

## Cultiu extensiu de la gírgola de panical (*Pleurotus eryngii* (D.C. : Fr.) Qué.)

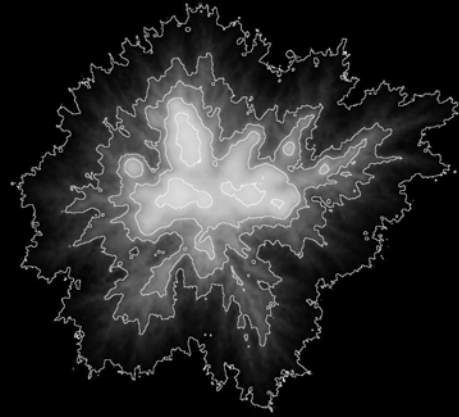
Josep Maria Lanau Galceran



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0. Spain License.**



## RESUM:

Proposem un nou procediment de cultiu a camp per al bolet comestible *Pleurotus eryngii* (D.C.: Fr.) Quél. *sensu lato*, basat en la possibilitat de inocular-lo en sòls no estèrils a on s'hi ha desenvolupat prèviament *Eryngium campestre* L. o alguna altra de les seves plantes hoste. Actualment hi ha molt poca informació disponible sobre la biologia de *P. eryngii* en el seu entorn natural, ni tampoc sobre el cultiu d'*E. campestre*.

Presentem en aquest estudi un recull multidisciplinar de tota la informació al nostre abast – incloent una revisió del seu cultiu industrial, la taxonomia i el sistema ligninolític del grup –, i els primers avenços en les tècniques d'estudi i la biologia d'aquests dos organismes per tal de fer viable aquest model de cultiu. En concret, s'ha creat un banc de cultius de soques de *P. eryngii* que inclou totes les varietats europees del complex, s'ha desenvolupat un nou procediment per a la caracterització *in vitro* d'aïllats de basidiomicets basat en l'anàlisi d'imatge, s'ha avaluat els fenòmens de dormància i la biologia de la llavor d'*E. campestre* per tal de poder-lo cultivar mitjançant sembra, s'ha realitzat una selecció dels sistemes d'inoculació més efectius per a inocular el fong al sòl i s'ha estudiat el comportament de *P. eryngii* en sòls no estèrils en presència i absència del seu hoste. Descrivim per primera vegada una dormància induïda per fred en llavors d'*E. campestre* i la formació de cordons micelians per part de *P. eryngii*, que aporten una informació valuosa per a entendre el seu comportament en condicions naturals.

Finalment, demostrarem la viabilitat del sistema de cultiu proposat amb l'obtenció de primordis i carpòfors sobre rels d'*E. campestre* arrelades en test sobre sòl no estèril, i identifiquem quins són els factors limitants que caldrà resoldre en un futur per a fer fiable i econòmicament rendible el sistema de cultiu proposat.



TESI DOCTORAL  
JOSEP M. LANAU

# CULTIU EXTENSIU DE LA GÍRGOLA DE PANICAL (*Pleurotus eryngii* (D.C. : Fr.) Quél.) - Primeres aproximacions -

JOSEP M. LANAU GALCERAN  
TESI DOCTORAL - 2013

CULTIU EXTENSIU DE LA GÍRGOLA DE PANICAL  
(*Pleurotus eryngii* (D.C. : Fr.) Quél.)

Director i Tutor: Enric Gràcia Barba  
Dpt. de Biologia Vegetal, Facultat de Biologia, UB

TESI DOCTORAL

# **Cultiu extensiu de la gírgola de panical (*Pleurotus eryngii* (D.C. : Fr.) Quél.)**

Memòria presentada per JOSEP MARIA LANAU GALCERAN per optar al grau de doctor per la Universitat de Barcelona.

**CENTRE:** Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

**PROGRAMA DE DOCTORAT:** Biologia Vegetal

**DOCTORAND:**

Nom: JOSEP MARIA LANAU GALCERAN  
NIF: 38122075N

Signat:

**DIRECTOR I TUTOR:**

Nom: ENRIC GRACIA BARBA  
NIF: 40271475Q

Signat:

**Barcelona, 26 de Setembre de 2013**



## RESUM:

Proposem un nou procediment de cultiu a camp per al bolet comestible *Pleurotus eryngii* (D.C.: Fr.) Quél. *sensu lato*, basat en la possibilitat de inocular-lo en sòls no estèrils a on s'hi ha desenvolupat prèviament *Eryngium campestre* L. o alguna altra de les seves plantes hoste. Actualment hi ha molt poca informació disponible sobre la biologia de *P. eryngii* en el seu entorn natural, ni tampoc sobre el cultiu d'*E. campestre*.

Presentem en aquest estudi un recull multidisciplinar de tota la informació al nostre abast – incloent una revisió del seu cultiu industrial, la taxonomia i el sistema ligninolític del grup –, i els primers avenços en les tècniques d'estudi i la biologia d'aquests dos organismes per tal de fer viable aquest model de cultiu. En concret, s'ha creat un banc de cultius de soques de *P. eryngii* que inclou totes les varietats europees del complex, s'ha desenvolupat un nou procediment per a la caracterització in vitro d'aïllats de basidiomicets basat en l'anàlisi d'imatge, s'ha avaluat els fenòmens de dormància i la biologia de la llavor d'*E. campestre* per tal de poder-lo cultivar mitjançant sembra, s'ha realitzat una selecció dels sistemes d'inoculació més efectius per a inocular el fong al sòl i s'ha estudiat el comportament de *P. eryngii* en sòls no estèrils en presència i absència del seu hoste. Descriuim per primera vegada una dormància induïda per fred en llavors d'*E. campestre* i la formació de cordons micelians per part de *P. eryngii*, que aporten una informació valuosa per a entendre el seu comportament en condicions naturals.

Finalment, demostrem la viabilitat del sistema de cultiu proposat amb l'obtenció de primordis i carpòfors sobre rels d'*E. campestre* arrelades en test sobre sòl no estèril, i identifiquem quins són els factors limitants que caldrà resoldre en un futur per a fer fiable i econòmicament rendible el sistema de cultiu proposat.

## **ABSTRACT:**

A new procedure for *Pleurotus eryngii* (D.C.: Fr.) Quél. *sensu lato* cultivation is proposed. This procedure is based on inoculating the basidiomycete on non-sterile soils, so it may parasitize surrounding *Eryngium campestre* L. or any of its natural plant hosts, previously grown in the field, and obtain edible carpophores.

There is currently little information on *E. campestre* cultivation requirements and *P. eryngii* behaviour in his natural environment. This work reviews current knowledge on *P. eryngii*, including it's taxonomy, ligninolytic system and industrial cultivation. We also present our first advances in order to make this cultivation procedure feasible. Namely, a culture collection has been created, including isolates of all European representatives from the *eryngii* complex, a new image analysis procedure for fungal in vitro characterization has been developed, *Eryngium campestre* seed biology and seed dormancy phenomena have been studied in order to grow the host plant by direct seeding on the field, most suitable inoculation techniques have been selected, and finally, *P. eryngii* behaviour on non-sterile soils either in presence or absence of a nearby host plant has been investigated. Cold induced dormancy in *E. campestre* seeds and myceliar cord formation in non-sterile soils in *P. eryngii* have been recoded for the first time, providing new insight on their behaviour in natural habitats.

Finally, the feasibility of this cultivation procedure has been demonstrated by obtaining *P. eryngii* primordia and carpophores on living *E. campestre* plants growing in a non-sterile soil, and we analyse which are the remaining limiting factors to be unraveled in order to achieve a reliable and profitable cultivation procedure.

## **AGRAÏMENTS:**

Als pares, perquè m'han donat tot allò que sóc i tinc, perquè són qui m'han ensenyat a aprendre, perquè només ells i jo sabem els sacrificis que han fet per a que ho acabés, perquè me'ls estimo, perquè m'estimen, i per tantíssimes coses més que no cal dir. Aquesta tesi duu el seu nom gravat amb foc a la portada, encara que no les hi pugueu llegir.

M'he posat a fer llista i sincerament, ho he hagut de deixar córrer. Perdoneu si em deixo algú, que no hauria. Han estat molts anys (massa) i he tingut la sort de compartir-los amb un munt de bona gent, que sens dubte són el que més ha pagat la pena de tots aquests anys.

A l'Enric Gràcia, perquè sense ell no hi hauria tesi, però sobretot per totes les estones en que m'ha fet de mestre, que sens dubte han estat les millors. Dic mestre, i no professor, perquè per a mi no és ben bé el mateix i de mestres no se'n troben gaires. El matis és important.

A la Yolanda. No sé si és perquè vam parir junts el nostre primer bolet (una *Volvariella volvacea*), si és per tots els substrats i porqueries que hem fet plegats al laboratori, o pel fantàstic caràcter que té, però ha aconseguit que me l'estimi com una germana, i de rebot, al Toni, la Laia i en Marc!.

A la Laura Ganzer i la Tere Marí, amb qui també he compartit laboratori, que m'han ajudat a trobar i mantenir els aïllats dels darrers anys, i amb qui hem acabat amb una amistat molt especial (espero que ens anem veient més sovint, ara ja no hi ha excusa!). I per descomptat, a tota la resta de companys que m'han acompanyat en més d'una aventura a dins i fora del lab: la Yolanda Guarc, Joan Planella, Xevi Comerma, Xevi Nadal, Guy-Roger...

A la Núria i en Patxi, i a na Diana i en Sergi ( i l'Ot, és clar!). Perquè no només m'han regalat la seva amistat, sinó que a més han volgut compartir els seus amics amb mi, un regal immens que no es rep tots els dies.

A la Laura Llorens i les seves bogeries de bomber (a veure si ens veiem més sovint, eh?), la Sandra Garcés (la propera cervesa quan?), i tota la resta del "Criptoteam": Esteve, Roser Ortiz, Gemma, Samantha, Roser Farrés ...

Passem als botànics?. Sens dubte, al Jose Manuel (el meu gurú particular de R, quina paciència que tens, fill meu!), a la Mercè i en Sebas, i a l'Hèctor, per la seva amistat i per descobrir-me la muntanya com mai havia conegut fins aleshores, a base d'excursions i travesses (com les trobo a faltar!).

A tota la resta de la colla del Departament i les grans estones dins i fora del Coffea: Aaron, Artur, Estela i Albert Petit, Albert Farré, Albert Romero, Berta, Rafael, David i Neus, Arnau, Lúdia, Miquel, Ester .... buf, la llista no s'acaba mai!. Ja sabeu qui sou; poseu el vostre nom aquí, que em fa mandra!

Als professors de la unitat de Botànica, per haver mantingut sempre un caràcter proper amb mi i haver estat més que atents amb qualsevol dubte. Haig de fer algunes mencions especials. Primer, a en Jaume Llistosella, que sempre m'ha preguntat com anàvem amb la tesi, m'ha esperonat per a acabar-la, i em va proporcionar una font d'ingressos en forma de beques de col·laboració, sense la qual no hauria ni començat. En segon lloc, a en Xavier Llimona, amb qui he compartit menys ciència de la que m'agradaria. I a en Ramon Masalles, per haver compartit, sobretot els primers anys, un munt d'esmorzars amb mi i alguns dels aleshores principiants de doctorat a on xerràvem de botànica i qualsevol altre cosa que sortís al cas. Si ho tinc ben entès, va ser en una conversa de passadís entre en Ramon Masalles i n'Enric Gràcia on va sortir per primer cop la idea de cultivar la gírgola de panical sobre plantes d'*Eryngium*. Si és així, espero haver estat a l'alçada.

A na Mercè Durfort, per totes les classes de biologia que li he pogut gaudir al llarg de la carrera (recordeu allò que deia dels mestres al principi?). A l'Isidre Casals, per la seva bonhomia i els seus consells al CCTiUB. I a en Juli Pujade, pel seu ajut amb la identificació dels insectes que han sortit entre llavor i llavor de card panical.

A en Xavi, na Irma i en David, que sempre m'heu animat a tirar endavant amb la tesi, i per totes les estones que hem passat i passarem entre entrepans i cerveses enraonant de música, de les aventures i desventures d'un investigador a la Universitat, i de mil coses més. Sempre se'm fa curt estar amb vosaltres!.

Surto de la Universitat. A la meva família. A l'Albert i la Montse, que sempre venen a casa i se'ns emporten a fer un tomb per a distreure'ns quan les coses no van bé . Als avis; fet i fet han estat ells i els pares qui em van ensenyar això d'anar a collir bolets i m'han fet venir ganes de conèixer-los. A la Núria, n'Albert i en Carles, per fer-me sentir com una criatura tot sovint (en realitat a aquestes alçades jo ho sóc més que ells). I a tota la resta de tiets i cosins (ja sabeu qui sou) que cada vegada que m'heu vist davant de l'ordinador m'heu preguntat sens falta com portava la tesi.

A en Miquel Canals. Per totes les estones que hem passat xiuxiuejant d'assumptes tenebrosos en els racons més foscos, envoltats de dimonis, cavallers, bruixes i fades, mantenint encesa la flama de la imaginació (que no s'apagui!). Ah, i per suportar com a amic a un somnàmbul com jo, això sí que té mèrit!.



Al Sisco Melgosa, perquè sempre està allà per animar-me quan més falta fa, sense ni tant sols haver-ho de demanar. A la Paula Furmann (i família), gràcies als quals m'he pogut integrar a Les Borges, i amb qui sempre em vindrà de gust passejar i fer-la petar per les Garrigues. I a la resta de MPG's de Les Borges Blanques - Calvís, Pastó, Raül ... - , que m'heu engrescat i acollit a la colla sense ni tant sols preguntar.

A en Jordi Boada i l'Associació d'Amics de la Micologia d'Esplugues, per oferir-me la extraordinària oportunitat de participar en les trobades micològiques. Special thanks to Reinhöld Poeder, for allowing me in his unforgettable "forest masterclass" on mycology and biophilosophy. A Jose Antonio Muñoz (padre e hijo), y a Pepe Lorés, por los buenos ratos entre árboles, setas y fotos (espero poder repetirlo más a menudo!). Y al resto de colegas de Italia, que en las Jornadas nunca dudáis en atender mis preguntas más sencillas y con quien tanto he aprendido.

Per acabar, vull donar les gràcies a totes les associacions de Micologia amb qui he contactat per a realitzar aquest treball (Ass. d'Amics de la Micologia d'Esplugues, Ass. Micol. Font i Quer, Soc. Catalana Micologia, Soc. Micol. Joaquim Codina, Institut d'Estudis Ilerdencs, Ass. Micol. de Tarragona) i a tots els micòlegs i aficionats que m'heu aportat dades sobre la distribució de la gírgola de card. La llista de persones és molt llarga, hi trobareu el vostre nom al lloc corresponent dins la llista de localitats. Haig d'agraïr especialment a en Joaquim Carbó, Carles Constantino, Miquel Àngel Perez-de-Gregorio, August Rocabruna, Pep Siquier, i Francisco Tejedor, que m'han abocat totes les cites bibliogràfiques i personals que disposaven a les seves bases de dades.

Aquesta recerca ha gaudit de suport econòmic per part del Grup de Qualitat en Criptogàmia (UB, Facultat de Biologia, Departament de Biologia Vegetal, Unitat de Botànica).



# ÍNDEX

<b>1. Introducció.....</b>	<b>1</b>
1.1. Introducció al gènere <i>Pleurotus</i> .....	1
<i>Interès del gènere en la indústria alimentària</i> .....	1
<i>Interès medicinal i industrial</i> .....	2
1.2. <i>Pleurotus eryngii</i> i afins: generalitats.....	2
<i>Biologia i comportament en l'entorn natural</i> .....	4
<i>Situació de retrocés a Catalunya</i> .....	5
1.3. Taxonomia.....	6
1.4. Interès econòmic.....	7
<i>Valor nutritiu</i> .....	7
<i>Interès farmacèutic</i> .....	10
<i>Toxicitat i al·lèrgies</i> .....	12
<i>Interès industrial, mediambiental i agrícola</i> .....	12
1.5. El sistema ligninolític en <i>P. eryngii</i> .....	13
<i>Generalitats</i> .....	14
<i>Hemo-peroxidases</i> .....	15
<i>Lacases (Lac)</i> .....	17
<i>Oxidases i deshidrogenases extracel·lulars. Aril-alcohol oxidasa.</i> .....	22
1.6. Cultiu industrial de <i>P. eryngii</i> .....	23
<i>Substrat de cultiu</i> .....	24
<i>Procés general de cultiu. Paràmetres ambientals</i> .....	27
<i>Principals sistemes de cultiu</i> .....	29
<i>Cultiu industrial d'altres varietats</i> .....	31
<i>Problemes de cultiu</i> .....	33
<i>Envasat i comercialització</i> .....	34
1.7. Proposta d'un sistema de cultiu extensiu de <i>P. eryngii</i> .....	36
<i>Concepte general</i> .....	37
<i>Tipologies de cultiu.</i> .....	37

*Altres aplicacions: bioremediació de sòls*..... 38

## **2. Objectius. ....39**

2.1. Obtenció de material biològic i creació d'un banc de soques de cultiu. ....39

2.2. Desenvolupament d'una tècnica de seguiment de biomassa in vitro per anàlisi d'imatge. ....40

2.3. Caracterització de la germinació d'*Eryngium campestre* .....40

2.4. Disseny de sistemes d'inoculació de *P. eryngii* en sòls no estèrils. ....41

## **3. Material biològic. ....43**

3.1. Introducció .....43

3.2. Materials i mètodes .....45

*Recollida de mostres, aïllament i conservació de soques*..... 45

*Aïllament*..... 46

*Conservació de soques* ..... 46

*Estudi microscòpic i anàlisi estadístic*. .... 47

*Elaboració dels plànols de distribució. Consultes populars*. .... 48

3.3. Resultats .....49

*Pleurotus eryngii* (D.C. : Fries) Quél..... 49

*Pleurotus eryngii* var. *ferulae* (Lanzi) Sacc. .... 65

*Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini* Venturella ..... 73

*Pleurotus eryngii* var. *thapsiae* Venturella ..... 81

*Pleurotus eryngii* var. *tingitanus* Lewinsohn..... 87

*Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* C.J. Mou ..... 89

*Pleurotus nebrodensis* Inzenga..... 91

*Pleurotus fossulatus* (Cooke) Sacc. .... 99

3.4. Discussió .....101

*Banc de cultius* ..... 101

*Distribució*..... 101

*Vinçle amb la pastura* ..... 104

*Taxonomia del grup*..... 105

3.5. Conclusions .....	116
<i>Clau per a la identificació de les formes europees del complex eryngii</i> .....	119
<b>4. Nou procediment per a la caracterització del creixement d'aïllats de bolets mitjançant anàlisi d'imatge. ....</b>	<b>121</b>
4.1. Introducció.....	121
4.2. Materials i mètodes.....	124
<i>Material biològic</i> .....	124
<i>Disseny d'un medi de cultiu transparent per l'anàlisi</i> .....	125
<i>Dissenys experimentals</i> .....	126
<i>Captura d'imatges</i> .....	127
<i>Processat d'imatges</i> .....	128
<i>Mesura de pes sec, C i N</i> .....	129
<i>Tractament estadístic</i> .....	130
4.3. Resultats.....	132
<i>Captura d'imatges</i> .....	132
<i>Calibrat</i> .....	132
<i>Llindars de la mesura, sensibilitat, i resolució teòrics</i> .....	134
<i>Efecte de la concentració de fructosa en el creixement micelià de P. eryngii</i> .....	134
<i>Perfils radials de les colònies</i> .....	136
<i>Comparació morfològica de diferents soques del complex eryngii</i> .....	138
4.4. Discussió.....	144
<i>Disseny d'un medi de cultiu transparent</i> .....	144
<i>Inòcul</i> .....	145
<i>Captura i processat d'imatges</i> .....	145
<i>Calibrat de la tècnica</i> .....	146
<i>Descriptors morfològics</i> .....	147
<i>Perfils radials</i> .....	150
<i>Efecte de la concentració de sucre en el patró de creixement de P. eryngii</i> .....	151
<i>Comparació morfològica de colònies d'aïllats del complex eryngii</i> .....	152
<i>Limitacions de la tècnica. Perspectives</i> .....	154
4.5. Conclusions .....	157

<b>5. Caracterització de la germinació de llavors d'<i>Eryngium campestre</i></b> .....	<b>159</b>
5.1. Introducció .....	159
<i>Eryngium campestre</i> L. ....	160
Coneixements previs sobre la germinació de llavors d' <i>E. campestre</i> i espècies properes .....	161
Experiències preliminars .....	163
5.2. Materials i mètodes .....	165
Mostres d'estudi: recol·lecció i conservació. ....	165
Conservació de llavors d' <i>E. campestre</i> .....	166
Condicions generals per als assaigs de germinació.....	166
Germinació de poblacions silvestres d' <i>E. campestre</i> .....	167
Efecte del substrat en la germinació d' <i>E. campestre</i> .....	167
Avaluació de possibles fenòmens de dormància en les llavors .....	168
Evolució de l'estat i la viabilitat de les llavors d' <i>E. campestre</i> al llarg de la maduració i senescència de la inflorescència.....	169
Efecte de la mirmecocòria en el banc de llavors al sòl.....	170
Anàlisi estadístic dels resultats .....	171
5.3. Resultats .....	172
Efecte de la conservació en fred en la germinació d' <i>E. campestre</i> .....	172
Efecte del substrat en la germinació d' <i>E. campestre</i> .....	173
Avaluació de possibles fenòmens de dormància en les llavors .....	174
Evolució de l'estat i viabilitat de les llavors d' <i>E. campestre</i> al llarg de la maduració i senescència de la inflorescència.....	175
Efecte de la mirmecocòria en el banc de llavors al sòl.....	178
5.4. Discussió .....	180
Observacions de camp de la biologia d' <i>Eryngium campestre</i> .....	180
Conservació de llavors d' <i>Eryngium campestre</i> a 4°C. ....	181
Taxa de germinació en poblacions naturals d' <i>Eryngium campestre</i> .....	182
Substrat i pH.....	182
Cerca de possibles fenòmens de dormància en les llavors d' <i>E.</i> <i>campestre</i> .....	184
Evolució de l'estat i viabilitat de les llavors en poblacions naturals. ....	185
Mirmecocòria.....	187

5.5. Conclusions .....	189
<b>6. Inoculació en entorns no estèrils.....</b>	<b>193</b>
6.1. Introducció.....	193
<i>Desenvolupament de basidiomicets ligninolítics en el sòl.....</i>	<i>194</i>
<i>Mecanismes implicats en el parasitisme de plantes.....</i>	<i>201</i>
<i>Antecedents en la inoculació de P. eryngii al sòl.....</i>	<i>203</i>
<i>Sistemes d'inoculació de fongs filamentosos.....</i>	<i>203</i>
<i>Recobriments per a inòculs .....</i>	<i>207</i>
<i>Requisits per a un sistema d'inoculació de P. eryngii a camp .....</i>	<i>209</i>
6.2-. Materials i mètodes.....	210
<i>Anàlisi de minerals en sòls on creix P. eryngii.....</i>	<i>210</i>
<i>Estudi de fenòmens d'autoinhibició esporal en P. eryngii.....</i>	<i>211</i>
<i>Efecte del carbó actiu en la interacció P. eryngii vers Trichoderma</i>	
<i>harzianum.....</i>	<i>212</i>
<i>Disseny de sistemes d'inoculació per a P. eryngii .....</i>	<i>213</i>
<i>Recobriments.....</i>	<i>217</i>
<i>Comportament dels inòculs seleccionats en sòl .....</i>	<i>218</i>
<i>Infecció de plàntules i plantes adultes.....</i>	<i>219</i>
<i>Anàlisi estadístic.....</i>	<i>221</i>
6.3. Resultats.....	222
<i>Anàlisi de sòls.....</i>	<i>222</i>
<i>Viabilitat esporal .....</i>	<i>223</i>
<i>Efecte del carbó actiu en la competitivitat vers Trichoderma</i>	
<i>harzianum.....</i>	<i>223</i>
<i>Disseny de sistemes d'inòcul .....</i>	<i>224</i>
<i>Pel·letitzat de llavors colonitzades .....</i>	<i>226</i>
<i>Recobriment plàstic .....</i>	<i>228</i>
<i>Caracterització d'inòculs seleccionats in vitro i en sòl .....</i>	<i>229</i>
<i>Infecció de plàntules i plantes adultes.....</i>	<i>236</i>
6.4. Discussió.....	245
<i>Variabilitat dels sòls on creix P. eryngii.....</i>	<i>245</i>
<i>Sistemes d'inoculació.....</i>	<i>246</i>
<i>Comportament de P. eryngii en el sòl .....</i>	<i>251</i>
<i>Proposta d'un procediment de cultiu a camp.....</i>	<i>254</i>
<i>Inconvenients crítics i recerca pendent. ....</i>	<i>256</i>

6.5. Conclusions .....	258
<b>7. Conclusions. ....</b>	<b>261</b>
<b>8. Bibliografia.....</b>	<b>263</b>
<b>9. Annex: Macros.....</b>	<b>299</b>
9.1. Macros per a la neteja d'imatges .....	299
9.2. Macros per a la mesura de la densitat integrada .....	300
9.3. Macro per a la mesura de la biomassa i paràmetres morfològics.....	301
9.4. Macros per a l'obtenció dels perfils radials.....	306



# 1. Introducció.

## *Antecedents. Proposta d'un nou procediment de cultiu.*

---

### 1.1. Introducció al gènere *Pleurotus*

El gènere *Pleurotus* (R. *Fungi*, Div. *Basidiomycota*, O. *Agaricales*, Fam. *Pleurotaceae*) és un grup cosmopolita d'hàbit ligninolític, que creix sobre fusta d'arbres vius o morts. Dins del gènere hi trobem un ampli ventall d'espècies comestibles amb interès comercial, degut al seu elevat valor nutritiu i la facilitat de cultiu. A banda del seu ús com a aliment, en les darreres dècades també està essent valorat per a l'obtenció de principis actius amb propietats medicinals, i pel seu potencial en aplicacions de gestió ambiental i biotecnològica.

