conservation and management of natural populations of edible fungi. *Can J Botany* 73 (suppl 1), S987-S998
- Baldwin, B.G. (1992). Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the *Compositae*. *Mol Phylogenet Evol* 1, 3-16
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., i Donoghue, M.J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Ann Mo Bot Gard* 82, 247-277
- Beidler, L.L., Hilliard, P.R., i Rill, R.L. (1982). Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem* 126, 374-380
- Bledsoe, C.S., Tennyson, K., i Lopushinsky, W. (1982). Survival and growth of outplanted Douglas-fir seedlings inoculated with mycorrhizal fungi. *Can J Forest Res* 12(3), 720-723
- Boa, E. (ed.) (2004). *Wild edible fungi. A global overview of their use and importance to people. Non wood forest products N° 17*, FAO, Rome, 147 pp
- Bonello, P., Bruns, T.D., i Gardes, M. (1998). Genetic structure of a natural population of the ectomycorrhizal fungus *Suillus pungens*. *New Phytol* 138, 533-542
- Bonet, J.A. (2001). *Gestión de recursos micológicos: aprovechamientos silvestres y plantaciones*. Tesis doctoral. Universitat de Lleida
- Bownlee, C., Duddridge, J.A., Malibari, A., i Read, J. (1983). The structure and function of mycelial systems of ectomycorrhizal roots with special reference to their role in forming inter-plant connections and providing pathways for assimilate and water transport. *Plant Soil* 71, 433-444
- Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T., i Malajczuk, N. (1996). *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. ACIAR Monograph 32, Canberra, 374 pp.
- Bruns, T.D., i Gardes, M. (1993). Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suillod fungi. *Mol Ecol* 2, 233-242.
- Bruns, T.D., i Shefferson, R.P. (2004). Evolutionary studies of ectomycorrhizal fungi: recent advances and future directions. *Can J Botany* 82, 1122-1132.
- Bruns, T.D., White, T.J., i Taylor, J.W. (1991). Fungal molecular systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 22, 525-564
- Cairney, J.W.G. (2005). Basidiomycete mycelia in forest soils: dimensions, dynamics and roles in nutrient distribution. *Mycol Res* 109 (1), 7-20
- Carrillo, C., Díaz, G., i Honrubia, M. (2004). Improving the production of ectomycorrhizal fungus mycelium in a bioreactor by measuring the ergosterol content. *Eng Life Sci* 4, 43-45

- Castellano, M.A. (1996). Outplanting performance of mycorrhizal inoculated seedlings. Dins Mukerji, K.G. (ed.). *Concepts in Mycorrhizal Research*. Kluwer Academic Publications. The Netherlands, pp. 223-301
- Castellano, M.A., i Molina, R. (1989). Mycorrhizae. Dins Landis, T.D., Tinus, R.W., McDonald, S.E., i Barnett, J.P. (eds.). *The container tree nursery manual, vol 5*. Agricultural Handbook 674. Washington, DC, USDA Forest Service, pp. 101-167
- Chakravarty, P., i Unestam, T. (1987). Differential influence of ectomycorrhizae on plant growth and disease resistance in *Pinus sylvestris* seedlings. *J Phytopathol* 120, 104-120
- Chen, D.M., i Cairney, J.W.G. (2002). Investigation of the influence of prescribed burning on ITS profiles of ectomycorrhizal and other soil fungi at three Australian sclerophyll forest sites. *Mycol Res* 106, 532-540
- Chen, W., Hoy, J.W., i Schneider, R.W. (1992). Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *Pythium* species. *Exp Mycol* 16, 22-34
- Chevalier, G., i Frochot, H. (1997). La maîtrise de la culture de la truffe. *Rev For Fr XLIX-n° sp*, 201-213
- Chu-Chou, M., i Grace, L.J. (1983). Characterization and identification of mycorrhizas of Douglas-fir in New Zealand. *Eur J For Pathol* 13, 251-260
- Danell, E. (1997). Les progress dans la maîtrise de la culture de la Chantarelle, *Cantharellus cibarius*. *Rev For Fr XLIX-n° sp*, 214-221
- De Román, M., Claveria, V., i de Miguel, A. (2005). A revision of the descriptions of ectomycorrhizas published since 1961. *Mycol Res* 109, 1063-1104
- Di Battista, C., Bouchard, D., Martin, F., Genere, B., Amirault, J.M., i LeTacon, F. (2002). Survival after outplanting of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N inoculated on Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco) cuttings. *Ann For Sci* 59, 81-92
- Di Battista, C., Selosse, M.A., Bouchard, D., Stenström, E., i LeTacon, F. (1996). Variations in symbiotic efficiency, phenotypic characters and ploidy level among different isolates of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* strain S 238. *Mycol Res* 100, 1315-1324
- Dickie, I.A., Xu, B., i Koide, R.T. (2002). Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soil as shown by T-RFLP analysis. *New Phytol* 156, 527-535.
- Duddridge, J.A. (1986). The development and ultrastructure of ectomycorrhizas. III. Compatible and incompatible interactions between *Suillus grevillei* (Klotzsch) Sing. and 11 species of ectomycorrhizal hosts *in vitro* in the absence of exogenous carbohydrate. *New Phytol* 103, 457-464
- Duddridge, J.A., Malibari, A. i Read, D.J. (1980). Structure and function of mycorrhizal rhizomorphs with special reference to their role in water transport. *Nature* 287, 834-836

- Duñabeitia, M.K., Hormilla, S., Salcedo, I. i Peña, J.I. (1996). Ectomycorrhizae synthesized between *Pinus radiata* and eight fungi associated with *Pinus* spp. *Mycologia* 88, 897-908
- Edel, V. (1998). Polymerase chain reaction in Mycology: an overview. Dins Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., i Elander, R.P. (eds.). *Applications of PCR in Mycology*. CAB International, Wallingford, UK, pp 1-20
- Egli, S., i Ayer, F. (1997). Est-il possible d'améliorer la production de champignons comestibles en forêt? L'exemple de la réserve mycologique de La Chanéaz en Suisse. *Rev For Fr XLIX-n^osp*, 235-243
- Egli, S., Peter, M., Buser, C., Stahel, W., i Ayer, F. (2006). Mushroom picking does not impair future harvests – results of a long-term study in Switzerland. *Biol Conserv* 129, 271-276
- Erland, S., i Taylor, A.F.S. (2002). Diversity of ecto-mycorrhizal fungal communities in relation to the abiotic environment. Dins van der Heijden, M.G.A., i Sanders, I. (eds.). *Ecological Studies Vol 57. Mycorrhizal Ecology*. Springer Verlag, Berlin, pp. 33-74
- Flores, R., Diaz, G., i Honrubia, M. (2005). Mycorrhizal synthesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. with five Neotropical pine species. *Mycorrhiza* 15, 563-570
- Förster, V.T. (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Ann Phys (Leipzig)* 2, 55-75
- Garbaye, J. (1991). Utilization des mycorhizes en sylviculture. Dins Strullu, D.G., Perrin, R., Planchette, C., i Garbaye, J. (eds.). *Les mycorhizes des arbres et plantes cultivées. Technique et documentation*. Lavoisier, Paris, 197-242
- Gardes, M., i Bruns, T.D. (1991). Rapid characterization of ectomycorrhizae using RFLP pattern of their PCR amplified-ITS. *Mycol Soc News* 41, 14
- Gardes, M., i Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2, 113-118.
- Gardes, M., White, T.J., Fortin, J.A., Bruns, T.D., i Taylor, J.W. (1991). Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. *Can J Botany* 69, 180-190
- Genney, D.R., Anderson, I.C., i Alexander, I.J. (2006). Fine-scale distribution of pine ectomycorrhizas and their extramatrical mycelium. *New Phytol* 170, 381-390.
- Giltrap, N.J. (1981). Formation of primordia and immature fruiting bodies by ectomycorrhizal fungi in culture. *T Brit Mycol Soc* 77, 204-205

- Gomes, E.A., Kasuya, M.C.M., de Barros, E.G., Borges, A.C., i Araújo, E.F. (2002). Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genet Mol Biol* 25, 477-483
- Gryta, H., Debaud, J.C., Effosse, A., Gay, G. i Marmiesse, R. (1997). Fine-scale structure of populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum* in coastal sand dune forest ecosystems. *Mol Ecol* 6, 353-364
- Gryta, H., Debaud, J.C., i Marmiesse, R. (2000). Population dynamics of the symbiotic mushroom *Hebeloma cylindrosporum*: mycelial persistence and inbreeding. *Heredity* 84, 294-302
- Guerin-Laguette, A., Conventi, S., Ruiz, G., Plassard, C., i Mousain, D. (2003). The ectomycorrhizal symbiosis between *Lactarius deliciosus* and *Pinus sylvestris* in forest soil samples: symbiotic efficiency and development on roots of a rDNA internal transcribed spacer-selected isolate of *L. deliciosus*. *Mycorrhiza* 13, 17-25
- Guerin-Laguette, A., Plassard, C., i Mousain, D. (2000). Effects of experimental conditions on mycorrhizal relationships between *Pinus sylvestris* and *Lactarius deliciosus* and unprecedented fruit-body formation of the Saffron milk cap under controlled soilless conditions. *Can J Microbiol* 46, 790-799.
- Guidot, A., Debaud, J.C., Effosse, A., i Marmiesse, R. (2003). Below-ground distribution and persistence of an ectomycorrhizal fungus. *New Phytol* 161, 539-547
- Guidot, A., Debaud, J.C., i Marmiesse, R. (2001). Correspondence between genet diversity and spatial distribution of above- and below-ground populations of the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporum*. *Mol Ecol* 10, 1121-1131
- Guidot, A., Debaud, J.C., i Marmiesse, R. (2002). Spatial distribution of the below-ground mycelia of an ectomycorrhizal fungus inferred from specific quantification of its DNA in soil samples. *FEMS Microbiol Ecol* 42, 477-486
- Guidot, A., Lumini, E., Debaud, J.C., i Marmiesse, R. (1999). The nuclear ribosomal DNA intergenic spacer as a target sequence to study intraspecific diversity of the ectomycorrhizal basidiomycete *Hebeloma cylindrosporum* directly on *Pinus* root systems. *Appl Environ Microb* 65, 903-909
- Guinberteau, J., Ducamp, M., Poitou, N., Mamoun, M., i Olivier, J.M. (1989). Ecology of various competitors from an experimental plot of *Pinus pinaster* inoculated with *Suillus granulatus* and *Lactarius deliciosus*. *Agr Ecosys Environ* 28, 161-165
- Hacskeylo, E. (1953). Pure culture synthesis of pine mycorrhizae in terra-lite. *Mycologia* 45, 971-975
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98

