

# ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN BASIDIOMICETOS FORMADORES DE ECTOMICORRIZAS EN *PINUS RADIATA* D. DON

Miren K. DUÑABEITIA, Susana HORMILLA,  
Emilio PÉREZ MORAL & José I. PEÑA

RESUMEN: La reproducción de enzimas extracelulares por las ectomicorrizas moviliza una fracción importante de los compuestos presentes en el suelo. Se presentan resultados de las actividades enzimáticas relacionadas con la movilización de nitrógeno y fósforo para cuatro especies de hongos formadores de ectomicorrizas, *Suillus luteus* (L.: Fr.) F. Gray, *Xerocomus badius* (Fr.:Fr.) Gilbert, *Boletus pinicola* (Vitt.) Venturi y *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch. Se considera el valor potencial de las actividades enzimáticas como criterio en la selección de hongos inoculantes. Los valores altos suponen una mayor utilidad de los hongos como inoculantes en condiciones de vivero.

Palabras clave: Ectomicorriza, fosfatasa, nitrato reductasa.

SUMMARY: Extracellular enzyme production by ectomycorrhizae is able to mobilize an important soil fraction. We report enzyme activities related with nitrogen and phosphorus mobilization in four ectomycorriza-forming fungi: *Suillus luteus* (L.: Fr.) F. Gray, *Xerocomus badius* (Fr.:Fr.) Gilbert, *Boletus pinicola* (Vitt.) Venturi and *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch. We examine the potential value of enzyme activity as a criterion for selecting inoculant fungi. High values are considered as profitable for inoculants under nursery conditions.

Key words: Ectomycorrhizae, phosphatase, nitrate reductase.

## INTRODUCCIÓN

Durante la última década se ha generalizado el interés por las micorrizas, en especial por su utilización en programas de reforestación y de inoculación en vivero. Sin embargo, antes de que esta inoculación con hongos ectomicorrícicos llegue a ser

una práctica rutinaria, es necesario estudiar a fondo diversos problemas, en especial la selección del hongo inoculante (Chalot & al., 1988).

La simbiosis con hongos ectomicorrícicos se traduce generalmente en una mejora de la nutrición de fósforo, atribuida en principio a un aumento del área de absorción de la raíz al incrementar la micorriza el volumen total de suelo explorado por el sistema radical (Bowen & al., 1975). Los hongos ectomicorrícicos difieren en gran medida en sus efectos sobre el hospedador. La diversidad fisiológica de las diferentes especies influye en el grado de desarrollo de la micorriza y en la respuesta de crecimiento de la planta hospedadora (Harley y Smith, 1983). Más aún, las actividades metabólicas de estos hongos y sus requerimientos nutritivos manifiestan una adaptación a la vida simbiótica que puede resultar de alguna forma limitante en condiciones de vida libre, por eso, se debe valorar también su capacidad de persistencia en el suelo, para que resulten efectivos como inoculantes en situaciones reales de campo. Parece probable que esta capacidad pueda estimarse a partir de medidas de actividad enzimática de procesos implicados en la movilización de nutrientes.

La mayor proporción del fósforo total presente en el suelo se encuentra en forma orgánica. La presencia en los simbioses fúngicos de fosfatasa ácida de superficie, capaces de hidrolizar cierta cantidad de los compuestos de fósforo orgánico hace suponer que la micorriza puede contribuir a la nutrición de fósforo de la planta hospedadora, además de aumentando la superficie de absorción radical, mediante la producción de enzimas extracelulares, que permiten a la planta utilizar este «pool» de fósforo, contribuyendo a movilizar una fracción importante del fosfato presente en el suelo a otras formas fácilmente asimilables (Doumas & al., 1986; Ho y Zak, 1979).

