

Caracterización de cepas de *Lactarius* sección *Deliciosi* de Guatemala y su comparación con cepas europeas de *L. deliciosus*

Roberto Flores¹

Mario Honrubia²

Gisela Díaz³

¹Departamento Microbiología. Facultad Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
²Departamento Biología Vegetal. Facultad Biología. Campus Espinardo. Universidad Murcia. 30100 Murcia, Spain. ³Departamento Biología Aplicada, Área Botánica. Universidad Miguel Hernández de Elche. Avda. Universidad s/n 03202 Elche, Spain

Characterizing strains of *Lactarius* section *Deliciosi* from Guatemala and its comparison with European strains of *L. deliciosus*

Abstract. The morphological features of the mycelial cultures of 8 *Lactarius* strains belonging to the section *Deliciosi* from Guatemala (2 *Lactarius deliciosus* s.l, 1 *L. aff. salmonicolor*, 3 *L. indigo* y 2 *L. aff. rubrilacteus*) and 2 *L. deliciosus* strains from Spain are described. They were grown in BAF medium at 4 different pH values. The maximal growth was obtained at different pH values for each fungal strain. The colonies of *L. deliciosus* were different in colour, shape and texture depending on its geographical origin. Whereas European strains were fibrillose and with surface yellow to orange, the Neotropical ones were densely fibrillose and orange-pinkish to cinnamon. That features support the possibility that European and Neotropical and *L. deliciosus* are different species.

Key-words: colony, edible fungi, mycorrhiza.

Resumen. Se mencionan las características morfológicas de cultivos miceliares de 8 cepas de *Lactarius* de la sección *Deliciosi* procedentes de Guatemala (2 *Lactarius deliciosus* s.l, 1 *L. aff. salmonicolor*, 3 *L. indigo* y 2 *L. aff. rubrilacteus*) y 2 cepas de *L. deliciosus* Europeos procedentes de España, cultivados en medio BAF a 4 valores de pH. El máximo crecimiento se obtuvo a diferente pH según la cepa. Las colonias de *L. deliciosus* resultaron ser diferentes en color, forma y textura según su origen. Mientras las Europeas son notoriamente fibrilosas y con mechones hirsutos de color amarillo a naranja en la superficie, las Neotropicales forman colonias fibrilosas muy compactas o fibriloso-tomentosas de color naranja-rosado a canela. Estas notorias diferencias de los micelios en cultivo puro apoyan la posibilidad de que sean especies diferentes.

Palabras clave: colonia, hongos comestibles, micorriza.

Received 20 December 2007; accepted 15 June 2008.
Recibido 20 de diciembre 2007; aceptado 15 de junio 2008.

Introducción

La sección *Deliciosi* del género *Lactarius* se encuentra distribuida principalmente en el hemisferio norte, sur-este de Asia y parte del Neotrópico (Hesler y Smith, 1979; Wu y Mueller, 1997; Hutchinson, 1999; Nuytinck *et al.*, 2006). Algunas especies han sido introducidas en otras latitudes con

Autor para correspondencia: Gisela Díaz
gdiaz@umh.es

la plantación de coníferas exóticas (Lazo, 2001; Hall y Yun, 2002). Diversos autores han puesto de manifiesto la diversidad evolutiva y dispersión a otras áreas (Heilmann-Clausen *et al.*, 1998; Verbeken y Horak, 2000; Miller *et al.* 2001; Verbeken, 2001). Su importancia radica principalmente en el valor comercial de los cuerpos fructíferos de algunas especies, tales como *L. deliciosus*, *L. sanguifluus* y *L. indigo*. Además se trata de un género ectomicorrícico asociado en su mayoría a coníferas y fagáceas, plantas dominantes de

muchos ecosistemas montañosos. Recientemente, se ha descrito la asociación micorrícica entre *L. indigo* y *L. deliciosus* con varias especies Neotropicales y Euroasiáticas de *Pinus* (Flores *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2007).

La determinación taxonómica completa hasta especie y variedad de especímenes Neotropicales de esta sección es complicada, debido a diferencias con las variedades europeas e incluso con las Norteamericanas (Hesler y Smith, 1979). Por ello, es necesario disponer de un conocimiento completo de las características morfológicas, culturales, moleculares así como de su asociación micorrícica, de tal manera que se pueda ampliar el conocimiento sobre la identidad de nuevas cepas de *Lactarius* pertenecientes a la sección *Deliciosi*.

El objetivo de este trabajo fue describir las características morfológicas de cultivos miceliares de algunas cepas guatemaltecas de especies de *Lactarius* comestibles, así como hacer una descripción y comparación con cepas de *L. deliciosus* europeos.