- Hall, I.R., i Wang, Y. (1996). Edible fungi - supplementary crops to wood production in plantation forests. *Proceedings of the New Zealand Institute of Forestry Conference*, 77-82. 29 April-1 May, Invercarhill, New Zealand
- Hall, I.R., i Wang, Y. (1998). Methods for cultivating edible ectomycorrhizal mushrooms. Dins Varma, A. (ed.). *Mycorrhiza manual*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 99-114
- Hall, I.R., i Wang, Y. (2001). Truffles and other edible mycorrhizal mushrooms – some new crops for the Southern Hemisphere. Dins Hall, I., Wang, Y., Danell, E., i Zambonelli, A. (eds) *Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, 3-6 July, New Zealand
- Hall, I.R., Wang, Y., i Amicucci, A. (2003). Cultivation of edible ectomycorrhizal mushrooms. *Trends Biotechnol* 21 (10), 433-438
- Harley, J.L., i Smith, S.E. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, 483 pp.
- Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Meth Appl* 1, 34-38
- Hayashi, K. (1992). PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *Genet Anal Tech Appl* 3, 73-79
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., i Williams, P.M. (1996). Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-994
- Hendricks, J.J., Mitchell, R.J., Kuehn, K.A., Pecot, S.D., i Sims, S.E. (2006). Measuring external mycelia production of ectomycorrhizal fungi in the field: the soil matrix matters. *New Phytol* 171, 179-186
- Henrion, B., Le Tacon, F., i Martin, F. (1992). Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes. *New Phytol* 122, 289-298
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., i Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88, 7276-7280
- Hongyo, T., Buzard, G.S., Calvert, R.J., i Weghorst, C.M. (1993). 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res* 21, 3637-3642
- Honrubia, M., Morte, A., i Gutiérrez, A. (2007). Las Terfezas. Un cultivo para el desarrollo rural en regiones áridas y semi-áridas. Dins Reyna, S. (ed). *Truficultura, Fundamentos y Técnicas*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 365-397

- Hortal, S., Pera, J., Galipienso, L., i Parladé, J. (2006). Molecular identification of the edible ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus* in the symbiotic and extraradical mycelium stages. *J Biotechnol* 126, 123-134
- Hortal, S., Pera, J., i Parladé, J. (2008). Tracking mycorrhizas and extraradical mycelium of the edible fungus *Lactarius deliciosus* under field competition with *Rhizopogon* spp. *Mycorrhiza* 18, 69-77
- Horton, T.R., i Bruns, T.D. (2001). The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Mol Ecol* 10, 1855-1871
- Hosford, D., Pilz, D., Molina, R., i Amaranthus, M. (1997). *Ecology and management of the commercially harvested American matsutake mushroom*. USDA Forest Service, Portland, OR, General Technical Report PNW-GTR-412. 68pp.
- Humphries, S.E., Gudnason, V., Whittall, R., i Day, I.N.M. (1997). Single-strand conformation polymorphism analysis with throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. *Clin Chem* 43, 427-435
- Hutchison, L.J. (1999). *Lactarius*. Dins Cairney, J.W.G., i Chambers, S.M. (eds.). *Ectomycorrhizal fungi: Key genera in profile*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp 269-285
- Kennedy, P.G., Bergemann, S.E., Hortal, S., i Bruns, T.D. (2007a). Determining the outcome of field-based competition between two *Rhizopogon* species using real-time PCR. *Mol Ecol* 16, 881-890
- Kennedy, P.G., i Bruns, T.D. (2005). Priority effects determine the outcome of ectomycorrhizal competition between two *Rhizopogon* species colonizing *Pinus muricata* seedlings. *New Phytol* 166, 631-638
- Kennedy, P.G., Hortal, S., Bergemann, S.E., i Bruns, T.D. (2007b). Competitive interactions among three ectomycorrhizal fungi and their relation to host plant performance. *J Ecol* 95, 1338-1345
- Kjøller, R. (2006). Disproportionate abundance between ectomycorrhizal root tips and their associated mycelia. *FEMS Microbiol Ecol* 58, 214-224
- Koide, R.T., Xu, B., Sharda, J., Lekberg, Y., i Ostiguy, N. (2005a). Evidence of species interactions within an ectomycorrhizal fungal community. *New Phytol* 165, 305-316
- Koide, R.T., Xu, B., Sharda, J. (2005b). Contrasting below-ground views of an ectomycorrhizal fungal community. *New Phytol* 166, 251-262
- Kropp, B.R., i Langlois, C.G. (1990). Ectomycorrhizae in reforestation. *Can J Forest Res* 20, 438-451
- Laiho, O. (1970). *Paxillus involutus* as a mycorrhizal symbiont of forest trees. *Acta For. Fenn.* 106, 1-72
- Lakowicz, J.R. (1983). *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum Press, New York, NY, 496 pp.

- Landeweert, R., Leeflang, P., Kuyper, T.W., Hoffland, E., Rosling, A., Wernars, K., i Smit, E. (2003a). Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons. *Appl Environ Microb* 69, 327-333
- Landeweert, R., Leeflang, P., Smit, E., i Kuyper, T. (2005). Diversity of an ectomycorrhizal fungal community by a root tip and total soil DNA approach. *Mycorrhiza* 15, 1-6
- Landeweert, R., Veenman, C., Kuyper, T.W., Fritze, H., Wernars, K., i Smit, E. (2003b). Quantification of ectomycorrhizal mycelium in soil by real-time PCR compared to conventional quantification techniques. *FEMS Microbiol Ecol* 45, 283-292
- Lanfranco, L., Perotto, S., Longato, S., Mello, A., Cometti, V., i Bonfante, P. (1998a). Molecular approaches to investigate biodiversity in mycorrhizal fungi. Dins Varma, A. (ed.). *Mycorrhiza manual*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 353-372
- Lanfranco, L., Perotto, S., i Bonfante, P. (1998b). Applications of PCR for studying the biodiversity of mycorrhizal fungi. Dins Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A., i Elander, R.P. (eds.). *Applications of PCR in mycology*. CAB International, Wallingford, UK, pp 107-124
- Le Tacon, F., Álvarez, I.F., Bouchard, D., Henrion, B., Jackson, R.M., Luff, S., Parladé, J., Pera, J., Stenström, E., Villeneuve, N., i Walker, C. (1992). Variations in field response of forest trees to nursery ectomycorrhizal inoculation in Europe. Dins Read, D.J., Lewis, D.H., Fitter, A.H., i Alexander, I.J. (eds.). *Mycorrhizas in Ecosystems*, CAB International, Wallingford, pp 119-134
- Leake, J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L., i Read, D. (2004). Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Can J Botany* 82, 1016-1045.
- Lee, S.B., i Taylor, J.W. (1992). Phylogeny of five fungus-like protist *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol Biol Evol* 9, 636-653
- Leonardi, M., Paolocci, F., Rubini, A., Simonini, G., i 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
- Lessa, E.P., i Applebaum, G. (1993). Screening techniques for detecting allelic variation in DNA sequences. *Mol Ecol* 2, 119-129
- Lilleskov, E.A., i Bruns, T.D. (2003). Root colonization dynamics of two ectomycorrhizal fungi of contrasting life history strategies are mediated by addition of organic nutrient patches. *New Phytol* 159, 141-151
- Mabru, D., Douet, J.P., Mouton, A., Dupre, C., Ricard, J.M., Medina, B., Castroviejo, M., i Chevalier, G. (2004). PCR-RFLP using a SNP on the mitochondrial Lsu-rDNA as an easy method to differentiate *Tuber melanosporum* (Perigord truffle) and other truffle species in cans. *Int J Food Microbiol* 94, 33-42

Mabru, D., Dupre, C., Douet, J.P., Leroy, P., Ravel, C., Ricard, J.M., Medina, B., Castroviejo, M., i Chevalier, G. (2001). Rapid molecular typing method for the reliable detection of Asiatic black truffle (*Tuber indicum*) in commercialized products: fruiting bodies and mycorrhizal seedlings. *Mycorrhiza* 11, 89-94

Mahmood, S. (2003). Colonisation of spruce roots by two interacting ectomycorrhizal fungi in wood ash amended substrates. *FEMS Microbiol Lett* 221, 81-87

MAPA 1991-1995. *Anuario de Estadística Agraria*. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica, Madrid.