A partir de la demostración por Woolhouse (1969) de la existencia de una fosfatasa activa (detectable como hidrólisis de p-nitrofenil fosfato) en las micorrizas de haya, aumentó en gran medida el interés por la investigación de fosfatasas ácidas de superficie tanto de las ectomicorrizas como de los hongos ectomicorrícicos (Antibus & al., 1986). Williamsom y Alexander (1975) encontraron actividad fosfatasa ácida localizada en la vaina de micelio que envuelve a la raíz de haya. Ho y Zak (1979), observaron una elevada actividad fosfatasa en *Hebeloma crustuliniforme* (Scop.: Fr.) Berk & Broome y, más recientemente, Ho (1987, 1989) y Ho y Tilak (1988) analizaron la actividad fosfatasa de varias especies (*Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker & Couch, *Laccaria laccata* (Scop.: Fr.) Berk & Broome, *Rhizopogon vinicolor* Smith, *Amanita muscaria* (L.: Fr.) Hook, y *Boletus edulis* Bull. ex Fr. entre otras).

La mayoría de las plantas leñosas colonizan suelos muy pobres en nitrógeno. Algunos análisis del contenido en nutrientes del árbol micorrizado han mostrado que el simbionte fúngico participa en la nutrición mineral nitrogenada de dos formas: a) en la absorción y traslocación de los compuestos nitrogenados del suelo a la raíz y b) en la conversión del nitrógeno absorbido a formas asimiladas (Martin & al., 1987). En lo que se refiere a la toma de nitrato, el papel del hongo es fundamental, ya que la actividad Nitrato Reductasa parece ocurrir en mayor medida en el micelio (Bledsoe y Zazoski, 1983; Boxmán y Roelöf, 1988).

En este trabajo se presentan resultados de las actividades enzimáticas relacionadas con la movilización de Nitrógeno y Fósforo, de varias especies de hongos basidiomicetos ectomicorrícicos en cultivo puro que se hallan asociados a *Pinus radiata* D. Don.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado cultivos puros de 4 hongos ectomicorizógenos asociados a *Pinus radiata* D. Don.: *Pisolithus tinctorius* (Pers.) Coker and Couch, *Boletus pinicola* (Vitt.) Venturi, *Xerocomus badius* (Fr.:Fr.) Gilbert y *Suillus luteus* (L.: Fr.) F. Gray. Todos ellos fueron aislados siguiendo la técnica descrita por Molina y Palmer (1982), a partir de un fragmento del pileo de un esporocarpo joven y cultivados sobre medio MMN (Melin-Norkrans modificado) agar, en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez bien desarrollados, se extrajeron pequeños trocitos de micelio (aproximadamente 5 mm de lado) y se sembraron en Erlenmeyers de 250 ml, conteniendo cada uno 75 ml de medio MN líquido compuesto por: 0,005 gr. de  $\text{CaCl}_2$ , 0,025 gr. de NaCl, 0,5 gr. de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,25 gr. de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,15 gr de  $\text{Mg SO}_4$ , 0,02 gr. de Sequestrene, 25  $\mu\text{gr.}$  de Thiamine HCl y 2,5 gr. de D-Glucosa por litro de agua destilada. Antes de inocularlos se ajustó el pH del medio a 5,5 con HCl al 2% y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 min. Una vez sembrados, los Erlenmeyer se colocaron en agitación a unas 100 r.p.m. de 28 a 30 días, a temperatura ambiente (18-25°C), con luz tenue durante el día y en oscuridad durante la noche.

### Medida de Actividad Fosfatasa

Modificando el método descrito por Ho (1987), el micelio fue filtrado, lavado asépticamente con agua destilada y posteriormente con tampón citrato 50 mM pH 4,5. Cada colonia de micelio se colocó en 2,5 ml de tampón citrato 50 mM pH 4,5 y 0,5 ml de p-nitrofenilfosfato 5 mM, incubando en baño a 25°C durante una hora. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron 5 ml de NaOH 0,1 M para detener la reacción. Se extrajo la colonia, se lavó y se dejó secar en la estufa durante 48 horas a 80°C. La actividad fosfatasa ácida se determinó por la cantidad de p-nitrofenol liberados en el medio de reacción, midiendo Absorbancia a 405 nm. Los resultados se expresaron en  $\mu\text{moles}$  de p-nitrofenol liberados por gramo de peso seco y por hora a 25°C.