Materiales y métodos

Material fúngico

Se utilizaron ocho cepas de *Lactarius* de la sección *Deliciosi* procedentes de Guatemala (*Lactarius deliciosus* (L.: Fr.) Gray s.l., *L. aff. salmonicolor* R. Heim & Leclair, *L. indigo* (Schw.) Fr. y *L. aff. rubrilacteus* Hesler & A.H. Sm.) y dos cepas de *L. deliciosus* (L.:Fr.) Gray, procedentes de España (Tabla 1). El material se encuentra depositado en el Herbario Rubén Mayorga Peralta de la Universidad de San Carlos de Guatemala, y en el Herbario del Laboratorio de Micología–Micorrizas de la Universidad de Murcia, España.

Aislamiento y cultivo

El aislamiento del micelio se realizó a partir de tejidos

internos estériles de basidiomas en medio de cultivo BAF (Moser 1960), acorde a los resultados de Oort (1981) y de Carrillo (2004). Se utilizaron cuatro niveles de pH (4.5, 5.5, 6.5 y 7.0), mediante adición de HCl o NaOH, con el fin de detectar el pH más adecuado para el crecimiento de las colonias, así como posibles variaciones en forma, apariencia y color. Los cultivos se realizaron en cajas de Petri de 9 cm y se mantuvieron en cámara oscura a 23 °C. Se prepararon tres placas por cada pH y una segunda repetición a los 60 días, a partir del primer cultivo. Semanalmente se revisaban los cultivos y se medía el diámetro de las colonias en la parte posterior de las cajas. Los colores de las colonias se compararon con la tabla de colores para hongos del Real Jardín Botánico de Edimburgo (1969). Las colonias se observaron con una lupa binocular OLYMPUS SZH y las características morfológicas (textura, margen y tipo de crecimiento) se describieron usando la terminología de Hutchinson (1991).

Resultados y discusión

Los resultados se encuentran en la tabla 2, donde se indican las texturas, colores, márgenes y diámetros de las colonias para cada pH empleado.

L. indigo SM 58.00 produjo colonias de crecimiento rápido (de 5 a 8.7 mm/día) especialmente con pH 4.5 y con diferentes tipos de textura. Las características generales de los cultivos de esta especie coinciden con la descripción de Hutchinson (1991).

L. salmonicolor PX 6.00 presentó colonias de crecimiento lento (de 2.5 a 3.5 mm/día) y muy parecidas a las colonias fibriloso-tomentosas de *L. deliciosus* SM 63.00 y con óptimo crecimiento a pH 6.5.

Las colonias de *Lactarius* aff. *rubrilacteus* manifestaron gran variación en cuanto a su crecimiento,

Tabla 1. Localidad, planta asociada y fecha de colecta de las cepas de *Lactarius* sección *Deliciosi* utilizadas

	Cepa	Localidad	Planta asociada	Fecha colecta
Guatemala	<i>L. indigo</i> USAC 8.00	Universidad San Carlos Ciudad de Guatemala 1518m.s.m	<i>Pinus oocarpa</i>	6/2000
	<i>L. indigo</i> SM 58.00	San Mateo Ixtatán, Huehuetenango 2590 m.s.m.	<i>P. hartwegii</i> <i>P. rudis</i>	6/2000
	<i>L. indigo</i> EN 126.00	Finca El Naranjo, Ciudad de Guatemala 1500 m.s.m	<i>P. pseudostrobus</i> <i>P. oocarpa</i> <i>Quercus peduncularis</i>	8/2000
	<i>L. deliciosus</i> SM 63.00	San Mateo Ixtatán, Huehuetenango 3590 m.s.m	<i>P. hartwegii</i> <i>P. rudis</i>	6/2000
	<i>L. deliciosus</i> PX 252.01	Panquix, Totonicapán 3000 m	<i>P. ayacahuite</i> <i>Abies guatemalensis</i>	9/2001
	<i>L. aff. rubrilacteus</i> CH 156.01	CantónPachoj Chichicastenango 1700 m.s.m.	<i>Pinus</i> spp. <i>Quercus</i> spp.	8/2001
	<i>L. aff. rubrilacteus</i> QT 202.01	San Miguel Siguilá, Quetzaltenango 1800 m.s.m	<i>P. hartwegii</i> <i>P. montezumae</i>	8/2001
	<i>L. aff. salmonicolor</i> PX 6.00	Panquix, Totonicapán 3000 m	<i>Abies guatemalensis</i>	6/2000
España	<i>L. deliciosus</i> SO 10	Almazán Soria 960 m.s.m.	<i>P. pinaster</i>	11/2000
	<i>L. deliciosus</i> Rp 31.01	Riópar, Albacete 950 m.s.m.	<i>P. sylvestris</i>	11/2000

aunque los mejores diámetros se alcanzaron con pH de 5.5. La cepa QT 202.01 produjo colonias más grandes y de color beige con centro beige o verde, mientras que la cepa CH 156.01 produjo colonias con tonos amarillo naranja. Desafortunadamente no se ha encontrado ninguna referencia sobre cultivos miceliares de *L. rubrilacteus* de Norteamérica para su comparación.