MAPA 1999-2004. *Anuario de Estadística Agroalimentaria*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica. Madrid. Recuperat desembre 2007, des de www.mapa.es

Martin, F., Selosse, M.-A., Di Battista, C., Gherbi, H., Delaruelle, C., Vairelles, D., Bouchard, D., i Le Tacon, F. (1998a). Molecular markers in ecology of ectomycorrhizal fungi. *Genet Sel Evol* 30 (Suppl 1), S333-S355

Martin, F., Costa, G., Delaruelle, C., i Diez, J. (1998b). Genomic fingerprinting of ectomycorrhizal fungi by microsatellite-primed PCR. Dins Varma, A. (ed.). *Mycorrhiza manual*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp 463-474

Martin, K.J. (2007). Introduction to molecular analysis of ectomycorrhizal communities. *Soil Sci Soc Am J* 71, 601-610

Martin, K.J., i Rygielwicz, P.T. (2005). Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol* 5, 28-38

Martín, M.P. (2001). Chorologic database of European *Rhizopogon* species. *Mycotaxon* 78, 191-244

Marx, D.H. (1980). Ectomycorrhiza fungus inoculations: a tool for improving forestation practices. Dins Mikola, P. (ed.). *Tropical mycorrhiza research*. Oxford University Press, Oxford, pp 13-71

Marx, D.H., i Bryan, W.C. (1975). Growth and ectomycorrhizal development of loblolly pine seedlings in fumigated soil infested with the fungal symbiont *Pisolithus tinctorius*. *Forest Sci* 21, 245-254

Marx, D.H., i Daniel, W.J. (1976). Maintaining cultures of ectomycorrhizal and plant pathogenic fungi in sterile water cold storage. *Can J Microbiol* 22, 338-341

Marx, D.H., i Davey, C.B. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. III. Resistance to aseptically formed mycorrhizae to infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 59, 549-558

Marx, D.H., i Kenney, D.S. (1982). Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. Dins Schenck, N.C. (ed.). *Methods and principles of mycorrhizal research*. American Phytopathology Society, St. Paul, MN, pp 131-146

- Marx, D.H., i Ruele, J.L. (1989). Ectomycorrhizae as biological tools in reclamation and revegetation of waste lands. Dins Mahadevan, A., Raman, N., i Natarajan, K. (eds.). *Micorrhizae for Green Asia. Proceedings of the 1st Asian Conference on Mycorrhizae*. Univ Madras, Madras, India, pp 336-344
- Marx, D.H., Ruele, J.L., i Cordell, C.E. (1991). Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrhiza. Dins Norris, J.R., Read, D.J., i Varma, A.K. (eds.). *Methods in Microbiology*, 23. Academic Press, London, pp. 384-411
- Marx, D.H., i Zak, B. (1965). Effect of pH on mycorrhizal formation of slash pine in aseptic culture. *Forest Sci* 11, 66-75
- Mason, P.A. (1980). Aseptic synthesis of sheathing (ecto-) mycorrhizas. Dins Ingram, D.S., i Helgeson, J.P. (eds.). *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*. Federation of British Plant Pathologists. Blackwell, London, 272 pp
- Massicotte, H.B., Melville, L.H., Peterson, R.L., i Molina, R. (1999). Biology of the ectomycorrhizal fungal genus, *Rhizopogon*. IV. Comparative morphology and anatomy of ectomycorrhizas synthesized between several *Rhizopogon* species on Ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). *New Phytol* 142, 355-370
- Massicotte, H.B., Molina, R., Luoma, D.L., i Smith, J.E. (1994). Biology of the ectomycorrhizal genus, *Rhizopogon*. II. Patterns of host-fungus specificity following spore inoculation of diverse hosts grown in monoculture and dual culture. *New Phytol* 126, 677-690
- McAfee, B.J., i Fortin, J.A. (1985). Competitive interactions of ectomycorrhizal mycobionts under field conditions. *Can J Botany* 64, 848-852
- Melin, E. (1921). Über die Mykorrhizenpilze von *Pinus sylvestris* L. Und *Picea abies* (L.) Karst. *Sven Bot Tidsskr* 15, 192-203
- Melin, E. (1922). Untersuchungen über die *Larix* Mykorrhiza. I. Synthese der Mykorrhiza in Reinkulture. *Sven Bot Tidsskr* 17, 479-520
- Melin, E., i Nilsson, H. (1950). Transfer of radioactive phosphorus to pine seedlings by means of mycorrhizal hyphae. *Physiol Plant* 3, 88-92
- Melin, E., i Nilsson, H. (1958). Translocation of nutritive elements through mycorrhizal mycelia to pine seedlings. *Bot Notis* 111, 251-256
- Melin, E., i Nilsson, H. (1957). Transport of C14 labelled photosynthate to the fungal associate of pine mycorrhiza. *Sven Bot Tidsskr* 51, 166-186
- Mello, A., Garner, L., i Bonfante, P. (1999) Specific PCR-primers as a reliable tool for the detection of white truffles in mycorrhizal roots. *New Phytol* 141, 511-516

Meotto, F., Pellegrino, S., i Bounous, G. (1999) Evolution of *Amanita caesarea* (Scop.: Fr.) Pers. and *Boletus edulis* Bull.: Fr. synthetic ectomycorrhizae on European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) seedlings under field conditions. *Acta Hort* 494, 201-204

Meyer, W., Mitchell, T.G., Freedman, E.Z., i Vilgalys, R. (1993) Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 31, 2274-2280

MMA (2005). *Anuario de Estadística Forestal*. Ministerio de Medio Ambiente. Secretaría General para el Territorio y la Biodiversidad. Madrid. Recuperat desembre 2007, des de www.mma.es

Mohabeer, A.J., Hiti, A.L., i Martin, W.J. (1991). Non-radioactiv single-strand conformation polymorphism (SSCP) using the Pharmacia 'Phast-System'. *Nucleic Acids Res* 19, 3154

Molina, R. (1979). Pure culture synthesis and host specificity of red alder mycorrhizae. *Can J Botany* 57, 1223-1228

Molina, R. (1981). Ectomycorrhizal specificity in the genus *Alnus*. *Can J Botany* 59, 325-334

Molina, R., O'Dell, T., Luoma, D., Amaranthus, M., Castellano, M., i Russell, K. (1993). *Biology, ecology and social aspects of wild edible mushrooms in the forests of the Pacific Northwest: a preface to managing commercial harvest*. USDA Forest Service, Portland, OR, General Technical Report PNW-GTR-309, 42 pp

Molina, R., Palmer, J.G. (1982). Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. Dins Schenk, N.C. (ed). *Methods and principles of mycorrhizal research*. Am Phytopathol Soc, St Paul, MN, pp 115-129

Molina, R., Pilz, D., Smith, J., Dunham, S., Dreisbach, T., O'Dell, T., i Castellano, M. (2001) Conservation and management of forest fungi in the Pacific Northwestern United States: an integrated ecosystem approach. Dins Moore, D., Nauta, M.M., Evans, S.E., i Rotheroe, M. (eds). *Fungal conservation. Issues and solutions*. British Mycological Society, Cambridge University Press, pp 19-63

Molina, R., i Trappe, J.M. (1982). Patterns of ectomycorrhizal host specificity and potential among Pacific Northwest conifers and fungi. *Forest Sci* 28, 423-458

Molina, R., i Trappe, J.M. (1994). Biology of the ectomycorrhizal genus, *Rhizopogon*. I. Host associations, host specificity and pure culture syntheses. *New Phytol* 126, 653-675

Molina, R., Massicotte, H., i Trappe, J.M. (1992). Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. Dins Allen, M.F. (ed). *Mycorrhizal Functioning*. Chapman & Hall. New York, pp 357-423

Morte, M.A., Cano, A., Honrubia, M., i Torres, P. (1994). In vitro mycorrhization of micropropagataed *Helianthemum almeriense* plantlets with *Terfezia claveryi* (desert truffle). *Agr Sci Finland* 3, 309-314

- Murat, C., Vizzini, A., Bonfante, P., Mello, A. (2005). Morphological and molecular typing of the below-ground fungal community in a natural *Tuber magnatum* truffle-ground. *FEMS Microbiol Lett* 245, 307-313
- Nair, S., Lin, T.K., Pang, T., i Altwegg, M. (2002). Characterization of *Salmonella* serovars by PCR-Single strand conformation polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 40, 2346-2351
- Nilsson, L.O., i Wallander, H. (2003). Production of external mycelium by ectomycorrhizal fungi in a Norway spruce forest was reduced in response to nitrogen fertilization. *New Phytol* 158, 409-416
- Olivier, J.M., Guinberteau, J., Rondet, J., i Mamoun, M. (1997). Vers l'inoculation contrôlée des cèpes et bolets comestibles? *Rev For Fr XLIX-nº sp*, 222-234
- Oort, A.J.P. (1981). Nutritional requirements of *Lactarius* species and cultural characters in relation to taxonomy. *Serie Ver. Km. Ned. Akad. Wet., Natuur.* 76, 1-95
- Oria de Rueda, J.A. (1989). Silvicultura y ordenación de montes productores de hongos micorrizógenos comestibles. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* 13, 175-188
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., i Sekiya, T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86, 2766-2770
- Parke, J.L., Linderman, R.G. i Black, C.H. (1983). The role of ectomycorrhizas in drought tolerance of Douglas-fir seedlings. *New Phytol* 95, 83-95
- Parladé, J., Hortal, S., Pera, J., i Galipienso, L. (2007). Quantitative detection of *Lactarius deliciosus* extraradical soil mycelium by real-time PCR and its application in the study of fungal persistence and interspecific competition. *J Biotechnol* 128, 14-23
- Parladé, J., Luque, J., Pera, J., i Rincón, A. (2004a). Field performance of *Pinus pinea* and *P. halepensis* seedlings inoculated with *Rhizopogon* spp. and outplanted in formerly arable land. *Ann For Sci* 61, 507-514
- Parladé, J., Pera, J., i Alvarez, I.F. (1996). Inoculation of containerized *Pseudotsuga menziesii* and *Pinus pinaster* seedlings with spores of five species of ectomycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 6, 237-245
- Parladé, J., Pera, J., i Luque, J. (2004b). Evaluation of mycelial inocula of edible *Lactarius* species for the production of *Pinus pinaster* and *P. sylvestris* mycorrhizal seedlings under greenhouse conditions. *Mycorrhiza* 14, 171-176
- Peintner, U., Iotti, M., Klotz, P., Bonuso, E., i Zambonelli, A. (2007). Soil fungal communities in a *Castanea sativa* (chestnut) forest producing large quantities of *Boletus edulis sensu lato* (porcini): where is the mycelium of porcini? *Environ Microbiol* 9 (4), 880-889

Pera, J. (1992). Selección de hongos ectomicorrízicos de *Pinus pinaster* Ait. para su aplicación en reforestación. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, 196 pp.