### Medida de Actividad Nitrato Reductasa

El micelio se filtró, lavó con agua destilada y posteriormente con tampón fosfato 0,1 M pH 7,5. Siguiendo el método descrito por Aparicio-Tejo y Sánchez Díaz (1982), cada colonia se infiltró a vacío (presión de 5 KPa) durante 10 min., dos veces

consecutivas, en un medio que contenía tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7,5 EDTA 1 mM, KNO<sub>3</sub> 50 mM y propanol al 3%. Después de lavar las muestras con agua destilada se incubaron durante 24 horas a 25°C en el mismo medio, pero sin propanol. El nitrito acumulado en el medio se cuantificó con Sulfanilamida 1% en HCl 1,5 M y NEDA (N-1-Naphthylethylenediamine dihydrochloride) 0,1%, incubando la muestra durante 20 minutos y midiendo la absorbancia a 540 nm. El peso seco de la colonia se determinó secándola en la estufa durante 48 horas a 80°C. Los resultados se expresaron en nmoles de nitrito liberados por gramo de peso seco y por hora de incubación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de actividad fosfatasa obtenidos muestran valores semejantes en *Suillus luteus* y *Xerocomus badius*. Se obtuvieron valores significativamente inferiores en *Pisolithus tinctorius* y *Boletus pinicola*. Cabe destacar la poca dispersión de los resultados en cada especie, que es debida probablemente a la aclimatación de estos aislamientos a las condiciones de cultivo.

Una capacidad limitada en la producción de fosfatasa reduce las posibilidades colonizadoras del hongo en el suelo, sobre todo cuando la principal fuente de fósforo es orgánica. En los suelos pobres, el fósforo se encuentra mayoritariamente en forma inorgánica: como formas insolubles de fosfato cálcico. En estas condiciones puede ser de poco valor adaptativo, en cuanto a toma de fósforo, disponer de «p-nitrofenilfosfatasa», es decir, la actividad enzimática medida en este trabajo. Sin embargo, en suelos muy orgánicos los hongos con elevada capacidad fosfatasa y descomponedora parecen tener ventaja en la obtención de nutrientes (Ho, 1987).

ESPECIE FUNGICA	ACTIV. FOSFATASA ( $\mu$ mol. peso seco gr <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> )	ACTIV. NITRATO REDUCTASA (nmol. peso seco gr.1 h.1)
<i>Boletus pinicola</i> (Vitt.) Venturi	1,22 $\pm$ 0,20 a	24,54 $\pm$ 1,09 A
<i>Suillus luteus</i> Fr. ex L.	9,34 $\pm$ 0,69 b	7,19 $\pm$ 0,59 B
<i>Xerocomus badius</i> (Fr.: Fr.) Gilbert	10,24 $\pm$ 0,81 b	9,59 $\pm$ 0,67 B
<i>Pisolithus tinctorius</i> (Pers).Coker & Couch	6,63 $\pm$ 0,92 c	22,86 $\pm$ 1,24 A

Tabla 1. Valores de actividades enzimáticas expresadas como media  $\pm$  error típico (n=15). Los valores que difieren significativamente (P>0,05), van seguidos por letras diferentes.

Los resultados de actividad nitrato reductasa mostraron valores muy altos en *Boletus pinicola* y *Pisolithus tinctorius*. Cabe destacar que en estas dos especies, y de forma más acusada en *Boletus pinicola* se obtuvieron los valores más bajos de actividad



fosfatasa. Se observaron valores significativamente muy inferiores en *Suillus luteus* y *Xerocomus badius*. Algunos autores indican que los hongos ectomicorrícicos de suelos de bosque ácidos no utilizan con demasiada efectividad las formas nitrato. Así, Ho y Trappe (1980), mostraron que la actividad nitrato reductasa de los hongos ectomicorrícicos es baja comparada con la de las raíces del abeto de Douglas.

