

Descripción de cultivos miceliares de Boletales neotropicales y europeos (*Boletus* grupo *edulis*, *Boletellus* y *Suillus*) y formación de primordios de *B. edulis* en cultivo puro

Gisela Díaz¹

Roberto Flores²

Mario Honrubia³

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

Description of mycelial cultures of Boletales (*Boletus* of the *edulis* group, *Boletellus* and *Suillus*) from Guatemala and primordium formation of *B. edulis* in pure culture

Abstract. The morphological features of 7 mycelial culture fungal strains belonging to Boletales from Guatemala (2 of *Boletus edulis*, 1 of *B. pinophilus*, 1 of *B. luteoloincrustatus*, 1 of *Boletellus russelii*, 1 of *Suillus tomentosus*, 1 of *S. bovinus*) and 3 fungal strains from Spain (2 of *Boletus edulis*, 1 of *B. pinophilus*) are described. They were grown in MNM, Moser B, Gamborg and Pachlewski culture media. The maximal growth was obtained with MNM and Moser medium. *Boletus* mycelia of the *edulis* group were similar among them. *B. luteoloincrustatus* mycelia were darker in colour than *B. edulis* and *B. pinophilus*. *Suillus tomentosus* have a faster growth than the other strains tested in MNM medium. Primordia of *B. edulis* SO 18 with rudimentary stipe and pileus were obtained in bottles with peat-vermiculite and MNM medium but not in tubes with PDA, at different pH levels.

Key words: mycelial growth, edible fungi, mycorrhizas, wild strains.

Resumen. Se describen las características morfológicas de cultivos miceliares de 7 cepas de Boletales procedentes de Guatemala (2 de *Boletus edulis*, 1 de *B. pinophilus*, 1 de *B. luteoloincrustatus*, 1 de *Boletellus russelii*, 1 de *Suillus tomentosus*, 1 de *S. bovinus*) y 3 cepas procedentes de España (2 de *Boletus edulis*, 1 de *B. pinophilus*) cultivadas en los medios de cultivo MNM, Moser B, Gamborg y Pachlewski. En general, los mayores crecimientos de micelios se obtuvieron con los medios MNM y Moser. Los micelios de las cepas de *Boletus* grupo *edulis* fueron similares entre sí. *B. luteoloincrustatus* produjo micelios de color beige más oscuro que *B. edulis* y *B. pinophilus*. *Suillus tomentosus* presentó mayor velocidad de crecimiento que el resto de las cepas en los medios MNM y Moser. Se obtuvo la formación de primordios diferenciados en píleos y estípites rudimentarios en la cepa *B. edulis* SO 18 en frasco con turba-vermiculita y medio MNM, pero no en tubos con PDA a diferentes valores de pH.

Palabras clave: crecimiento micelial, hongos comestibles, micorrizas, cepas silvestres.

Received 10 October 2008; accepted 17 July 2009.

Recibido 10 de octubre 2008; aceptado 17 de julio 2009.

Introducción

En el norte del Neotrópico (México y Centroamérica) se desarrollan la mayor parte de los géneros y especies de

Autor para correspondencia: Gisela Díaz
gdiaz@umh.es

Boletales que se conocen del Hemisferio Norte (Singer *et al.*, 1983; Sommerkamp y Guzmán, 1990; Gómez, 1996; Flores *et al.*, 2000). La mayoría de las especies han sido identificadas con los nombres de especies europeas. Sin embargo, la determinación taxonómica de especímenes neotropicales es complicada debido a diferencias morfológicas, moleculares

y de cultivo con las especies europeas, que es necesario conocer. Así, aunque muchas especies crecen en ambas regiones, existen también especies de distribución restringida, como *B. guatemalensis* Flores & Simonini y *B. luteoloincrustatus* Flores & Simonini en Guatemala (Flores y Simonini, 2000) y *B. flavoniger* Halling, *B. neoregius* Halling & G.M. Muell. y *B. quercophilus* Halling & G.M. Muell. en Costa Rica (Halling y Mueller, 1999).