El crecimiento de *L. deliciosus* s.l. también varió según el pH: la cepa PX 250.01 produjo mayores colonias en pH 4.5 y la cepa SM 63.00 en pH 6.5. Las dos cepas proceden

de lugares ecológicamente similares, pero muy distantes entre sí. La cepa SM 63.00 formó dos tipos de colonias, una fibrilosa y otra tomentosa-fibrilosa, que se mantuvieron durante los siguientes subcultivos. La cepa PX 252.01 formó colonias fibrilosas muy parecidas a las de la cepa SM 63.00.

La morfología de las cepas españolas de *L. deliciosus* coincidió con descripciones previas (Torres y Honrubia, 1991; Sánchez *et al.*, 2000). Resulta interesante la comparación de las cepas guatemaltecas con las españolas, pues ambas difieren notablemente en color, forma y textura.

Tabla 2. Características morfológicas de cultivos miceliares de *Lactarius* sección *Deliciosi* de Guatemala y de *L. deliciosus* español

Cepa	pH	Centro de la colonia		Colonia		Margen		Reverso de la placa	Pigmentos difusibles	Cordones miceliares	Diámetro 7 días (mm)
		Textura	Color	Textura	Color	Textura	Color				
<i>Lactarius indigo</i> USAC 8.00	4.5	F,A,h	n-c-v	F,ss,R	b-n-v	i,sm	a	m-mn-v-a	-	n-v	64
	5.5	A,h	n-c-v	F,ss,R	b-n-v	i,sm	a	m-mn-v-a	-	n-v	60
	6.5	A,h	n-c-v	F,ss,R	b-n-v	i,sm	a	m-mn-v-a	-	n-v	55
	7.0	A,h	n-c-v	F,ss,R	b-n-v	i,sm	a	m-mn-v-a	-	n-v	62
<i>L. indigo</i> SM 58.00	4.5	A,h	n-c-v	F,ss	b-n-v	i,sm	a	m-nv-a	-	n-v	61
	5.5	T,h	n-c-v	F,ss	b-n-v	r,sm	a	mv-nv-a	-	n-v	52
	6.5	A,h	n-c-v	F,s,z	b-n-v	r,sm	a	m-nv-a	-	n-v	41
	7.0	A,h	b-n-v	F,s,z	b-n-v	i,sm	a	mv-mn-a	-	n-v	35
<i>L. indigo</i> EN 126.00	4.5	A,h	b-c-v	F,ss	b-n-v	i,sm	a	m-mn-a	-	n-v	52
	5.5	A,h	b-c-v	F,ss,R	b-n-v	i,sm	a	m-mn-a	-	n-v	56
	6.5	A,h	b-c-v	F,ss,R	b-n-v	i,sm	a	m-mn-a	-	n-v	46
	7.0	A,h	b-c-v	F,ss	b-n-v	i,sm	a	m-mnv-a	-	n-v	44
<i>L. aff. rubrilacteus</i> CH 156.01	4.5	h	n-v	T,h,ss	b-n-v	i,sm	a	m-mn-a	+	n-v	26
	5.5	T,h	n-v	T,h,s	b-n-v	r,sm	a	m-mnv-a	+	n-v	27
	6.5	T,h	n-v	T,s	b-n	i,sm	a	m-mnv-a	+	n-n	23
	7.0	T,h	n-v	T,h,s	b-n-v	i,sm	a	m-mvn-a	+	n-v	30
<i>L. aff. rubrilacteus</i> QT 202.01	4.5	T,h	b	T,F,h,ss	b	i,sm	b	m-b-b	-	b	52
	5.5	T,h	b	T,h,s	b-v	r,sm	b	m-bn-b	-	b	60
	6.5	T,h	b	T,h,s	b	r,sm	b	m-bm-b	-	b	55
	7.0	t,h	b	T,F,h	b	i,sm	b	m-b-b	-	b	
<i>L. aff. salmonicolor</i> PX 6.00	4.5	T	b-m	T,F,z,H	m-n	i,sm	a	m-mn-a	+	n-v	22
	5.5	T	b-m	T,F,z,H	b-m	i,sm	a	m-mn-a	+	n-v	18
	6.5	T	b-m	T,F,z,H	b-m	i,sm	a	m-mn-a	+	n-v	25
	7.0	T,h	b-m	T,F,z,H	b-m	i,sm	a	m-mn-a	+	n-v	24
<i>L. deliciosus</i> SM 63.00	4.5	b-m	b-m	T,F,H	n-m	r,sm	a	m-n-a	+	n-m	24
	5.5	T,h	b-m	T,F,H	n-m	r,ss	a	n-n-a	+	n-m	22
	6.5	T,h	b-m	F,H	n-m	r,sm	a	n-n-a	+	n-m	30
	7.0	T	b-m	F,A,H	n-m	r,ss	a	m-n-a	+	n-m	28
<i>L. deliciosus</i> PX 252.01	4.5	T	b	T,F,H	b-m	i,sm	a	m-n-a	+	n-m	32
	5.5	T	b-n	T,F,H	b-m	i,sm	a	m-mn-a	+	n-m	22
	6.5	T	b	T,F,H	b-m	i,sm	a	m-n-a	+	n-m	27
	7.0	T	b-n	T,F,H	b-m	i,ss	a	m-mn-a	+	n-m	20
<i>L. deliciosus</i> SO.10	4.5	T,h	n-m	F,h,ss	a-n	r,sm	a	m-n-a	-	n-m	62
	5.5	T,h	n-m	F,h,ss	a-n	r,sm	a	m-n-a	-	n-m	70
	6.5	T,h,A	n-m-v	F,h,ss,R	a-n	i,sm	a	m-n-a	-	n-m	68
	7.0	T,h	n-m-v	F,h,ss,R	a-n	i,sm	a	m-n-a	-	n-m	66
<i>L. deliciosus</i> Rp.01	4.5	F,h	a-n-v	F,h,ss	a-n	i,sm	a	m-n-a	-	n-m	22
	5.5	F,h	a-n-v	F,h,s	a-n	i,sm	a	m-n-a	-	n-m	19
	6.5	F,h,A	a-n	F,h,A	a-n	i,sm	a	m-n-a	-	n-m	19
	7.0	F,h,A	a-n	F,h,A	a-n	i,sm	a	m-n-a	-	n-m	26