#### Interès del gènere en la indústria alimentària

Les espècies cultivades del gènere *Pleurotus* destaquen en la indústria alimentària per les seves propietats organolèptiques, la conservació post-collita i per la facilitat de cultiu industrial sobre substrats de tipus lignocel·lulòsic. Com la majoria de bolets, suposen una font important de fibra, proteïna i d'algunes sals minerals i vitamines, i es consideren un aliment dietèticament equilibrat.

Dins d'aquest gènere en destaca l'orellana o gírgola (*Pleurotus ostreatus sensu lato*), actualment el tercer bolet més important en producció com a font d'aliment, darrere del camperol o xampinyó (*Agaricus spp.*) i el xiitake (*Lentinula edodes*). Avui dia, el seu cultiu industrial s'estén arreu del món. A Catalunya se'n cultiven i comercialitzen un seguit de varietats i híbrids comercials seleccionats per la seva productivitat, durada post-collita, i pel rang de temperatura òptima de cultiu. Generalment, la producció industrial de *P. ostreatus* es valora de forma conjunta amb la producció de *Pleurotus pulmonarius*, ja que les dues espècies es comercialitzen sota la mateixa denominació. A les nostres contrades, les soques d'aquesta darrera espècie substitueixen a *P. ostreatus* al llarg dels períodes estivals per ser un bolet força més tolerant a temperatures elevades.

Des de fa uns anys també es cultiva i comercialitza un ventall considerable d'altres tàxons del gènere *Pleurotus*, tot i que per ara el seu cultiu a Catalunya és mínim o nul. Dins d'aquest grup figuren espècies com *Pleurotus eryngii*, *P. eryngii var. tuoliensis* (comercialitzada com a *P. nebrodensis*), *P. citrinopilleatus*, *P. salmoneostramineus* o *P. abalone*, entre d'altres. La presència al mercat català i europeu de *P. eryngii* és molt menor al de l'orellana i pràcticament nul·la per a la resta d'espècies.

## Interès medicinal i industrial

L'ús de bolets com a font medicinal és una pràctica ancestral. Probablement el màxim exponent es troba en la cultura tradicional xinesa, en la que des de fa segles s'empra un gran nombre d'espècies de bolets amb finalitats medicinals, pràctica que s'ha conservat fins als nostres dies. Contràriament, aquesta pràctica no s'ha estès a occident.

En les darreres dècades, però, s'han descobert i caracteritzat nombrosos principis actius a partir de fructificacions o de cultius micelians amb més d'un centenar de funcions medicinals diferents, fet que n'ha despertat l'interès per part de la indústria farmacèutica (Wasser, S. P., 2011). El gènere *Pleurotus* no n'és una excepció, i se n'ha aïllat nombroses substàncies d'interès medicinal, amb activitats de tipus antibiòtic, antiviral, hipocol·lesterolèmic, antitumoral, o immunomodulant, entre d'altres (Wasser, S., 2002, Chang, S.-T. i Miles, P. G., 2004). En destaca la lovastatina, un inhibidor de l'HMG-CoA reductasa del grup de les estatines, present en carpòfors de *P. ostreatus* i d'altres representants del gènere (Gunde-Cimerman, N. i Cimerman, A., 1995), i que actualment es comercialitza amb diverses denominacions comercials per a regular el colesterol.

Com ja s'ha esmentat, el gènere *Pleurotus* es caracteritza per créixer en substrats de tipus lignocel·lulòsic, generalment fusta. El fet d'ésser un grup d'espècies que ha desenvolupat una ampla capacitat i selectivitat en la degradació de lignina i compostos fenòlics, fa que també hi hagi un creixent interès per aquest gènere en la indústria i la recerca aplicada (Cohen, R., Persky, L. et al., 2002). En aquest context, hi ha dos àmbits que concentren bona part dels estudis realitzats fins ara. La primera és l'aplicació de la seva capacitat ligninolítica en la biopulpció de fusta per a optimitzar processos d'elaboració de paper. La segona, l'aplicació en tasques de bioremediació, per a la degradació de compostos tòxics com hidrocarburs i compostos fenòlics, entre d'altres. També hi ha estudis dirigits a altres aplicacions del fong, com pot ser el seu ús en l'augment de la digestibilitat de components lignocel·lulòsics per a pinsos animals, entre d'altres.

---

### 1.2.- *Pleurotus eryngii* i afins: generalitats.

Donada la manca de consens en el criteri taxonòmic del grup, hom parla del "complex *eryngii*" (*Pleurotus eryngii* sensu lato) per a referir-se a un conjunt de tàxons molt similars, genèticament propers a la varietat tipus de *Pleurotus eryngii*, amb qui comparteixen l'hàbit. Aquest complex inclou totes les varietats de *P. eryngii* i a *P. nebrodensis*, a més d'alguna altra espècie de validesa dubtosa (*P. fossulatus* i *P. hadamardii*).

Es tracta de bolets comestibles que viuen com a paràsits sobre rels de diverses espècies d'umbel·líferes i ocasionalment alguna composta, sovint (però no exclusivament) en terrenys calcaris, generalment erms, pastures, entorns ruderals, o prats secs de muntanya. Aquest fet els diferencia de la resta de *Pleurotus*, tots ells d'hàbit ligninolític,

sobre fusta morta o d'arbres malferits, a excepció d'algunes espècies exòtiques que viuen sobre restes de monocotiledònies, pteridòfits i molt rarament d'hàbit terrícola (Corner, E. J. H., 1981). Probablement, l'única d'aquestes excepcions a les nostres contrades sigui *Pleurotus opuntiae*, una espècie rarament citada, taxonòmicament propera al grup de *P. pulmonarius* (Bao, D. P., Kinugasa, S. et al., 2004), i que viu sobre cladodis morts de figuera de moro (*Opuntia spp.*).

Tot i ser més conegut per la seva presència en contrades mediterrànies, la distribució del complex *eryngii* s'estén en una extensa franja entre els 30-50°N, compresa des de Marroc fins als Països Baixos, i que cobreix tota la mediterrània a l'oest, allargant-se a l'est per l'Àsia, fins a la Xina i l'Índia (Hilber, O., 1982; Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001, Kawai, G., Babasaki, K. et al., 2008).



**Fig. 1.1:** Aproximació a l'àrea de distribució del complex *eryngii* per països, en base a la bibliografia existent.

Típicament, els hostes sobre els quals creix són plantes de la família de les umbel·líferes. En el cas de la varietat tipus de *P. eryngii*, l'hoste principal és *Eryngium campestre*, i més rarament *E. maritimum*, en aquest darrer cas només en dunes de platja ben conservades. La resta de varietats es troben sobretot sobre els gèneres *Ferula* (varietats *ferulae*, *tingitanus* i *tuoliensis*), *Elaeoselinum* (var. *elaeoselini*), *Thapsia* (var. *thapsiae*), i en el cas de *P. nebrodensis*, sobre *Cachrys*.

Els carpòfors recollits en el seu entorn natural són bolets amb un barret o píleu hemisfèric a la joventut i més aplanat a la maduresa, en alguns casos lobulat i/o lleugerament infundibuliforme. La cutícula és de color molt variable, des de bru cremós a bru-negre, segons les condicions ambientals i l'hoste sobre el que creix. Aquesta variabilitat de color és deguda a la presència de menudes fibres adnades de color fosc, que poden conferir un lleuger aspecte de vellut al barret. Algunes varietats del complex

*eryngii* manquen d'aquest pigment a la cutícula, i aleshores el bolet és llis i de color blanc o blanc crema. Les làmines són de color blanc cremós, molt decurrents, sovint anastomosades a la base. La cama o estípit és del mateix color de les làmines, llisa, sense anell, lleugerament excèntrica respecte al barret, molt rarament sublateral o central. El peu és simple, a vegades radicant, i sempre es troba adherit al coll d'una rel d'umbel·lífera o les seves restes.

La mida i el color del barret són caràcters molt variables segons el tàxon, l'hoste o substrat i les condicions de fructificació. En el cas de carpòfors cultivats en substrats lignocel·lulòsics, les diferències són molt majors, i sovint donen lloc a carpòfors més grossos, amb un color pileic més clar que en el cas de les fructificacions silvestres. El port és molt variable, podent-se obtenir carpòfors marcadament infundibuliformes, com és el cas dels bolets de cultiu d'estil europeu. En l'estil de cultiu oriental, *P. eryngii* presenta una morfologia totalment diferent, amb carpòfors de barret menut i aplanat i amb un estípit obès, de diàmetre similar al barret i una alçada fins a tres vegades més gran. Els darrers anys, aquesta darrera morfologia està prenent força en els nostres mercats, pel seu aspecte exòtic i per la obesitat de la cama, que a un consumidor profà pot recordar la d'un cep (*Boletus* gr. *edulis*). En general, quan es tracta de carpòfors obtinguts en cultiu les diferències macroscòpiques entre les diferents varietats s'escurcen o desapareixen.

## **Biologia i comportament en l'entorn natural**

Avui dia es coneix ben poc sobre el comportament de *Pleurotus eryngii* en l'entorn natural. Sí coneixem que el seu rol parasític sobre rels d'umbel·líferes és facultatiu, donat que es pot cultivar i fructificar el bolet com a sapròtrof en altres substrats lignocel·lulòsics. A l'igual que els seus congèneres, *Pleurotus eryngii* es considera un fong de "podriment blanc", donada la seva capacitat de degradar la lignina, que ha estat força estudiada els darrers anys (vegis més endavant).

Nogensmenys, no es coneixen casos de fructificació del bolet silvestre sobre fusta o cap altre substrat que no sigui un dels seus hostes naturals. Els factors que condicionen aquest fet ens són totalment desconeguts. Tampoc coneixem quin grau d'agressivitat té sobre les plantes que parasita, ni si pot infectar plantes sanes, o requereix que aquestes es trobin debilitades per algun factor d'estrès. Tampoc es té cap mena d'informació sobre la especificitat hoste-patògen de les diferents varietats, és a dir, la capacitat d'una determinada varietat de *P. eryngii* a infectar als hostes típics de la resta de varietats. Finalment, la biologia del desenvolupament dels basidiomicets que habiten en el sòl o les seves proximitats (fullaraca, virosta, fusta soterrada, erols...) també és un camp molt desconegut, donada la enorme complexitat de l'hàbitat, i la dificultat per al fer un seguiment *in situ* del miceli.

## Situació de retrocés a Catalunya

Als Països Catalans, *Pleurotus eryngii* rep diversos noms populars: “gírgola de panical”, “gírgola de card”, “bolet d’espinal”, i en el cas de la varietat *ferulae*, “gírgola de canyafèrlera” (Mallorca). Nosaltres, a més, l’hem sentit puntualment anomenada “gírgola de prat” en terres gironines (Francesc Peracaula i Rovira, Serra de Daró, correspondència escrita), nom popular que no ens consta que hagi estat recollit fins ara. Probablement, la denominació amb més pes a nivell popular és la de “gírgola de card”, tot i que desconexem si aquest terme és conseqüència de la tendència a emprar la solució lingüística més propera al nom popular castellà, “seta de cardo”. Per altra banda, el seu hoste típic, el card panical (*Eryngium campestre*) també té diversos noms populars, entre els del que en volem destacar el de “card girgoler”.

És rellevant observar que aquesta riquesa en denominacions populars catalanes, i l’extensió que aquestes tenen al llarg del territori, no es corresponen ni de bon tros a la dificultat actual per a la seva recol·lecció, com a mínim, al Principat i a Mallorca. Avui dia la gírgola de panical és un bolet molt infreqüent a Catalunya (Menal, R., 1983), i actualment força desconegut per la majoria de la població catalana.

Les cites bibliogràfiques recents que disposem dins el Principat corresponen a timonedes i erms molt concrets. Aquest fet contrasta amb que sigui un bolet molt popular i freqüent a força zones de la Franja de Ponent i País Valencià. Curiosament, aquest bolet ja era citat en més d’una ocasió en els primers catàlegs de la flora micològica catalana per al Principat (Codina i Viñas, J., 1908; Codina i Viñas, J. i Font i Quer, P., 1930). A més tenim constància escrita de la venda habitual d’aquest bolet a principis del segle XX en mercats, com a mínim a Mallorca (Gamundi Ballester, J., 1925).

També ens ha arribat el testimoni oral de pagesos d’avançada edat que l’han collit tota la vida a Catalunya i que han observat la seva desaparició progressiva en aquells cultius en que s’abandonava el guaret en favor de l’ús del cultiu intensiu amb maquinària agrícola, especialment en determinats tipus de llaurat (Tomeu Lliteres i Femenies, Artà, Mallorca, com. oral; Francesc Peracaula i Rovira, Serra de Daró, correspondència escrita). Aquesta relació entre la desaparició de la gírgola de panical i les pràctiques agrícoles també la subscriuen altres persones de la Península que també han recollit el bolet des de menuts (Santiago Martínez Meléndez, Villanueva de la Serena, Badajoz, correspondència escrita, a més de nombroses converses amb pastors i pagesos).

Tot plegat fa pensar que a casa nostra, *P. eryngii* es troba en una situació de fort retrocés, en bona part a causa de la desaparició de la pastura per ovelles, la transhumància i d’algunes pràctiques d’agricultura tradicional, com el guaret.

---

### 1.3.- Taxonomia

Des de les descripcions originals de *Pleurotus eryngii* (D.C.: Fr.) Quél. (sub *Agaricus eryngii*, De Candolle, A. P. i Lamarck, 1815), *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* Lanzi (sub. *Agaricus ferulae*, Lanzi, M., 1873) i de *Pleurotus nebrodensis* (Inzenga, G., 1865), hi ha hagut una important controvèrsia sobre quina és la correcta classificació dels diferents tàxons, be sigui com a espècies diferents, o com a varietats de la mateixa espècie (vegis les revisions de Hilber, O., 1982, o Candusso, M. i Basso, M. T., 1995, entre d'altres).

L'aparició de tècniques de taxonomia molecular, i l'estudi de noves troballes sobre hostes diferents, han donat lloc a l'aparició de noves varietats per a *P. eryngii* (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000; Lewinsohn, D., Wasser, S. P. et al., 2002; Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2002). Aquestes publicacions, lluny d'esclarir els dubtes existents, aporten més complexitat al grup *eryngii*. Prova d'aquest fet és que en les publicacions de taxonomia i fil·logènia més recents encara hi ha un total desacord en el seu estat taxonòmic, les unes considerant-les varietats i les altres com a espècies independents (vegis els treballs de Urbanelli, S., Della Rosa, V. et al., 2003; Gioia, T., Sisto, D. et al., 2005; Zhang, J., JinHuang, C. et al., 2006, a tall d'exemple).

Si no s'especifica el contrari, per als apartats experimentals del present treball ens hem restringit a la varietat tipus, *Pleurotus eryngii* var. *eryngii*, donat que és el tàxon més ben tipificat i, amb diferència, el més amplament distribuït al llarg de la Mediterrània. D'aquesta manera evitem alteracions d'origen varietal en els resultats, i se'n facilita l'estudi per la disponibilitat de material. Per aquesta raó, al parlar de *P. eryngii* ens referirem estrictament a la varietat tipus, i emprarem els termes *complex eryngii* o *grup eryngii* per a referir-nos al conjunt de tàxons d'hàbit parasític sobre rels d'apiàcees, incloent-hi *Pleurotus nebrodensis*.

Tot i això, donada la manca d'un criteri estandarditzat a seguir, i pel fet que el sistema de cultiu aquí proposat és vàlid per a tot el grup *eryngii*, creiem convenient realitzar un recull de la informació disponible pel que fa a taxonomia, hostes coneguts i distribució (vegis capítol 3). A més, s'ha obtingut mostres i aïllats de la major part dels tàxons descrits, de cara a establir un criteri de treball i la creació d'un banc de cultius per a posteriors estudis .

---

## 1.4.- Interès econòmic.

La gírgola de panical té un creixent interès econòmic, principalment en l'àmbit alimentari. A conseqüència de l'agradable textura de la seva carn i el seu sabor i aroma, és un dels bolets cultivables més ben valorats en gastronomia. Actualment, el preu de venda del bolet cultivat a Catalunya (a nivell de distribuïdor) oscil·la al voltant dels 11-15 €/kg, segons la mida del carpòfor. A nivell internacional, el preu de mercat és força variable; en països com Estats Units o Alemanya es duplica o triplica si es ven com a producte de cultiu biològic, mentre que el preu de venda a la Xina per al mercat interior oscil·la entre els 2 i 5 \$/kg (Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2008).

Tot i que el bolet d'origen silvestre és més conegut i preuat com a comestible en l'entorn mediterrani, el seu cultiu a gran escala ha estat desenvolupat en contrades orientals. Actualment, el principal productor és la Xina - amb una producció de 114.000 tones l'any 2003- , seguida de Corea del Sud, Japó i Itàlia. El cultiu industrial és força més recent als Estats Units i a la resta d'Europa, on la producció és molt més petita. Actualment, a Espanya el seu cultiu és modest, i nul a Catalunya, tot i que sembla que algunes empreses s'estan plantejant iniciar el seu cultiu a major escala.

*Pleurotus eryngii* és un bolet freqüent a la gran majoria de regions de clima mediterrani i continental de la Península Ibèrica, especialment en aquelles zones on l'activitat agrícola manté grans extensions vinculades a l'activitat humana i a la pastura d'oví i cabrum, bé sigui en forma d'erms, conreus en desús o conreus on es practica el guaret (Oria de Rueda, J. A., Martínez de Azagra, A. et al., 1991). En aquestes contrades el bolet, anomenat "seta de cardo", és molt preuat, en una mesura similar a com ho és el rovelló a Catalunya. Aquest fet es tradueix en una elevada pressió de recol·lecció. El bolet recollit a camp és molt més preuat que el de cultiu perquè té més qualitat organolèptica. El comerç d'aquest bolet d'origen silvestre es limita a l'autoconsum i el comerç local, amb preus de venda variables i en general força més elevats. Donada la seva raresa, actualment aquesta mena de mercat no es dona al Principat, i com ja hem esmentat és un bolet amplament desconegut per la població, al marge de la seva forma cultivada.

### Valor nutritiu

Els carpòfors de *P. eryngii* tenen un elevat valor nutritiu, tant pel seu aport d'elements a la dieta, com per a seva riquesa en principis actius beneficiosos per la salut (vegis més endavant). Són una font important de carbohidrats, especialment en forma de fibra i quitina, alhora que baixos en lípids i una aportació moderada de proteïna (Taula 1.1). Aquesta darrera és d'elevada qualitat per contenir una proporció elevada dels aminoàcids essencials (Taula 1.2). Alhora, també són especialment rics en 5'-nucleòtids (Taula 1.3), aspàrtic i glutàmic, que en conjunt confereixen al bolet la palatabilitat deguda a l'intens sabor umami (Tsai, S. Y., Huang, S. J. et al., 2009). També són una font significativa de vitamina A, B1, B2, C, D i niacina (Stajic, M., Vukojevic, J. et al., 2009).

Finalment, conté diversos compostos aromàtics (Taula 1.4), entre els quals l'1-octen-3-ol – responsable del característic aroma fúngic del bolet - és amb diferència el més abundant (Tsai, S. Y., Huang, S. J. et al., 2009).

És conegut que la composició dels carpòfors depèn en certa mesura de la soca analitzada i de la composició del substrat on ha crescut. Com molts altres fongs, *Pleurotus eryngii* pot absorbir i acumular determinats elements del medi de cultiu, inclosos metalls pesats (Baeza, A., Guillén, J. et al., 2000; 2002). Aquest fet pot ser emprat per a enriquir els nivells de determinats elements en els carpòfors, com per exemple, calci (Lee, N. H., Im, M. H. et al., 2006) o seleni (Rodríguez Estrada, A. E., Lee, H. J. et al., 2009), obtenint així un producte amb valor afegit.

	<b>Contingut</b> (per 100g de pes fresc de bolet)	
	<b><i>P. eryngii</i></b>	<b><i>P. ferulae</i></b>
Aigua (g)	86,6 - 91,5	88,13 ± 0,16
Proteïna total (g)	1,88 - 2,2	2,65 ± 0,02
N total (g)	0,43-0,45 ± 0,01	0,6 ± 0,01
Lípids (g)	0,8 ± 0,0	
Carbohidrats (g)	9,6 ± 0,1	
Fibra dietètica total	4,64 ± 0,58	
Fibra dietètica soluble	0,53 ± 0,19	
Fibra dietètica insoluble	4,11 ± 0,38	
Beta-glucans	0,41 ± 0,05	
Quitina	0,5 ± 0,1	
Cendres (g)	0,76-1,2	1,00 ± 0,02
Na (mg)	4,2-6,5 ± 0,02	5,2 ± 0,7
K (mg)	257,3-346,5 ± 20,9	309,0 ± 10,3
Mg (mg)	12,0-16,0 ± 0,8	16,0 ± 0,8
Ca (mg)	2,8-3,0 ± 0,1	3,7 ± 1,5
Fe (µg)	501,7-1270,4	432,9-951,9
Zn (µg)	37,3-85,6	27,9-85,4
Mn (µg)	14,8-31,3	34,7-53,8
Cu (µg)	10,5-30,0	21,5-40,4
Cr (µg)		1,1-1,9

**Taula 1.1:** Composició nutricional de carpòfors cultivats de *P. eryngii* i *P. eryngii* var. *ferulae* (a partir de Manzi, P., Gambelli, L. et al., 1999, i Manzi, P., Marconi, S. et al., 2004). Fe, Zn, Mn, Cu i Cr han estat calculats a partir de Akyuz, M. i Kirbag, S., 2010a i Akyuz, M. i Kirbag, S., 2010b, suposant un contingut del 88% d'aigua.



Aminoàcids	Contingut (mg/100 g pes fresc de bolet)	
	<i>P. eryngii</i>	<i>P.eryngii</i> var. <i>ferulae</i>
Alanina	5,99-6,01	6,24
Arginina	9,62-10,61	11,66
Àcid aspàrtic	10,8-11,2	12,09
Cisteïna	1,66-1,70	1,57
GABA	0,22	0,08
Àcid glutàmic	12,76-13,42	12,89
Glicina	4,62-4,65	4,52
Histidina	3,16-3,24	3,31
Isoleucina	3,50-3,83	4,11
Leucina	6,96-7,24	6,56
Lisina	6,87-6,71	6,71
Metionina	1,61-1,71	1,69
Ornitina	3,00-3,76	0,59
Fenilalanina	4,01-4,26	4,04
Prolina	3,38-3,49	3,77
Serina	5,57-6,13	5,96
Treonina	5,27-5,3	5,04
Triptòfan	1,34-1,48	1,22
Tirosina	3,21-3,69	3,42
Valina	3,79-4,00	4,51

**Taula 1.2:** Aminoàcids en carpòfors cultivats de *P. eryngii* var. *ferulae* (Segons Manzi, P., Gambelli, L. et al., 1999). Es marquen en gris aquells responsables del sabor umami.

5' Nucleòtids:	Contingut (mg/ g pes sec de bolet)
	<i>P.eryngii</i> var. <i>ferulae</i>
50-adenosina monofosfat	1,48 ± 0,02
50-citosina monofosfat	0,32 ± 0,01
50-guanosina monofosfat	0,58 ± 0,02
50-inosina monofosfat	0,69 ± 0,02
50-uridina monofosfat	1,94 ± 0,01
50-xantosina monofosfat	1,78 ± 0,04

**Taula 1.3:** 5'nucleòtids en carpòfors cultivats de *P. eryngii* var. *ferulae* (segons Tsai, S. Y., Huang, S. J. et al., 2009). Es marquen en gris aquells responsables del sabor umami.

<b>Compostos volàtils</b>	<b>Contingut (µg/g de pes fresc de bolet)</b>
	<b><i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i></b>
3-Octanona	3.49 ± 0.08
1-Octen-3-ona	1.13 ± 0.55
3-Octanol	0.94 ± 0.26
1-Octen-3-ol	98.8 ± 5.25
Benzaldèhid	0.85 ± 0.09
1-Octanol	5.28 ± 0.64
2-Octen-1-ol	0.52 ± 0.05
Benzil alcohol	6.28 ± 0.40
<b>Total</b>	<b>117 ± 4.57</b>
<b>Compostos 8-C</b>	<b>110</b>
<b>Compostos aromàtics</b>	<b>7.13</b>

**Taula 1.4:** Compostos volàtils en carpòfors cultivats de *P. eryngii* var. *ferulae* (Tsai, S. Y., Huang, S. J. et al., 2009).

## Interès farmacèutic

De la mateixa manera que en el cas d'alguns bolets comestibles, en els recents anys s'ha descobert nombrosos principis actius en *Pleurotus eryngii* amb un ampli ventall d'activitats d'interès farmacèutic, que fins i tot s'han traduït en patents registrades.

L'eringina és un polipèptid de 10 kDa amb activitat antifúngica que ha estat aïllada a partir de carpòfors de *P. eryngii* (Wang, H. X. i Ng, T. B., 2004). També s'ha aïllat esterols amb activitat antitumoral (Lee, Y. H., Park, K. H. et al., 2006) i enzims amb activitat fibrinolítica (Cha, W. S., Park, S. S. et al., 2010) que podrien ser emprats per combatre la trombosi i prevenir infarts de miocardi.

*P. eryngii* és d'interès per produir un interessant espectre de beta-glucans (Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P. et al., 2006), tant en carpòfors com en fermentacions micelïanes. Aquests beta-glucans podrien tenir nombroses aplicacions farmacèutiques per la seva activitat immunoestimulant, antitumoral i antiinflamatòria (Jung, H. Y., Bae, I. Y. et al., 2011). La presència d'activitat antitumoral i immunoestimulant ha despertat la recent publicació de patents amb extractes de cultius de *P. eryngii* com a part del principi actiu (Song, C. H. et al., 2007, Patent KR2007001502A). Els treballs més recents mostren a més, que aquests beta-glucans extrets a partir de *P. eryngii* poden ser modificats per substitució amb radicals de sofre per a augmentar-ne l'activitat antitumoral (Jung, H. Y., Bae, I. Y. et al., 2011).

També s'estudia la possibilitat d'emprar *P. eryngii* per obtenir aliments funcionals, per exemple, emprant-lo en processos de fermentació per obtenir tofu amb activitat immunoestimulant (Lee, S. W., Kang, J. W. et al., 2010), o emprant els seus extractes rics en glucans per a obtenir aliments probiòtics (Synytsya, A., Mícková, K. et al., 2009).