Pera, J., i Alvarez, I.F. (1995). Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinaster*. *Mycorrhiza* 5, 193-200

Perotto, S., Actis-Perino, E., Perugini, J., i Bonfante, P. (1996). Molecular diversity of fungi from ericoid mycorrhizal roots. *Mol Ecol* 5, 123-131

Perrin, R., Parladé, J., i Pera, J. (1996). Receptiveness of forest soils to ectomycorrhizal association: I. Concept and method as applied to the symbiosis between *Laccaria bicolor* (Maire) Orton and *Pinus pinaster* Ait. or *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco. *Mycorrhiza* 6, 469-476

Piché, Y., i Fortin, J.A. (1982). Development of mycorrhizae, extramatrical mycelium and sclerotia on *Pinus strobus* seedlings. *New Phytol* 91, 211-220

Pilz, D., i Molina, R. (2002). Commercial harvests of edible mushrooms from the forests of the Pacific Northwest United States: issues, management, and monitoring for sustainability. *Forest Ecol Manag* 155, 3-16

Pilz, D., Molina, R., i Mayo, J. (2006). Effects of thinning young forests on chanterelle mushroom production. *J Forest* 104 (1), 9-14

Plamboeck, A.H., Dawson, T.E., Egerton-Warburton, L.M., North, M., Bruns, T.D., i Querejeta, J.I. (2007). Water transfer via ectomycorrhizal fungal hyphae to conifer seedlings. *Mycorrhiza* 17, 439-447

Poitou, N., Mamoun, M., Ducamp, M., i Delmas, J. (1984). Après le bolet granuleux, le Lactaire délicieux obtenu en fructification au champ à partir de plants mycorhizés. *PHM Rev Horti* 244, 65-68

Qiagen (2004). Critical factors for successful real-time PCR. Recuperat 2004, des de www.qiagen.com

Raidl, S., Bonfigli, R., i Agerer, R. (2005). Calibration of quantitative real-time Taqman PCR by correlation with hyphal biomass and ITS copies in mycelia of *Piloderma croceum*. *Plant Biol* 7, 713-717

Read, D.J. (1992). The mycorrhizal mycelium. Dins Allen, M.F. (ed.). *Mycorrhizal functioning*. Chapman & Hall, London, pp. 102-133

Read, D.J., Francis, R., i Finlay, R.D. (1985). Mycorrhizal mycelia and nutrient cycling in plant communities. Dins Fitter, A.H., Atkinson, D., Read, D.J., i Usher, M.B. (eds). *Ecological interactions in soil*. Blackwell Sci. Publ., Oxford, pp 193-218

Read, D.J., i Perez-Moreno, J. (2003). Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? *New Phytol* 157, 475-492

Reid, C.P.P., i Woods, F.W. (1969). Translocation of C¹⁴-labeled compounds in mycorrhizae and its implications in interplant nutrient cycling. *Ecology* 50, 179-187

- Rincón, A., Alvarez, I.F., i Pera, J. (1999). Ectomycorrhizal fungi of *Pinus pinea* L. in northern Spain. *Mycorrhiza* 8, 271-276
- Rosling, A., Landeweert, R., Lindahl, B.D., Larsson, K.-H., Kuyper, T.W., Taylor, A.F.S., i Finlay, R.D. (2003). Vertical distribution of ectomycorrhizal fungal taxa in a podzol soil profile. *New Phytol* 159, 775-783
- Rubio, L., Ayllón, M.A., Guerri, J., Pappu, H., Niblett, C., i Moreno, P. (1996). Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann Appl Biol* 129, 479-489
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., i Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Savov, A., Angelicheva, D., Jordanova, A., Eigel, A., i Kalaydjieva, L. (1992). High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res* 20, 6741-6742
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., i Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *Eur J Plant Pathol* 110, 893-908
- Schild, T.A. (1996). *Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie*. Weiterstadt, Germany, PE Applied Biosystems GmbH.
- Schubert, R., Raidl, S., Funk, R., Bahnweg, G., Müller-Starck, G., i Agerer, R. (2003). Quantitative detection of agar-cultivated and rhizotron-grown *Piloderma croceum* Erikss. & Hjortst. by ITS1-based Fluorescent PCR. *Mycorrhiza* 13, 159-165
- Schübler, A., Schwarzott, D., i Walker, Ch. (2001). A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol Res* 105 (12), 1413-1421
- Séjalon-Delmas, N., Roux, C., Martins, M., Kulifaj, M., Becard, G., i Dargent, R. (2000). Molecular tools for the identification of *Tuber melanosporum* in agroindustry. *J Agr Food Chem* 48, 2608-2613
- Selosse, M.A., Costa, G., Di Battista, C., Le Tacon, F., i Martin, F. (1996). Meiotic segregation and recombination of the intergenic spacer of the ribosomal DNA in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. *Curr Genet* 30, 332-337
- Selosse, M.A., Jacquot, D., Bouchard, D., Martin, F., i Le Tacon, F. (1998). Temporal persistence and spatial distribution of an American inoculant strain of the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor* in a French forest plantation. *Mol Ecol* 7, 561-573
- Selosse, M.A., Martin, F., Bouchard, D., i LeTacon, F. (1999). Structure and dynamics of experimentally introduced and naturally occurring *Laccaria* sp. discrete genotypes in a Douglas fir plantation. *Appl Environ Microb* 65, 2006-2014

Selosse, M.A., Martin, F., i LeTacon, F. (2001). Intraspecific variation in fruiting phenology in an ectomycorrhizal *Laccaria* population under Douglas fir. *Mycol Res* 105, 524-531

Serrasolsas, I., i Khanna, P.K. (1995a). Changes in heated and autoclaved forest soils of S.E. Australia. I. Carbon and nitrogen. *Biogeochemistry* 29 (1), 3-24

Serrasolsas, I., i Khanna, P.K. (1995b). Changes in heated and autoclaved forest soils of S.E. Australia. II. Phosphorus and Phosphatase Activity. *Biogeochemistry* 29 (1), 25-41

Simard, S.W., Jones, M.D., i Durall, D.M. (2002). Carbon and nutrient fluxes within and between mycorrhizal plants. Dins Sanders, I.R., i van der Heijden, M. (eds). *Mycorrhizal Ecology*. Springer Verlag, Berlin, pp. 33-74

Simard, S.W., i Durall, D.M. (2004). Mycorrhizal networks: a review of their extent, function, and importance. *Can J Botany* 82, 1140-1165

Singer, R. (1986). *The Agaricales in modern taxonomy*. Koeltz Scientific Books, 4th ed., Koenigstein, Germany, 981 pp

Slankis, V. (1974). Soil factors influencing formation of mycorrhizae. *Annu Rev Phytopathol* 12, 437-457

Smit, E., Veenman, C., i Baar, J. (2003). Molecular analysis of ectomycorrhizal basidiomycete communities in a *Pinus sylvestris* L. stand reveals long-term increased diversity after removal of litter and humus layers. *FEMS Microbiol Ecol* 45, 49-57

Smith, S.E., i Read, D.J. (1997). *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, Cambridge, 605 pp

Stenlid, J., Karlsson, J.O., i Hogberg, N. (1994). Intraspecific genetic variation in *Heterobasidion annosum* revealed by amplification of minisatellite DNA. *Mycol Res* 99, 179-186

Stenström, E. (1991). The effects of flooding on the formation of ectomycorrhizae in *Pinus sylvestris* seedlings. *Plant Soil* 131, 247-250.

Stenström, E., i Unestam, T. (1987). Ecological variation in pine mycorrhizae. Dins Sylvia, D.M., Hung L-L., i Graham, J.H. (ed). *Proceedings of the 7th North American Conference on Mycorrhizae*. University of Florida, Florida, p. 104

Suz, L.M., Martín, M.P., i Colinas, C. (2006) Detection of *Tuber melanosporum* DNA in soil. *FEMS Microbiol Lett* 254, 251-257

Thomson, B.D., Malajczuk, N., Grove, T.S., i Hardy, G.E. StJ. (1993). Improving the colonization capacity and effectiveness of ectomycorrhizal fungal cultures by association with a host plant and re-isolation. *Mycol Res* 97, 839-844

Torres, P., i Honrubia, M. (1994). Ectomycorrhizal associations proven for *Pinus halepensis*. *Isr J Plant Sci* 42, 51-58

- Trappe, J.M. (1962). Fungus associates of ectotrophic mycorrhizae. *Bot Rev* 28, 538-606
- Trappe, J.M. (1967). Pure culture synthesis of Douglas-fir mycorrhizae with species of *Hebeloma*, *Suillus*, *Rhizopogon*, and *Astraeus*. *Forest Sci* 13, 121-130
- Trappe, J.M. (1977). Selection of fungi for ectomycorrhizal inoculation in nurseries. *Annu Rev Phytopathol* 15, 203-222
- Trappe, J.M. (1987). Phylogenetic and ecological aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. Dins Safir, G.R. (ed). *Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants*. CRC Press. Boca Raton, FL, pp 5-25
- Vázquez-Marrufo, G., Vázquez-Garcidueñas, M.S., Gómez-Luna, B.E., i Olalde-Portugal, V. 2002. DNA isolation from forest soil suitable for PCR assays of fungal and plant rRNA genes. *Plant Mol Biol Rep* 20, 379-390
- Villeneuve, N., Le Tacon, F., Bouchard, D. (1991). Survival of inoculated *Laccaria bicolor* in competition with native ectomycorrhizal fungi and effects on the growth of outplanted Douglas-fir seedlings. *Plant Soil* 135, 95-107
- Volossiuk, T., Robb, E.J., i Nazar, R.N. (1995). Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Appl Environ Microbiol* 61 (11), 3972-3976
- Wallander, H. (2006). External mycorrhizal mycelia – the importance of quantification in natural ecosystems. *New Phytol* 171, 240-242
- Wallander, H., Mahmood, S., Hagerberg, D., Johansson, L., i Pallon, J. (2003). Elemental composition of ectomycorrhizal mycelia identified by PCR-RFLP analysis and grown in contact with apatite or wood ash in forest soil. *FEMS Microbiol Ecol* 44, 57-65
- Wallander, H., Nilsson, L.O., Hagerberg, D., i Baath, E. (2001). Estimation of the biomass and seasonal growth of external mycelium of ectomycorrhizal fungi in the field. *New Phytol* 151, 753-760
- Wang, Y., i Hall, I.R. (2002). The cultivation of *Lactarius deliciosus* and *Rhizopogon rubescens* (shoro) in New Zealand. Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Dins Hall, I., Wang, Y., Danell, E., i Zambonelli, A. (eds) *Edible mycorrhizal mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, 3-6 July, New Zealand
- Wang, Y., i Hall, I.R. (2004). Edible ectomycorrhizal mushrooms: challenges and achievements. *Can J Botany* 82, 1063-1073
- Wang, Y., Hall, I.R, Dixon, C., Hance-Holloy, M., Strong, G., i Barclay, C. (2003). Potential of cultivation of *Lactarius deliciosus* (saffron milk cap) in NZ. Dins Berch, S. *Proceedings of the 3rd International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms*, 3-6 August, British Columbia, Canada