El orden Boletales incluye géneros que han sido muy estudiados y utilizados en la producción de planta forestal micorrizada, tales como *Rhizopogon*, *Suillus*, *Pisolithus* o *Scleroderma* (Marx, 1977; Cairney y Chambers, 1999). También incluye otros géneros micorrícicos, como *Boletus* grupo *edulis*, con especies de gran interés para la producción de cuerpos fructíferos comestibles. Por ello, algunas especies de este grupo se han utilizado para intentar inducir la formación de basidiomas en cultivo puro (Pantidou y Watling, 1973; Giltrap, 1981; Yamanaka *et al.*, 2000), existiendo solo una cita previa de formación de primordios con *B. edulis* (Karpinski, 1967). Sin embargo, los resultados positivos de micorrización controlada en condiciones experimentales son muy escasos, en ocasiones confusos o con poca difusión, y siempre utilizando cepas europeas (Zuccherelli, 1988; Cerutti *et al.*, 1985-86; Cerutti *et al.*, 1987-88; Rodríguez *et al.*, 1992; Meotto *et al.*, 1994; Águeda *et al.*, 2008). En todo caso, el estudio del comportamiento de estos hongos en cultivo puro y sus requerimientos constituye la base de la producción de inóculo, etapa necesaria para la síntesis micorrícica en plantas de importancia forestal y posterior producción de carpóforos.

El objetivo de este trabajo fue describir las características morfológicas de cultivos miceliales de algunos Boletales que crecen en Guatemala, y su comparación con cepas europeas, con el fin de identificar las características de cultivo que pudieran ser consideradas como base, tanto para estudios taxonómicos que permitan aumentar el conocimiento sobre la identidad de nuevas cepas neotropicales, como para estudios aplicados orientados a la

síntesis micorrícica con hongos comestibles. Este trabajo forma parte de un estudio más amplio que tiene como finalidad la caracterización de hongos comestibles de Guatemala, su simbiosis micorrícica y su comparación con cepas europeas (Díaz *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2005, 2008a y b).

Materiales y métodos

Material fúngico

Los basidiomas de *Boletus edulis* Bull.: Fr., *B. pinophilus* Pilát & Dermek *B. luteoloincrustatus*, *Boletellus russelli* (Frost) Gilbert, *Suillus bovinus*. (L.) Kuntze y *S. tomentosus* (Kauff.) Sing. fueron recolectados en distintos lugares, fechas y bajo diferentes especies vegetales, tal como se muestra en la Tabla 1. Las cepas fueron aisladas y subcultivadas cada tres meses en medio MNM y mantenidas en tubos a 4°C hasta su utilización. Además, para tener un patrón de referencia para *B. edulis* y *B. pinophilus*, se utilizaron varias cepas aisladas de basidiomas procedentes de Almazán (Soria), España. Estas cepas se habían utilizado previamente en otros estudios de producción de inóculo y síntesis micorrícica con diferentes especies de pino (datos no publicados). Los especímenes colectados están depositados en el Herbario Rubén Mayorga Peralta de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC) y en el Herbario del Laboratorio de Micología-Micorrizas de la Universidad de Murcia, España (HUM).

Caracterización micelial

Se emplearon los medios de cultivo Moser-B (Moser, 1960), Melin y Norrans modificado-MNM (Marx, 1969), Pachlewski (Pachlewski y Pachlewski, 1974) y Gamborg (Gamborg *et al.*, 1968). Las cepas se sembraron en todos los medios de cultivo utilizados, preparándose tres repeticiones en cajas de Petri de 9 cm de Ø, por cada condición. Las cajas se inocularon con un fragmento de cultivo de 0,8 cm de Ø

tomado con un sacabocados del margen del cultivo reactivado. Las placas se incubaron a 23°C, en oscuridad durante 5 semanas. Cada semana se midió el Ø del micelio, marcando la parte inferior de las placas y se calculó restando el Ø inicial del fragmento inoculado. Los datos para cada cepa fúngica se sometieron a un análisis estadístico de comparación de medias mediante la prueba de Duncan con un nivel de significancia de $\alpha < 0.05$. Los colores de los micelios se compararon con la tabla de colores para hongos del Royal Botanic Garden Edimburg (Hendersen *et al.*, 1969). Los micelios se observaron con una lupa binocular marca Olympus SZH y las características morfológicas (textura, margen y tipo de crecimiento) se describieron usando la terminología de Hutchinson (1991).