Darrerament s'ha descrit una activitat similar a la dels estrògens en extractes de *P. eryngii*, que resulta en la reducció del procés d'osteoporosi (Kim, S. W., Kim, H. G. et al., 2006, Shimizu, K., Yamanaka, M. et al., 2006). Aquests treballs s'han traduït al registre de l'ús dels extractes del bolet en patents internacionals (Kim, J. G. et al., 2004, Patent JP2004-549894).

Altres treballs científics i patents internacionals versen sobre l'ús d'extractes dels carpòfors de la gírgola de card per la seva activitat antihistamínica (Han, E. H., Hwang, Y. P. et al., 2011), antihipertensiva (Eguchi, F. and Watanabe, Y., 2002, Patent JP2002176975-A; Cho, T. S. et al., 2004, Patent KR2004046313-A), hipocolesterolèmica (Mori, K., Kobayashi, C. et al., 2008) i hipolipidèmica (Watanabe, Y. Wata et al., 1999, Patent JP2001064194-A; Mizutani, T., Inatomi, S. et al., 2010). Pel que fa a aquest darrer cas, s'ha demostrat que el consum d'extractes del carpòfor en àpats lleugerament grassos redueix significativament els nivells de triacilglicerols postprandials en sang sense cap efecte advers (Mizutani, T., Inatomi, S. et al., 2008) i que el consum continuat de *P. eryngii* en forma deshidratada (9 g/dia) redueix significativament en 12 setmanes els nivells de greix en individus obesos o amb sobrepès (Kawai, J., Inatomi, S. et al., 2010). També s'ha provat aquest efecte anti-hiperlipidèmic i anti-hipoglucèmic en ratolins, on a més s'ha comprovat que el consum habitual del bolet podria millorar la sensibilitat a la insulina (Kim, J. I., Kang, M. J. et al., 2010).

S'ha descobert la presència de nivells significatius d'activitat antioxidant en extractes etanòlics de *P. eryngii* (Fui, H. Y., Shieh, D. E. et al., 2002; Choi, Y. M., Ku, J. B. et al., 2005; Tsai, S. Y., Huang, S. J. et al., 2008), principalment deguda a la producció de polisacàrids (Liu, X., Zhou, B. et al., 2010), compostos fenòlics (Oke, F. i Aslim, B., 2011), ergotioneïna i seleni (Rodríguez Estrada, A. E., Lee, H. J. et al., 2009). Aquest fet ha despertat l'interès en l'ús d'aquests extractes en productes cosmètics (Tsuruoka, Hiroki et al., 2003, Patent JP10158144-A), i en la indústria alimentària (Bao, H. N. D., Osako, K. et al., 2010).

A més, se n'ha aïllat enzims d'interès, com poden ser el cas d'una nova ribonucleasa termoestable (les ribonucleases tenen diverses activitats, incloent antivirals, immunomoduladores i antineoplàsiques, segons Ng, T. B. i Wang, H. X., 2004), una lacasa amb activitat inhibidora contra la revers-transcriptasa del VIH-1 (Wang, H. X. i Ng, T. B., 2006), o una aminopeptidasa (eringasa) que podria ser emprada a la síntesi de dipèptids amb finalitats farmacèutiques (Arima, J., Chiba, M. et al., 2010).

Els darrers avenços en biotecnologia han aconseguit expressar en cultius transgènics de *P. eryngii* diverses proteïnes humanes d'elevat interès en aplicacions medicinals. La transformació s'aconsegueix mitjançant plàsmids, emprant *Agrobacterium tumefaciens* com a vector, el qual es perfora en fragments estèrils de la carn del bolet aplicant un buit parcial. La primera expressió heteròloga en *P. eryngii* va ser la de la hormona del creixement humana (rhGH; Kim, S., Sapkota, K. et al., 2010), i més recentment, la de la

interleucina-32 humana i el factor de creixement rhPDGF-BB (Chung, S. J., Kim, S. et al., 2011; Choi, J. H., Kim, S. et al., 2011).

## **Toxicitat i al·lèrgies**

A l'igual que en molts d'altres bolets comestibles d'origen cultivat i silvestre, s'han descrit petites concentracions de components tòxics en carpòfors frescos de *P. eryngii*. Per una banda, alguns treballs hi han descrit la presència de petites concentracions de compostos ciànics, com l'àcid hidrociànic (Stijve, T. i de Meijer, A. A. R., 1999; Chou, P. Y., Hong, C. H. et al., 2006), que desapareixen totalment o en la seva major part després d'una cocció lleu a 50°C.

A més, també s'ha detectat nivells significatius de hemolisines (eringeolisines i erilisines) en carpòfors frescos (Ngai, P. H. K. i Ng, T. B., 2006; Shibata, T., Kudou, M. et al., 2010). Les eringeolisines són molt termolàbils, i són completament inactivades mitjançant un curt tractament tèrmic, també a 50°C.

La presència d'aquests components no suposen cap risc per al consum habitual d'aquest bolet, donat que es troben en molt baixes concentracions i el bolet sol rebre un tractament de calor previ al seu consum. Amb tot, caldrà tenir en compte aquest fet i evitar un possible consum en cru, especialment tenint en compte la manca d'estudis en aquest sentit per a les diferents varietats del grup *eryngii*.

Per altra banda, és conegut el fet que la gran quantitat d'espores produïdes en un cultiu industrial de bolets pot donar lloc a al·lèrgies. *Pleurotus eryngii* no n'és una excepció (Saikai, T., Tanaka, H. et al., 2002, Miyazaki, H., Gemma, H. et al., 2003), i pot induir pneumonitis al·lèrgiques en persones sensibles, pel que és recomanable l'ús de mascaretes en les sales de fructificació (grau de protecció FFP2 o més, segons norma UNE-EN 149:2001). Aquest risc podria evitar-se amb l'ús de soques aespòriques (Obatake, Y., Murakami, S. et al., 2003), tot i que no coneixem que s'emprin a nivell industrial.

## **Interès industrial, mediambiental i agrícola**

*Pleurotus eryngii* és objecte d'estudi per la seva capacitat de degradar la lignina, essent amb diferència el camp d'estudi més prolífic en aquest organisme. Els darrers anys s'ha realitzat nombrosos treballs emprant aquest fong com a model per a esbrinar els processos moleculars involucrats en la degradació de la lignina i altres compostos fenòlics, i fins i tot se n'ha aïllat, descrit i caracteritzat diversos isoenzims d'un nou tipus de manganès peroxidasa, que ha estat anomenada "versàtil peroxidasa" (Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J. et al., 1999 i treballs posteriors, vegis més endavant).

En la vessant aplicada, s'han realitzat estudis per emprar aquesta capacitat ligninàsica de *P. eryngii* en processos de biopropiació de fusta (Camarero, S., Barrasa, J. M. et al., 1998, Sigoillot, C., Camarero, S. et al., 2005), de bioremediació de sòls (Rodríguez, E., Nuero, O. et al., 2004) i de llixivats de l'extracció de l'oli d'oliva (Ballero, M., Mascia, E. et al., 1991; Sanjust, E., Pompei, R. et al., 1994; Zervakis, G., Yiatras, P. et al., 1996), o per augmentar la digestibilitat de substrats per al seu ús en alimentació animal (Zadrazil, F. i Puniya, A. K., 1995; Bae, J., Kim, Y., I et al., 2006; Okano, K., Fukui, S. et al., 2007). L'ús habitual d'aquests enzims ligninolítics s'estén a més a les indústries alimentària, química, tèxtil, cosmètica, i fins i tot en aplicacions nanobiotecnològiques com la fabricació de biosensors, entre d'altres (Rodríguez Couto, S. i Toca Herrera, J. L., 2006).

Tot i que la més important, la capacitat per degradar la lignina no és l'únic aspecte d'interès a nivell industrial. *P. eryngii* presenta una capacitat proteolítica d'ampli espectre amb un potencial interessant de cara a la indústria (Nakamura, M., Iketani, A. et al., 2011). Les proteases d'origen microbià s'empren de forma extensa en la producció de detergents, indústria alimentària, cuir, tèxtil, etc.

Tot i que menys freqüents en la bibliografia, també hi ha uns pocs treballs que incideixen en l'ús de *Pleurotus eryngii* per a aplicacions agrícoles, amb resultats mediocres. L'aplicació de les restes del substrat de *P. eryngii* en el cultiu de canya de sucre resulta parcialment efectiu per al control de nemàtodes (Palizi, P., Goltapeh, E. M. et al., 2009). També s'ha considerat el seu ús com a biocontrol de fongs patògens vegetals, com *Fusarium oxysporum* (Ruiz-Dueñas, F. J. i Martínez, M. J., 1996), malgrat que es prefereix l'ús d'altres fongs sense activitats cel·lulàsiques i xil·lanàsiques, que poden afectar a les parets cel·lulars vegetals. Finalment, s'ha purificat proteïnes amb activitat antivírica contra el virus del mosaic del tabac (Fu, M., Lin, J. et al., 2003) a partir de mostres de carpòfor deshidratat.

Altres exemples d'aplicacions industrials en estudi són l'ús de producció de biomassa de *P. eryngii* mitjançant cultius líquids en bioreactors per a l'obtenció de compostos fenòlics com l'anisaldèhid (Hong, J. G. et al., 2003, Patent 2003-741815), o per a l'extracció de trehalosa (Peng, J. T. et al., 1999, Patent US 5858735).

---

## 1.5.- El sistema ligninolític en *P. eryngii*

Com ja hem esmentat, el procés de degradació de la lignina ha estat un dels camps més estudiats en *P. eryngii* al llarg de les dues darreres dècades. A banda de la mera degradació del substrat, aquest complex sistema enzimàtic també està involucrat en processos de morfogènesi, i participa en la competència davant d'altres microorganismes o en la resposta a condicions d'estrés. En conjunt, les ligninases juguen un paper clau en l'agressivitat de la soca vers la planta hoste i en el desenvolupament del miceli en un

entorn no estèril, com és el sòl. Conèixer-ne el funcionament i sobretot la regulació del mateix pot ajudar a explicar el comportament de *P. eryngii* en el seu entorn natural.

## Generalitats

La lignina és un component àmpliament estès en el regne vegetal. Es tracta del segon polímer orgànic més abundant a la terra, després de la cel·lulosa, al representar al voltant del 35% dels constituents dels teixits llenyosos.

Es tracta d'un polímer aromàtic heterogeni, compost a grans trets per tres unitats bàsiques en proporció variable: *p*-hidroxifenil (H), guaiacil (G) i siringil (S). La proporció varia notablement en funció dels diferents grups de plantes vasculars. Aquestes unitats estan unides entre sí per enllaços covalents de natura diferent (enllaços C-C, aril-éter, aril- aril...). Aquesta estructura heterogènia fa que la lignina no pugui ser degradada directament per enzims hidrolítics com en el cas de la majoria de polímers naturals (cel·lulosa, midó, proteïnes, etc.). Donada la seva rigidesa i difícil degradació, les seves funcions principals són estructurals, impermeabilitzants i de resistència al atac microbià.

Tot i que estudis recents han mostrat que alguns grups de bacteris presenten activitat ligninàsica (Bugg, T. D. H., Ahmad, M. et al., 2011), els fongs, i principalment els basidiomicets, es consideren els únics organismes amb capacitat per a degradar aquest component de forma substancial (Hofrichter, M., 2002). Per a assolir-ho, han desenvolupat un complex sistema enzimàtic, la natura i mecanisme del qual encara no resta del tot esclarit. La degradació de lignina no suposa *per se* un aport energètic per als fongs, però els permet d'obtenir nitrogen i sobretot exposar un volum important d'unitats de cel·lulosa i altres polisacàrids que d'altra manera no podrien degradar (Ten Have, R., Wijngaard, H. et al., 2003).

La biodegradació de lignina en basidiomicets es du a terme principalment gràcies a la acció de tres famílies d'enzims: un conjunt de hemo-peroxidases, les lacases (Lac), i un seguit d'oxidases extracel·lulars, en especial aril-alcohol oxidases (AAO).

Tot i que aquestes famílies d'enzims juguen un paper clau, no són les úniques involucrades en el procés. Hi ha altres enzims amb activitat reductasa, com la cel·lobiosa deshidrogenasa (CDH) i la cel·lobiosa-quinona deshidrogenasa (CBQ), que també participen dins el mecanisme enzimàtic (reducció de quinones) i a més redueixen compostos derivats de la degradació del polímer (radicals fenoxil), evitant-ne la toxicitat i la seva repolimerització (Gutiérrez, A. i Martínez, A. T., 1996). Alguns treballs indiquen que hi pot haver més enzims involucrats en el complex enzimàtic, com per exemple, el cas de les esterases (Call, H. P. i Muecke, I., 1997).

En termes generals la inducció de enzims degradadors de lignina ocorre al llarg del metabolisme secundari, com a conseqüència de depleció de nutrients fàcilment assequibles en l'entorn, principalment de nitrogen. Altres factors que n'afecten l'activitat

són l'assequibilitat de compostos mediadors de baix pes molecular al medi, la presència de determinats metalls en aquest, (molt especialment el manganès), o l'airejat i l'agitació si es tracta de un cultiu líquid, entre d'altres (Leung, P.-C. i Pointing, S., 2002).

## **Hemo-peroxidases**

Els fongs de podriment blanc produeixen tres menes de hemo-peroxidases implicades en la degradació de la lignina: les lignina peroxidases (LiP), les manganès peroxidases (MnP), i les versàtil peroxidases (VP).

Totes tres peroxidases tenen un cicle catalític comú (Banci, L., Camarero, S. et al., 2003). El grup hemo de l'enzim en estat de repòs interactua amb  $H_2O_2$ , donant lloc a un estat de l'enzim doblement oxidat (Compost I). Aquesta espècie de l'enzim pot tornar a l'estat de repòs oxidant dos substrats successivament. En el procés, l'enzim passa per un estat de transició (Compost II) oxidat per un únic electró. Les principals diferències catalítiques entre els tres enzims (LiP, MnP i VP) rau en la mena de substrats que poden oxidar.

### **LIGNINA PEROXIDASES**

La lignina peroxidasa (LiP) és un enzim present en un considerable nombre de basidiomicets, i es caracteritza per oxidar preferentment compostos aromàtics no fenòlics amb un potencial redox elevat, que constitueixen fins al 90% del polímer.

Dins dels fongs de podriment blanc, es poden diferenciar dos grans grups d'espècies, segons si produeixen o no LiP, a més de MnP. Al igual que la resta del gènere *Pleurotus*, *P. eryngii* forma part del primer grup, al no produir LiP (Caramelo, L., Martínez, M. J. et al., 1999). Per aquesta raó no detallarem els mecanismes de funcionament, transcripció i regulació d'aquest enzim (vegis la revisió de Higuchi, T., 2004)

### **MN PEROXIDASES**

Les MnP són enzims extracel·lulars, directament implicats en la degradació de la lignina i ubicats en fongs ligninolítics (Pelaez, F., Martínez, M. J. et al., 1995; Martínez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J. et al., 1996). Aquest enzim és específic per a basidiomicets de podriment blanc i descomposadors de matèria orgànica al sòl, i no se'n coneix la producció per part de cap bacteri, llevat, deuteromicet o basidiomicet micorízic (Hofrichter, M., 2002).

Les MnP són hemo-peroxidases amb un pes molecular entre 38 i 62,5 kDa, que catalitzen una reacció d'oxidació dependent de  $H_2O_2$ . La reacció típica de l'enzim és la oxidació de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ , que actuarà de mediador, i al seu torn oxidarà compostos fenòlics. Tot i que l'enzim també pot oxidar altres substrats, la reducció del Compost II requereix forçosament de la oxidació de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ , i per això les MnP són Mn-dependents (Hofrichter, M., 2002).

Es consideren un enzim important per a l'atac primari de la lignina, donat que  $Mn^{3+}$  és un agent oxidant que es difon i pot penetrar les cèl·lules vegetals i actuar en llocs inicialment inaccessibles per als enzims ligninolítics (Evans, C. S., Dutton, M. V. et al., 1994; Joseleau, J. P., Gharibian, S. et al., 1994; Hofrichter, M., 2002). Diversos àcids carboxílics, com l'oxalat, malonat, malat, tartrat o lactat, generalment sintetitzats pel mateix fong, actuen com a agents quelants que estableixen  $Mn^{3+}$ , de forma que aquest es pot difondre de forma estable des de la superfície de l'enzim cap al substrat (Gutiérrez, A., Caramelo, L. et al., 1994; Schick, Z. L. i Tien, M., 1997). Aquests radicals  $Mn^{3+}$  poden oxidar compostos fenòlics i determinats productes no fenòlics, o també generar radicals superòxid.

A més del sistema mediat per  $Mn^{3+}$ , el sistema catalític de MnP pot donar lloc a altres cooxidants. MnP pot actuar sobre lípids com àcids grassos insaturats i alguns derivats (p. ex. àcid linoleic o Tween 80; Moen, M. A. i Hammel, K. E., 1994). De forma similar, MnP oxida certs compostos orgànics amb sofre (p. ex. glutatió, L-cisteïna). Els radicals que es generen (peroxils i tiïls, respectivament) són particularment reactius i cooxiden al seu torn components de lignina no fenòlics (Hofrichter, M., 2002), ampliant el ventall de substrats oxidables per acció de l'enzim.

#### **VERSÀTIL PEROXIDASES (VP)**

Recentment s'ha descobert, aïllat i caracteritzat en *P. eryngii* una forma peculiar de manganès peroxidasa, que pot donar lloc a les reaccions oxidatives tant de LiP i MnP i a més pot oxidar fenols substituïts i hidroquinones en absència de  $Mn^{2+}$  (Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J. et al., 1999; Camarero, S., Sarkar, S. et al., 1999; Ruiz-Dueñas, F. J., Camarero, S. et al., 2001). Per aquesta raó, ha estat anomenada versàtil peroxidasa (VP). A més del sistema mediat per  $Mn^{3+}$  o altres cooxidants, VP també té activitat peroxidasa independent de  $Mn^{2+}$  contra un ampli espectre de compostos fenòlics i no fenòlics de la lignina, a més d'una major resistència al peròxid d'hidrogen (Martínez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J. et al., 1996). Posteriorment al seu descobiment, la VP ha estat trobada en altres espècies, com en el cas de *P. ostreatus* o en *Berkjandera spp.*

#### **HEMO-PEROXIDASES EN *P. ERYNGII*.**

En *P. eryngii* s'ha identificat dos isoenzims de VP a partir de cultius líquids (Martínez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J. et al., 1996). Aquests isoenzims, de 42-45 kDa, són codificats per dos al·lels del gen *mnpl* que difereixen per un element de resposta a metalls en el promotor (Camarero, S., Sarkar, S. et al., 1999; Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F. et al., 1999a).

A banda d'aquests isoenzims, s'ha identificat 3 peroxidases més a partir de cultius de *P. eryngii* en palla de blat (PS1, PS2 i PS3; Camarero, S., Sarkar, S. et al., 1999). D'aquestes, només PS3 és  $Mn^{2+}$  dependent, mentre que PS2 és un fragment funcional de PS1 (Caramelo, L., Martínez, M. J. et al., 1999). Les obtingudes en cultiu líquid tenen una gran similitud amb les aïllades sobre palla (vora el 74%, Camarero, S., Ruiz-Dueñas, F. J. et al.,



2000) però es diferencien per la seqüència N-terminal (Camarero, S., Sarkar, S. et al., 1999, Ruiz-Dueñas, F. J., Camarero, S. et al., 2001).

La producció de peroxidases en *P. eryngii* és depenent del tipus de la font de nitrogen. Els nivells de Mn i VP produïts en medis sintètics amb prou feines són detectables, mentre que la presència de peptona o de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en el medi de creixement estimulen la producció de peroxidases (Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F. et al., 1999a; Stajic, M., Persky, L. et al., 2006a).

La presència de determinats metalls en el medi també pot afectar els nivells de producció de les MnP i VP en *P. eryngii*. De fet, els promotors dels gens que les codifiquen tenen elements de resposta tant a metalls com als xocs de calor. La regulació de peroxidases per  $\text{Mn}^{2+}$  és depenent del tipus i composició de substrat; mentre que en palla, la presència de  $\text{Mn}^{2+}$  no afecta els nivells de Mn-peroxidases, l'esmena amb  $\text{Mn}^{2+}$  (25 mM) en cultius líquids amb peptona inhibeix la producció de peroxidases (Martínez, M. J., Ruiz-Dueñas, F. J. et al., 1996), i en canvi l'activa (5 mM  $\text{Mn}^{2+}$ ) en cultius líquids amb pell de mandarina mòlta (Stajic, M., Persky, L. et al., 2006b). Aquest comportament és diferent del de *P. ostreatus* i *P. pulmonarius*, que en les mateixes condicions de cultiu tenen la màxima producció de peroxidases en absència de Cu o Mn. Hi ha la possibilitat que aquest comportament heterogeni tingui a veure amb una regulació diferencial de les MnP i les VP, com la ja descrita per a *P. ostreatus*, en la que l'esmena amb Mn inhibeix la producció de les VP, alhora que indueix la transcripció de la MnP (Cohen, R., Hadar, Y. et al., 2001).

El manganès no és l'únic metall que regula la producció de peroxidases en *P. eryngii*. L'esmena d'un cultiu de *P. eryngii* amb  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{SeO}_2$  també pot augmentar l'activitat peroxidasa (Stajic, M., Vukojevic, J. et al., 2009). S'ha demostrat que  $\text{Fe}^{3+}$  actua a nivell transcripcional, induïnt directament l'expressió del gen *mnpl* (Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F. et al., 1999a).

La presència de  $\text{H}_2\text{O}_2$  o de radicals lliures (especialment OH $\cdot$ ) en el medi també augmenta bruscament la transcripció del gen *mnpl* en *P. eryngii*, independentment de si es tracta de peròxid exògen o fruit dels cicles redox del mecanisme ligninàsic propi del fong (Ruiz-Dueñas, F. J., Guillén, F. et al., 1999b). Aquests autors atribueixen aquesta expressió com a una estratègia de resposta a condicions d'estrès.

## **Lacases (Lac)**

Les lacases són enzims que es troben en plantes i fongs, i excepcionalment en bacteris. En les plantes, les lacases participen sobretot del procés de formació del polímer de la lignina, mentre que en fongs intervenen en la degradació de la mateixa (tot i que sembli contradictori), en processos de morfogènesi, en la interacció hoste-patògen, en la interacció amb microorganismes competidors, o com a resposta a condicions d'estrès (Dwivedi, U. N., Singh, P. et al., 2011).

En els fongs les lacases poden ser enzims tant intracel·lulars com extracel·lulars, en alguns casos associades a la paret cel·lular del fong. La localització de l'enzim condiciona els substrats que li són assequibles, i per tant la seva funció (Baldrian, P., 2006). Es creu que les lacases intracel·lulars, participen en la transformació de compostos fenòlics de baix pes molecular, i en la formació de melanina i altres compostos protectors.

Dins el grup dels fongs, les lacases s'han detectat en força grups d'ascomicets, principalment patògens de plantes o degradadors de fusta, i són ubiqües en basidiomicets de podriment blanc (Baldrian, P., 2006). En fongs ectomicorrízics s'ha detectat fragments de genoma similars a les lacases, però rarament se n'ha detectat l'activitat enzimàtica, essent les tirosinases les principals fenoloxidasas per a aquest grup (Burke, R. M. i Cairney, J. W. G., 2002). En el cas de *Trichoderma sp.* – d'especial interès en el nostre cas, donat que és un dels contaminants més agressius en cultius de bolets – s'ha detectat activitat de l'enzim, sempre correlacionada amb el grau d'esperulació però no amb la degradació del substrat, i amb nivells baixos d'activitat contra la siringaldazina, pel que probablement té una funció morfogènica (Assavanig, A., Amornkitticharoen, B. et al., 1992; Holker, U., Dohse, J. et al., 2002).

Les lacases (benzediol:oxigen oxidoreductases, EC1.10.3.2) són enzims generalment monomèrics (a vegades homodimèrics, com en el cas de *P. pulmonarius* i dos dels isoenzims de *P. ostreatus*). Catalitzen la reducció d'oxigen a aigua, a partir de la oxidació d'un substrat. Aquest substrat sol ser un compost fenòlic (els més universals, probablement, *p*-fenols) o una amina aromàtica. Aquesta reacció no depèn de la producció de peròxid d'hidrogen, com en el cas de les peroxidases.

Les lacases són proteïnes generalment de 50-80 kDa, amb un nucli catalític format per quatre ions de coure. Un d'aquests és un Cu de tipus 1 (T1), que li confereix el color blau característic de l'enzim. Els altres tres coures, un de tipus 2 (T2) i dos de tipus 3 (T3), es troben agrupats. En el cicle catalític de l'enzim el T1 oxida el substrat, transferint els electrons al grup T2-T3, que redueixen al seu torn l'oxigen a aigua (Baldrian, P., 2006). Algunes lacases manquen del coure T1, i són anomenades lacases grogues, tot i que molts autors no les consideren veritables lacases. *P. ostreatus* produeix una d'aquestes lacases, amb un sol àtom de coure, dos de zinc i un de ferro (Palmieri, G., Giardina, P. et al., 1997).

El ventall de substrats oxidables per aquest grup d'enzims és molt ampli, i la capacitat o l'eficiència per a oxidar determinats grups de compostos varia segons la espècie i l'isoenzim de que es tracta (Baldrian, P., 2006). Els tipus de substrats que poden oxidar les lacases s'encavalquen amb els de les tirosinases, (monofenol-mono-oxigenasa tirosinasa, EC1.14.18.1), però les Lac se'n diferencien per no oxidar la tirosina (Thurston, C. F., 1994). Sovint s'empra la capacitat d'oxidar siringaldazina combinada amb la incapacitat de oxidar tirosina com a indicador de activitat de l'enzim. Les lacases tenen més potencial redox que les tirosinases, però menys que hemo-peroxidases com les MnP

(260 mV, 450-800 mV, i >1 V, respectivament), i per tant no poden arribar a degradar compostos altament recalcitrants, com ho fan les peroxidases (Baldrian, P., 2006).