Los valores altos de actividad nitrato reductasa resultan eficaces en suelos ricos, fertilizados, más que en los suelos pobres, no fertilizados y de orografía desfavorable, que son los que generalmente se destinan a uso forestal.

Se ha observado que las actividades fosfatasas ácidas de superficie difieren significativamente entre micorizas sintetizadas con diferentes hongos (Antibus & al., 1986; Dighton, 1983) y entre diferentes especies de hongos ectomicorrícicos creciendo en cultivo puro, sugiriéndose la posibilidad de que la actividad fosfatasa resulte útil en la selección de los hongos micorrizógenos para su uso como inoculantes (Ho y Zak, 1979). En condiciones de vivero, donde se utilizan suelos ricos en materia orgánica y fertilizados para estimular un crecimiento rápido de las plántulas, resulta interesante seleccionar hongos con valores altos para ambas actividades enzimáticas. Por ejemplo, Le Tacon y Buchard (1986), trabajando con plántulas de abeto de Douglas inoculadas con *Laccaria laccata* pudieron disminuir el tiempo de cultivo a dos años, mientras que las plántulas no inoculadas requerían de tres a cuatro años para alcanzar el estado adecuado para su trasplante al campo. La micorrización constituye además una herramienta biológica para mejorar la supervivencia y el crecimiento de los plantones de pino en lugares de reforestación de baja calidad.

En nuestros resultados, tanto *Suillus luteus* como *Xerocomus badius* muestran valores aceptables por equilibrados, mientras que los de *Pisolithus tinctorius*, aunque más favorables para nitrato reductasa, disminuyen para fosfatasa.

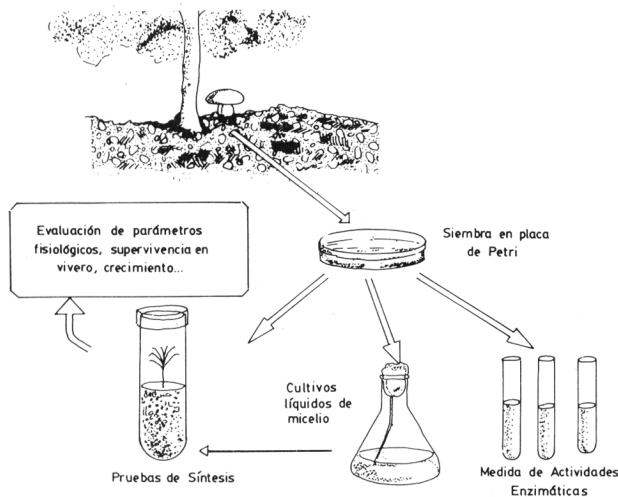


Figura 1. Esquema de las etapas de selección de hongos ectomicorrícicos.

En el esquema de la figura 1, hemos tratado de resumir las etapas en la selección de hongos inoculantes que estamos llevando a cabo en nuestro laboratorio: obtención del micelio en cultivo puro a partir de los cuerpos fructíferos recolectados en campo, cultivos del micelio en placa Petri y medio líquido, medida de actividades enzimáticas y posteriormente se realizarán las síntesis de las simbiosis ectomicorrícicas. Una vez obtenida la micorrización, se procederá a evaluar los parámetros fisiológicos, que en el último término indicarán la validez de los criterios enzimáticos seguidos en la selección.