Cultivos para la obtención de primordios

Las placas de *B. edulis* que presentaron mejor crecimiento micelial fueron seleccionadas para preparar inóculo de la cepa en medio MNM semilíquido (1.5 g agar/L), dejándose en incubación a 23°C y con agitación manual cada 4 días. Además y de acuerdo a resultados de experimentos previos (datos no publicados) de la formación de primordios de la especie *in vitro* se prepararon tubos de ensaye con medio de cultivo de papa dextrosa agar (PDA) a tres valores de pH (4.5, 5.5 y 7.0), para determinar si este medio y el grado de acidez favorecían la inducción de primordios en *B. edulis*. También se prepararon frascos de 500 ml con 400 ml de turba-vermiculita humedecida con medio MNM, Gamborg o extracto de malta líquido (pH 5.5). Tanto los tubos como los frascos se inocularon con las cepas de *B. edulis* previamente crecidas en cultivos sólidos y semilíquidos. Todas las pruebas se colocaron en cámara oscura a 23°C durante cinco meses.

Resultados y discusión

Las características macroscópicas de los micelios obtenidas en los diferentes medios de cultivo utilizados se presentan en la Tabla 2.

En general, las cepas ensayadas alcanzaron los mayores diámetros miceliales en los medios MNM y Moser B. Para el caso de las cepas *Boletellus russelli* y *B. edulis* SO 18, los diámetros miceliales fueron mayores en MNM y comparables con los otros tres medios de cultivo utilizados. El crecimiento de *B. edulis* Ix154.00 fue similar en medio MNM y Pachlewski. Por tanto, sugerimos que los medios MNM y Moser son los más apropiados en el proceso de producción de inóculo, para su posterior uso en la síntesis micorrícica.

El crecimiento de los micelios de *Boletus* fue lento, sin llegar a ocupar la totalidad de la caja de Petri, en ningún caso, a los 35 días de inicio del cultivo. El crecimiento promedio de las cepas guatemaltecas en medio MNM fue desde 0.46 a 0.57 mm/día. Las cepas guatemaltecas de *B. edulis* produjeron micelios más pequeños que la cepa española *B. edulis* SO 18 (que fue previamente seleccionada, junto con la cepa SO 19, entre más de 10 aislamientos de distintos basidioma jóvenes procedentes de Soria). *Boletellus russelli* en cambio, produjo micelios mayores (de 24 a 34 mm) que las cepas guatemaltecas de *B. edulis*. *Suillus tomentosus* presentó mayor crecimiento promedio (1.43 mm/día) que el resto de las cepas en los medios MNM y Moser, con micelios promedio de 50 mm a los 35 días de cultivo. Esta cepa incrementó su crecimiento a partir de la tercera semana de incubación, logrando cubrir el diámetro total de las cajas de Petri a las 7-8 semanas de iniciado el cultivo (datos no presentados), lo cual no ocurrió con el resto de los hongos utilizados. Los diámetros miceliales alcanzados en este estudio son mayores a los reportados previamente por Vázquez-García *et al.*, (2002) para cepas de *S. tomentosus* procedentes de México, cultivadas a diferentes condiciones

Tabla 1. Localidad de origen y especie vegetal asociada a los Boletales de Guatemala y España empleados en este estudio