Les lacases també poden oxidar  $Mn^{2+}$  en presència de compostos quelants (Höfer, C. i Schlosser, D., 1999). En el cas de *P. eryngii*, s'ha demostrat que a més de la oxidació directa de unitats de lignina, les lacases extracel·lulars intervenen en un cicle redox de quinones que allibera superòxid  $O_2^-$  extracel·lular (Guillén, F., Martínez, M. J. et al., 1997, Muñoz, C., Guillén, F. et al., 1997b; Guillén, F., Muñoz, C. et al., 2000a). En presència de  $Mn^{2+}$ , la reducció de superòxid a  $H_2O_2$  oxida aquest a  $Mn^{3+}$ . Donada la reduïda autooxidació de les semiquinones, l' $H_2O_2$  és el factor limitant en aquest cicle redox. S'ha demostrat però l'efecte sinèrgic de les aril-alcohol oxidases amb les lacases, al ser productores de peròxid (Guillén, F., Gomez, T., V et al., 2000 i Guillén, F., Muñoz, C. et al., 2000b). La producció d' $H_2O_2$  en la oxidació de quinones també genera un efecte sinèrgic entre lacases i Mn-peroxidases (Schlosser, D. i Hofer, C., 2002).

Per altra banda, les lacases també poden oxidar components de baix pes molecular, sovint subproductes de la pròpia degradació de la lignina o bé compostos fenòlics sintetitzats pel propi fong. Aquests actuen de mediadors redox, oxidant indirectament altres compostos que no són un substrat de l'enzim (p. ex., la fracció no fenòlica), ampliant-ne encara més l'abast (Camarero, S., Ibarra, D. et al., 2005; Gutiérrez, A., Caramelo, L. et al., 1994). Aquest fet ha estat demostrat en *P. eryngii* per un substrat sintètic, l'ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfonat; Martínez, M. J., Muñoz, C. et al., 1994).

Generalment, les lacases tenen l'òptim en el rang de pH àcids. A pH bàsics, l'activitat i l'estabilitat de l'enzim disminueixen notablement (Muñoz, C., Guillén, F. et al., 1997a), i a més pot afectar les reaccions subseqüents a partir dels radicals formats per l'enzim, donant lloc a compostos finals diferents. Pel que fa a la temperatura, l'òptim es situa entre els 50-70°C, tot i que és molt variable segons la espècie i l'isoenzim (Baldrian, P., 2006).

#### INTERACCIONS I ROL DE LES LACASES EN L'ENTORN NATURAL

Les lacases estan probablement involucrades en els mecanismes de defensa de basidiomicets de podriment blanc quan interactuen contra microorganismes competidors (p. ex., *Trichoderma spp.*). En aquests casos és freqüent detectar un fort increment de l'activitat de l'enzim (Baldrian, P., 2004). Les lacases no tenen un efecte directe sobre aquests microorganismes, però probablement juguen un rol defensiu generant metabòlits secundaris com melanines, o degradant antibiòtics de caire fenòlic.

L'activitat de les lacases han estat associades en la adhesió química entre hifes via polimerització de compostos fenòlics amb carbohidrats i proteïnes de la paret cel·lular, cosa que permet la formació de cordons micelians, esclerocis, primordis i carpòfors (vegis la revisió de Burke, R. M. i Cairney, J. W. G., 2002).

En alguns treballs s'ha considerat que les lacases poden descompondre certs metabòlits secundaris de plantes que actuen com a fitoalexines, com el resveratrol. Nogensmenys, el seu paper no queda del tot esclarit. En *Botrytis cinerea*, la degradació de resveratrol i tanins per part de les lacases dona lloc a una inhibició del creixement del fong, probablement deguda a la cogeneració de compostos tòxics, mentre que en les soques de *Botrytis* a les que es substitueixen els gens de les lacases implicades no canvien la seva virulència (Schouten, A., Wagemakers, L. et al., 2002).

Les substàncies húmiques interactuen de forma complexa amb les lacases. Per una banda s'ha demostrat que els àcids húmics n'indueixen l'activitat lacasa i l'expressió mRNA (Scheel, T., Hofer, M. et al., 2000), però determinats tipus de substàncies húmiques també poden competir o fins i tot inactivar l'activitat de l'enzim, adsorbint-lo (Zavarzina, A. G., Leontievsky, A. A. et al., 2004) i especialment, dissociant i quelant-ne el coure (Keum, Y. S. i Li, Q. X., 2004).

En entorns com el sòl o la virosta, hi ha molts substrats de les lacases que poden competir per l'enzim i per tant inhibir la degradació d'altres compostos, reduint-ne la eficiència (Itoh, K., Fujita, M. et al., 2000). Els nivells de lacases detectats en prats i sòls agrícoles són molt baixos (Gramss, G., 2010), i força més alts en virosta de boscos planifolis o de coníferes, on la lacasa és l'enzim ligninolític dominant i és indicadora de l'estat de degradació de la matèria orgànica (Criquet, S., Farnet, A. M. et al., 2000). També reflecteix la presència de miceli en erols de fongs com *Marasmius oreades*, on n'augmenta l'activitat de l'enzim, la presència d'àcids orgànics, i el C i N assequibles (Gramss, G., Voigt, K. D. et al., 2005). Diversos estudis han detectat una davallada en l'activitat de les lacases i peroxidases en sòls de boscos quan s'han adobat amb una quantitat de N elevada, alhora que davalla la proporció de biomassa fúngica respecte la bacteriana (Carreiro, M. M., Sinsabaugh, R. L. et al., 2000; Gallo, M., Amonette, R. et al., 2004).

#### LACASES EN *P. ERYNGII*

Es coneixen dos isoenzims produïts en cultius micelians de *P. eryngii*, Lac I i Lac II, de 65 i 61 kDa respectivament, amb característiques similars a altres lacases d'altres fongs ligninolítics (Muñoz, C., Guillén, F. et al., 1997b, Stajic, M., Persky, L. et al., 2006a). Es diferencien en que només la Lacasa II de *P. eryngii* és induïda per compostos derivats de la lignina i menys activa sobre aquests a pH 3,5-4. A més tenen una seqüència d'aminoàcids molt diferent de la resta de lacases, fins i tot respecte les lacases de *P. ostreatus*, amb la que només comparteix 3 aminoàcids. Les lacases de *P. eryngii* són enzims estables a pH elevats (60-70% de la activitat a les 12h a pH 8-12), tot i que la seva activitat màxima es dona en pH vora 3,5-4 (Muñoz, C., Guillén, F. et al., 1997b). També difereixen en la especificitat pel substrat: Lac I oxida preferentment fenols, i Lac II amines.

S'ha caracteritzat una tercera lacasa en *P. eryngii*, la única expressada en carpòfors (Wang, H. X. i Ng, T. B., 2006). Aquesta lacasa és dimèrica, amb un pes molecular de

34kDa, un òptim a 70°C i pH 3-4, i no té cap similaritat amb la seqüència N-terminal de les lacases micelianses.

Les lacases són glicoproteïnes amb un grau de glicosilació molt variable, generalment entre el 10-25%, tot i que en alguns casos molt més alt (44% en *P. pulmonarius*). La glicosilació participa en la protecció de l'enzim vers la proteòlisi. Les lacases de *P. eryngii* tenen un índex de glicosilació molt baix, vora el 7% per a la Lac I i menys del 1% per a Lac II. La glicosilació dificulta la producció heteròloga de l'enzim, i per aquesta raó les lacases de *P. eryngii*, són especialment interessants en aplicacions biotecnològiques. Amb aquesta finalitat, les lacases de *P. eryngii* ja han estat clonades i expressades amb èxit, com a mínim, en *Saccharomyces cerevisiae* i *Aspergillus niger* (Bleve, G., Lezzi, C. et al., 2008; Rodríguez, E., Ruiz-Dueñas, F. J. et al., 2008).

### REGULACIÓ

Al igual que en el cas de les peroxidases, la producció de lacases varia molt en funció del substrat i les condicions de creixement. En termes generals, és ben conegut que el tipus de font de carboni i nitrogen, la presència de compostos inductors de baix pes molecular i de determinats microelements, així com la soca estudiada, afecten la producció i l'activitat de l'enzim.

En *P. eryngii*, s'ha descrit que la font de nitrogen òptima per a la producció de l'enzim en cultius micelians és l'(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a concentració de 20mM (Muñoz, C., Guillén, F. et al., 1997b, Stajic, M., Persky, L. et al., 2006a).

L'esmena amb determinats substrats o extractes de plantes poden promoure la activitat de lacasa extracel·lular en diverses espècies de *Pleurotus*. Generalment s'atribueix aquest fet a la presència de compostos de baix pes molecular derivats de la lignina que actuen com a inductors. En *P. eryngii*, s'ha demostrat que l'activitat de les lacases és estimulada per la presència de lignina àlcali de palla de blat, així com d'àcid vainílic i veràtric. (Muñoz, C., Guillén, F. et al., 1997a; Muñoz, C., Guillén, F. et al., 1997b).

La presència de determinats metalls i microelements també regulen la producció de l'enzim. El Cu<sup>2+</sup> és un inductor important en moltes lacases fúngiques, com en el cas de *P. ostreatus* (Palmieri, P., Giardina, P. et al., 2000). En *Pleurotus eryngii*, l'efecte de Cu<sup>2+</sup> en la producció de lacases és variable, probablement en funció de la composició del medi i la soca estudiada; mentre que uns estudis no detecten cap efecte de l'esmena a concentracions 5mM (Muñoz, C., Guillén, F. et al., 1997b), d'altres detecten una inducció amb un òptim a concentració 1 mM (Stajic, M., Persky, L. et al., 2006b).

La regulació de l'enzim per Cu<sup>2+</sup> i d'altres metalls no resta del tot esclareida, i pot ser força complexa. A més de induir la síntesi de l'enzim, Cu<sup>2+</sup> també n'augmenta la estabilitat en *P. ostreatus*, al inhibir una proteasa extracel·lular del mateix fong que degrada lacases i que s'inhibeix en presència del metall (Palmieri, P., Bianco, C. et al., 2000). A més, en *P.*

*ostreatus* la sensibilitat vers Cu i Cd varia segons la fase de creixement, probablement per diferències en el comportament dels diferents isoenzims (Palmieri, P., Giardina, P. et al., 2000; Baldrian, P. i Gabriel, J., 2002). És probable que en *P. eryngii* existeixin processos de regulació similars.

A més del coure hi ha altres microelements que poden afectar la producció de lacases en *P. eryngii*, ja sigui inhibint-la (CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, KCl o FeCl<sub>3</sub> 2,5 mM; Se 1 mM), o induint-la (Mn<sup>2+</sup> 5 mM, Zn<sup>2+</sup> i Fe<sup>2+</sup> 1 mM; Muñoz, C., Guillén, F. et al., 1997a; Stajic, M., Persky, L. et al., 2006b; Stajic, M. i Vukojevic, J., 2010).

Finalment, Delgado, G., Guillén, F. et al., 1992 no va detectar diferències significatives de l'activitat de lacases en *P. eryngii* en presència o absència de llum.

### **Oxidases i deshidrogenases extracel·lulars. Aril-alcohol oxidasa.**

En el procés de la degradació de la lignina també hi intervenen un seguit d'oxidases extracel·lulars, d'entre les que en destaca l'aril-alcohol deshidrogenasa (AAO). Hi ha altres oxidases implicades, com les glioxal oxidases (GLOx), les glucosa oxidases (GlcOx), o les veratril alcohol oxidases (VAO) (Call, H. P. i Muecke, I., 1997). Aquests enzims generen el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necessari per a la activitat peroxidasa i participen a través d'aquests radicals en la degradació de la lignina.

L'aril-alcohol oxidasa (AAO, [E.C.1.1.3.7]) és un enzim present en un ampli ventall d'espècies ligninolítiques. *P. eryngii* en destaca per presentar-ne uns nivells d'activitat molt elevats en cultiu (Pelaez, F., Martínez, M. J. et al., 1995). És una oxidasa extracel·lular d'ampli espectre que pot oxidar diversos compostos aromàtics i alcohols alipàtics poliinsaturats, generalment derivats de la pròpia degradació de la lignina, amb una afinitat màxima per el *p*-anisil alcohol. La reacció típica de l'enzim consisteix en la oxidació d'aquest a *p*-anisaldèhid, que lentament s'oxidarà a àcid *p*-anísic. La reacció dona lloc a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que podrà ser emprat per les hemo-peroxidases, i que a més té un efecte sinèrgic amb les lacases, augmentant-ne la activitat ligninolítica (Guillén, F., Gomez, T., V et al., 2000).

S'ha demostrat que el peròxid d'hidrogen també pot degradar indirectament la lignina (Burke, R. M. i Cairney, J. W. G., 1998). En medis amb presència de ió ferro, el peròxid d'hidrogen dona lloc a radicals hidroxil i radicals de Fenton (Reacció de Fenton: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup> → Fe<sup>3+</sup> + HO· + HO·). Es creu que els radicals de Fenton (HO·) poden contribuir a la degradació directa de la lignina, tot i que aquesta només pot arribar a ser parcial. El radical hidroxil (HO·) pot participar també en la degradació de la cel·lulosa. D'aquesta manera, la producció col·lateral de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per part d'AAO o d'altres oxidases, també podria jugar un rol important en la degradació de lignina.

L'AAO i altres d'oxidases actuen conjuntament amb reductases i deshidrogenases, en un cicle de reaccions redox. A més de la producció de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aquest cicle garanteix la

presència de diversos alcohols aromàtics, aldehids i àcids orgànics (veratril-alcohol i altres) que fan de mediadors cooxidants en la degradació de la lignina per MnP i VP (Gutiérrez, A., Caramelo, L. et al., 1994, Guillén, F. i Evans, C. S., 1994, Guillén, F., Martínez, A. T. et al., 1994).

L'acció de les AAO també evita la repolimerització dels productes alliberats en la degradació de la lignina (Guillén, F., Gomez-Toribio, V. et al., 2000).

### **AAO I AAD EN *P. ERYNGII***

Només es coneix un únic isoenzim de aril-alcohol oxidasa en *P. eryngii* (AAO), detectat tant en extractes intra- com extracel·lulars (Guillén, F., Martínez, A. T. et al., 1990). L'AAO de *P. eryngii* és una flavoproteïna de 72,6 kDa, codificada pel gen *aaO* (Varela, E., Martínez, A. T. et al., 1999). Aquest enzim és estable a pH 4,0-9,0 té una activitat màxima a 40-50 °C i pH 6-6,5.

S'ha observat que conjuntament amb la AAO, *P. eryngii* excreta glucans que actuen com una beina hifal que immobilitza l'AAO excretada i alhora juga un rol en l'adhesió del miceli a la superfície de les cèl·lules vegetals que degrada. Posteriorment, les AAO acaben difonent-hi fins a l'interior (Barrasa, J. M., Gutierrez, A. et al., 1998).

### **REGULACIÓ**

La producció d'AAO és estimulada per la presència de substrats lignocel·lulòsics, com la palla. L'enzim és inhibit per Ag, Pb<sup>2+</sup> i NaN<sub>3</sub> (Guillén, F., Martínez, A. T. et al., 1992). La quantitat de AAO produïda per *P. eryngii* augmenta en presència de llum (Delgado, G., Guillén, F. et al., 1992), però no augmenta els nivells de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el medi.

---

## **1.6.- Cultiu industrial de *P. eryngii***

Com ja hem comentat, *Pleurotus eryngii* es comporta en el seu entorn natural com paràsit estricte, i per tant, només fructifica sobre rels de umbel·líferes. Tot i això, en laboratori també es comporta com a sapròtrof, de forma que se'l pot fer créixer i fructificar en condicions controlades sobre altres substrats (fusta, palla, etc.). Es desconeix quin són els factors que fan que *P. eryngii* només fructifiqui a la natura sobre arrels de plantes, ni tampoc perquè ho fa específicament sobre determinades umbel·líferes i no altres hostes.

Tot i que existeixen referències bibliogràfiques anteriors (Györfi, J. i Hajdú, Cs., 2007), es considera que el cultiu industrial de la gírgola de panical va iniciar-se a Itàlia, als voltants de 1970. El seu cultiu s'ha anat estenent arreu del món, arribant a la Xina el 1987, que va iniciar el seu cultiu a gran escala pels voltants de 1997, i actualment n'és el principal productor (Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2008). Actualment *P. eryngii* es cultiva

principalment a Xina, Corea del Sud, i Japó, i de forma més recent als Estats Units i a Europa, on la producció és molt més modesta. Itàlia és el principal productor europeu, i també hi ha produccions discretes a Polònia, Espanya i Alemanya (Oei, P., 2007; Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2008).

## **Substrat de cultiu**

La gírgola de card es cultiva a la indústria principalment sobre substrats esterilitzats, generalment emprant serradures de fusta com a base lignocel·lulòsica (Oei, P., 1996), tot i que també es cultiva sobre palla, sobretot a Europa (Scanu, A., 2009). El pH òptim del substrat es situa entre 5-7, amb un creixement òptim a pH 6 (Zhang, S., Bao, Q. et al., 2005). Segons la bibliografia, l'eficiència biològica obtinguda (pes fresc de bolet /pes sec de substrat) generalment oscil·la al voltant del 60-90% BE (Stamets, P., 1993; Hassan, F. R. H., Medany, G. M. et al., 2010).

### **CULTIU SOBRE FUSTA**

Existeixen alguns estudis sobre l'efecte del tipus de fusta en la productivitat de *P. eryngii* (Peng, J., 1997; Ohga, S., 2000; Sawa, S., 2001). A la pràctica, la disponibilitat i el preu de la fusta condicionen el tipus de fusta emprada, que varia segons la regió. Al Japó i a Corea, on probablement el cultiu es troba més estandarditzat, el substrat és en base a serradures envellides de "sugi" (*Cryptomeria japonica*) i "hinoki" (*Chamaecyparis obtusa*), (Ohga, S., 2000; Ohga, S. i Royse, D. J., 2004; Sawa, S., 2001). Als Estats Units, la fusta més emprada és probablement la de *Quercus rubra* (red oak). A les nostres contrades, la fusta de *Populus spp.* o *Fagus spp.* serien les d'elecció, principalment per raons de preu i disponibilitat.

En el cas de les serradures de coníferes, com és el cas de *Cryptomeria* o *Chamaecyparis*, les serradures es solen "madurar" al exterior, humitejant-les contínuament durant uns tres mesos, i deixant-les en repòs durant tres mesos més (Sawa, S., 2001), o bé emmagatzemant-les acabades de tallar, apilades a l'exterior (sovint més d'un any), abans d'emprar-les. La fusta de *Cryptomeria japonica* i d'altres espècies contenen compostos antifúngics i antibiòtics (principalment sandaracopimarinol i ferruginol) que alenteixen el desenvolupament micelià. S'ha demostrat que aquest procés de lixivat i maduració redueix la fase extractable que conté aquests compostos sense alterar significativament la proporció de lignina, cel·lulosa i hemicel·luloses, fent-la apta per al cultiu de bolets com *Lentinula edodes* (Hong, J., Zeng, R. et al., 2003). A banda del procés de lixivat, també hi té lloc una fermentació per part de microorganismes, que a llarg termini eliminen terpens, olis essencials, resines i altres components, de forma equivalent al mètode proposat per Croan, S. C., 2003 per fer apta la fusta de *Pinus taeda* per al cultiu de diversos bolets – inclòs *P. eryngii* – mitjançant una fermentació prèvia amb *Ophiostoma piliferum*.

Curiosament, aquest procés de maduració no resta gaire ben detallat a la bibliografia occidental, que deduïm, en alguns casos es refereix al producte resultant com a



serradures o fusta “envellides” (*aged sawdust*) o “apilades” (*heaped*) durant mesos. Aquest procés tampoc s’especifica als materials i mètodes en estudis sobre l’efecte del tipus de fusta o la composició del substrat de cultiu (tot i incloure *Cryptomeria* i d’altres coníferes a l’estudi; Ohga, S., 2000).

### **CULTIU SOBRE PALLA**

*Pleurotus ostreatus* i *P. pulmonarius* es solen cultivar sobre substrats pasteuritzats elaborats a partir de palla de blat. En el cas de *Pleurotus eryngii*, el cultiu en aquest tipus de substrat dóna lloc a produccions molt reduïdes, a la pràctica amb eficiències biològiques vora el 26-40% (Oei, P., 2007). Els substrats pasteuritzats es contaminen amb facilitat, i produeixen menys i de forma més heterogènia que els substrats esterilitzats. Per aquesta raó s’han d’inocular sempre amb grans quantitats d’inòcul (com a mínim amb el 10 % en pes, segons Stamets, P., 1993). Els substrats compostats també resulten en produccions més petites (Philippoussis, A., Zervakis, G. et al., 2001).

Existeixen diversos estudis sobre la productivitat de *P. eryngii* en substrats esterilitzats amb base de palla, generalment esmenada amb segó o algun altre component ric en sucres fàcilment assimilables i/o nitrogen. Les productivitats reflectides a la bibliografia són molt heterogènies segons el tipus de palla, l’esmena i el volum d’inòcul emprats (6,7-93,2% BE; Akyuz, M. i Yildiz, A., 2008; Kirbag, S. i Akyuz, M., 2008a), sovint amb EB comparables als d’altres treballs sobre fusta (vegis la Taula 1.5). Tot i això, la palla dóna lloc a produccions més petites que la fusta quan es comparen en les mateixes condicions de cultiu (Stamets, P., 1993; Moonmoon, M., Uddin, M. N. et al., 2010).

Malgrat aquesta productivitat inferior, el cultiu sobre palla de blat és força comú a Europa i sobretot a Itàlia, on *P. eryngii* es cultiva en palla de blat barrejada amb d’altres subproductes agrícoles, com el residu de la remolatxa de sucre, esterilitzats (Scanu, A., 2009). Probablement aquest fet es deu a la disponibilitat i el baix cost de les matèries primeres, que compensen la baixa productivitat.

També s’ha estudiat l’ús d’altres substrats amb bons resultats, com poden ser el bambú (Ohga, S., 1999), o *Cyperus alternifolius*, (Ohga, S. i Royse, D. J., 2004) amb el que els autors varen obtenir millor producció de bolets que amb el substrat estàndard. El cultiu de *P. eryngii* s’ha estudiat també per a l’aprofitament i la bioconversió de residus lignocel·lulòsics miscel·lanis, com residus d’esporga d’avellaner (Torta, L., 1994), esporga de pomera i de vinya, residu de remolatxa de sucre, residu de *kenaf* (Sisto, D., Faggiano, S. et al., 1998), residu de cotó, pellofa de cacauet (Philippoussis, A., Zervakis, G. et al., 2001), residu de canya de sucre (Hong, J., Zeng, R. et al., 2003; Okano, K., Fukui, S. et al., 2007), i molts d’altres, tot i que no ens consta que aquests hagin tingut gaire ressò en la indústria com a component principal del substrat.

Referència	Composició (% PS)	% H <sub>2</sub> O	% inòcul	Esterilització i format	% EB
Kirbag, S. i Akyuz, M., 2008b	Palla de blat (80%) + Segó d'arròs (20%). Esmenat amb 1% CaCO <sub>3</sub> i 1% guix.	70-75%	10%	121°C, 15'. Recipients 2L (500 g)	57,4 ±10,4 %
Philippoussis, A., Zervakis, G. et al., 2001	Palla de blat (90%) + segó de blat (10%); esmenat amb CaCO <sub>3</sub> 2% p/p, pH 6-7.	70%	3%	2x 120°C, 60'	88%
Kirbag, S. i Akyuz, M., 2008b	Palla de blat (40%) + tiges de cotó (40%) + segó d'arròs (20%). Esmenat amb 1% CaCO <sub>3</sub> i 1% guix.	70-75%	10%	121°C, 15'. Recipients 2L (500 g)	77,2 ±10,7 %
Sisto, D., Faggiano, S. et al., 1998	Palla de blat (13%) + polpa de bleada-rave (50%) + llavor de mill (37%). Esmenat amb CaCO <sub>3</sub> , pH 6-6,5.	65-70%	N/D	120°C, 30'	94%
Torta, L., 1994	"Xips" d'avellaner (branques) (100%)	retenció	10%	10%	77% (*)
Sawa, S., 2001	Serradures de sugi (57,5%) "apilades" durant 6 mesos + segó de blat (34%) + segó de blat de moro (8,5%)	65%	2%	121°C, 60', o bé 95°C, 5 h. Ampolles 800cc (530g)	97% (1a florada: 67%)
Stamets, P., 1993	Serradures d' <i>Alnus</i> spp. (80%) + segó (20%)	N/D	N/D	N/D	fins a 90%
Peng, J. T., Jene-Tung, C. et al., 2002	Serradures ( <i>Trema orientalis</i> ) apilades durant 4 mesos (61%) + segó d'arròs (38%); esmenat amb CaCO <sub>3</sub> (0,66%)	68%	N/D	121°C, 45'	87%
Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2007	Cloves de llavor de cotó (62%) + serradures ( <i>Quercus rubra</i> ) "envellides" 3 mesos (27%) + llavor de soja molta (6%) + tortó de blat de moro (4%) + sulfat càlcic (1%)	60%	1-1,5%	121°C, 90'. Ampolles 1L.	57,5% (florada única)
Sisto, D., Faggiano, S. et al., 1998	Esporga de vinya (50%) + polpa de bleada-rave (50%); esmenat amb CaCO <sub>3</sub> , pH 6-6,5.	65-70%	N/D	95°C, 180'	95%

**Taula 1.5:** Diversos exemples de formulació de substrat industrial per a *Pleurotus eryngii*. Els percentatges dels components s'expressen sobre el pes sec. EB = pes fresc de bolet produït / pes sec de substrat. N/D: No descrit. (\*) EB calculada suposant un 65% H<sub>2</sub>O en el substrat.

## ESMENES

Generalment la base lignocel·lulòsica és esmenada amb alguna font nitrogenada, sovint amb segó d'arròs o de blat. La proporció òptima varia lleugerament segons la soca emprada, i és a una concentració elevada de segó (òptim al voltant del 38-48% en pes sec per al segó d'arròs, segons Peng, J. T., Jene-Tung, C. et al., 2002). Donat el cost elevat que això suposa, a efectes pràctics s'empra menys quantitat, molt variable (5-20%) segons la font bibliogràfica (Oei, P., 1996; Ohga, S. i Royle, D. J., 2004, entre d'altres).