Weber, J., Diez, J., Selosse, M.A., Tagu, D., i LeTacon, F. (2002). SCAR markers to detect mycorrhizas of an American *Laccaria bicolor* strain inoculated in European Douglas-fir plantations. *Mycorrhiza* 12, 19-27

Weising, K., Atkinson, R.G., i Gardner, R.C. (1995). Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Meth Appl* 4, 249-255

Welsh, J.A., Castrén, K., i Vähäkangas, K.H. (1997). Single-strand conformation polymorphism analysis to detect p53 mutations: characterization and development of controls. *Clin Chem* 43, 2251-2255

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., i Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Dins Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., i White, T.J. (eds). *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA, pp 315-322

Wilkinson, D.M., i Dickinson, N.M. (1995). Metal resistance in trees: the role of mycorrhizae. *Oikos* 72, 298-300

Wu, B., Nara, K., i Hogetsu, T. (1999). Competition between ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus densiflora*. *Mycorrhiza* 9, 151-159

Yeates, C., Gillings, M.R., Davison, A.D., Altavilla, N., i Veal, D.A. (1998). Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biol Proced Online* 1 (1) [en línia] Disponible a www.biologicalprocedures.com

ANNEXOS

ANNEX 1. DADES DE LES SOQUES UTILITZADES, disponibles a la col·lecció de fongs ectomicorrízics de l'IRTA

Nº CULTIU	ESPÈCIE FÚNGICA	ESPÈCIE ASSOCIADA	DATA RECOL·LECCIÓ	LOCALITAT RECOL·LECCIÓ	Nº ACCÈS GENBANK
34AYA	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus canariensis</i>	21/01/2003	Tamadaba (Gran Canària)	DQ116893
49AYA	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus canariensis</i>	03/12/2003	Tamadaba (Gran Canària)	DQ116896
61AYA	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus canariensis</i>	04/12/2003	Tamadaba (Gran Canària)	DQ116897
120	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	16/11/1988	Fitor (Girona)	DQ116894
178	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinea</i>	27/10/1994	Cabrils (Barcelona)	DQ116888
217	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinea</i>	19/11/1994	Fitor (Girona)	DQ116895
274	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinea</i>	24/10/1995	Fitor (Girona)	DQ116889/90
312	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	24/10/2000	Sta. Coloma Farners (Girona)	DQ116886
313	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinea</i>	24/10/2000	Sta. Coloma Farners (Girona)	DQ116887
330	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus halepensis</i>	30/11/2003	Pierola (Barcelona)	DQ116898
331	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	12/10/2003	Prades (Tarragona)	DQ116899
332	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	12/10/2003	Berga (Barcelona)	DQ116900
334	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	26/09/2004	Can Cadi, Saldes (Barcelona)	DQ116901
335	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	26/09/2004	Can Cadi, Saldes (Barcelona)	DQ116902
336	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	12/10/2004	Sorribes (Barcelona)	DQ116903
337	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	12/10/2004	Vallcebre (Barcelona)	DQ116904
347	<i>Lactarius deliciosus</i>	micorriza		Camprodon (Girona)	EU423912
352	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	03/09/2005	El Vert, Gósol (Lleida)	
353	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	04/09/2005	El Vert, Gósol (Lleida)	
354	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	10/09/2005	Ensija, Saldes (Barcelona)	EU423913
355	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	10/09/2005	Ensija, Saldes (Barcelona)	
356	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	17/09/2005	Ensija, Saldes (Barcelona)	EU423914
358	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sp.</i>	08/10/2005	Coll de Pal (Barcelona)	
361	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus uncinata</i>	15/10/2005	Cortals d'Encamp (Andorra)	EU423915
362	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	12/11/2005	Bescanó (Girona)	EU423916
364	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sp.</i>	17/11/2005	Fitor (Girona)	
365	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sp.</i>	17/11/2005	Fitor (Girona)	
366	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus halepensis</i>	20/11/2005	St. Salvador de Guardiola (Barcelona)	EU423917
378	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	07/10/2006	St. Llorenç de Morunys (Lleida)	EU423920
381	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	20/10/2006	Fitor (Girona)	
382	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	27/10/2006	Fitor (Girona)	
383	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	08/11/2006	Massanes (Girona)	EU423922
384	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	08/11/2006	Massanes (Girona)	EU423923
385	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	10/10/2006	Fitor (Girona)	
892SO	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	26/09/2002	Pinar Grande (Sòria)	DQ116892
894SO	<i>Lactarius deliciosus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	27/09/2002	El Royo (Sòria)	DQ116891

ANNEX 1. Continuació

Nº CULTIU	ESPÈCIE FÚNGICA	ESPÈCIE ASSOCIADA	DATA RECOL·LECCIÓ	LOCALITAT RECOL·LECCIÓ	NºACCÉS GENBANK
261	<i>Lactarius sanguifluus</i>	<i>Pinus radiata</i>	19/10/1995	St. Feliu de Buixalleu (Girona)	DQ116905
263	<i>Lactarius sanguifluus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	24/10/1995	Fitor (Girona)	DQ116906
328	<i>Lactarius sanguifluus</i>	<i>Pinus halepensis</i>	06/11/2003	Cervelló (Barcelona)	DQ116907
329	<i>Lactarius sanguifluus</i>	<i>Pinus sp.</i>	19/10/2003	Terol (Terol)	DQ116909
333	<i>Lactarius sanguifluus</i>	<i>Pinus pinea</i>	01/11/2003	Cabrils (Barcelona)	DQ116908
357	<i>Lactarius sanguifluus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	17/09/2005	Ensija, Saldes (Barcelona)	
367	<i>Lactarius sanguifluus</i>	<i>Pinus halepensis</i>	20/11/2005	St. Salvador de Guardiola (Barcelona)	
380	<i>Lactarius sanguifluus</i>	<i>Pinus pinaster</i>	27/10/2006	Fitor (Girona)	EU423921
338	<i>Lactarius semisanguifluus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	15/10/2004	La Rabassa (Andorra)	DQ116910
339	<i>Lactarius semisanguifluus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	15/10/2004	La Rabassa (Andorra)	DQ116911
262	<i>Lactarius chrysorrheus</i>	<i>Pinus sp.</i>	19/10/1995	Montseny (Girona)	
368	<i>Lactarius chrysorrheus</i>	<i>Pinus halepensis</i>	20/11/2005	St. Salvador de Guardiola (Barcelona)	EU423918
344	<i>Lactarius rufus</i>	<i>Pinus sylvestris</i>	15/10/2004	La Rabassa (Andorra)	DQ116912
345	<i>Lactarius tesquorum</i>	<i>Cistus sp.</i>	21/12/2004	Massanes (Girona)	DQ116913
387	<i>Lactarius tesquorum</i>	<i>Cistus sp.</i>	08/11/2006	Massanes (Girona)	EU423924

ANNEX 2. ALINEAMENT DE SEQÜÈNCIES DE LA REGIÓ ITS DE *Lactarius* spp.

Nomenclatura utilitzada:

· = base igual a la superior

- = base absent

Indeterminacions: Y=C o T; R=A o G; S= C o G; K= G o T; W= A o T; N=A,T,C o G.

Seqüències en sentit 5'-3'.

S'assenyalen amb un requadre els oligonucleòtids dissenyats en aquesta tesi.

	10	20	30	40	50	60
	FWD _{del}					
					
<i>L. deliciosus</i> 894	TCGTACAACG	TGCGTTGAGGGCG	TGCGAGGGCTG	TCGCTGACTTTT	TG	ITGACGCAAAAG
<i>L. deliciosus</i> 312
<i>L. deliciosus</i> 313Y
<i>L. deliciosus</i> 178Y
<i>L. deliciosus</i> 274 (a)	T.-
<i>L. deliciosus</i> 274 (b)
<i>L. deliciosus</i> 892
<i>L. deliciosus</i> 120Y
<i>L. deliciosus</i> 217Y
<i>L. deliciosus</i> 34C
<i>L. deliciosus</i> 49C
<i>L. deliciosus</i> 61C
<i>L. deliciosus</i> 330Y
<i>L. deliciosus</i> 331Y
<i>L. deliciosus</i> 332	T.-
<i>L. deliciosus</i> 334
<i>L. deliciosus</i> 335
<i>L. deliciosus</i> 336Y
<i>L. deliciosus</i> 337
<i>L. deliciosus</i> 347N
<i>L. deliciosus</i> 354
<i>L. deliciosus</i> 356C
<i>L. deliciosus</i> 362
<i>L. deliciosus</i> 366Y
<i>L. deliciosus</i> 361
<i>L. deliciosus</i> 378C
<i>L. deliciosus</i> 384
<i>L. deliciosus</i> 383
<i>L. sanguifluus</i> 261A	T.GAGA	C-----
<i>L. sanguifluus</i> 328A	T.GTGA	C-----
<i>L. sanguifluus</i> 263A	T.GAGA	Y.....	C-----
<i>L. sanguifluus</i> 380A	T.GAGA	Y.....	C-----
<i>L. sanguifluus</i> 333A	T.GA	-----	CAAA-----
<i>L. sanguifluus</i> 329A	T.GA	-----	CAAA-----
<i>L. semisanguifluus</i> 338T	GTGA	T...T	---A.....
<i>L. semisanguifluus</i> 339T	GTGA	T...T	---A.....
<i>L. chrysorrhoeus</i> 368	-----T	AGAGA	A...A	CCAA-----
<i>L. tesquorum</i> 345	AAC.A.AA	T...AGA	A---T.....
<i>L. tesquorum</i> 387	AAC.A.AA	T...AGA	A---T.....
<i>L. rufus</i> 344AA	T.AGAG	CAAA-----