Cepa	Localidad	Especie vegetal asociada
<i>Boletus edulis</i> Ix 154.00	Ixchiguán, San Marcos Guatemala 3500 m	<i>Pinus hartwegii</i> <i>P. rudis</i>
<i>B. edulis</i> Chi 190.00	Tzichím, Todos Santos Cuchumatán Guatemala 3600 m	<i>P. hartwegii</i> <i>P. rudis</i>
<i>B. pinophilus</i> X 46.01	San Miguel Siguilá Quetzaltenango Guatemala 2200 m	<i>P. hartwegii</i> <i>Pinus spp.</i>
<i>B. luteoloincrustatus</i> T13.6.00	Tecpán, Chimaltenango Guatemala 1800 m	<i>Quercus peduncularis</i> <i>Quercus spp.</i>
<i>B. edulis</i> SO 18	Almazán, Soria España 1100 m	<i>P. sylvestris</i>
<i>B. edulis</i> SO 19	Almazán, Soria España 1100 m	<i>P. sylvestris</i>
<i>B. pinophilus</i> SO 20	Almazán, Soria España 1100 m	<i>P. sylvestris</i>
<i>Boletellus russelii</i> Ar16.6.99	Finca El Ardiller, Ciudad de Guatemala Guatemala 1500 m	<i>Q. peduncularis</i>
<i>Suillus tomentosus</i> Tt 99.00	Totonicapán Guatemala 3000 m s.n.m.	<i>P. hartwegii</i> <i>Pinus spp.</i>
<i>S. bovinus</i> TS 1.99	Todos Santos Cuchumatán Guatemala 2900 m	<i>P. ayacahuite</i> <i>P. rudis</i> <i>P. hartwegii</i>

de pH (25.9-34.2 mm de diámetro a pH 5 y 6, en cultivos de 30 d de incubación).

Las características de crecimiento de los cultivos obtenidos de *Boletus* grupo *edulis* de Guatemala fueron similares entre sí. Sin embargo, la cepa *B. luteoloincrustatus* presentó micelios de menor tamaño que *B. edulis* y *B. pinophilus* en los medios Gamborg y Pachlewski y con una coloración beige más oscura que éstos. El color, textura, forma y velocidad de crecimiento de estas cepas coinciden a mayoritariamente con lo reportado para las cepas de especies europeas (Torres y Honrubia, 1993). Las características de los

cultivos de *B. edulis*, *B. russelii* y *S. tomentosus* coinciden también con lo citado por Hutchinson (1991) para cepas de Norteamérica, en los medios de PDA y MNM, aunque los diámetros fueron menores.

Las diferencias de crecimiento observadas entre cepas pueden tener su origen en la variedad genética de las mismas, tal como han señalado Dahlberg y Stenlid (1995), quienes consideraron que las variaciones pueden ocurrir entre poblaciones de hongos de una misma especie e incluso, en una misma localidad.

Tabla 2. Características morfológicas de los micelios de Boletales procedentes de Guatemala y España en cinco medios nutritivos de cultivo en placa