El guix ( $\text{CaSO}_4$ ), emprat habitualment en l'elaboració d'inòcul de bolets a base de gra com anticompactant (*anticaking*), pot inhibir lleugerament el desenvolupament micelià de *P. eryngii*, mentre que  $\text{CaCO}_3$  o  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  no l'afecten (Lee, N. H., Im, M. H. et al., 2006). El carbonat càlcic s'empra habitualment per a ajustar el pH del substrat. Pel que fa al fosfat tricàlcic, hem observat que *P. eryngii* té la capacitat de solubilitzar-lo in vitro i emprar-lo com a font de fòsfor (dades no presentades). L'esmena de substrat de cultiu amb  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  a raó de 0,1-0,5 % augmenta els nivells de Ca en els carpòfors entre 4,5 i 8,5 vegades més que als controls (Lee, N. H., Im, M. H. et al., 2006).

Tot i que l'ús d'altres esmenes minerals no s'esmenta en la bibliografia general de cultiu, es disposa d'estudis recents que indiquen que aquestes podrien millorar les productivitats de *P. eryngii*. Els treballs de Rodríguez Estrada, A. E. i Royle, D. J., 2007 han posat de manifest que les esmenes amb Mn en el substrat augmenten la taxa de creixement micelià i la producció de bolets, amb l'òptim vora els 50µg Mn /g de substrat. Ja hem comentat com el Mn afecta els nivells de transcripció de Mn-peroxidases i participa en el procés de la degradació de la lignina. Al contrari, l'esmena del substrat de cultiu amb Cu (metall que forma part del nucli de les lacases, també implicades directament en la degradació de la lignina) no augmenta els nivells de producció de *P. eryngii* i tampoc no es detecta un augment dels nivells de Cu presents al barret, però sí pot afavorir l'atac de *Pseudomonas tolaasi*, un bacteri patògen que sovint afecta als carpòfors, causant embruniment i malformacions (Rodríguez Estrada, A. E. i Royle, D. J., 2007).

## **Procés general de cultiu. Paràmetres ambientals**

El sistema de cultiu industrial segueix les pautes estàndard sobre substrats esterilitzats. El substrat, un cop disposat en un recipient tancat, esterilitzat i refredat, (vegis els diferents sistemes de cultiu més endavant), s'inocula i s'incuba fins a que el miceli colonitza per complet (per regla general, uns 15 dies). En acabat, s'indueix la fructificació, i es manté en condicions controlades de temperatura, humitat i ventilació obtenint-se d'una a tres fructificacions de 8-12 dies de durada, separades per intervals d'uns 14 dies.

## INOCULACIÓ I FASE DE COLONITZACIÓ.

La inoculació del substrat es sol realitzar mitjançant gra de cereal (generalment sègol, mill o avena esmenats amb 1% CaCO<sub>3</sub> i 1% guix), hidratat i esterilitzat, sobre el qual s'ha fet créixer el miceli de *P. eryngii* (tècnica estàndard). La proporció d'inòcul i el sistema emprat varia en funció del sistema de cultiu emprat (vegis més endavant).

*Pleurotus eryngii* presenta creixement micelià in vitro dins el rang de (<5) 15-30 (35)°C, aturant-se el creixement per sobre d'aquesta temperatura (Marras, F., Maddau, L. et al., 1997). La temperatura òptima per al creixement micelià (fase de colonització, ang: *spawn-run*) es situa vora els 25°C. Segons Zhang, S., Bao, Q. et al., 2005, el pH òptim del substrat es situa entre 5-7 (òptim a 6), i el miceli creix millor en condicions de fosc.

*P. eryngii* presenta més creixement micelià i produeix més carpòfors a concentracions baixes de CO<sub>2</sub> (Maddau, L., Franceschini, A. et al., 2002). En comparació a *Pleurotus ostreatus* i *Pleurotus pulmonarius*, és força menys tolerant a concentracions elevades de CO<sub>2</sub>; el creixement micelià de *P. eryngii* s'inhibeix a partir del 22% de CO<sub>2</sub>, mentre que aquesta concentració estimula el desenvolupament dels altres *Pleurotus* (Zadrazil, F., 1975).

## FRUCTIFICACIÓ

Acabada la fase de colonització, el substrat és destapat (o bé es perfora l'embolcall, en cas del cultiu en bosses), i sotmès a un xoc tèrmic per fred, baixant la temperatura fins als 10-15°C, amb un règim de llum difosa suau (200 lux). Els estímuls per la davallada de CO<sub>2</sub> i temperatura, i la llum activen la formació i desenvolupament de primordis. La humitat en aquest procés s'ha de mantenir molt alta (vora el 90-95%), per tal d'evitar que els primordis, molt sensibles, s'assequin. Un cop formats els primordis, la humitat relativa de la sala pot reduir-se una mica (80%)

Es poden diferenciar dues variants en el sistema de cultiu que donen lloc a les dues morfologies comercials de bolet ja esmentades, l'una de cama obesa i barret petit, l'altra de cama més curta i barret ben desenvolupat. Aquestes diferències es deuen al maneig en el cultiu i sobretot, a la concentració de CO<sub>2</sub> en la fase de fructificació. La morfologia obesa (de fet, una malformació del carpòfor per la manca de CO<sub>2</sub>) s'obté controlant els recanvis d'aire per tal de mantenir nivells de CO<sub>2</sub> al voltant dels 2000 ppm, mentre que la morfologia més semblant a la del bolet silvestre s'obté mantenint els mínims nivells possibles de CO<sub>2</sub>, sempre per sota dels 1000 ppm.

Segons Yanagibashi, H., Matsuoka, D. et al., 2005, les longituds d'ona en la il·luminació també afecten la morfologia del carpòfor, i l'espectre de llum blava (420–480 nm) dona lloc a carpòfors amb un barret més desenvolupat i peu reduït, més similars als que es troben a camp. La incidència de llum també estimula l'enfosquiment del barret.

	Stamets, P., 1993	Oei, P., 1996 i 2007	Sawa, S., 2001
<b>Creixement micelià (incubació)</b>			
Temperatura:	24°C	20-25°C	23°C
Humitat:	95-100%	-	65-70%, opcional
CO <sub>2</sub> :	5000-20.000 ppm	-	< 2000 ppm
Recanvis d'aire:	> 1/h	-	-
Llum:	-	-	fosc / 200 lux
<b>Formació de primordis:</b>			
Temperatura	10-15°C	15-22°C	15-17°C
Humitat:	95-100%	85-95%	85-90%
CO <sub>2</sub> :	500-1000 ppm	500-1000 ppm	< 2000 ppm *
Recanvis d'aire:	4-8 recanvis /h	-	-
Llum:	500 / 1000 lux	250 lux , 8h / dia	200 lux
<b>Fructificació:</b>			
Temperatura:	15-21°C	18-22°C	15-17°C
Humitat:	85-90%	85%	85-90%
CO <sub>2</sub> ( <sup>†</sup> ):	< 2000 ppm	< 2000 ppm	< 2000 ppm
Recanvis d'aire	4-5 recanvis /h	-	-
Llum:	500 / 1000 lux	250 lux , 8h / dia	200 lux

**Taula 1.6:** Paràmetres ambientals per al cultiu de *P. eryngii*.

## Principals sistemes de cultiu

*Pleurotus eryngii* es cultiva mitjançant tres sistemes: en ampolles, en bosses, o bé en bosses o sacs, aplicant una capa de cobertura.

### AMPOLLES

El cultiu en ampolles es practica principalment a Japó, Corea del Sud, Xina i en algunes instal·lacions modernes als Estats Units (Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2008). La unitat de cultiu són ampolles de plàstic reutilitzables, de 0,8-1 l, de broc gros, i amb un tap que disposa d'un filtre per permetre l'intercanvi de gasos. Aquest sistema permet automatitzar gairebé tot el procés amb maquinària, que gestiona les ampolles mitjançant safates de 16 unitats. El substrat emprat sempre és amb base de serradures de fusta. La inoculació, també automatitzada, es realitza amb gra i/o serradures colonitzades. Darrerament, algunes empreses –especialment a Corea del Sud i Canadà– han popularitzat l'ús d'inòcul líquid per al cultiu en ampolles (Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2008).

En aquest sistema de cultiu es realitza una única fructificació, o com a màxim dues. Passada la incubació de les ampolles, tapades i disposades en lleixes a 16-24°C durant 28-35 dies, la fructificació s'estimula destapant-les i eliminant la part externa de substrat,

que conté el miceli més envellit i les restes de l'inòcul (procediment anomenat "kinkaki") i opcionalment, provocant una davallada de temperatura (13°C) (Ohga, S., 2000). El *kinkaki* redueix el nombre de carpòfors per ampolla, però en millora la producció i la qualitat (Oei, P., 2007). Generalment els primordis es protegeixen de la deshidratació cobrint les ampolles amb un plàstic microperforat fins que arriben a tenir 1 cm.

Un cop formats els primordis es sol reduir a mà el nombre d'aquests per ampolla, per tal d'obtenir menys bolets però més grossos (3-4 per ampolla). Aquest sistema de cultiu s'empra per a obtenir carpòfors amb la morfologia obesa ja descrita. Per aquesta raó, al llarg del desenvolupament la ventilació es redueix, per tal de mantenir els nivells de CO<sub>2</sub> entre 1000 i 2000 ppm. Aquesta estratègia economitza el cost energètic per climatitzar la instal·lació (cal climatitzar menys renovacions d'aire), es facilita el procés de recollida i manipulat, i es minimitzen les pèrdues en el processat del bolet, ja que es consumeix la cama sencera.

A les contrades europees, la gírgola de card cultivada no és tant coneguda, i el consumidor profà percep les dues morfologies comercialitzades (obesa, i normal) com a productes diferents. Actualment, la manca de demanda del producte, i el baix cost del bolet d'importació no justifiquen la inversió de maquinària pesada per a un sistema automatitzat de cultiu en ampolles, i no ha estat fins als darrers anys que les empreses nacionals comencen a plantejar-se la opció de cultivar bolets en aquest format.

## **BOSSES**

El cultiu en bosses s'empra principalment a Europa i a la Xina (Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2008). Aquest procediment és molt menys automatitzat però menys costós en infraestructura. A més, el sistema de bosses és similar al que s'empra en altres cultius més populars, com el de *Lentinula edodes*.

El cultiu es realitza en bosses de plàstic que contenen uns 0,5-3 kg de substrat. El plàstic, resistent a la temperatura, és microperforat o disposa d'un filtre que permet la ventilació. El substrat pot ser en base de palla (més popular a Europa), o de serradures de fusta. Aquest s'inocula sempre amb gra de cereal, i la incubació dura entre 21 i 28 dies.

La inducció a la fructificació es realitza mitjançant xoc tèrmic per fred. Les bosses es perforen (Györfi, J. i Hajdú, Cs., 2007) o se'ls retira la part superior del plàstic per a que es desenvolupin els primordis (Stamets, P., 1993; Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2008). El nombre i mida de les perforacions afecta el rendiment. Es considera que la millor producció s'obté quan els forats suposen el 5% de la superfície del substrat, obtenint bolets més menuts com més nombre de forats (Györfi, J. i Hajdú, Cs., 2007; Oei, P., 2007).

Per aquest sistema s'obtenen d'una a tres fructificacions (ja siguin amb morfologia obesa o normal), segons si s'ha perforat o retirat el plàstic.

## **CULTIU AMB COBERTURA**

L'ús de una capa de cobertura (ang. *casing layer*) és una tècnica emprada en el cultiu de *Agaricus spp.* per a induir la fructificació. Al contrari del cas d'*Agaricus*, aquesta cobertura no és necessària per a estimular la fructificació de *P. eryngii*, però serveix per a reduir la deshidratació del substrat, i permet el rec del mateix. Per aquesta raó aquesta tècnica s'empra principalment en cultius amb poc control dels paràmetres ambientals o en cultius a l'exterior, i és mot estès a Itàlia i a la Xina.

El substrat i el procediment emprat per a preparar-lo és el mateix que en el cas del cultiu en bosses, que en aquest cas, poden tenir més volum de substrat (fins a 15-18 Kg). Acabada la incubació, es retira la part superior (o la totalitat) del plàstic i es disposa a tocar l'un de l'altre, en bancades. Finalment, es recobreix la superfície superior amb 2-3 cm d'una barreja de torba i carbonat càlcic 9:1 (com la que sovint s'empra en cultius de *Agaricus spp.*; Györfi, J. i Hajdú, Cs., 2007). A Itàlia el sistema habitual consisteix en disposar el substrat a terra, en trinxeres fetes d'obra, i la capa de cobertura emprada sol ser terra natural mullada a capacitat de camp (Scanu, A., 2009; Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2008). Aquesta capa de cobertura actua de barrera a la deshidratació i permet rehidratar el substrat regant directament a sobre per aspersió, de forma que s'obtenen fins a tres fructificacions. Per contra, la incidència de contaminacions és molt major, i els bolets s'embruten amb la mateixa capa de cobertura, rebaixant-los la qualitat i dificultant-ne el processat. L'ús de sòl com a capa de cobertura dóna lloc a fructificacions amb el barret molt més fosc i per tant més similar al de les fructificacions silvestres.

Alguns treballs recents assenyalen que l'ús de la capa de cobertura amb carbonat càlcic i torba, en condicions controlades pot millorar la productivitat i la qualitat (Györfi, J., Hajdú, Cs. et al., 2007), especialment si és combinada amb esmenes d'alliberació lenta (Rodríguez Estrada, A. E., Lee, H. J. et al., 2009; Rodríguez Estrada, A. E., Jimenez-Gasco, M. et al., 2009).

D'altres estudis han aïllat algunes soques bacterianes a partir d'aquestes capes de cobertura que promouen el desenvolupament micelià de *P. eryngii* mitjançant l'alliberació de metabòlits secundaris. La soca més eficient ha estat identificada com a *Pseudomonas sp.* (soca P7014, Kim, M. K., Math, R. K. et al., 2007).

## **Cultiu industrial d'altres varietats**

A banda de la varietat tipus, avui dia també es cultiven d'altres varietats del complex *eryngii*. La varietat *ferulae* té unes condicions de cultiu pràcticament idèntiques a la varietat tipus. Donat que els carpòfors obtinguts són idèntics a les de la varietat *eryngii*, i que l'elevada intercompatibilitat entre les diferents varietats en facilita molt l'encreuament de soques, a efectes pràctics aquests aïllats es cultiven i comercialitzen sota la mateixa denominació.

Aproximadament en els darrers 10 anys s'està cultivant a la Xina un altre bolet que pertany al complex *eryngii*, sota la denominació "Nebrodensis". Els bolets d'importació que nosaltres hem vist arribar a Catalunya amb aquesta denominació de producte són molt diferents als de la varietat *eryngii*: tenen un carpòfor totalment blanc, grans, molt més carnosos i densos, amb la cama curta, i pràcticament lateral, donant al carpòfor un aspecte gairebé en forma de mènula. Segons Zhang, J. et al, 2005, a la Xina se'n cultiven com a mínim quatre soques diferents, incompatibles entre sí i ben caracteritzades per RFLP, que donen lloc a carpòfors sempre blancs i molsuts, però que es diferencien morfològicament perquè tenen diferents graus d'excentricitat en la cama, que pot ser des de central fins a sublateral, com en els exemplars que nosaltres hem vist.

Aquesta varietat va ser introduïda massivament al mercat xinès per Beijing Jinxin Edible Fungus Ltd. el 1997, inicialment comercialitzada com a "Eryngii blanc", i més tard es va popularitzar com a "Nebrodensis", produint-se'n més de 34.000 tones anuals el 2002 (Shen, J. et al, 2005). Segons la literatura recent, en realitat aquesta varietat es correspon a *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* Mou (Kawai, G., Babasaki, K. et al., 2008; Mou, C., Cao, Y. et al., 1987).

Hi ha molt poca literatura específica sobre les característiques de cultiu d'aquesta varietat, si més no, accessible a nivell occidental. El sistema de cultiu és molt semblant al de la varietat tipus, i avui dia es cultiva pels sistemes d'ampolles, o en bosses menudes de 0,5-1 kg. En alguns casos les bosses són, de fet, tubs de film plàstic tancats pels dos extrems, fet que permet inocular-les i fer-les fructificar per ambdós costats, reduint el temps de colonització i optimitzant la gestió del cultiu (Oei, P., 2007, Tan, Q., 2011).

Segons Shen, J. et al, 2005, al igual que per a la varietat *eryngii* el substrat es pot elaborar amb nombrosos residus agrícoles de caire lignocel·lulòsic - com poden ser el residu de llavor de cotó, flocs de fusta, palla, residus de canya de sucre, etc.- i esmenat amb productes que n'augmentin els sucres fàcilment assimilables i el contingut en nitrogen, fòsfor i altres micronutrients (farina, segó, urea, fosfats, extracte de llevat, etc.) a més de guix i carbonat càlcic. La ràtio C:N del substrat es situa en el rang dels 40-25:1 (Tan, Q., 2011). Els substrats que s'empren més sovint són serradures, restes de panotxa desgranada i residu de llavor de cotó (Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2008). El pH idoni per al substrat és de 5,5-6,5 (tot i que tolera un rang molt més ampli, entre pH 5 i 11), i el contingut d'aigua vora el 60-70%. El substrat sol fermentar-se prèviament i després s'esterilitza (Shen, J. et al, 2005).

La temperatura òptima de creixement oscil·la entre els 23-28°C amb l'òptim als 25°C, i no té requeriments de llum. La incubació dura uns 22 dies. La fructificació generalment s'activa mitjançant un xoc tèrmic amb fred (0-13°C segons Shen, J. et al, 2005; 10-15°C durant 15 dies segons Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2008). Durant la formació de primordis la humitat entre el 70-85% i els nivells de CO<sub>2</sub> entre els 300 i 1000 ppm (Tan, Q., 2011). La fructificació es realitza a 87-95% HR i amb poca llum. La temperatura de



fructificació també varia segons l'autor, 8-13°C segons Shen, J. et al, 2005, 15-20°C segons Tan, Q., 2011.

Només s'obté una única fructificació i un únic carpòfor per ampolla, fet que s'aconsegueix reduint a mà el nombre de primordis.

## **Problemes de cultiu**

Com ocorre en tots els cultius de bolets, una de les principals malalties en cultius industrials de la gírgola de card és l'atac del substrat per part d'espècies del gènere *Trichoderma* (Seaby, D., 1998; Hong, S. B., Kim, H. K. et al., 2000), sovint *T. viride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii*, i *T. longibranchiatum*. Aquests fongs, de distribució cosmopolita, creixement ràpid i esporulació prolífica, presenten una forta activitat hemicel·lulàsica, cel·lulàsica i també quitinàsica, i es troben amb freqüència en el sòl i en substrats lignocel·lulòsics com fusta o virosta. A banda de la competència pel substrat, la seva capacitat de degradar la quitina els permet parasitar les hifes d'altres fongs. Per això generalment són invasors secundaris de la fusta, donat que per sí sols només poden degradar-ne els carbohidrats no estructurals.

Aquestes característiques permeten a aquest grup de fongs proliferar amb molta facilitat en els cultius industrials de bolets, i són de molt difícil eradicació un cop instaurats. Es coneixen algunes soques especialment agressives que s'han adaptat específicament a l'entorn del cultiu de bolets, esdevenint resistents a antifúngics, i que poden donar lloc a pèrdues econòmiques molt importants. En algunes contrades s'han registrat epidèmies que han causat pèrdues entre el 30 i 100% de la producció de xampinyó (*A. bisporus*), com és el cas dels Països Baixos (1971-76), Irlanda (1985-86), o Estats Units i Canadà (1990-96). Actualment es considera que un cultiu de bolets amb menys d'un 5% de pèrdues de producció manté un correcte control d'aquest contaminant (Seaby, D., 1998).

Malgrat els estudis de l'ús d'antifúngics i altres sistemes de desinfecció per combatre aquest fong paràsit (Aboriswill, S. O. i Clancy, K. J., 2002, i d'altres), no hi ha un mètode efectiu per eliminar-lo. Sí s'ha trobat determinats compostos, com l'extracte d'olis essencials de *Melaleuca alternifolia*, que inhibeixen el creixement de *Trichoderma harzianum* i en canvi estimulen el creixement de *P. eryngii* in vitro, però resulta inviable aplicar-los a un cultiu intensiu pel cost que suposaria. Per tot això, en els cultius intensius és imprescindible realitzar desinfeccions preventives freqüents i en qualsevol cas eliminar el substrat afectat així que es detecta. Els substrats formulats amb continguts elevats d'aigua (>65%) són més susceptibles d'infectar-se per *Trichoderma* (Seung-Hun, Y. i Gun-Sik, H., 2000).

Alguns fongs també poden causar greus alteracions als carpòfors, com són el cas de *Mycogone perniciososa*, que causa malformacions (Rana, G. L., Bacci, L. et al., 1998), o *Gliocladium roseum*, que produeix taques brunes i malformacions (Chen, J. i Huang, J., 2004).

D'altres fongs són habitualment causants de contaminacions en el substrat, sovint a conseqüència d'una mala esterilització o pasteurització, però que d'estar instaurats en un cultiu poden ser difícils d'eradicar i causar també notables pèrdues econòmiques. Els causants més habituals són membres del gènere *Penicillium* [*P. corylophilum* (Jo, W. s., Rew, Y. h. et al., 1999), *P. italicum*, etc.], *Aspergillus* (*A. fumigatus*), *Chaetomium setosum*, *Chrysosporium lutea*, *Sepedonium chrysospermum*, *Chrysonilia sitophila*, *Nigrospora sphaerica*, o *Arthrimum phaeospermum*, entre d'altres (Rana, G. L., Bacci, L. et al., 1998).

S'ha aïllat àcars micòfags (*Pediculaster mesembrinae* Canestrini) que devoren el miceli de *Trichoderma viride* Pers., *Cladobotryum dendroides* (Bull.) Fr., *Chrysonilia sitophila* Shear et B. Dodge i *Mycogone perniciosus* (Magn.) Delacr., però no el de *P. eryngii*, i segons algun autor es podrien emprar com a control biològic (de Lillo, E., 1997). No obstant, els àcars en un cultiu són ben coneguts per actuar de vector, propagant les espores d'aquests contaminants en el cultiu (Seaby, D., 1998, Rana, G. L., Bacci, L. et al., 1998, i d'altres). En qualsevol cas, no coneixem que hagin estat emprats a escala industrial.

L'afecció bacteriana més freqüent és causada per *Pseudomonas tolaasii*, que causa taques brunes i malformacions als carpòfors (Rana, G. L., Bacci, L. et al., 1998; Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2005; González, A. J., González-Varela, G. et al., 2009). En el cas de *P. eryngii*, aquest bacteri és més perniciós quan es troba present en el substrat, més que quan s'aplica a la superfície del barret (Russo, A., Filippi, C. et al., 2003). La patogeneïtat sembla ser específica d'algunes soques, que ataquen a *P. eryngii* i no a altres espècies, com *P. ostreatus* o *A. bisporus* (Russo, A., Filippi, C. et al., 2003). També s'ha descrit altres afeccions bacterianes en carpòfors, produïdes per *Erwinia carotovora* o *Pantoea* sp. (Kim, M. K., Ryu, J. S. et al., 2007).

També s'ha descrit l'existència de micovirus que poden afectar específicament al cultiu de gírgola de card, com el cas de PeSV, un virus esfèric no relacionat amb altres micovirus coneguts que causa malformacions als carpòfors i retard en el cicle de cultiu (*Pleurotus eryngii Spherical Virus*; Ro, H. S., Kang, E. J. et al., 2007).

Pel que fa als insectes, com en la majoria de cultius de bolets, les principals plagues són causades per petits dípters (principalment de les famílies *Sciaridae* i *Phoridae*) que ponen els ous en el substrat, actuant de vectors d'altres contaminants. A més, el desenvolupament de les larves en el substrat merma la producció i la qualitat dels bolets. Un estudi recent sobre la incidència de dípters en carpòfors silvestres de *P. eryngii* en la província de Segòvia ha fet palès que un 20,4% dels mateixos es troba afectat per un dípter, *Tarnaria fenestralis* Meigen (*Micetophilidae*), les larves del qual barrinen els carpòfors (Tobar, V., Notario, A. et al., 2010). No ens consta la incidència d'aquest insecte en cultius intensius. També s'ha descrit puntualment a la bibliografia l'atac dels carpòfors en cultius per part de laves d'un coleòpter (*Triplax rufipes*, *Erotylidae*; De Marzo, L. i Rana, G. L., 2003).

## Envasat i comercialització

*Pleurotus eryngii* i la varietat comercialitzada com a “Nebrodensis” són les més ben preuades dins del gènere *Pleurotus*, per la textura de la carn, sabor i aroma. La producció d’aquest bolet els darrers anys s’ha vist incrementada exponencialment. A tall d’exemple, a la Xina l’any 2001 es comercialitzaven 21.000 tones. Dos anys després, la producció era cinc vegades superior (114.000 tones l’any 2003, segons Chang, S. T., 2005).

La gírgola de panical cultivada es comercialitza principalment en fresc, generalment envasada en safates embolicades amb film extensible semi-permeable als gasos, o bé per sistema flow-pack amb film micro o nanoperforat. *Pleurotus eryngii* es caracteritza per tenir una consistència ferma i una conservació post-collita excel·lent, que permeten comercialitzar el bolet a l’engròs a llargues distàncies (Oei, P., 2007). Aquest fet es veu molt afavorit per la forma obesa del bolet, que redueix la proporció superfície / volum i es deshidrata amb menys facilitat.

Segons Rodríguez Estrada, A. E. i Royse, D. J., 2008, els diferents països on es comercialitza el bolet prefereixen variants diferents pel que fa a l’aspecte del bolet. El mercat europeu prefereix la forma més similar a la silvestre, amb estípit curt i un barret ben desenvolupat. A Itàlia el mercat prefereix formes amb el barret fosc, mentre que al mercat espanyol prefereix les formes clares. A la Xina, la forma obesa és la preferida, minimitzant l’himeni per aconseguir la forma més carnosa possible. A Corea, Japó i Estats units, es comercialitza una forma obesa intermèdia, amb la cama obesa i el barret també desenvolupat.

*Pleurotus eryngii* també es comercialitza en conserva, generalment salmorra, tot i que en una proporció menor. A casa nostra aquest producte en conserva és difícil de trobar, i la majoria de conserves no artesanes que venen etiquetades com a “seta de cardo” contenen en realitat *Pleurotus ostreatus*. També es ven deshidratat, laminat o polvoritzat, tot i que aquest cas representa una proporció mínima.