ANNEX 2. Continuació

```

                                     70      80      90      STQIdel      100      110      120
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
L. deliciosus 894 TCGTGCACGCCGGAGCGCGTCCCTCTCGCATAAAATCCATCTCACCC-TTTTGTGC
L. deliciosus 312 .....,Y.....
L. deliciosus 313 .Y.....
L. deliciosus 178 .....
L. deliciosus 274 (a) .....
L. deliciosus 274 (b) .....,T.....
L. deliciosus 892 .T.....
L. deliciosus 120 .....
L. deliciosus 217 .Y.....R.....
L. deliciosus 34 .....
L. deliciosus 49 .....
L. deliciosus 61 .....
L. deliciosus 330 .Y.....
L. deliciosus 331 .....
L. deliciosus 332 .....
L. deliciosus 334 .Y.....NNN.....
L. deliciosus 335 .....T.....
L. deliciosus 336 .Y.....
L. deliciosus 337 .T.....
L. deliciosus 347 .Y.....
L. deliciosus 354 .....T.....
L. deliciosus 356 .....
L. deliciosus 362 .....
L. deliciosus 366 .T.....R.....
L. deliciosus 361 .Y.....
L. deliciosus 378 .....
L. deliciosus 384 .....
L. deliciosus 383 .....
L. sanguifluus 261 .....T...A...T...
L. sanguifluus 328 .....T...A...T...
L. sanguifluus 263 .....T...A...T...
L. sanguifluus 380 .....T...A...T...
L. sanguifluus 333 .....T...A...T...
L. sanguifluus 329 .....T...A...T...
L. semisanguifluus 338 .....A...CTCTA...
L. semisanguifluus 339 .....A...CTCTA...
L. chrysorrheus 368 .....T...C...A...A.T...G...
L. tesquorum 345 .....T...A...A...C...
L. tesquorum 387 .....T...A...A...C...
L. rufus 344 .....C...T.T...GC...A...A.T...

```

ANNEX 2. Continuació

	130	140	150	160	170	180
	RVS1del					
					
<i>L. deliciosus</i> 894	ACCACCGCGTGGGCA	CCT- TTTGGGATCGAACCGAT	CCTGGA	-GGGGGCTTGC	TTTCA	
<i>L. deliciosus</i> 312					
<i>L. deliciosus</i> 313					
<i>L. deliciosus</i> 178					
<i>L. deliciosus</i> 274 (a)					
<i>L. deliciosus</i> 274 (b)					
<i>L. deliciosus</i> 892					
<i>L. deliciosus</i> 120					
<i>L. deliciosus</i> 217					
<i>L. deliciosus</i> 34					
<i>L. deliciosus</i> 49					
<i>L. deliciosus</i> 61					
<i>L. deliciosus</i> 330					
<i>L. deliciosus</i> 331					
<i>L. deliciosus</i> 332					
<i>L. deliciosus</i> 334					
<i>L. deliciosus</i> 335					
<i>L. deliciosus</i> 336					
<i>L. deliciosus</i> 337					
<i>L. deliciosus</i> 347					
<i>L. deliciosus</i> 354					
<i>L. deliciosus</i> 356					
<i>L. deliciosus</i> 362					
<i>L. deliciosus</i> 366					
<i>L. deliciosus</i> 361					
<i>L. deliciosus</i> 378					
<i>L. deliciosus</i> 384					
<i>L. deliciosus</i> 383					
<i>L. sanguifluus</i> 261					
<i>L. sanguifluus</i> 328					
<i>L. sanguifluus</i> 263					
<i>L. sanguifluus</i> 380					
<i>L. sanguifluus</i> 333					
<i>L. sanguifluus</i> 329					
<i>L. semisanguifluus</i> 338					
<i>L. semisanguifluus</i> 339					
<i>L. chrysorrhoeus</i> 368					
<i>L. tesquorum</i> 345					
<i>L. tesquorum</i> 387					
<i>L. rufus</i> 344					

ANNEX 2. Continuació

	190	200	210	220	230	240
					
<i>L. deliciosus</i> 894	CACAAA-CCCCTTTT-AAAAAGTGTAGAAATGACCCCATTT--TGCGATGACACGCAATCA					
<i>L. deliciosus</i> 312-.....T.....					
<i>L. deliciosus</i> 313-.....					
<i>L. deliciosus</i> 178-.....T.....					
<i>L. deliciosus</i> 274 (a)-.....					
<i>L. deliciosus</i> 274 (b)-.....T.....					
<i>L. deliciosus</i> 892-.....					
<i>L. deliciosus</i> 120-.....					
<i>L. deliciosus</i> 217-.....					
<i>L. deliciosus</i> 34-.....					
<i>L. deliciosus</i> 49-.....					
<i>L. deliciosus</i> 61-.....					
<i>L. deliciosus</i> 330-.....					
<i>L. deliciosus</i> 331-.....					
<i>L. deliciosus</i> 332-.....					
<i>L. deliciosus</i> 334-.....T.....					
<i>L. deliciosus</i> 335-.....T.....					
<i>L. deliciosus</i> 336-.....					
<i>L. deliciosus</i> 337-.....					
<i>L. deliciosus</i> 347-.....C...TR.....					
<i>L. deliciosus</i> 354-.....T.....					
<i>L. deliciosus</i> 356-.....C...T.....					
<i>L. deliciosus</i> 362-.....C...T.....					
<i>L. deliciosus</i> 366-.....C...T.....					
<i>L. deliciosus</i> 361-.....C...T.....					
<i>L. deliciosus</i> 378-.....C...T.....					
<i>L. deliciosus</i> 384-.....C...T.....					
<i>L. deliciosus</i> 383-.....C...T.....					
<i>L. sanguifluus</i> 261-.....			C..		
<i>L. sanguifluus</i> 328-.....			C..		
<i>L. sanguifluus</i> 263-.....			C..		
<i>L. sanguifluus</i> 380-.....			C..		
<i>L. sanguifluus</i> 333-.....			C..		
<i>L. sanguifluus</i> 329-.....			C..		
<i>L. semisanguifluus</i> 338-.....A.....			C..		
<i>L. semisanguifluus</i> 339-.....A.....			C..		
<i>L. chrysorrheus</i> 368-.....CC..TT.....G.....T.....A.....C..A..C.....					
<i>L. tesquorum</i> 345C...T.....TT.....A.....					
<i>L. tesquorum</i> 387C...T.....TT.....A.....					
<i>L. rufus</i> 344A...CC..TT.....T.....A.....C..A..C.....					

ANNEX 2. Continuació

	250	260	270	280	290	300
					
<i>L. deliciosus</i> 894	ATACAAC	TTTCAACAAC	GGATCTCTT	GGCTCTCGCAT	CGATGAAGAAC	GCAGCGAAATGC
<i>L. deliciosus</i> 312
<i>L. deliciosus</i> 313
<i>L. deliciosus</i> 178
<i>L. deliciosus</i> 274 (a)
<i>L. deliciosus</i> 274 (b)
<i>L. deliciosus</i> 892
<i>L. deliciosus</i> 120
<i>L. deliciosus</i> 217
<i>L. deliciosus</i> 34
<i>L. deliciosus</i> 49
<i>L. deliciosus</i> 61
<i>L. deliciosus</i> 330
<i>L. deliciosus</i> 331
<i>L. deliciosus</i> 332
<i>L. deliciosus</i> 334
<i>L. deliciosus</i> 335
<i>L. deliciosus</i> 336
<i>L. deliciosus</i> 337
<i>L. deliciosus</i> 347
<i>L. deliciosus</i> 354
<i>L. deliciosus</i> 356
<i>L. deliciosus</i> 362
<i>L. deliciosus</i> 366
<i>L. deliciosus</i> 361
<i>L. deliciosus</i> 378
<i>L. deliciosus</i> 384
<i>L. deliciosus</i> 383
<i>L. sanguifluus</i> 261
<i>L. sanguifluus</i> 328
<i>L. sanguifluus</i> 263
<i>L. sanguifluus</i> 380
<i>L. sanguifluus</i> 333
<i>L. sanguifluus</i> 329
<i>L. semisanguifluus</i> 338
<i>L. semisanguifluus</i> 339
<i>L. chrysorrheus</i> 368
<i>L. tesquorum</i> 345
<i>L. tesquorum</i> 387
<i>L. rufus</i> 344

ANNEX 2. Continuació

	310	320	330	340	350	360
					
<i>L. deliciosus</i> 894	GATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGC					
<i>L. deliciosus</i> 312					
<i>L. deliciosus</i> 313					
<i>L. deliciosus</i> 178					
<i>L. deliciosus</i> 274 (a)					
<i>L. deliciosus</i> 274 (b)					
<i>L. deliciosus</i> 892					
<i>L. deliciosus</i> 120					
<i>L. deliciosus</i> 217					
<i>L. deliciosus</i> 34					
<i>L. deliciosus</i> 49					
<i>L. deliciosus</i> 61					
<i>L. deliciosus</i> 330					
<i>L. deliciosus</i> 331					
<i>L. deliciosus</i> 332					
<i>L. deliciosus</i> 334					
<i>L. deliciosus</i> 335					
<i>L. deliciosus</i> 336					
<i>L. deliciosus</i> 337					
<i>L. deliciosus</i> 347					
<i>L. deliciosus</i> 354					
<i>L. deliciosus</i> 356					
<i>L. deliciosus</i> 362					
<i>L. deliciosus</i> 366					
<i>L. deliciosus</i> 361					
<i>L. deliciosus</i> 378					
<i>L. deliciosus</i> 384					
<i>L. deliciosus</i> 383					
<i>L. sanguifluus</i> 261					
<i>L. sanguifluus</i> 328					
<i>L. sanguifluus</i> 263					
<i>L. sanguifluus</i> 380					
<i>L. sanguifluus</i> 333					
<i>L. sanguifluus</i> 329					
<i>L. semisanguifluus</i> 338					
<i>L. semisanguifluus</i> 339					
<i>L. chrysorrheus</i> 368					
<i>L. tesquorum</i> 345					
<i>L. tesquorum</i> 387					
<i>L. rufus</i> 344					