Cepa	Medio	Centro		Micelio		Margen ³		Reverso de la placa	Diámetro ⁴ 35 d (mm)
		Textura ¹	Color ²	Textura	Color	Textura	Color		
<i>Boletus edulis</i> Ix 154.00	MNM	A	b-be	Ac, Z	b-be-a	r,c	b-be-a	p-b	18 ± 0.5 a
	Moser B	A	B	ATc, Z, H	b, ga	r,c	a	p-b	10 ± 0.5 b
	Gamborg	A	b-be	ATc, Z	b-be	i,l	b-be-a	p-b	12 ± 0.6 b
	PACH	A	B	AFI	be	i,l	b	p-b	19 ± 0.6 a
<i>B. edulis</i> Chi 190.00	MNM	A	b-be	AFc	b-be-a	i,l	b	pn-b	18 ± 0.5 a
	Moser B	A	B	Ac, H	b	r,c	b-be	p-b	11 ± 0.5 b
	Gamborg	A	B	Ac	b-be	i,l	b-be	pn-b	10 ± 0.7 b
	PACH	--	--	--	--	--	--	--	0 ± 0.0 c
<i>B. luteoloincrustatus</i> T 13.6.00	MNM	T	b-be	Ac, Z	b-be	r,c	b-be	p-ba	18 ± 0.9 a
	Moser B	T	B	ATc, H	b-a	r,c	b-be	p-b	10 ± 0.7 a
	Gamborg	A	B	ATc	b	r,l	b-be	p-b	6 ± 0.5 b
	PACH	T	Be	Fs	be-p	i,l	be	p-b	4 ± 0.5 b
<i>Boletellus russelii</i> Ar 16.6.99	MNM	A	b-a	Ac, Z	a-be,GTb-av	r,l	b-be	pn-a-b	34 ± 0.8 a
	Moser B	A	b-a,ga	Ac	a-be, GTb-n	i,l, GTb-n	b-be	pn-a-b	27 ± 0.6 b
	Gamborg	A	a-p	AFc	a-p	i,l	b-be	pn-a-b	25 ± 0.7 b
	PACH	A	b-a	AFc	a-p, GTb-n	i,l	b-be	pn-a-b	24 ± 0.9 b
<i>B. edulis</i> SO 18	MNM	A	b	AFc, H	b	r,l	b	B	33 ± 0.6 a
	Moser B	A	b, gb	AFc, H	b	r,l	b	p-ba	22 ± 1.1 b
	Gamborg	A	b	AFI, H	b	r,l	b-be	B	23 ± 0.9 b
	PACH	A	b	F,l	b	i,l	b-be	br-b	28 ± 1.0 b
<i>B. edulis</i> SO 19	MNM	A	b	AFc, Z,H	b-be	r,l	b-be	p-b	3 ± 0.5 b
	Moser B	A	b	ATc, Z,H	b-be	r,c	b	p-b	8 ± 0.6 b
	Gamborg	A	b	FTI	b-be-a	i,l	b-g	B	26 ± 0.9 a
	PACH	A	b	AFI	b-be	i,l	b	p-b	34 ± 1.3 a
<i>B. pinophilus</i> X 46.01	MNM	AT	b	Ac	b-be, ga	i,l, GTb	be	p-be	20 ± 1.1
<i>B. pinophilus</i> SO 20	MNM	AT	b	ATc	b-be-a	i,l, GTb	b-be	p-bn-be	16 ± 1.2
<i>Suillus tomentosus</i> Tt 99.00	MNM	AT	b-s	AFc, Z	pa-ps	rftc	be	pn-a-be	49 ± 1.1 a
	Moser B	AT	b-s	ATc, H	b-s, gp	rte	be	pv-p-be	50 ± 0.9 a
	Gamborg	---	---	---	---	---	---	---	0 ± 0.0 c
	PACH	A	be	F,l	b-be	i,l	be	Be	20 ± 0.8 b
<i>S. bovinus</i> TS 1.99	MNM	T	be-a	AFc, Z	pa-a, Csn-be	i,l	be	p-pn-be	20 ± 1.1 a
	Moser B	T	b-be	ATc	Be-s-v, gp	i,l	be-s	po-p	19 ± 0.6 a
	Gamborg	AT	a-b	FS	be-s	i,l, GTb	be-a	p-be	02 ± 0.5 c
	PACH	AT	b	FS	p	i,l, GTb	be	po-p	11 ± 0.8 b

¹Textura: A=algodonoso, Ac=algodonoso compacto, AT=algodonoso-tomentoso, AF=algodonoso-fibriloso. F=fibriloso, GT=acúmulos tomentosos, Z=zonado, H=hendiduras, radiales, C=cordones miceliares, S=sumergido. ²Color: be=beige, a=amarillento, n=naranja, p=pardo, po=pardo oscuro, s=salmón, v=verdoso, b=blanquecino. ³Margen: r=regular, i=irregular, l=laxo, g=gotitas de exudados. ⁴Los datos son media de tres repeticiones ± desviación estándar. Para cada cepa, letras distintas indican que son significativamente diferentes según la prueba de Duncan (p<0.05).