---

## 1.7.- Proposta d'un sistema de cultiu extensiu de *P. eryngii*

El present treball pretén estudiar si és factible, i en el seu cas, establir els precedents necessaris per a desenvolupar un procediment de cultiu de bolets no industrial, específicament dissenyat per a bolets del grup *eryngii*. Les principals raons per fer-ho són les següents:

En primer lloc, el cultiu industrial de bolets generalment dona lloc a bolets de menys qualitat que els recollits en l'entorn natural. Per a algunes espècies de bolets comestibles existeixen procediments de cultiu alternatius, força similars al desenvolupament natural, que donen lloc a fructificacions de qualitat. En són exemples el cultiu de bolets sobre troncs – especialment desenvolupat en el cas del xiitake (*Lentinula edodes*) i força estès en algunes contrades, com Japó o Estats Units – o el cultiu de *Stropharia rugoso-annulata* sobre virosta de fusta en el sòl.

El cas de *Pleurotus eryngii* no n'és una excepció; els carpòfors obtinguts en cultiu no tenen les mateixes qualitats de sabor i textura que les recollides a camp, fet que valoren els recol·lectors de les zones naturalment productores del bolet, i que queda reflectit en el preu del bolet d'origen silvestre en els mercats. En contraposició, donat que l'hàbitat de *Pleurotus eryngii* és peculiar i no permet traslladar les tècniques de cultiu d'altres bolets, no existeix cap procediment per al cultiu de la gírgola de camp en l'entorn natural.

En segon lloc, al tractar-se d'un bolet força preuat, la gírgola de card és un bolet sotmès a una forta pressió de recol·lecció. A la zona de Catalunya no és un bolet massa conegut, però a diferència d'altres regions de la Península, és un bolet poc freqüent. Com veurem més endavant, hi ha indicis que fan pensar que s'hi troba en una situació de retrocés, probablement degut a que seu hàbitat natural també ho està, conjuntament amb determinades practiques agrícoles vinculades a la presència del bolet –com el guaret i la pastura per oví i cabrum - . El cultiu a camp de soques autòctones de la regió podria afavorir l'aturada d'aquest procés i si més no, alleujar-ne la pressió recol·lectora, a més d'oferir una alternativa agrària a conreus devaluats i promoure el restabliment de terres de conreu en desús.

Finalment, el mercat actual tendeix a introduir bolets amb un valor afegit elevat, donat que les quotes de mercat de bolet de baix cost té un reduït marge de benefici. A més, els nínxols de mercat per al bolet de cultiu industrial ja es troben força coberts per les produccions actuals i cada cop més, per bolets importats d'orient.

En aquest context, proposem un nou procediment de cultiu per a la gírgola de card a camp, emulant el procés natural de desenvolupament del bolet.

## **Concepte general**

El concepte general del procediment de cultiu proposat és aparentment senzill. L'hem subdividit en tres fases:

### **FASE 1: DESENVOLUPAMENT DE L'HOSTE**

La primera fase passa pel cultiu d'un dels hostes naturals de la gírgola de panical en el camp, per tal d'obtenir plantes susceptibles de ser infectades pel fong. Aquestes plantes hoste, hauran de desenvolupar un sistema radicular prou desenvolupat com per assegurar una fructificació suficient de bolets a partir de les seves reserves.

Aquests hostes poden pertànyer a una població natural o bé ésser obtinguts per conreu, ja sigui per sembra directa o mitjançant planter. A nivell teòric, hi ha la possibilitat de realitzar el cultiu de la planta en testos, o fins i tot en cultiu hidropònic, tot i que donat el cost que això suposaria, difícilment serà rendible.

### **FASE 2: INOCULACIÓ I INFECCIÓ DE LES RELS**

La segona fase consisteix en la inoculació del fong i el desenvolupament del miceli en el sòl i més tard, sobre la rel de l'hoste. La inoculació és un dels punts més crítics, donat que com veurem, gairebé no s'ha descrit tècniques específicament dissenyades per a la inoculació de fongs productors de bolets al sòl que siguin prou eficients. Malauradament, el coneixement actual sobre la biologia de *P. eryngii*, el seu comportament en el sòl i la interacció amb la flora i els microorganismes també són molt minsos.

### **FASE 3: FRUCTIFICACIÓ**

L'última fase del procés de cultiu és l'obtenció de carpòfors a partir de les rels infectades. Donat que el procediment de cultiu es donarà a l'aire lliure, aquestes fructificacions seran força estacionals (primavera – tardor) i dependran de les condicions climàtiques, encara que podrien ser modulades amb tècniques d'ombregat, humitejat i rec.

## **Tipologies de cultiu.**

El procediment de cultiu que aquí plantegem es pot orientar a dues estratègies de cultiu diferents.

Per una banda permetria generar parcel·les naturalment productores de gírgola de card, bé sigui sobre una població de cards ja existent, o bé en una parcel·la en guaret o simplement en desús, sense manteniment agrícola, a la que s'introdueix la planta per sembra. Aquesta estratègia de cultiu donaria lloc a produccions de bolets reduïdes i molt estacionals, però amb un cost de manteniment també molt reduït. Aquesta estratègia

seria ideal per a revalorar zones de conreu en desús, o amb finalitats de reintroducció d'espècies d'hàbit equivalent al de *P. eryngii*.

Per una altra banda, hi ha la possibilitat de realitzar cultius intensius a camp, realitzant plantacions de l'hoste a densitats elevades i potenciant-ne la producció de biomassa radicular. Aquestes plantacions serien inoculades més tard, controlant en la mesura del possible la vegetació dins la parcel·la i les condicions edafològiques i climatològiques mitjançant l'ús de tècniques agrícoles. Aquest segon model de treball, requereix d'una posta a punt i optimització del cultiu molt més considerable, però permetria obtenir produccions de bolet més elevades i més ben controlades al llarg del temps, a canvi d'un major esforç d'inversió i manteniment de la parcel·la.

### **Altres aplicacions: bioremediació de sòls**

L'aplicació de fongs ligninolítics en sòls ha estat un aspecte molt estudiat en les darreres dècades, amb la finalitat de bioremediar terrenys contaminats amb productes recalcitrants (compostos fenòlics, hidrocarburs...), gràcies a les propietats del sistema ligninolític d'aquests basidiomicets. Malauradament, les aplicacions en condicions reals han tingut fins ara èxits molt discrets per la dificultat d'establir aquests fongs al·lòctons en un ambient hostil com és el sòl.

A nivell teòric, el sistema proposat de cultiu podria ajudar a resoldre aquesta problemàtica, ja que permetria establir una població estable de *P. eryngii* i els seus hostes en el terreny que podria actuar a llarg termini sobre els productes contaminants, degradant-los. Aquesta possibilitat no està exempta de dificultats i encara resta lluny de ser factible, ja que no tots els terrenys han de ser necessàriament conductors per a *P. eryngii* i tenim un coneixement molt limitat del seu comportament en condicions naturals. Nogensmenys, creiem que aquest concepte té més potencial que els procediments proposats fins ara; per una banda sembla força versemblant que resulti més senzill introduir en un terreny un fong ligninolític que viu de forma natural en el sòl, i de l'altra, la possibilitat que aquest s'estableixi al terreny durant un llarg termini de temps augmentaria en gran mesura la seva efectivitat en degradar els compostos recalcitrants que hi són presents.

## 2. Objectius.

---

L'objectiu general del present treball és assentar unes bases mínimes encaminades a desenvolupar en un futur un procediment fiable i rendible per a cultivar la gírgola de panical a camp. Com exposarem en els següents capítols, en estudis preliminars hem anat topant amb alguns factors limitants (manca de tècniques estandarditzades, resultats inesperats en les infeccions dirigides, en el cultiu d'hostes, etc.) que cal resoldre prèviament.

En base a aquestes experiències, la diversitat de disciplines que hi ha involucrades, i donades les amples llacunes de coneixement que hi ha en aquest camp, hem limitat el present estudi als següents objectius:

---

### 2.1.- Obtenció de material biològic i creació d'un banc de soques de cultiu.

Els darrers anys s'han descrit nombroses varietats de *Pleurotus eryngii sensu lato*, cadascuna d'elles sobre hostes específics i diferents. Actualment no hi ha un consens sobre la validesa ni l'estat taxonòmic d'aquestes varietats, i es desconeix del tot quin grau d'especificitat té cada varietat per als hostes descrits. A banda, no hi ha disponible un banc de cultius de soques de *Pleurotus eryngii*, imprescindible per a poder realitzar estudis en un futur sobre quines plantes hoste podrien resultar més productives i realitzar una selecció de soques de *P. eryngii*.

Per aquestes raons, els objectius concrets per a aquest apartat són els següents:

- Realitzar un recull de tota la informació taxonòmica disponible sobre les diferents varietats del complex *eryngii*.
- Crear un banc de cultius de les diferents varietats europees de *P. eryngii*.
- Establir un criteri taxonòmic per a la identificació d'aquestes soques en base a la informació recopilada i les recol·leccions pròpies.
- Traçar un esbós inicial sobre la distribució de la gírgola de panical als Països Catalans.

---

## **2.2.- Desenvolupament d'una tècnica de seguiment de biomassa in vitro per anàlisi d'imatge.**

Sorprenentment, no existeix a coneixement de l'autor una tècnica estandarditzada per a la caracterització *in vitro* de soques de bolets comestibles. Els creixements de *P. eryngii* en diferents medis de cultiu resulten en colònies amb densitats molt diferents, i la mesura clàssica del diàmetre no sempre resulta fiable. L'experiència al nostre laboratori i la recerca prevista sobre els sistemes d'inoculació generen la necessitat de desenvolupar una tècnica rutinària per al futur estudi de les soques aïllades en el nostre banc de cultius.

Els objectius per a aquest apartat són:

- Dissenyar i calibrar una tècnica estandarditzable, rutinària i no destructiva per a la mesura del creixement de fongs comestibles basada en l'anàlisi d'imatge.
- Avaluar el potencial d'aquesta tècnica per a mesurar paràmetres morfològics de les colònies, mitjançant la comparació de soques de les diferents varietats de *P. eryngii*.

---

## **2.3.- Caracterització de la germinació d'*Eryngium campestre***

La reproducció d'*E. campestre* mitjançant llavors sembla la millor alternativa per a la propagació de la planta en un cultiu. La posta a punt d'un procediment de sembra directa seria molt avantatjós, per la facilitat de recol·lecció i conservació del material vegetal i per l'abaratiment de costos (donat que no caldria generar planter en hivernacle). La manca de coneixements previs respecte la germinació de llavors d'*E. campestre* fa necessari realitzar una caracterització preliminar de la seva germinació.

Els objectius concrets per a aquest apartat són:

- Observar les taxes de germinació i viabilitat de llavors d'*E. campestre* en diverses poblacions silvestres.
- Comprovar si existeix pèrdua de viabilitat en les llavors conservades a 4°C a llarg termini.
- Analitzar la influència de la llum, pH i tipus de substrat en la germinació.
- Avaluar la possible presència de fenòmens de dormància en llavors d'*E. campestre*.



- Estudiar l'estat de les llavors al llarg de la senescència de la inflorescència en parcel·les naturals, per tal d'optimitzar-ne el moment de recollida.
- Avaluar altres factors que podrien explicar la baixa taxa d'èxit obtinguda fins ara en les sèmbras directes a camp, i en especial, la incidència d'insectes fitòfags i de la depredació per formigues.

---

## 2.4.- Disseny de sistemes d'inoculació de *P. eryngii* en sòls no estèrils.

Donada la manca d'experiència i informació prèvia pel que fa al desenvolupament de la gírgola de panical en el seu entorn natural, la manca de tècniques d'inoculació específicament pensades per a basidiomicets com *P. eryngii* en entorns no estèrils, i la diversitat de disciplines involucrades, resulta poc factible poder presentar en el present estudi un procediment definitiu i econòmicament viable per al cultiu de la gírgola de card a camp. Per tant, els objectius d'aquest estudi hauran de limitar-se a realitzar un recull multidisciplinar de la informació al nostre abast, presentar una primera aproximació als sistemes d'inoculació més viables per a la inoculació de *P. eryngii* a camp i un estudi preliminar del comportament de *P. eryngii* en el sòl amb i sense la presència de plantes d'*Eryngium campestre*.

Els objectius concrets per aquest apartat són:

- Analitzar les característiques físico-químiques genèriques de sòls on viu *P. eryngii* i *P. nebrodensis*.
- Avaluar la presència de fenòmens d'autoinhibició en la germinació d'espores de *P. eryngii*.
- Avaluar l'efecte del carbó actiu en el creixement i la competitivitat de *P. eryngii* vers *Trichoderma harzianum*, de cara a poder-lo emprar o no com a additiu en inòculs.
- Dissenyar, produir i seleccionar els sistemes d'inoculació més idonis per a l'aplicació a camp de *P. eryngii*, basats els següents procediments:
  - Suspensió líquida de miceli.
  - Fusta colonitzada
  - Llavors colonitzades
  - Encapsulació en hidrogels

- Avaluar l'efecte de dos recobriments acrílics en la deshidratació diverses menes de llavors colonitzades a diferents humitats relatives, l'impacte en la seva resistència a contaminacions i la capacitat de producció i extensió de miceli.
- Avaluar la viabilitat d'aplicar tècniques de pel·letitzat de llavors per a facilitar la sembra de llavors colonitzades.
- Avaluar en els sistemes d'inoculació preseleccionats, la producció de biomassa miceliana i la seva extensió in vitro (agar), en sòls estèrils i en no estèrils.
- Observar el comportament de *P. eryngii* al desenvolupar-se in vitro i en sòl vora plàntules d'*E. campestre*, i el procés d'infecció de les mateixes.
- Demostrar que el sistema de cultiu proposat és factible, obtenint infeccions de *P. eryngii* sobre *E. campestre* adults arrelats en test i la producció de carpòfors mitjançant el sistema d'inoculació escollit.

Finalment, proposem un procediment de treball inicial per al cultiu de *Pleurotus eryngii* sobre *E. campestre* en base als resultats obtinguts, n'analitzem els punts febles, i proposem quines haurien de ser les properes línies de recerca a desenvolupar per tal de fer-lo fiable i eficient.

Per a més claredat i facilitat de consulta per al lector, hem separat els materials i mètodes, resultats i conclusions per a aquests quatre objectius generals en capítols independents. Donada la diversitat de les disciplines tractades, a cada apartat incloem una introducció específica amb un recull bibliogràfic dels antecedents científics i l'estat actual de l'art.

# 3. Material biològic.

## *Estat taxonòmic del complex eryngii. Hostes. Creació d'un banc de cultius.*

---

### 3.1.- Introducció

El complex *eryngii* comprèn un conjunt de tàxons propers a les varietats tipus de *Pleurotus eryngii* (D.C.: Fr.) Quél. i de *Pleurotus nebrodensis* Inzenga, totes elles d'hàbit parasitari sobre rels d'umbel·líferes i excepcionalment, sobre alguna composta. La variabilitat del port i coloració del barret, la recent descripció de troballes sobre nous hostes, i els resultats dels primers estudis de taxonomia molecular, fan que darrerament se n'hagi descrit nombroses varietats.

Avui dia, el complex *eryngii* es considera format per *Pleurotus nebrodensis* Inzenga (Inzenga, G., 1863) i per les varietats *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* (DC. ex Fr.) Quél. (De Candolle, A. P. i Lamarck, 1815), var. *ferulae* (Lanzi) Sacc. (Lanzi, M., 1873), var. *tuoliensis* C.J. Mou (Mou, C., Cao, Y. et al., 1987), var. *elaeoselini* Venturella (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000), var. *thapsiae* Venturella (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2002) i var. *tingitanus* Lewinsohn (Lewinsohn, D., Wasser, S. P. et al., 2002). A tots aquests tàxons cal afegir *Pleurotus fossulatus* (Cooke) Sacc. (Saccardo, P. A., 1891) i *Pleurotus hadamardii* Costantin (Costantin, J., 1923), ambdós de validesa dubtosa.

En la bibliografia recent encara no hi ha un criteri unànim sobre la validesa d'algunes d'aquestes varietats. La posició taxonòmica dels tàxons d'aquest grup sempre ha estat poc clara: des de la publicació de les descripcions originals, a *Pleurotus nebrodensis*, *P. eryngii* i *P. ferulae*, se'ls ha considerat com a varietats d'una mateixa espècie, com a espècies independents, i fins i tot com a sinònims. Abans de l'arribada dels primers estudis de filogènia molecular per a aquest grup, la postura amb més consens considerava *P. eryngii* i *P. nebrodensis* com espècies independents, i als bolets recollits sobre *Ferula spp.* com a una varietat de *P. eryngii* (Candusso, M. i Basso, M. T., 1995a).

La recent designació de l'epítip de *P. nebrodensis* (Venturella, G., 2000), la descripció de la varietat *elaeoselini* (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000) i treballs posteriors basats en filogènia molecular han reobert la controvèrsia. Des d'aleshores ençà, s'ha descrit noves varietats, ha aparegut a la llum pública la descripció de la varietat *tuoliensis* - fins fa poc desapercebuda en la bibliografia occidental en ser publicada en xinès- i s'ha reconsiderat la validesa de *Pleurotus fossulatus* com a membre del complex *eryngii*.

En conjunt, a aquesta manca de consens en les publicacions recents, cal afegir les minses diferències macroscòpiques i microscòpiques entre les diferents varietats, i la dificultat

afegida d'identificar les restes descompostes de la rel de la planta hoste. Tot plegat fa difícil establir un criteri pràctic de treball a l'hora de identificar les recol·leccions de bolets del grup.

Per al disseny i l'estudi de viabilitat d'un cultiu de *Pleurotus eryngii* 'sensu lato' sobre el seus hostes naturals, és necessari poder disposar d'un banc de cultius de soques autòctones de les diferents varietats conegudes. La posta a punt d'un sistema de cultiu requerirà la selecció de soques que en millorin el rendiment, per exemple, per a obtenir més eficiència biològica (EB, relació entre el pes fresc de bolet produït i pes sec de substrat), més agressivitat sobre la planta hoste, un cicle de cultiu més curt, més competitivitat davant de competidors en el sòl, o una millor adaptació a condicions ambientals desfavorables. A més, cal tenir present que no es coneix per a cap de les diferents varietats quin és el grau d'especificitat del patògen vers els diferents hostes, i que la facilitat de cultiu de la planta hoste també serà un punt crític en el procés de cultiu.

Malauradament, manca un banc públic de soques de *P. eryngii* en cultiu, a partir de la qual es puguin realitzar estudis, tant pel que fa a taxonomia, com a selecció de soques i estudi del comportament a camp. Prèviament a aquest treball, no existia cap col·lecció de cultius a Catalunya que preservés basidiomicets d'interès comestible o medicinal. A nivell estatal, només coneixem un banc de cultius que preservi basidiomicets, la CECT (Colección Nacional de Cultivos Tipo, València), que a data de 2013 tant sols disposa d'una soca de *P. eryngii* en catàleg. A nivell internacional, les col·leccions de cultius tipus de referència tampoc tenen una col·lecció de soques representativa de les diferents varietats: la col·lecció de cultius tipus ATTCC, disposa d'una desena de soques de la varietat *eryngii* i dues assignades a *P. fossulatus*, i bona part d'aquests són aïllats monosporals obtinguts a partir de la resta de soques. Quelcom similar trobem a la col·lecció de cultius CBS, amb 8 aïllats de *P. eryngii* i un de sol de la varietat *ferulae*. La majoria d'aquestes referències no estan associades a un exemplar conservat en micoteca.

Pel que fa a la indústria del cultiu de bolets, també hi ha molt poques soques comercials disponibles. El principal proveïdor de inòculs i substrats de bolets de la península disposa d'una única soca de cultiu en catàleg (Fungisem S.L., soca ER-15), i l'empresa de referència a Europa (Mycelia bvba, Ghent, Bèlgica) en disposa dues per a *P. eryngii* (M-2600 i M-2607) i una per a *P. eryngii* var. *ferulae* (M-2650, de classificació taxonòmica dubtosa).

El principal objectiu d'aquest capítol ha estat crear una col·lecció de cultius de soques del complex *eryngii* a partir de recol·leccions de camp. Aquesta col·lecció s'ha realitzat procurant disposar d'una quantitat representativa de soques autòctones, i alhora aconseguir material del major nombre de varietats possibles.

Donada la baixa freqüència d'aquest bolet a Catalunya, també es recullen les cites bibliogràfiques i de camp que ens han arribat referents al Principat, per tal d'aproximar un plànol de distribució de *P. eryngii* en el nostre territori.

Amb l'objectiu d'establir un criteri de identificació de les varietats aïllades, i amb la intenció de recopilar tota la informació disponible en un únic document de consulta, s'acompanya els resultats obtinguts amb un recull exhaustiu de la informació bibliogràfica disponible pel que fa a la taxonomia de cada varietat. S'inclou en tots els casos on ha estat possible les diagnòsi en llatí i una traducció de la descripció original de cadascuna de les varietats. A banda, llistem les mesures microscòpiques i d'altres caràcters descrits en publicacions posteriors. Finalment, oferim una taula sintètica amb els caràcters que segons la bibliografia diferencien unes i altres varietats. Donat que resulta impossible resoldre l'estat taxonòmic del grup sense fer-ne una revisió exhaustiva a nivell morfològic, molecular i de la especificitat hoste vers patògen (fora de l'abast d'aquest treball), reflectim els criteris emprats per a la identificació de les nostres troballes en una clau d'identificació.

---

## **3.2.- Materials i mètodes**

### **Recollida de mostres, aïllament i conservació de soques**

La majoria de les recol·leccions pertanyen a diverses sortides a camp realitzades pel nostre grup de recerca entre els anys 2000 i 2009 a Catalunya i també a les províncies de Sòria, Palència, Còrdoba, Mallorca, Menorca i Eivissa, a més d'algunes aportacions desinteressades d'exemplars per part de col·laboradors. Per a obtenir mostres de *P. nebrodensis* i les varietats *thapsiae* i *elaeoselini*, s'ha realitzat també tres viatges a Sicília a les regions de Madonie, Etna i Ficuzza, d'on provenen les recol·lectes de les descripcions originals d'aquests tres tàxons (Maig de 2007, Setembre de 2007 i Abril de 2008). La identificació de la planta hoste s'ha realitzat en base a la presència de fulles encara adherides a la rel de l'hoste, i en el seu defecte per la morfologia de les restes de la rel subjacent i les plantes presents en l'àrea circumdant. Només especifiquem l'hoste ("s/planta hoste") en aquelles recol·leccions en que no hi ha dubte de la seva identitat, com ocorreria per exemple, per coexistència de dos possibles hostes en un mateix lloc, o per trobar les restes de l'arrel excessivament descompostes. En tots aquests casos s'ha considerat l'hoste com a dubtós.

Donada la impossibilitat de determinar si dos carpòfors propers procedeixen d'un mateix erol, i que fins i tot en aïllaments de carpòfors diferents d'un mateix erol poden existir alteracions genètiques significatives, s'han registrat com a exemplars diferents a aquells carpòfors que disten més de 2 metres entre sí, o que presentin diferències macroscòpiques significatives. Independentment de l'èxit de l'aïllament i de la conservació de la soca en cultiu, en tots els casos s'ha registrat l'exemplar a la nostra base

de dades, amb un codi únic (registre UBCC), i s'ha conservat en micoteca una mostra del carpòfor deshidratada amb aire calent. Els exemplars actualment conservats en cultiu pur estan especificats en la llista d'aïllats amb una "c" minúscula. En alguns casos també s'ha recollit mostra de la rel de l'hoste (deshidratada o fixada en formaldehid acètic), mostra del sòl adjacent a l'arrel (20 cm de profunditat) i/o esporada.

## **Aïllament**

En tots els casos s'ha intentat l'aïllament del miceli dicariòtic a partir de la carn del carpòfor, o en cas de descomposició avançada, a partir de l'esporada o bé de les restes de la rel de l'hoste. L'aïllament s'ha realitzat esquinçant el bolet i transferint de forma asèptica un fragment sa de la carn interior a una càpsula de Petri amb medi Maltosa-2g Tartrat Agar (M2TA), amb tetraciclina i benomil (vegis el capítol 4 per a consideracions sobre la formulació d'aquest medi de cultiu).

La formulació per al medi de cultiu M2TA modificat per a aïllament és la següent: 2g maltosa, 0,62 g tartrat amònic, 0,75 g  $\text{KH}_2\text{MnO}_4$ , 0,20 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,025 g NaCl, 1 ml solució elements traça, 1 ml solució vitamines, 200 mg cloramfenicol, 5 mg benomil (Benlate, Dupont), 15 g agar (grau bacteriològic) i 1 l d'aigua destil·lada. La solució resultant es disposa en ampolles Pyrex de 0,5 litres, i s'esterilitza en autoclau a 115°C durant 20 minuts.

La formulació de la solució d'elements traça (modificat a partir de Eriksson, T., 1965), per a 200 ml és: 1,9g EDTA disòdic, 1,4g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 170mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 63mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 287mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 75 mg KI, 2,5 mg  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  i 0,25 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . L'EDTA i el  $\text{FeSO}_4$  es dissolen prèviament en aigua destil·lada calenta (agitador orbital, 300 rpm, 1h) per a la formació d'EDTA fèrric, i retirant el residu insoluble abans de afegir la resta d'elements. La formulació de la solució de vitamines (Fries, N., 1978) és la següent: 10 mg tiamina (B1), 10 mg piridoxina (B6), 10 mg riboflavina, (B2, E101), 2,5 mg biotina (H, B7, B8), 10 mg nicotinamida (B3), 10 mg àcid *p*-aminobenzoic (PABA), 10 mg àcid pantotènic i 500 ml d'aigua.

El miceli resultant s'ha repicat tants cops com fos necessari en medi d'aïllament fins a obtenir un cultiu pur lliure de contaminacions i àcars.