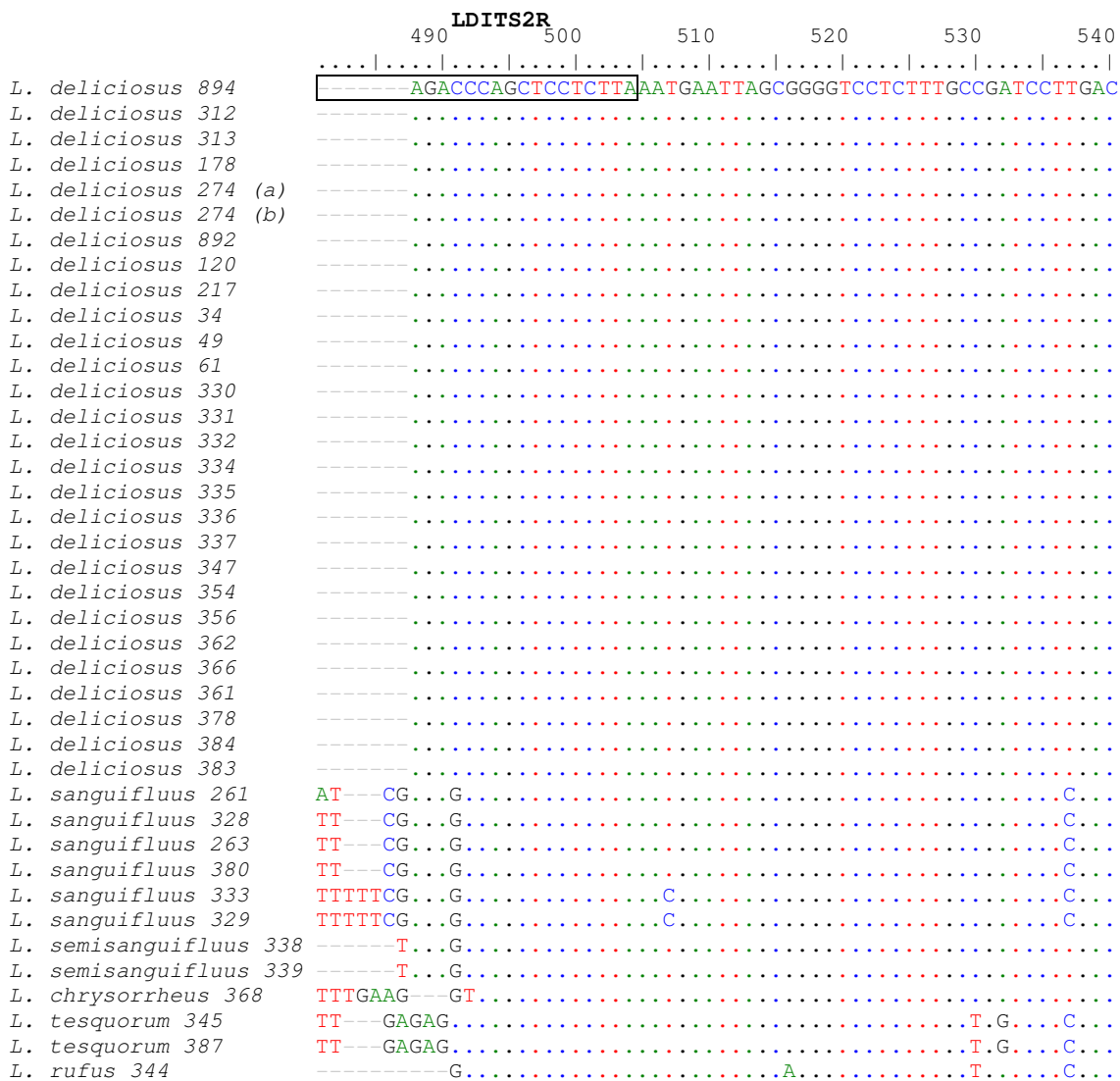
ANNEX 2. Continuació

	370	380	390	400	410	420
					
<i>L. deliciosus</i> 894	CCCTTGGTATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTCGTGAAATTCTCAACCTTCTCGGT					
<i>L. deliciosus</i> 312					
<i>L. deliciosus</i> 313					
<i>L. deliciosus</i> 178					
<i>L. deliciosus</i> 274 (a)					
<i>L. deliciosus</i> 274 (b)					
<i>L. deliciosus</i> 892					
<i>L. deliciosus</i> 120					
<i>L. deliciosus</i> 217					
<i>L. deliciosus</i> 34					
<i>L. deliciosus</i> 49					
<i>L. deliciosus</i> 61					
<i>L. deliciosus</i> 330					
<i>L. deliciosus</i> 331					
<i>L. deliciosus</i> 332					
<i>L. deliciosus</i> 334					
<i>L. deliciosus</i> 335					
<i>L. deliciosus</i> 336					
<i>L. deliciosus</i> 337					
<i>L. deliciosus</i> 347					
<i>L. deliciosus</i> 354					
<i>L. deliciosus</i> 356					
<i>L. deliciosus</i> 362					
<i>L. deliciosus</i> 366R.....					
<i>L. deliciosus</i> 361					
<i>L. deliciosus</i> 378					
<i>L. deliciosus</i> 384					
<i>L. deliciosus</i> 383					
<i>L. sanguifluus</i> 261			A.....		C.....
<i>L. sanguifluus</i> 328			A.....		C.....
<i>L. sanguifluus</i> 263			A.....		
<i>L. sanguifluus</i> 380			A.....		S.....
<i>L. sanguifluus</i> 333			A.....		
<i>L. sanguifluus</i> 329			A.....		
<i>L. semisanguifluus</i> 338			A.....		
<i>L. semisanguifluus</i> 339			A.....		
<i>L. chrysorrheus</i> 368T.....			A.....	G.....	C.....T.....
<i>L. tesquorum</i> 345			A.....		
<i>L. tesquorum</i> 387			A.....		
<i>L. rufus</i> 344C.....			AC.....		C.....T.....

ANNEX 2. Continuació

	430	440	450	460	470	480
					
<i>L. deliciosus</i> 894	TTTCTTCTGGACACCGAAGGAGGCTTGGACATTGGAGGCCTTTGCTGGCGTCTCTT					CTT----
<i>L. deliciosus</i> 312					----
<i>L. deliciosus</i> 313					----
<i>L. deliciosus</i> 178					----
<i>L. deliciosus</i> 274 (a)					----
<i>L. deliciosus</i> 274 (b)					----
<i>L. deliciosus</i> 892					----
<i>L. deliciosus</i> 120					----
<i>L. deliciosus</i> 217					----
<i>L. deliciosus</i> 34				Y	----
<i>L. deliciosus</i> 49					----
<i>L. deliciosus</i> 61					----
<i>L. deliciosus</i> 330					----
<i>L. deliciosus</i> 331					----
<i>L. deliciosus</i> 332					----
<i>L. deliciosus</i> 334					----
<i>L. deliciosus</i> 335					----
<i>L. deliciosus</i> 336					----
<i>L. deliciosus</i> 337					----
<i>L. deliciosus</i> 347					----
<i>L. deliciosus</i> 354					----
<i>L. deliciosus</i> 356					----
<i>L. deliciosus</i> 362					----
<i>L. deliciosus</i> 366					----
<i>L. deliciosus</i> 361					----
<i>L. deliciosus</i> 378					----
<i>L. deliciosus</i> 384					----
<i>L. deliciosus</i> 383					----
<i>L. sanguifluus</i> 261	.G.....G.....T.....C.....					CTCTT
<i>L. sanguifluus</i> 328	.G.....G.....T.....					CTCTT
<i>L. sanguifluus</i> 263	.K.....YG.....T.....					CTCTT
<i>L. sanguifluus</i> 380	.K.....YG.....T.....					CTCTT
<i>L. sanguifluus</i> 333G.....T.....A.....					CTCTT
<i>L. sanguifluus</i> 329G.....T.....A.....					CTCTT
<i>L. semisanguifluus</i> 338T.....					C----
<i>L. semisanguifluus</i> 339T.....					C----
<i>L. chrysorrhoeus</i> 368G..A.....T.....A.....A.....TC					CTCTT
<i>L. tesquorum</i> 345A..A.....T.....T.....					CTCTT
<i>L. tesquorum</i> 387A..A.....T.....T.....					CTCTT
<i>L. rufus</i> 344G..A..C.....T.....AC.....					C----

ANNEX 2. Continuació



ANNEX 2. Continuació

	550	560	570	580	590	600
					
<i>L. deliciosus</i> 894	ATGTGATAAGATGTTTCCATGACTTGGTTTCTGGCTCTGTTGCATTGGGACCCGCTTCT					
<i>L. deliciosus</i> 312					
<i>L. deliciosus</i> 313					
<i>L. deliciosus</i> 178					
<i>L. deliciosus</i> 274 (a)					
<i>L. deliciosus</i> 274 (b)					
<i>L. deliciosus</i> 892					
<i>L. deliciosus</i> 120					
<i>L. deliciosus</i> 217					
<i>L. deliciosus</i> 34					
<i>L. deliciosus</i> 49					
<i>L. deliciosus</i> 61					
<i>L. deliciosus</i> 330					
<i>L. deliciosus</i> 331					
<i>L. deliciosus</i> 332					
<i>L. deliciosus</i> 334					
<i>L. deliciosus</i> 335					
<i>L. deliciosus</i> 336					
<i>L. deliciosus</i> 337					R
<i>L. deliciosus</i> 347					
<i>L. deliciosus</i> 354					
<i>L. deliciosus</i> 356					
<i>L. deliciosus</i> 362					
<i>L. deliciosus</i> 366					
<i>L. deliciosus</i> 361					
<i>L. deliciosus</i> 378					
<i>L. deliciosus</i> 384					
<i>L. deliciosus</i> 383					
<i>L. sanguifluus</i> 261				C	A
<i>L. sanguifluus</i> 328				C	A
<i>L. sanguifluus</i> 263				C	A
<i>L. sanguifluus</i> 380				C	Y
<i>L. sanguifluus</i> 333				C	
<i>L. sanguifluus</i> 329				C	
<i>L. semisanguifluus</i> 338				C	T
<i>L. semisanguifluus</i> 339				C	T
<i>L. chrysorrhoeus</i> 368				C	T
<i>L. tesquorum</i> 345				T	T
<i>L. tesquorum</i> 387				T	T
<i>L. rufus</i> 344	G				T	CA.C