### BIBLIOGRAFÍA

- ANTIBUS, R.K., C.J. KROEHLER & A.E. LINKIS -1986- The effects of external pH, temperature and substrate concentration on acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 64:2383-2387.
- APARICIO TEJO, P.M. & M. SANCHEZ DIAZ -1982- Nodule and leaf nitrate reductases and nitrogen fixation in *Medicago sativa* L. under water stress. *Plant Physiol.*, 69:479-482.
- BLEDSE, C.S. & R.J. ZAZOSKI -1983- Effects of ammonium and nitrate on growth and nitrogen uptake by mycorrhizal Douglas-fir seedlings. *Plant and soil*, 71:445-454.
- BOWEN, G.D., D.I. BEVEGE & B. MOSSE -1975- *Phosphate physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizas*. En: *Endomycorrhizas*. F.E. Sanders, B. Mosse & P.B. Tinker (eds.) Academic Press, London.
- BOXMAN, A.W. & J.G.M. ROELOFS -1988- Some effects of nitrate versus ammonium nutrition on the nutrient fluxes in *Pinus sylvestris* seedlings. Effects of mycorrhizal infection. *Can. J. Bot.*, 66:1091-1097.
- CHALOT, M., P.M. BATTUT, B. BOTTON, F. LE TACON & J. GARBAYE -1988- Recent advances in physiological and practical aspects of ectomycorrhizal effects on tree development. *Acta Oecol., Oecol. Applic.*, 9(4):333-351.
- DIGHTON, J. -1983- Phosphatase production by mycorrhizal fungi. *Plant and soil*, 71:455-462.
- DOUMAS, P., D.C. BERJAUD, M. CALLEJA, M. COUPE, C. ESPIAU & J. D'AUZAC -1986- Phosphatases extracellulaires et nutrition phosphatée chez les champignons ectomycorhiziens et les plantes hôtes. *Physiol. Veg.*, 24(2):173-184.
- HARLEY, J.L. & S.E. SMITH -1983- *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, New York.
- HO, I -1987- Comparison of eight *Pisolithus tinctorius* isolates for growth rate, enzyme activity and phytohormone production. *Can. J. For. Res.*, 17:31-35.
- HO, I. -1989- Acid phosphatase, alkaline phosphatase, and nitrate reductase activity of selected ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 67(3):750-753.
- HO, I. & K.V.B.R. TILAK -1988- A simple method for assessing acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 91(2):346-347.
- HO, I. & ZAK, B. -1979- Acid phosphatase activity of six ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 57:1203-1205.
- HO, I. & J.M. TRAPPE -1980- Nitrate reductase activity of nonmycorrhizal Douglas-fir rootlets and some associated mycorrhizal fungi. *PLANT and Soil*, 54:395-398.
- KROEHLER, C.J., R.K. ANTIBUS & A.E. LINKIS -1988- Effects of organic and inorganic phosphorus concentration on the acid phosphatase activity of ectomycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 66:750-756.

- LE TACON, F. & D. BOUCHARD -1986- Effects of different ectomycorrhizal fungi on growth of Larch, Douglas fir, Scots pine and Norway spruce seedlings in fumigated nursery soil. *ACTA OECOL., OECOL APPLIC.*, 7(4):389-402.
- MARTIN, F., M. RAMSTEDT & K. SÖDERHALL -1987- Carbon and nitrogen metabolism in ectomycorrhizal fungi and ectomycorrhizas. *Biochimie*, 69:569-581.
- MOLINA, R. & J.G. PALMER -1982- Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. En. *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. N.C. Schenck (ed.) American *Phytopathological Soc. St. Paul*.
- WILLIAMSON, B. & I.J. ALEXANDER -1975- Acid phosphatase localised in the sheath of beech mycorrhiza. *Soil. Biol. Biochem.*, 7:195-198.
- WOOLHOUSE, H.W. -1969- *Differences in the properties of the acid phosphatase of plant roots and their significance in the evolution of edaphic ecotypes*. En: *Ecological aspects of the mineral nutrition of plants*. I.H. Rorison (ed.). Oxford; Blackwell.

(Aceptado para su publicación en Junio de 1.990 )