Textura: T tomentoso, A algodonoso, h hirsuto o acúmulos hirsutos, F fibriloso, R anillo algodonoso o tomentoso, H hendiduras radiales, z zonado,

Color: c celeste, b beige, n naranja, v verde, y amarillento, m marrón a canela

Margen y tipo de crecimiento: r regular, i irregular, s superficial, ss semisuperficial, sm sumergido

Mientras las españolas son notoriamente fibrilosas y con frecuentes mechones hirsutos de color amarillo a naranja en la superficie, las guatemaltecas forman colonias fibrilosas muy compactas o fibriloso-tomentosas de color naranja-rosado a canela.

Estas notorias diferencias de los micelios en cultivo puro apoyan la posibilidad de que *L. deliciosus* de Guatemala (del Neotrópico en general) sea una especie distinta a la

europaea. Este punto de vista se sustenta también por las diferencias microscópicas y macroscópicas que se presentan en los cuerpos fructíferos de *L. deliciosus* de Guatemala, tales como el menor tamaño de esporas y basidios, sombrero de color naranja rosado, presencia de un corto mamelón cuspidado o estipe hueco (Flores *et al.*, 2007). Hesler y Smith (1979), Agerer, (1986) y Kernaghan *et al.* (1996) mencionaron que *L. deliciosus s.l.* en América no había sido

plenamente estudiado, por lo que era necesario profundizar en su estudio para determinar la verdadera identidad de esta especie y de las que componen la sección *Deliciosi*. Recientemente, los estudios taxonómicos de *Lactarius* comienzan a discriminar las especies de Norteamérica. En particular, Nuytinck *et al.* (2006) evaluaron el DNA de *L. deliciosus* Europeos y Norteamericanos, comprobando que forman un clado separado, por lo que deberían considerarse especies diferentes. En otro estudio molecular realizado por Flores *et al.*, (2007) se encontró también que cepas Neotropicales de *L. deliciosus*, algunas de las cuales se han utilizado en el presente estudio, están separadas de las especies europeas. Sostienen además, que *L. aff. salmonicolor* guatemalteco se sitúa lejos del europeo.