ANNEX 2. Continuació

	610	620	630	640	650	660
					
<i>L. deliciosus</i> 894	-AACCGTCT	CGACGAGACAACGTTT	GGGCGTGTCTCCCTTCT	CGGGAGACT		
<i>L. deliciosus</i> 312	-.....
<i>L. deliciosus</i> 313	-.....
<i>L. deliciosus</i> 178	-.....
<i>L. deliciosus</i> 274 (a)	-.....
<i>L. deliciosus</i> 274 (b)	-.....
<i>L. deliciosus</i> 892	-.....
<i>L. deliciosus</i> 120	-.....Y.....
<i>L. deliciosus</i> 217	-.....
<i>L. deliciosus</i> 34	-.....
<i>L. deliciosus</i> 49	-.....
<i>L. deliciosus</i> 61	-.....
<i>L. deliciosus</i> 330	-.....
<i>L. deliciosus</i> 331	-.....
<i>L. deliciosus</i> 332	-.....
<i>L. deliciosus</i> 334	-.....
<i>L. deliciosus</i> 335	-.....NNN.....
<i>L. deliciosus</i> 336	-.....
<i>L. deliciosus</i> 337	-.....
<i>L. deliciosus</i> 347	-.....
<i>L. deliciosus</i> 354	-.....
<i>L. deliciosus</i> 356	-.....
<i>L. deliciosus</i> 362	-.....
<i>L. deliciosus</i> 366	-.....
<i>L. deliciosus</i> 361	-.....Y.....
<i>L. deliciosus</i> 378	-.....
<i>L. deliciosus</i> 384	-.....
<i>L. deliciosus</i> 383	-.....
<i>L. sanguifluus</i> 261	-.....A..A
<i>L. sanguifluus</i> 328	-.....C.....A..A
<i>L. sanguifluus</i> 263	T.....C.....A..A
<i>L. sanguifluus</i> 380	-.....Y.....A..A
<i>L. sanguifluus</i> 333	-.....
<i>L. sanguifluus</i> 329	-.....
<i>L. semisanguifluus</i> 338	-.....G.....
<i>L. semisanguifluus</i> 339	-.....G.....
<i>L. chrysorrheus</i> 368	-.....T-GACCTTG..AT.....T...C.A..TC.....A
<i>L. tesquorum</i> 345	-.....A..AC.....G
<i>L. tesquorum</i> 387	-.....A..AC.....G
<i>L. rufus</i> 344	-.....TCAACCTTG..TT.....C.A..A.....AG..

ANNEX 2. Continuació

	670	680
	
<i>L. deliciosus</i> 894	CTCTCAACCCCCACGAACCT	
<i>L. deliciosus</i> 312	
<i>L. deliciosus</i> 313	
<i>L. deliciosus</i> 178	
<i>L. deliciosus</i> 274 (a)	
<i>L. deliciosus</i> 274 (b)	
<i>L. deliciosus</i> 892	
<i>L. deliciosus</i> 120	
<i>L. deliciosus</i> 217	
<i>L. deliciosus</i> 34	
<i>L. deliciosus</i> 49	
<i>L. deliciosus</i> 61	
<i>L. deliciosus</i> 330	
<i>L. deliciosus</i> 331	
<i>L. deliciosus</i> 332	
<i>L. deliciosus</i> 334	
<i>L. deliciosus</i> 335	
<i>L. deliciosus</i> 336	
<i>L. deliciosus</i> 337	
<i>L. deliciosus</i> 347R.....	
<i>L. deliciosus</i> 354	
<i>L. deliciosus</i> 356	
<i>L. deliciosus</i> 362	
<i>L. deliciosus</i> 366	
<i>L. deliciosus</i> 361	
<i>L. deliciosus</i> 378	
<i>L. deliciosus</i> 384	
<i>L. deliciosus</i> 383	
<i>L. sanguifluus</i> 261	.A.....-.....	
<i>L. sanguifluus</i> 328	.A.....-.....	
<i>L. sanguifluus</i> 263	.A.....T.....	
<i>L. sanguifluus</i> 380	.A.....T.-Y.....	
<i>L. sanguifluus</i> 333-.....	
<i>L. sanguifluus</i> 329-.....	
<i>L. semisanguifluus</i> 338G.....-.....	
<i>L. semisanguifluus</i> 339G.....-.....	
<i>L. chrysorrhoeus</i> 368G.....-.....	
<i>L. tesquorum</i> 345T.....-.....	
<i>L. tesquorum</i> 387T.....-.....	
<i>L. rufus</i> 344	.C...G.....-.....	

ANNEX 3: PUBLICACIONES I CONTRIBUCIONS A CONGRESSOS RELACIONADES AMB AQUESTA TESI

Publicacions:

Hortal, S; Galipienso, L; Pera, J; Parladé, J. (2005). Quantification of ectomycorrhizal fungi in the soil by Real Time PCR. Comparative biochemistry and physiology vol 141A number 3/suppl. S223

Hortal, S; Galipienso, L; Pera, J; Parladé, J. (2005). Seguimiento en campo de planta inoculada con el hongo ectomicorrícico *Lactarius deliciosus* mediante técnicas moleculares. IV Congreso Forestal Español. CD de actas. ISBN 84-921265-7-4

Hortal, S; Pera, J; Galipienso, L; Parladé, J. (2006). Molecular identification of the edible ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus* in the symbiotic and extraradical mycelium stages. Journal of Biotechnology 126: 123-134

Parladé, J; Hortal, S; Pera, J; Galipienso, L. (2007). Quantitative detection of *Lactarius deliciosus* extraradical soil mycelium by real-time PCR and its application in the study of fungal persistence and interspecific competition. Journal of Biotechnology 128: 14-23

Kennedy, PG; Bergemann, SE; Hortal, S; Bruns, TD. (2007). Determining the outcome of field-based competition between two *Rhizopogon* species using real-time PCR. Molecular Ecology 16: 881-890

Kennedy, PG; Hortal, S; Bergemann, SE; Bruns, TD. (2007). Competitive interactions among three ectomycorrhizal fungi and their relation to host plant performance. Journal of Ecology 95: 1338-1345

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

Congressos:**Octubre 2004. XII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología (Lloret de Mar)**

Hortal, S; Galipienso, L; Pera, J; Parladé, J. Caracterización molecular de los hongos ectomicorrícicos comestibles *Lactarius deliciosus* y *L. sanguifluus* mediante microsatellite-primed PCR y análisis ITS-SSCP. Pòster.

Hortal, S; Galipienso, L; Pera, J; Parladé, J. Determinación cuantitativa de micelio del hongo ectomicorrícico *Lactarius deliciosus* mediante PCR en tiempo real. Pòster.

Hortal, S; Girbal, J. Control biológico de *Senecio inaequidens* con *Puccinia lagenophorae*: técnicas de germinación. Pòster.

Juliol 2005. Annual meeting of the Society of Experimental Biology (Barcelona)

Hortal, S; Galipienso, L; Pera, J; Parladé, J. Quantification of ectomycorrhizal fungi in the soil by Real Time PCR. Pòster.

Setembre 2005. IV Congreso Forestal Español (Saragossa)

Hortal, S; Galipienso, L; Pera, J; Parladé, J. Seguimiento en campo de planta inoculada con el hongo ectomicorrícico *Lactarius deliciosus* mediante técnicas moleculares. Pòster.

Novembre 2005. IV International Workshop on Edible Mycorrhizal Mushrooms (Múrcia)

Hortal, S; Pera, J; Parladé, X. Tracking edible *Lactarius* strains in different phases of the managed mycorrhizal symbiosis. Pòster.

Juliol 2006. 5th International Conference on Mycorrhiza. Mycorrhiza for Science and Society (Granada)

Hortal, S; Pera, J; Parladé, J. Quantitative detection of extraradical soil mycelium of *Lactarius deliciosus* by real-time PCR. Application in the study of interspecific. Comunicació oral.

Parladé, J; Pera, J; Galipienso, L; Hortal, S. Molecular identification of the edible ectomycorrhizal fungus *Lactarius deliciosus* in the symbiotic and extraradical mycelium stages. Pòster.

Agost 2007. Fifth international workshop of edible mycorrhizal mushrooms (Chuxiong, Xina)

Martínez-Peña, F; Pera, J; Águeda, B; Cisneros, O; de Miguel, AM; Fernández-Toirán, LM; Hergueta, A; Hortal, S; Modrego, MP; Parladé, J. The “Arboletus” Project. Productive shrubs sites of *Boletus edulis* complex: ecological description, morphological characterization of its mycorrhizae, cultivation of its sporocarp mycelium and mycorrhization with shrubs. Pòster.

Setembre 2007. 4th International Symposium on Physiological Processes in Roots of Woody Plants (Bangor, Wales)

Hortal, S; Pera, J; Parladé, J. Persistence of *Lactarius deliciosus* extraradical soil mycelium and mycorrhizas in an interspecific competition study. Pòster.

Desembre 2007. 1ª Conferencia Mundial sobre Conservación y Uso Sostenible de Hongos Silvestres (Còrdova)

Hortal, S; Pera, J; Parladé, J. Tracking mycorrhizas and extraradical mycelium of the edible fungus *Lactarius deliciosus* under field competition with *Rhizopogon* spp. Pòster.

Martínez-Peña, F; Pera, J; Águeda, B; Cisneros, O; de Miguel, A; Fernández-Toirán, L.M; Hortal, S; Modrego, M.P; Parladé, J. El proyecto “Arboletus”: Producción de arbustos micorrizados con hongos del grupo *Boletus edulis*: caracterización morfológica y molecular de la simbiosis micorrícica y descripción del hàbitat de producció. Comunicació oral.