En todos los cultivos se observó un aparente cambio de color en el medio, lo que indica la posible presencia de metabolitos solubles producidos por los micelios, especialmente en los medios de cultivo de Moser-B, Pachlewski y en PDA. Esta característica de los micelios podría relacionarse con la inducción para la formación de carpóforos, y de modo particular con las dos especies de

Suillus. La producción de metabolitos en cultivos de Boletales fue puesta de manifiesto anteriormente por Hutchinson (1991).

Con respecto a la textura de los micelios, las dos cepas de *Suillus* produjeron abundante micelio algodonoso-lanoso, de color desde beige a rosado, tal como cita Hutchinson (1991) para *S. tomentosus*.

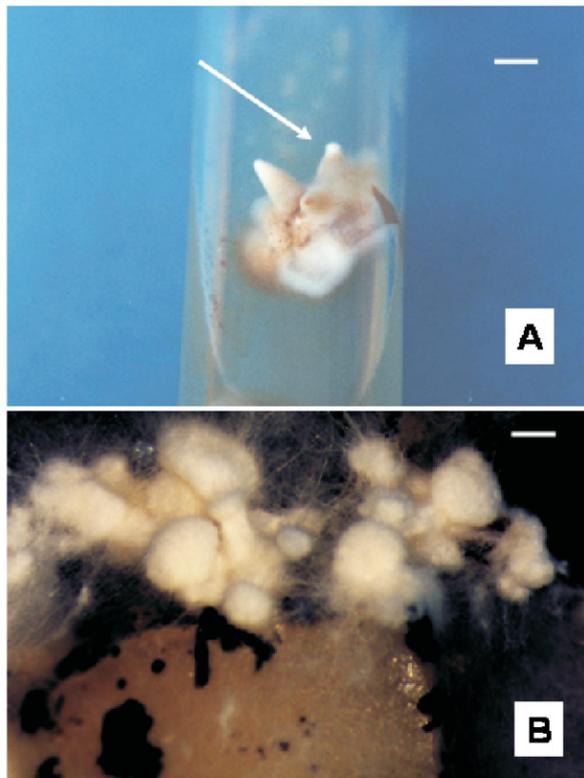


Figura 1. Formación de primordios de *Boletus edulis* en cultivo puro. A: en tubos con medio PDA. B: en frascos con turba-vermiculita y medio MNM. Escala: 1 mm.

En cuanto a la formación de primordios de *B. edulis* en los cultivos en tubo con PDA, las cepas presentaron micelio aéreo hirsuto y denso en los tres niveles de pH ensayados, muy distinto al observado en los otros medios y formando pequeños abultamientos en algunas áreas; sin embargo no se produjeron primordios bien diferenciados (Figura 1A). Los primordios se formaron solamente con la cepa SO 18 en los frascos con turba-vermiculita y medio MNM. Los primordios aparecieron agrupados en la superficie del substrato y midieron hasta 2 mm de largo, alcanzando a observarse las formas diferenciadas en píleo y estípite, aunque rudimentarias, como puede observarse en la Figura 1B.

Aparentemente los primordios se forman a partir de primeros aislamientos o cultivos miceliares muy jóvenes. Giltrap (1981) señaló la formación de este tipo de estructuras

en primeros aislamientos de *Xerocomus badius*, *B. porosporus*, *B. subtomentosus* y *Suillus piperatus*, anotando que dicha característica se perdía después de 3-4 meses de cultivo. Olivier *et al.* (1997) mencionan la obtención de primordios de *B. aestivalis*, de hasta 7 mm, utilizando medio Pachlewski modificado. Se han obtenido también primordios de *B. edulis* (Karpinski, 1967), *B. amarellus* Quel. (Pantidou y Watling, 1973) y más recientemente se ha conseguido la formación de basidiomas jóvenes de una cepa de *B. reticulatus* (Yamanaka *et al.*, 2000). Estos autores indican también la pérdida de la capacidad de formar primordios un año después del aislamiento del hongo. La empresa neozelandesa Crop & Food también indica haber obtenido primordios de *B. edulis* en medio sólido, como expone en su página web (www.crop.cri.nz), pero no da información alguna sobre técnicas ni medios empleados.