Sin embargo, y a pesar de todos estos datos, falta por precisar la identidad precisa de *L. deliciosus s.l.* Neotropical (Kuo, 2007) y de otras especies de la sección *Deliciosi*. En este sentido, los resultados presentados en este estudio pueden contribuir a profundizar en el conocimiento de estos hongos.

Literatura citada

Agerer, R., 1986. Studies on ectomycorrhizae. III. Mycorrhizae formed by four fungi in the genera *Lactarius* and *Russula* on spruce. Mycotaxon 27: 1-59

Carrillo, C., G. Díaz, M. Honrubia, 2004. Improving the production of ectomycorrhizal fungus mycelium in a biorreactor by measuring the ergosterol content. Engineering in Life Sciences 4: 43-45.

Díaz, G., R. Flores, M. Honrubia, 2007. *Lactarius indigo* and *L. deliciosus* form mycorrhizae with Eurasian or Neotropical *Pinus* species. Sydowia 59: 32-45.

Flores, R., G. Díaz, M. Honrubia, 2005. Mycorrhizal síntesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. with five Neotropical pine species. Mycorrhiza 15: 563-570.

Flores, R., G. Díaz, M. Honrubia, 2007. *Lactarius* section *Deliciosi* in Guatemala: a clue to undrstand the puzzle. The Fifth International Workshop of Edible Mycorrhizal Mushrooms, Chuxiong, China.

Hall, I., W. Yun, 2002. The cultivation of *Lactarius deliciosus* (Saffron milk cap) and *Rhizopogon rubescens* (shoro) in New Zealand. In: Hall I, W. Yun, E. Danell, A. Zambonelli (eds.), Edible Mycorrhizal Mushrooms and their cultivation. Proceedings of the Second International Conference on Edible Mycorrhizal Mushrooms, New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited, New Zealand.

Heilmann-Clausen, J., A. Verbeken, J. Vesterholt, 1998. The genus *Lactarius*. In: Lasso T, J. Petersen, S. Elborne (eds.), Fungi of Northern Europe Vol. 2. Jens H. Peteresen /Low budget Publishing, Denmark.

Hutchinson, L.J., 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. Mycotaxon 42: 387-504.

Hutchinson, L.J., 1999. *Lactarius*. In: Cairney, J.W.G., S.M. Chambers (eds.), Ectomycorrhizal Fungi. Key Genera in Profile. Springer-Verlag, Berlin. pp. 269-285.

Hesler, L.R., A.H. Smith, 1979. North American species of *Lactarius*. University of Michigan Press, Ann Harbor.

Kernaghan, G., R.S. Currah, R.J. Bayer, 1997. Russulaceous ectomycorrhizae of *Abies lasiocarpa* and *Picea engelmannii*. Canadian Journal of Botany 75: 1843-1850.

Kuo, M., 2007. *Lactarius deliciosus*. Retrieved from the Mushroom Expert.com website: http://www.mushroomexpert.com/lactarius_deliciosus.html.

Lazo, W., 2001. Hongos de Chile. Atlas Micológico. Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, Santiago.

Miller, S.L., T.M. McClean, B. Buyck, 2001. Molecular examination of the *Russula/Lactarius* interface. Phytopathology 91: S119. Publication no. P-2001-0121-MSA.

Moser, M.,1960. Die Gattung *Phlegmacium*. In: Die Pilze Mitteleuropas, 4, Aufl., Klinkhardt, Bad Heilbrunn, 442 p.

Nuytinck, J., S.L. Miller, A. Verbeken, 2006. A taxonomical treatment of the North and Central American species in *Lactarius* sect. *Deliciosi*. Mycotaxon 96: 261-307.

Oort, A.J.P., 1981. Nutritional Requirements of *Lactarius* species and Cultural Characters in Relation to Taxonomy. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

Sánchez, F., M. Honrubia, P. Torres, 2000. Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. Revista Iberoamericana de Micología 17: 127-134.

Torres, P., M. Honrubia, 1991. Dinámica de crecimiento y caracterización de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo. Cryptogamie Mycology 12: 183-92.

Verbeken, A., 2001. Worldwide Systematics of *Lactarius*: A State of the Art. Micologia e Vegetazione Mediterránea 16: 71-88.

Verbeken, A., E. Horak, 2000. *Lactarius* (Basidiomycota) in Papua New Guinea 2. Species in Tropical-montane Rainforest. Australian Systematic Botany 13: 649-707.

Wu, Q., G.M. Mueller, 1997. Biogeographic relationships between the macrofungi of temperate eastern Asia and eastern North America. Canadian Journal of Botany 75: 2108-2116.