## **Conservació de soques**

Els cultius purs obtinguts han estat repicats a medi de creixement (F20TA, mateixa formulació, amb 20g/L de fructosa i 2g/L de glucosa per comptes de maltosa, sense cloramfenicol, tetraciclina ni benomil). El miceli s'ha deixat créixer el temps suficient com per donar lloc a una colònia ben desenvolupada, aproximadament de més de 5 cm de diàmetre. Amb l'ajut d'un trepant s'ha extret de 4 a 6 discs d'agar de 7 mm Ø en la superfície de la colònia, i s'han transferit en condicions estèrils a un criovial hermètic

amb 1 ml d'aigua destil·lada estèril. De cada soca aïllada se n'ha preparat i conservat tres vials (triplicat de seguretat), i s'ha incubat el cultiu d'origen en F20TA durant 10 dies a temperatura ambient per comprovar la inexistència de contaminacions en les zones de tall del trepant. En cas d'extreure un dels criovials per a regenerar i/o recuperar la soca aïllada, es repeteix de nou el procés (obtenció de cultiu pur, creixement en F20TA i vialització) substituint el vial antic. Tots els criovials es preserven en nevera a 2-4°C.

La col·lecció de cultius resultant, amb la incorporació d'altres aïllats de bolets d'interès comestible, i/o medicinal o farmacèutic, ha estat registrada amb número de registre WFCC-799 a la World Federation of Culture Collections, sota l'acrònim UBCC (Universitat de Barcelona Culture Collection). Actualment la col·lecció de cultius UBCC compta amb prop de 1600 registres d'entrada, dels quals se'n preserven uns 400 aïllats en cultiu pur.

### **Estudi microscòpic i anàlisi estadístic.**

Les mesures esporals i de les estructures microscòpiques s'han realitzat a partir de material deshidratat de micoteca. Les mesures esporals s'han realitzat submergint breument una mostra del himeni en una gota de roig Congo a l'1%, i mesurant només aquelles espores madures que han estat alliberades a la mostra en primera instància. Per a la observació de les estructures de l'himeni o de la epicutis, s'ha rehidratat prèviament la mostra en KOH 1% durant 2 minuts i s'ha observat al microscopi òptic (Nikon 70187) en tinció amb roig Congo i a 1000 augments.

Les mesures esporals i el càlcul de percentils s'han realitzat mitjançant el programari Piximètre v.5,2 (Henriot, A. i Cheype, J.L., 2010), a partir d'imatges capturades amb una càmera digital Nikon Coolpix 4300. El sistema ha estat calibrat prèviament mitjançant un portaobjectes calibrat.

L'estudi de les diferències entre les mides esporals de les diferents varietats s'ha realitzat a partir de 4 recol·leccions de cada varietat, de les que se'n té total certesa de la identitat de hoste, i procedents - sempre que hagi estat possible - de les localitats originals dels tipus. Els exemplars emprats han estat els registres UBCC-009, 125, 955 i 1342 per a la varietat *eryngii*, UBCC-212, 1385, 1499 i 1525 per a la varietat *ferulae*, UBCC-1389, 1392, 1552 i 1557 per a la varietat *elaeoselini*, UBCC 1539, 1543, 1546 i 1541 per a la varietat *thapsiae* i UBC-1331, 1332, 1334 i 1340 per a *P. nebrodensis* (vegis l'apartat de resultats per a les dades de cada recol·lecció).

Per a avaluar si existeixen diferències significatives entre les mides esporals de les diferents varietats, s'ha emprat el test t-Student per parells amb els mètodes d'adjust Holm i FDR (False Discovery Rate, Benjamini, Y. i Hochberg, Y., 1995), amb un nivell de significació  $\alpha = 0,05$ , a partir de la mitjana de 100 mesures esporals de cada aïllat. L'anàlisi s'ha realitzat amb el paquet estadístic R v.2.9 (R Development Core Team, 2009).

## **Elaboració dels plànols de distribució. Consultes populars.**

Donada la reduïda freqüència del bolet al Principat, hem cregut interessant elaborar un segon plànol de distribució del bolet en el marc dels Països Catalans amb un major nivell de precisió. En aquest cas, el plànol s'ha elaborat a partir de les nostres recol·leccions, un recull de les referències bibliogràfiques disponibles i de observacions de camp.

Aprofitant el fet que *Pleurotus eryngii* és un bolet comestible de fàcil identificació i per tant relativament conegut per la població, s'ha recollit totes les observacions de camp que ens han arribat per part de micòlegs i aficionats, registrant com a mínim, el municipi on s'ha recollit aquest bolet. Per a major divulgació de la consulta, els anys 2000-2001 es varen publicar petites notes de premsa en revistes i diaris locals (Diari de Girona (26-11-2000), Diari Segre, setmanari La Fura (Vilafranca), Diario de Mallorca, Setmanari de l'Alt Empordà, Descobrir Catalunya (2001), i el 2011 s'ha contactat amb les principals societats de micologia catalanes (Ass. d'Amics de la Micologia d'Esplugues, Ass. Micol. Font i Quer, Soc. Catalana Micologia, Soc. Micol. Joaquim Codina, Institut d'Estudis Ilerdencs, i Ass. Micol. de Tarragona). En tots els casos s'ha comprovat la versemblança de la identificació en base a la descripció del bolet, l'hàbitat i el substrat reportats. En cas de manca de material de referència en micoteca, els registres es consideren separatament de la resta de cites, i es tracten com a informació complementària, conferint-les una certesa relativa.

Sempre que no s'ha disposat de les coordenades originals, s'ha cercat el quadrat UTM 10 × 10 més plausible per a la localitat. Donat el marge d'error que això suposa, aquest fet s'assenyala en tots els casos amb un asterisc ("UTM\*") en el llistat de cites.



---

### 3.3.- Resultats

#### ***Pleurotus eryngii* (De Candolle ex Fries) Quélet** (Fries, E., 1821; Quélet, L., 1872)

sub: *Agaricus eryngii* D.C. (De Candolle, A. P. i Lamarck, 1815)  
= *Omphalomyces fuscus* Batt. (Battarra, G. A., 1759)  
= *Pleurotus fuscus* Batt. ex Bres. (Bresadola, G., 1928)  
= *Agaricus cardarella* Batt. ex Fr. (Fries, E., 1821)  
= *Pleurotus cardarella* (Batt. ex Fr.) Quélet (Quélet, L., 1886)  
= *Dendrosarcus eryngii* (DC.) Kuntze, (Kuntze, 1898)  
= *Pleurotus eryngii* var. *caespitoso-terrestris* P. Hennings (Hennings, P., 1901)  
= *Pleurotus caespitoso-terrester* (P. Hennings) Pilát (Pilát, A., 1935)  
= *Pleurotus eryngii* var. *fuscus* (Battarra ex Bres.) Mre. (Maire, 1937<sup>1</sup>).

#### **NOMS POPULARS:**

Català: Gírgola de panical, gírgola de card, gírgola de prat <sup>2</sup>, bolet d'espinalcal.  
Castellà: Seta de cardo, seta de cardo cuco, seta de gatuña (gatuña = *Ononis spinosa*).  
Francès: Pleurote du panicaut.  
Anglès: King oyster mushroom.  
Italià: Cardoncello.  
Xinès: Xing bao gu.

#### **DIAGNOSI:** (Fries, E., 1821)

*Pileo subirregulari convexo-plano e griseo-rufescente, lamellis decurrentibus stipiteque solido obeso albis. Fung. – ex Acarna. Column. Part. I. 29? Fungi eryngii Magn. Bot. 103 Gar. Aix. 196. Mapp. Als. p. 118. Mich. t. 73. f. 2. A. Eryngii. Dec. fr. 6.p.47. (Oreille de chardon. Poullet Ch. 2. p. 133).*

*Species non minus memorabilis; esculenta. Pers. Ch. comest. Stipes saepe etiam excentricus, aequalis, (ex ic. Mich deorsum attenuatus, 1 ½ unc. fere longus). Pileus subirregularis, margine involutus, 3 unc. usque, etiam depressus. In radicibus emortuis eryngii. Oct. (v.ic.)*

#### **DESCRIPCIÓ ORIGINAL:** (Traduït a partir de De Candolle, A. P. i Lamarck, 1815)

Creix sobre les rels mortes del card panical. Cama curta, plena, blanca i cilíndrica, de vegades excèntrica, de vegades central, sense anell. Les làmines són blanques, desiguals, decurrents. Barret arrodonit o irregular, al principi un xic convex, després quasi pla, amb un marge una mica reflex o involut, d'un color vermell gris pàl·lid i brut. Olor subnul.

---

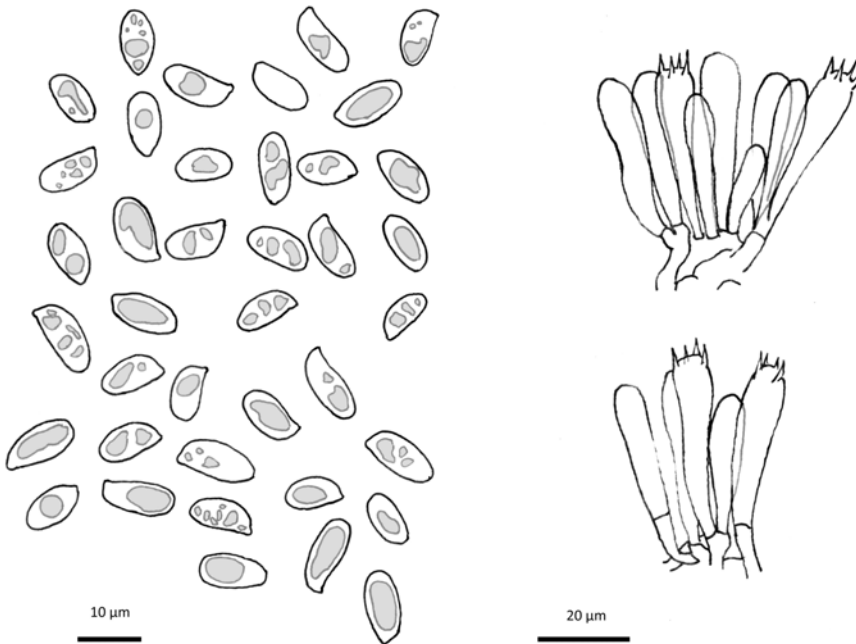
<sup>1</sup> Segons citen Malençon, G. i Bertault, R., 1975. No disposem de la referència bibliogràfica original.

<sup>2</sup> Nom popular recollit per nosaltres a l'Empordà. No en coneixem cap referència escrita anterior.

Comença a fructificar a principis d'octubre; té al igual que d'altres un hàbit entre "les gymnopes" i "les pleuropes". És molt comú i un bon comestible. S'anomena "ragoule", "gingoule" al nord de França, "Bouligoule, brigoule, baligoule", al sud, i "oreille de chardon" a Nivernois.

**DESCRIPCIÓ (EN BASE A LES RECOL·LECCIONS PRÒPIES):**

Píleu de color molt variable, bru crema pàl·lid a bru vermellós o bru-negre fosc, inicialment hemisfèric, més tard aplanat, subirregular, carnós, típicament de 4-10 cm de diàmetre (de vegades més) a la maduresa. Marge involut durant bona part del desenvolupament, més tard reflex, molt rarament festonejat. Cutícula seca, llisa, de color bru crema a bru vermellós, amb microfibril·les fosques i adnades, en proporció molt variable, que li confereixen la variabilitat de color al barret i un aspecte molt lleugerament avellutat quan són abundants. Quan el bolet és moll, la cutícula pot prendre un aspecte higròfan a subvísid i sovint les microfibril·les deixen de ser aparents. Làmines de color blanc a cremós pàl·lid, decurrents, de vegades amb anastomosis evidents a la base. Aresta no diferenciada, concolor. Cama cilíndrica, plena, subcentral a excèntrica, mai lateral, concolora o més pàl·lida que les làmines, unida per la base al coll d'una rel en descomposició, típicament de card panical (*Eryngium campestre*) però també en altres hostes, generalment del grup de les umbel·líferes. En les fructificacions en dunes



**Fig. 1:** Microscòpia de *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* (UBCC-0955).

de platja sobre *E. maritimum*, el peu pot ser llargament radlicant fins a trobar l'arrel de la planta hoste. Carn blanca, compacta, carnosa. Olor i sabor subnul, agradable, fúngic. Esporada blanca. Bon comestible.

Espores hialines, cilíndriques a el·líptiques, llises, gutul·lades (7,7) 9,0-11,8 (13,2) × (4,1) 4,6-5,6 (6,5) µm;  $Q_e = (1,5) 1,8-2,3 (2,6)$ ; Mitjana esporal (Me) = 10,35 ± 0,42 × 5,09 ± 0,20 µm. Basidis tetraesterigmats 30,5-42,4 × 7,4-8,4 µm. Cutícula amb hifes cilíndriques, septades a on de vegades es pot observar una pigmentació en espiral a les hies terminals. Fíbules molt abundants.

**ALTRES MIDES I INFORMACIÓ BIBLIOGRÀFICA ADDICIONALS:**

- Espores: 7-9 × 3,5 µm (Saccardo, P. A., 1887)  
8-11 × 6 µm; hialines, 1-gutul·lades (Hennings, P., 1901)  
9,6-12 × 4-4,8 µm (var. *fuscus*, Malençon, G. i Bertault, R., 1975).  
10-14 × 5-5,5 µm (Pilát, A., 1935)  
8-10 × 4,5-5,5 µm (*P. caespitoso terrester*, Pilát, A., 1935)  
9,6-11,6 × 3,7-5 µm, (var. *caespitoso-terrester*, Malençon, G. i Bertault, R., 1975).  
7-9 × 3,5 µm (Battiato, A., Napoli, M. et al., 1987).  
10-13 × 4,5-5,5 µm (Candusso, M. i Basso, M. T., 1995b).  
(8,8) 10,4-12 (13) × (4,8) 5,2-5,6 (6,0) µm (Krisai-Greilhuber, I. i Voglmayr, H., 1995).  
10-12,5 × 4,5-5,5 µm,  $Q=1,9-2,7$ ,  $Q=2,2-2,4$  (Bas, C. i Boeckout, T., 1998)  
9,1-13,5 × 4,8-6,7 µm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)
- Basidis: 50 × 8 µm (Saccardo, P. A., 1887)  
45-50 × 6-8 µm (Pilát, A., 1935)  
40-51 × 8,5-9,5 µm (Candusso, M. i Basso, M. T., 1995b).  
38-44 × 6,4-8,4 µm (Krisai-Greilhuber, I. i Voglmayr, H., 1995).  
40-50 × 7-8 µm (Bas, C. i Boeckout, T., 1998)  
34-51 × 7-9 µm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)
- Queilocistidis: Rars, de 3,2-5,6 µm d'amplada (Krisai-Greilhuber, I. i Voglmayr, H., 1995).
- Epicutis: Hifes cilíndriques septades, 34-68 × 4,2-6,8 µm, amb terminació arrodonida a obtusa (34-83 × 4,2-7 µm) i subclaviforme. Fíbules nombroses. Pigment de membrana en espiral a les hifes terminals, molt característic (Candusso, M. i Basso, M. T., 1995b).
- Ploidia (n): 12 o 14 (Slézec, A.-M., 1984)

## HOSTES:

Hoste principal: *Eryngium campestre* L.

Altres hostes descrits:

- *Eryngium maritimum* L., (Costantin, J., 1928; Hilber, O., 1982)
- *Eryngium multifidum* (Offner, J. i Heim, R., 1927)
- *Eryngium ilicifolium*, (Oria de Rueda, J. A., Martínez de Azagra, A. et al., 1991)
- *Eryngium bourgatii* (Oria de Rueda, J. A., Martínez de Azagra, A. et al., 1991)
- *Carlina gummifera* Less (*Asteraceae*; Comes, O., 1878; Hilber, O., 1982);
- *Carlina corymbosa* (*Asteraceae*; Bonafè, F., 1979)
- *Heracleum* spp. (Cetto, B., 1979).
- *Peucedanum cervaria* (Klán, J., 1990).
- *Atractylis cancellata* (*Asteraceae*; Comes, O., 1878).

## ICONOGRAFIA SELECTA:

Macroscòpia: Menal, R., 1983. Candusso, M. i Basso, M. T., 1995b; Llimona, X. i Aguasca, M., 1991. Cortés Moragrega, C. i Montón Martínez, J., 2005.

Microscòpia: Candusso, M. i Basso, M. T., 1995a; Krisai-Greilhuber, I. i Voglmayr, H., 1995; Palazón Lozano, F., 2001.

## LLISTAT DE CITES BIBLIOGRÀFIQUES (PAÏSOS CATALANS):

CATALUNYA:

*Barcelona:*

- Capolat; UTM\* 31T39465, 01/10/1982, Erm amb panicals, s/*Eryngium campestre*, leg.: Tabarés, M. (Menal, R., 1983).
- El Papiol; UTM\* 31T41458, s/*Eryngium campestre* (Codina i Viñas, J. i Font i Quer, P., 1930).

*Girona:*

- Amer; Sant Climent d'Amer, UTM\* 31T46465, s/ *Eryngium campestre* (Codina i Viñas, J. i Font i Quer, P., 1930).
- La Cellera de Ter; La Sellera, UTM\* 31T46464, s/ *Eryngium campestre* (Codina, J., 1924).
- Sant Gregori; Contestins, UTM\* 31T47464, s/ *Eryngium campestre* (Codina i Viñas, J. i Font i Quer, P., 1930).
- Serra de Daró; Sant Iscle, UTM\* 31T50465, /12/1986, s/ *Eryngium campestre* (Vidal, J. M. et al, 1999).

#### Lleida:

- Alfés; Timoneda d'Alfés, Aeròdrom, UTM 31T30460, 240 m, 25/10/1995, timoneda i pineda clara, *s/Eryngium campestre*, leg.: X. Llimona, J. Vila, P. Hoyo (Llimona, X., Vila, J. et al., 1995).
- Alfés; Timoneda d'Alfés, Aeròdrom, UTM 31T30460, 240 m, /10/2002, *s/Eryngium campestre*, leg.: Joan Montón (Cortés Moragrega, C. i Montón Martínez, J., 2005).
- Alfés; Timoneda d'Alfés, UTM 31T30460, 240 m, *s/Eryngium campestre*, herb.: BCC (Llimona, X. i Blanco, M. J., 2000).
- Espot (?); Parc Nacional d'Aigüestortes i Sant Maurici, UTM\* 31T33471 (Vila, J., Rocabruna, A. et al., 2000).

#### ILLES BALEARS:

##### Eivissa:

- Sant Joan de Labritja; Arenal Gros de Portinatx, UTM 31S3714330, 0-10 m, 09/01/2007, en dunes davanteres, *s/Eryngium maritimum*, Herb.: JLS 2319, (Siquier, J. L., Salom, J. C. et al., 2011).

##### Mallorca:

- Campos; Ses Covetes, Dunes d'Es Trenc, UTM 31S497 4355, 1 m, 07/11/2009, dunes , *s/Eryngium maritimum*, herb.: mar-47, (Pancorbo, F. i Ribes, M. A., 2010).
- Campos; Es Trenc, UTM 31S4994354, 23/11/1990, *s/Eryngium maritimum*, (Pérez de Gregorio, M. À. i Vidal, J. M., 1994).
- Campos; La Rapita, UTM\* 31S49435, 05/12/1987, *s/Eryngium maritimum*, (Schilling, A., 1987).
- Campos; Ses Covetes, UTM\* 31S4974355 02/04/1987, *s/Eryngium maritimum*, (Schilling, A., 1987).
- Escorca; Cúber, UTM 31S48440, 600-700 m, /11/1984, erms i pastures, *s/Eryngium campestre*, leg.: C. Constantino, herb.: CC 39-84 (Aguasca, M., Llistosella, J. et al., 1992).
- Escorca; Pla d' Almallutx, UTM 31S48440, 500-600 m, 01/11/1985, erms i pastures, *s/Eryngium campestre*, leg.: C. Constantino, herb.: CC13-85 (Aguasca, M., Llistosella, J. et al., 1992).
- Santa Margalida; UTM\* 31S50439 , (Constantino, C. i Siquier, J. L., 1985).
- Santa Margalida; Serra Nord i Santa Margalida, UTM\* 31S50439, *s/Eryngium campestre* (Constantino, C. i Siquier, J. L., 1996).
- Santanyí; Parc de Mondragó, platja de s'Amarador, UTM 31S5164355, 0-10 m, 26/01/1993, a la platja, *s/Eryngium maritimum*, herb.: JCS 661B (Siquier, J. L. i Salom, J. C., 2003).

##### Menorca:

- Alaior; Torre Vella, UTM 31S5944416, 05/11/1988, *s/Eryngium campestre* (Mateo-Alvarez, B., 2004).
- Alaior; Alcotx, UTM 31S6004424, 110 m, 18/11/1988, (Llistosella, J. i Aguasca, M., 1990).
- Ciutadella de Menorca; UTM\* 31S57442 (Cardona, M. A., 1979).
- Ciutadella de Menorca; els Aljups, Son Pebre, UTM 31T5784430, 80-100 m, 17/11/1985, (Llistosella, J. i Aguasca, M., 1990).
- Maó, Sa Cudia Vella, UTM\* 31S60441 , "asociado a diversas especies de cardos" (Escandell, T. i Escandell, J., 1999).
- Sant Lluís; Binisaida de sa Torre, UTM 31S6114412, 40 m, 18/12/1988, (Llistosella, J. i Aguasca, M., 1990).
- Sant

Lluís; centre urbà de Sant Lluís, UTM 31S6074412, 50 m, 25/11/1983, (Llistosella, J. i Aguasca, M., 1990).

#### PAIS VALENCIÀ:

##### *Alacant:*

- Alcoi; Cava Coloma, UTM 30S7124281, 1300 m, 02/10/2001, camp erm calcari amb *E. campestre*, s/ *Eryngium campestre*, leg. i det.: A. Conca et al., herb.: ACM-201052, (Conca, A., García, F. et al., 2003).

##### *Castelló:*

- Pina de Montalgrao; Ballesteros, UTM 30T6984434, 1000 m, 25/10/1996, s/*Eryngium campestre*, leg. i det.: F. Tejedor, herb.: PT-0139 (Tejedor, F., 2009).
- Vilamalur; UTM 30S721144251, 770 m, s/*Eryngium campestre*, leg. i det.: A. Burguete, herb.: AB1 (Burguete, A., 1995).

##### *València:*

- Bocairent; Serra de Mariola, UTM 30S7124290, 920 m, 25/06/1992, prat calcari amb *Eryngium campestre*, s/*Eryngium campestre*, leg. i det.: R. Mahiques, herb.: MES-0000 (Mahiques, R., 1995).
- Bocairent; Pla d'Aparici, UTM 30S7124291, 920 m, 06/10/1995, s/*Eryngium campestre*, Leg: A. Conca i F.García, det: A. Conca, herb.: ACM-95032 (Conca, A., García, F. et al., 2004).
- Bocairent; Sta. Bàrbara, UTM 30S7094291, 850 m, 10/12/2002, s/*Eryngium campestre*, Leg: A. Conca i F.García, det: A. Conca, herb.: ACM-202095 (Conca, A., García, F. et al., 2004).
- Bocairent; Pla de Nones, UTM 30S7074290, 850 m, 23/11/2003, s/*Eryngium campestre*, Leg: A. Conca i F.García, det: F. García, herb.: FGA-032461 (Conca, A., García, F. et al., 2004).

#### LLISTAT DE RECOL·LECCIONS I AÏLLATS EN BANC DE CULTIUS<sup>3</sup>:

##### - ESPANYA -

#### ANDALUSIA:

##### *Córdoba*

- Carcabuey; Parque Natural de las Sierras Subbéticas, Paraje de Navazuelo, 1300 m, UTM 30S3814149, s/*Eryngium campestre*, 18/11/2002, leg.: M. Morcillo, Herb.: UBCC-948. Íbidem, 1200-1300 m, s/ *Eryngium campestre*, /12/2002, leg.: Personal del Projecte Cussta, Herb. i C.cult.: UBCC-0999 a UBCC-1020. Íbidem, Paraje de Navazuelo, camí de la finca

---

<sup>3</sup> Abreviatures emprades per als recol·lectors: EG: Enric Gracia; GRE: Guy-Roger Embumba; JML: Josep M. Lanau; LG: Laura Ganzer; TM: Teresa Marí, XN: Xavier Nadal; YG: Yolanda Guarc.

de Navahermosa., 1200 m, marge de camí vora un camp d'oliveres, s/ *Eryngium campestre*, 04/11/2003, leg.: EG, JML, YGM i XN, Herb.: UBCC-1134. Íbidem, finca de Navahermosa, 1200 m, s/ *Eryngium campestre*, 04/11/2003, leg.: EG, JML, YGM i XN, Herb.: UBCC-1141. Íbidem, vora un Cortijo, prat i devesa d'alzines, amb *Eryngium* i *Alianthus altissima*, s/ *Eryngium campestre*, 04/11/2003, leg.: EG, JML, YGM i XN, Herb. i C.cult.: UBCC-1144c. Íbidem, finca de Navahermosa, 1200 m, prat de muntanya amb alzines, s/ *Eryngium campestre*, 04/11/2003, leg.: EG, JML, YGM i XN, Herb.: UBCC-1145, 1152 i 1153.

### Jaén

- Segura de la Sierra; 1230 m, UTM 30S5304238, 01/11/2003, Herb. i C.cult.: UBCC-1112c.

### Sevilla

- Sevilla; rodalies de Sevilla, sobre cf. *Carlina corymbosa*, UTM N/D, //2003, Herb. i C.cult.: UBCC-1196. Íbidem, sobre umbel·lífera desconeguda, no *E.campestre*, //2003, Herb.: UBCC-1210.