En varios de los primeros aislamientos de *B. edulis* realizados en este estudio y en otros posteriores, se encontró la formación de pequeños acúmulos tomentosos alrededor del centro de el micelio, pero ninguno llegó a producir formas tan definidas como las precedentes.

En las pruebas en medio de PDA, el hongo produjo hifas aéreas hirsutas y gruesas en el centro, situación que no se produjo en ninguno de los otros medios. El pH del medio tampoco parece haber influido pues en todos los tubos los resultados fueron similares. En cuanto a los primordios en turba-vermiculita, éstos se formaron exclusivamente con la cepa SO 18, de reciente aislamiento y con pocos subcultivos. También se observaron acumulaciones miceliales pruinosas en algunas áreas de los frascos, las cuáles se originaron a partir de piezas de cultivos sólidos.

Pantidou y Watling (1973) y Giltrap (1981) sugirieron que la formación de primordios es un indicio de un posible cambio de forma micorrícica a saprofita de la cepa o de la especie durante su cultivo. Esto es discutible, pues el hecho de que hongos micorrícicos puedan desarrollarse en medios de cultivo es ya una indicación de que pueden crecer

en forma saprobia. Mas bien, la capacidad de formación de primordios o basidiomas en cultivo puro depende de características nutricionales y ambientales tales como luz, temperatura y concentración de CO₂, así como de la propia capacidad de las cepas de fructificar (Yamanaka *et al.*, 2000). Por lo anterior, la selección de cepas fúngicas con una capacidad eficiente de formar primordios y la investigación de las características nutricionales y ambientales que favorecen la obtención de basidiomas, pueden constituir las bases de futuras investigaciones con estos hongos comestibles.

Literatura citada

- Águeda, B., J. Parladé, L.M. Fernández-Toirán, O. Cisneros, A.M. de Miguel, M.P. Modrego, F. Martínez-Peña, J. Pera, 2008. Mycorrhizal synthesis between *Boletus edulis* species complex and rockroses (*Cistus* sp.). *Mycorrhiza* 18 (8): 443-448.
- Cairney, J.W.G., S.M. Chambers, 1999. Ectomycorrhizal fungi: key genera in profile. Springer, Berlin.
- Cerutti, A., M. Tozzi, G. Reitano, 1985-86. Sintesi micorrizica tra *Boletus aureus* e *Castanea sativa*. *Allionia* 27:5-9.
- Cerutti, A., M. Tozzi, G. Reitano, 1987-88. Micorrize di sintesi tra *Boletus edulis*, *Pinus sylvestris* e *Picea excelsa*. *Allionia* 28:117-124.
- Dahlberg, A., J. Stenlid, 1995. Spatio-temporal patterns in ectomycorrhizal populations. *Canadian Journal of Botany* 73:1222-1230.
- Díaz, G., R. Flores, M. Honrubia, 2007. *Lactarius indigo* and *L. deliciosus* form mycorrhizae with Eurasian or Neotropical *Pinus* species. *Sydowia* 59 (1):32-45.
- Flores, R., G. Simonini, 2000. Contributo alla conoscenza delle Boletales del Guatemala. *Revista di Micologia* 2:121-145.
- Flores R., M.C. Bran, E. Rodríguez, O. Morales, P. Montes, 2002. Hongos micorrícicos de pino y pinabete en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Flores, R., G. Díaz, M. Honrubia, 2005. Mycorrhizal synthesis of *Lactarius indigo* (Schw.) Fr. with five neotropical pine species. *Mycorrhiza* 15:563-570.
- Flores, R., G. Díaz, M. Honrubia, 2008a. Mycorrhizal synthesis and basidioma primordium formation between *Abies guatemalensis* and *Laccaria bicolor*. *Nova Hedwigia* 87:153-160.
- Flores, R., M. Honrubia, G. Díaz, 2008b. Caracterización de cepas de *Lactarius* sección *Deliciosi* de Guatemala y su comparación con cepas europeas de *L. deliciosus*. *Revista Mexicana de Micología* 26:51-55.
- Gamborg, O.L., R.A. Millar, A. Djma, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Giltrap, N.J., 1981. Formation of primordia and immature fruiting bodies by ectomycorrhizal fungi in cultures. *Transactions of the British Mycological Society* 77:204-205.
- Gómez, L., 1996. Basidiomicetes de Costa Rica: *Xerocomus*, *Chalciporus*, *Pulveroboletus*, *Boletellus*, *Xanthocomium* (Agaricales: Boletaceae). *Revista de Biología Tropical* 44:59-89.
- Halling R., G. Mueller, 1999. New Boletes from Costa Rica. *Mycologia* 91:893-899.
- Hutchinson, L.J., 1991. Description and identification of cultures of ectomycorrhizal fungi found in North America. *Mycotaxon* 42:387-504.
- Karpinski, J.J., 1967. Erste Ergebnisse der Zucht von *Boletus edulis* auf kunstlichem Nährboden. *Mushroom Science* 6: 533-541.
- Marx, D.H., 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infection. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59:153-163.
- Marx, D.H., 1977. Tree host range and world distribution of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Canadian Journal of Microbiology* 23:217-223.
- Meotto, F., S. Pellegrino, J. Craddock, 1994. Funghi ectomicorrizici del castagno con particolare riferimento ai funghi eduli. *Italus Hortus* 1:58-64.
- Moser, M., 1960. Die Gattung *Phlegmacium*. In: *Die Pilze Mitteleuropas*, 4. Aufl., Klinkhardt, Bad Heilbrunn.
- Olivier, J.M., J. Guinberteau, J. Rondet, M. Mamoun, 1997. Vers l'inoculation contrôlée des cèpes et bolets comestibles? *Revue Forestière Française* 49:222-234.
- Pachlewski, R., J. Pachlewski, 1974. Studies on symbiotic properties of mycorrhizal fungi of Pine (*Pinus sylvestris* L.) with the aid of the method of mycorrhizal synthesis in pure cultures on agar. *Forest Research Institute, Warsaw*.
- Pantidou, M.E., R. Watling, 1973. Fruit-bodies of *Boletus amarellus* in pure-culture. *Notes on the Royal Botanic Garden Edinburgh* 32:439-443.
- Rodríguez, A., F.J. Fernández de Ana Magán, R.J. Rodríguez-Fernández, 1992. Estudio de la variabilidad intraespecífica de un hongo ectomicorrícico de *Castanea* sp.: *Boletus fragrans* Vitt. *Nova Acta Scientifica Compostelana (Biología)* 3:67-76.
- Hendersen, D.M., P.D. Orton, R. Watling, 1969. *Flora of British Fungi: colour identification chart*. Her Majesty's Stationery Office, Edinburgh.
- Singer, R., I. Araujo, M.H. Ivory, 1983. The ecotrophically mycorrhizal fungi of the neotropical lowlands, especially in Central Amazonia. *Nova Hedwigia* 77:1-352.
- Sommerkamp, Y., G. Guzmán, 1990. Hongos de Guatemala, II. Especies depositadas en el herbario de la Universidad de San Carlos de Guatemala. *Revista Mexicana de Micología* 6:179-197.
- Torres, P., M. Honrubia, 1993. Descripción de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* 18:163-170.
- Vázquez-García, A., G. Santiago-Martínez, A. Estrada-Torres, 2002. Influencia del pH en el crecimiento de quince cepas de hongos ectomicorrízogenos. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, serie Botánica* 73 (1):1-15.
- Yamanaka, K., K. Namba, A. Tajiri, 2000. Fruit body formation of *Boletus reticulatus* in pure culture. *Mycoscience* 41: 189-191.
- Zuccherelli, G., 1988. Prime esperienze sulla produzione di piante forestali micorrizate con *Boletus edulis*. *Monti e Boschi* 3: 11-14.