## CASTELLA I LLEÓ:

### Palencia

- Astudillo; Carretera de Palencia a Astudillo, Finca Monte del Rey, UTM 30T3844663, s/ *Eryngium campestre*, 31/11/2003, leg.: XN i EG, Herb. i C.cult.: UBCC-1198c. Ídem, zona tancada de un conreu en desús, actualment pasturat per vacum, s/ *Eryngium campestre*, 25/11/2004, leg.: JML i X. Comerma, Herb. i C.cult.: UBCC-1229c.
- Cordovilla la Real; Cerrato, carretera de Cordovilla la Real a Quintana del Puente, Dehesa "Peñoñori", 780 m, UTM 30T3974659, Conreu abandonat d'avellaners, amb *Eryngium campestre* i *Thapsia villosa*, s/ *Eryngium campestre*, 26/11/2004, leg.: JML i X. Comerma, Herb.: UBCC-1230 i UBCC-1231.
- Grijota; Carretera d'Husillos, carretera Palència-Guardo, a 8 Km de Palència, Cañada Real vora la subestació elèctrica de Grijota, 722 m, UTM 30T3714659, Camí molt ample amb aspecte d'erm, per on circulen o circulaven ramats de bestiar oví transhumant, s/ *Eryngium campestre*, 05/12/2002, leg.: EG i JML, Herb. i C.cult.: UBCC-974c i UBCC-976.
- Soto de Cerrato; Soto de Cerrato, 720 m, UTM 30T3804646, Erm amb farigola, pasturat per bestiar oví, s/ *Eryngium campestre*, 05/12/2002, leg.: EG i JML, Herb. i C.cult.: UBCC-978c, 979 i 980c.
- Tariego; Tariego, Mesón del Cerrato, 750 m, UTM 30T3774640, Erm pasturat per bestiar oví, amb farigola i *Ononis spinosa*, s/ *Eryngium campestre*, 05/12/2002, leg.: EG i JML, Herb. i C.cult.: UBCC-981c, 982, 983 i 984.

### Soria

- Arévalo de la Sierra; Camí d'El Acebal de Garagüeta, prop de Gallinero, 1400 m, UTM 30T5474646, Extensió d'erms pasturats per oví, amb *Eryngium campestre*, s/ *Eryngium campestre*, 31/10/2000, leg.: EG, JML i GRE, Herb. i C.cult.: UBCC-0020, 0021, 0022c, 0023,

0024-0028. • El Royo; carretera de El Royo a Vinuesa, 1000 m, UTM 30T5234636, prat de sòl profund, molt femat, amb *Eryngium campestre*, s/ *Eryngium campestre*, 01/11/2000, leg.: EG, JML i GRE, Herb.: UBCC-0039 a 0044. • Vinuesa; Vinuesa, 1100 m, UTM 31T5194640, bosc de *Pinus sylvestris* i *Quercus pyrenaica*, amb sotabosc pasturat, s/ *Eryngium campestre*, 04/11/2000, leg.: EG, JML i GRE, Herb.: UBCC-0058. • Burgo de Osma-Ciudad de Osma; Carretera N-122, entre Burgo de Osma i la cruïlla cap a Valdeñarros, 895 m, UTM 30T4984604, col·lecció d'exemplars de mida molt gran en un descampat on s'havia apilat palla., s/ *Eryngium campestre*, 05/12/2002, leg.: EG i JML, Herb. i C.cult.: UBCC-0957c, 0958c, 0959c, 0960, i 0961. • Cabrejas del Pinar, Muriel de la Fuente, 1020 m, UTM 30T5114619, Prat pasturat per cavalls, s/ *Eryngium campestre*, 04/11/2000, leg.: EG, JML i GRE, Herb.: UBCC-0152 a 0154. • Calatañazor; rodalies de Calatañazor, 1070 m, UTM 30T5154616, Erms, s/ *Eryngium campestre*, 05/11/2000, leg.: EG, JML i GRE, Herb.: UBCC-0173 i 0174. • Pozalmuro; Puerto del Madero, Sierra del Madero, 1100 m, 30T5744628, Brolla de farigola amb *Cistus cf. laurifolius*, entre alzines, s/ *Eryngium campestre*, 04/12/2002, leg.: EG i JML, Herb. i C.cult.: UBCC-954c. • Ucero; Castillo de Ucero, 970 m, UTM 30T4954618, s/ *Eryngium campestre*, 03/11/2000, leg.: EG, JML i GRE, Herb. i C.cult.: UBCC-0124, 0125c (Me = 10,88 × 5,27µm , Qe = 2,07), 0129 i 0130. • Valdeavellano de Tera; Valdeavellano de Tera, rodalies, 1120 m, UTM 30T5364643, prat pasturat amb *Eryngium campestre*, s/ *Eryngium campestre*, 02/11/2000, leg.: EG, JML i GRE, Herb.: UBCC-0098, 0099 i 0100. • Valdeavellano de Tera; la Loma, 1120 m, UTM 30T5354645, prat pasturat, s/ *Eryngium campestre*, 03/11/2000, leg.: EG i JML, Herb. i C.cult.: UBCC-0109c, UBCC-0110.

### Valladolid

• Castronuevo de Esgueva; El Páramo, reserva militar, extensa zona militar tancada, on es fan maniobres amb carros de combat, 850 m, UTM 30T3674617, Erm amb molt *Eryngium campestre*, s/ *Eryngium campestre*, 06/12/2002, leg.: EG i JML, Herb. i C.cult.: UBCC-0985c, 0986c, 0987, 0988, 0989c, 0990c, 0991, 0992c, 0993, 0994c, 0995c, 0996, 0997 i 0998.

### CASTELLA LA MANXA

#### Cuenca

• Villar del Humo; Villar del Humo, 990 m, UTM\* 30S62441, erm amb panical, s/ *Eryngium campestre*, 30/10/2002, leg.: P. Hoyo, Herb.: UBCC-946.

### CATALUNYA

#### Barcelona

• Subirats; L'Avern, UTM\* 31T40458, Fenassar amb *Aphyllantes*, s/ *Eryngium campestre*, 31/10/2003, leg.: L. Chamorro, Herb. i C.cult.: UBCC-1157.



## Lleida

• Alfés; Timoneda d'Alfés, rodalies del "Reial Aeroclub de Lleida", 235 m, UTM 31T3044602, Timoneda amb *Eryngium campestre*, s/ *Eryngium campestre*, 30/10/2000, leg.: EG i JML, Herb.: UBCC-0006 a 0008, UBCC-0009 (Me =  $9,86 \times 4,86 \mu\text{m}$ , Qe = 2,03), i UBCC-0010 a 0013. Ídem, 16/11/2000, leg.: EG, JML i GRE, Herb.: UBCC-0184, 0186, 0187 i 0193. Ídem, 18/11/2003, leg.: X. Llimona, Herb.: UBCC-1174. Ídem, /12/2006, leg.: EG i JML, Herb. i C.cult.: UBCC-1325c. • Alfés; Timoneda d'Alfés, erms vora el marge del canal d'Urgell, 200 m, UTM 31T3044602, s/ *Eryngium campestre*, 30/10/2000, leg.: EG i JML, Herb.: UBCC-0014, i 0015. Ídem, 16/11/2000, leg.: EG, Herb.: 0188, 0189, 0190 i 0194. • Alfés; Sortida de l'autopista, abans d'Alfés, 200 m, UTM 31T3024603, s/ *Eryngium campestre*, 16/11/2000, Herb.: UBCC-0192. • Conca de Dalt; Aramunt, 520 m, en un camp de futbol, UTM 31T3344673, s/*Eryngium sp.*, 04/10/2008, Herb. i C.cult.: UBCC-1458. • Corbins; Corbins, marges del Segre, 210 m, UTM 31T3074615, Pollancreda amb salzes, s/ *Eryngium campestre*, 05/11/2000, leg.: EG, JML i GRE, Herb.: UBCC-0175 i 0176. • Naut Aran; Cabana d'en Botet, Vall d'Aiguamòg, 1600 m, UTM 31T3294725, 22/10/2004, leg.: J. Geli, Herb.: UBCC-1225.

## Tarragona

• Alió; erms entre els terme d'Alió i Santa Maria, coneguts com "l'Aeròdrom", 230 m, UTM 31T3584574, Brolla de farigola, s/ *Eryngium campestre*, 03/12/2002, leg.: EG i JML, Herb. i C.cult.: UBCC-955c (Me =  $10,37 \times 5,25 \mu\text{m}$ , Qe = 1,98), UBCC-956. • Amposta; Pla de la Galla, Serra de Montsià, Montsià, UTM 31T2934502, s/ *Eryngium campestre*, 15/10/2006, leg.: P. Luque, Herb. i C.cult.: UBCC-1314.

## ILLES BALEARS

### Mallorca

• Campos; Es Trenc, 0 m, UTM 31S4984355, dunes arran de mar, s/*Eryngium maritimum*, 01/12/2001, leg.: EG i JML, Herb.: UBCC-0736 i 0737. • Escorca; Son Torrella, 800 m, UTM 31S4814404, prat adobat amb alzinar marginal, s/ *Eryngium campestre*, 05/12/2001, leg.: C. Constantino, EG i JML, Herb.: UBCC-0815, 0817, 0819, 0820. Ídem, 06/12/2001, leg.: EG, JML i G. Mir, Herb.: UBCC-0859. • Escorca; Bassa de Cúber, 750 m, UTM 31S4824404, Erm amb *Ampelodesma* i plantació de pi blanc i alzina, amb *Eryngium campestre* i cf. *Carlina*, s/ *Eryngium campestre*, 06/12/2001, leg.: EG, JML i G. Mir, Herb.: UBCC-0860, a 0866. • Santa Margalida; Dunes de Son Real, UTM 31S5144400, dunes vora mar amb *Eryngium maritimum*, s/*Eryngium maritimum*, 07/12/2001, leg.: C. Constantino, EG, JML i G. Mir, Herb.: UBCC-0871, 0873 a 0876 i 0883.

### Menorca

• Mercadal (Es); Tirant Vell, 71 m, UTM 31S5944432, Lloc obert amb plantes anuals: *Inula*

*viscosa*, s/ *Eryngium campestre*, *Carlina corymbosa* var *corymbosa*, envoltat de *P. halepensis* i *J. Phoenicera*. Sòl molt arenós., s/ *Eryngium campestre*, //2001, leg.: Samuel Pons, Herb.: UBCC-0198 a 0202.

## PAÍS VALENCIÀ

### Castelló

- Pina de Montalgrao; Pina de Montalgrao, conreus en desús, UTM 30T6984434, 700 m, s/ *Eryngium campestre*, 28/04/2004, leg.: F. Tejedor, EG i JML, Herb. i C.cult.: UBCC-1222c. Ídem, 03/05/2007, leg.: JML i EG, Herb. i C.cult.: UBCC-1327c. Íbidem; parcel·la de conreu en desús., s/ *Eryngium campestre*, 27/11/2006, leg.: JML, Herb. i C.cult.: UBCC-1322c i 1323c.

## - ITÀLIA -

### SICÍLIA

- Palermo; Parco delle Madonie, vora el camí baixant cap al Bevaio di Faggio, 1300 m, UTM 33S4124191, s/ *Eryngium campestre*., 24/05/2007, leg.: EG, JML i LG, Herb. i C.cult.: UBCC-1342 (Me = 10,28 × 4,98 µm, Qe = 2,07).

## - AÏLLATS NO GEOREFERENCIABLES -

- Sense localitat; s/ *Eryngium campestre*, /11/2003, leg.: J.D. Reyes, Herb. i C.cult.: UBCC-1171 i 1172c. • Sense localitat; s/ *Eryngium campestre*, 19/12/2003, Herb. i C.cult.: UBCC-1215c, 1216 i 1217c. • Soca comercial cultivada sobre palla pasteuritzada (Xop – Conserves de Ponent, S.L., Juneda, Lleida.), 14/01/2008, Herb. i C.cult.: UBCC-1428. • Soca comercial cultivada, probablement d'origen coreà (comprat al mercat de la Boqueria, Barcelona), 10/03/2005 i 19/10/2007, Herb. i C.cult.: UBCC-1255 i UBCC-1343c.

## LLISTAT DE CITES ORALS (PRINCIPAT, BALEARS I FRANJA DE PONENT):

### CATALUNYA

#### Barcelona

- Sabadell; Aeròdrom de Sabadell, UTM\* 31T4254596, (Josep Girbal, SCM). • La Llacuna; UTM\* 31T37459, s/E. *campestre*, (Santiago Salvador). Íbidem, Conreus de cereal abandonat, s/E. *campestre*, (Sergi Estanyol, AMFQ). • Collserola; UTM\* 31T42458, s/E. *campestre*, (Nicolás Latorre). • Calaf; UTM\* 31T37 462, s/E. *campestre*, (Victor Samperi Gracia). • Capolat; Carretera de Berga a Sant Llorenç de Morunys, prop del túnel a la dreta, UTM\* 31T3974660, s/E. *campestre*, (August Rocabruna, SCM). • Manresa; Rodalies de Manresa (localitat actualment urbanitzada), UTM?: 31T40 462, s/E. *campestre*, (Isidre Casals, Parc Científic, UB). • Mediona; Cases Noves de Can Pardo, entre els municipis de

Mediona i La Llacuna, UTM\* 31T37459, 550 m, s/E. *campestre*, (Lluís Vich Gallego). • Sant Martí de Tous; UTM\* 31T37460, s/E. *campestre*, (Joan Hervàs i Martínez). • Veciana; Entre Santa Maria del Camí i la Panadella, en un talús damunt la N-II, UTM\* 31TCG71, s/E. *campestre*, (Josep Maria Serrano).

### Girona

• Colera; Cap de Ras, UTM\* 31T51469, s/E. *campestre*, (Enric Ribera Peña). • Colera; Pla del Castell, UTM\* 31T51469, s/E. *campestre*, (Enric Ribera Peña). • Colera; Quatre camins, UTM\* 31T51469, s/E. *campestre*, (Enric Ribera Peña). • Forallac; Fitor, Santa Coloma de Fitor - Riera del Mas Plaja, UTM 31T5074639, 250 m, 23/11/2002, s/E. *campestre*, leg.: J. Carbó, J.M. Vidal i M.À. Pérez-De-Gregorio, (AMJC); 20/11/2010, s/E. *campestre*, leg.: S. Baone, C. Bodeux, P. Giambona, J.M. Godart, M. Lecomte, C. Mertens, C. Miñarro, M.À. Pérez-De-Gregorio, P. Pirot, C. Roqué, À. Torrent i G. Vreys, (AMJC). • La Jonquera; Entre L'horta d'en Geli i la urbanització del Carme, UTM\* 31T48469: , s/E. *campestre*, (Enric Ribera Peña). • Llers; Entre Hostalets de Llers i Llers, Banda esquerra de la carretera, UTM\* 31T49468, entre mig d'oliveres que s'han deixat de conrear, s/E. *campestre*, (Raimon Fernández i Armijo). • Maçanet de Cabrenys; Marge de carretera, UTM\* 31T47469 s/E. *campestre* (Antoni Montgay). • Malla (municipi dubtós); Entre Vic i Tona, als anys 40. N'hi havia bastant poca, UTM\* 31T43463, s/E. *campestre*, (Xevi Comerma). • Molló; Espinavell, Clot de la Seca, UTM, 31T4504692, 1240 m, 30/06/2007, s/E. *campestre*, leg.: J. Carbó, J.M<sup>a</sup>. Ibarbia i M.À. Pérez-De-Gregorio, (AMJC). • Palau-sator; Pantaleu, Mas Ventós, UTM 31T5094647, 40 m, 05/11/2005 i 08/12/2008, s/E. *campestre*, leg.: J. Carbó, (AMJC); 03/01/2009, s/E. *campestre*, leg.: S. Baone, M.À. Pérez-De-Gregorio i J. Carbó, (AMJC); *ibidem*, 29/11/2009, en clarianes, s/E. *campestre*, leg.: J. Carbó, herb.; JC-20091129.1-Ex-2196, (Joaquim Carbó, AMJC); *ibidem*, 09/10/2010, Pràctica, en clarianes herboses, s/E. *campestre*, leg.: J. Carbó, herb.; JC-20101009.2 Ex-2277, (Joaquim Carbó, AMJC); *ibidem*, 01/11/2011, s/E. *campestre*, leg.: J. Carbó i M.À. Pérez-De-Gregorio, (AMJC); *ibidem*, 03/12/2011, s/E. *campestre*, leg.: J. Carbó, (Joaquim Carbó, AMJC). • Pals; UTM\* 31T51464, 21/10/2001, Arenícola, a la sorra de les pinedes, s/E. *campestre*, leg.: J. Carbó, herb.; JC-20011021.1 Ex-1373, (Joaquim Carbó, AMJC). • Prats de Lluçanès; Carretera de Vic a Gironella, UTM\* 31T41465 , s/E. *campestre*, (August Rocabruna, SCM). • Sant Joan de les Fonts; Coll de Viviers, UTM\* 31T46467, 25/10/2007, prat envoltat d'alzinar, s/E. *campestre*, (Ernest Gatell, Associació Micològica de Tarragona). *Íbidem*, UTM 31TDG6074, 530, m, 24/10/2009, s/E. *campestre*, leg.: À. Torrent i J. Carbó, (AMJC). • Serra de Daró; UTM\* 31T50465, /10/2001, "encara n'he trobat sols una vintena -de gírgoles de prat- a uns 500 m del poble, com tota la vida", s/E. *campestre*, (Francesc Peracaula Rovira, "Xicu Flequer"). • Torroella de Montgrí; La Fonollera, El Pi de la Fonollera, UTM 31T5154651, 10 m, 27/12/2005, s/E. *campestre*, leg.: J. Carbó, (AMJC). • Torroella de Montgrí; L'Abolleria, Urbanització Sant Josep o dels francesos, UTM 31T5084658, 40 m, 29/11/2008, s/E. *campestre*, leg.: J. Carbó, (AMJC). • Torroella de Montgrí, Sobrestany, Olivets de Sobrestany, UTM 31T5104658, 40 m, 04/12/2004, s/E. *campestre*, leg.: G. Carbó i J. Carbó, (AMJC). • Torroella de Montgrí, Sobrestany, Torre Ferrana, UTM 31T5114659, 10 m, 07/11/1998, s/E. *campestre*, leg.: Cursillistes del Museu

del Montgrí i Baix Ter, (AMJC); *ibidem*, 17/11/2002 i 09/10/2010, s/E. *campestre*, leg.: J. Carbó, (AMJC). • Torroella de Montgrí; Vallpetita, Camí de Santa Caterina, UTM 31T5094657, 70 m, 05/12/2004, s/E. *campestre*, leg.: G. Carbó i J. Carbó, AMJC.

#### Lleida:

• Aitona; UTM\* 31T28459, s/E. *campestre*, (José M. Millá). • Albesa; UTM\* 31T30462, s/E. *campestre*, (Josep Maria Serrano). • Alfés; Aeròdrom d'Alfés, UTM\* 31T30460, s/E. *campestre*, (Joan Montón, IEI). • Almatret; UTM\* 31T28457, s/E. *campestre*, (Ezequiel Uson i Guardiola). • Balaguer; UTM\* 31T31462, s/E. *campestre*, (Josep Maria Serrano). • Barruera; UTM\* 31T31470, s/E. *campestre*, herb: SCM-3609 (August Rocabruna, SCM). • Granja d'escarp; UTM\* 31T27458, s/E. *campestre*, Ezequiel Uson i Guardiola. • Llobera; UTM\* 31T37464, s/E. *campestre*, herb: SCM-1818, (August Rocabruna, SCM). • Maials; UTM\* 31T29458, s/E. *campestre*, (José M. Millá; Ezequiel Uson i Guardiola). • Menàrguens; UTM\* 31T31462, s/E. *campestre*, (Josep Maria Serrano). • Pont de Suert; A 500m de Pont de Suert, Alta Ribagorça, orientació SW, UTM\* 31T31469, 900 m, en pastures de sòl bastant pobre desenvolupat damunt de guixos del Keuper, s/E. *campestre*, (Josep Maria Serrano). • Pont de Suert; Sarroqueta, UTM\* 31T31469, s/E. *campestre*, (Esperança Florit, SCM). • Sarroca de Lleida; UTM\*, 31T29459, s/E. *campestre*, (José M. Millá). • Serós; UTM\* 31T28459, s/E. *campestre*, (Ezequiel Uson i Guardiola). • Torres de Segre; Prop del Pantà d'Utxesa, UTM\* 31T29459, s/E. *campestre*, (José M. Millá). • Tremp; Llastarri, sobre Sopeira, vora l'embassament d'Escales, UTM\* 31T31468, s/E. *campestre*, (Esperança Florit, SCM). • Tremp; Vilamitjana, vora el canal de Gavet de la Conca, UTM\* 31T32466, s/E. *campestre*, (Joan Montón, IEI).

#### Tarragona:

• Alió, erm que hi ha entre Alió i el Pla de Sta. Maria, "el camp d'aviació", UTM\* 31T35457, s/E. *campestre*, (Paco Ramos, SCM). • Batea; UTM\* 31T27455, (Joan Riba, SCM). • Constantí; UTM\* 31T35455, 02/12/2011, s/E. *campestre*, (Joan Riba, SCM). • Gandesa; Partició entre els termes de Gandesa i Batea, Terra Alta, UTM\* 31T27454, "erms amb *Eryngium campestre* on hi havia hagut conreus de vinya i ametllers, de sols pobres, poc profunds, de textura franca o franco-llimosa i amb pHs lleugerament bàsics", s/E. *campestre*, (Anton Monner). • La Sènia; Prats del Caro, en direcció a Fredes, UTM\* 31T26450, s/E. *campestre*, (Paco Ramos, SCM). • Prades, UTM\* 31T33457, s/E. *campestre*, (Paco Ramos, SCM). • Ulldemolins, UTM\* 31T32457, s/E. *campestre*, (Paco Ramos, SCM).

#### ILLES BALEARS

##### Mallorca

• Campos; Platja de Ses Covetes, UTM 31S4554397, 2 m, 24/11/2003, s/E. *campestre*, leg.: G. Mir, R. López, J. Carbó, R. Vilavedra, G. i A. Carbó, (AMJC). • Campos; Colònia de Sant Jordi, Platja d'es Trenc, UTM 31S4554398, 3 m, 24/11/2003, s/E. *campestre*, leg.: G. Mir,

R. López, J. Carbó, R. Vilavedra, G. i A. Carbó, (AMJC). Íbidem, 23/11/1990 i 16/12/1991, *s/Eryngium maritimum*, (Miquel Àngel Pérez-De-Gregorio i Capella). • Escorca; Vall de Sòller, Prop de Puig Major: Finca de Son Torrella, Finca de Cúber i voltants del Gorg Blau, UTM\* 31S48440, 650 - 900 m, *s/E. campestre*, (Carles Constantino). • Santa Margalida; Son Serra de Marina, UTM\* 31S51459, 0 m, dunes de platja, *s/Eryngium maritimum*, (Carles Constantino).

#### *Menorca*

• Ciutadella; UTM\* 31S57442, *s/E. campestre*, (Cristófol Mascaró, Comissió de Botànica GOB-Menorca). • Mercadal (Es); UTM\* 31S59442, *s/E. campestre*, (Cristófol Mascaró, Comissió de Botànica GOB-Menorca). • Maó; UTM\* 31S60441, *s/E. campestre*, (Cristófol Mascaró, Comissió de Botànica GOB-Menorca).

#### PAIS VALENCIÀ:

##### *Castelló*

• Pina de Montalgrao; UTM\* 30T69443 , *s/E. campestre*, (Mercè Redon). • Viver; UTM\* 30S70442, *s/E. campestre*, (Jordi Xavier Feliu Gil).

#### ARAGÓ (Franja de Ponent)

##### *Oscà*

• Benavarri; Sant Medardo , UTM\* 31T29466, *s/E. campestre*, (Joan Montón, IEI). • Benavarri; Purroi de la Solana, carretera de Benavarri, cruïlla d'Estopanyà, a l'aeròdrom, UTM\* 31T29465, *s/E. campestre*, (Joan Montón, IEI). • Benavarri; Purroi de la Solana, Más blanc, UTM\* 31T28465, *s/E. campestre*, (Victor Samperi Gracia). • Castellonroi; UTM\* 31T29463, zona de guixos, *s/E. campestre*, (Josep Maria Serrano). • Estopanyà; UTM\* 31T29465, erms, *s/E. campestre*, (Joan Montón). • Fraga, UTM\* 31T27459, *s/E. campestre*, (Ezequiel Uson i Guardiola). • Torrent de Cinca; UTM\* 31T27459, *s/E. campestre*, (Ezequiel Uson i Guardiola).

##### *Saragossa*

• Mequinensa; UTM\* 31T27458, *s/E. campestre*, (Ezequiel Uson i Guardiola).

##### *Terol*

• San Agustín; UTM\* 31T69443, *s/E. campestre*, (Mercè Redon).



**Fig. 2:** *Pleurotus eryngii* var. *eryngii*. Detall de les microfibril·les de la cutícula (esquerra) i de les anastomosi a la base de les làmines.



**Fig. 3:** *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* UBCC - 0997 i 0998. Foto: Enric Gracia.



**Fig. 4:** *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* UBCC – 1230 i 1231. Observis la variabilitat de coloració en la cutícula en exemplars recollits en una mateixa localitat. Foto: J.M. Lanau.



**Fig. 5:** *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* UBCC – 1229, sobre *Eryngium campestre*. Foto: J.M. Lanau.



**Fig. 6:** *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* UBCC – 1327, sobre *Eryngium campestre*.  
Foto: J.M. Lanau.



**Fig. 7:** *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* UBCC – 0736 i 0737, sobre *Eryngium maritimum*.  
Foto: J.M. Lanau.



***Pleurotus eryngii* var. *ferulae* (Lanzi) Sacc. (Saccardo, P. A., 1887)**

sub: *Agaricus ferulae* Lanzi, (Lanzi, M., 1874)

= *Agaricus anatrishes* Reichardt et Unger (Unger, F. i Kotschy, T., 1865)

= *Pleurotus ferulae* (Lanzi) X.L. Mao (Mao, X.L., 2000<sup>4</sup>)

= *Pleurotus fuscus* var. *ferulae* (Lanzi) Bres. (Bresadola, G., 1899)

= *Pleurotus eryngii* var. *ferulaginis* Stropnik, Tratnik & Seljak (Stropnik, Tratnik et al., 1988; *nomen invalidum*)

**NOMS POPULARS:**

Català: Gírgola de canyafèrlera (Illes Balears)

Castellà: Seta de caña, seta de cañaheja

Italià: Fungo della ferula, funciu di ferra

Xinès: A-Wei-Mo (Kawai, G., Babasaki, K. et al., 2008)

**DIAGNOSI:**

(Lanzi, M., 1874):

*Ag. F. caespitosus pileo carnosus laevi convexo-epanso, ut plurimum integro, e fuligineo fusco expallenti : lamellis albido-subgriseis lanceolato-acutis, postice reliculatim connexis, decurrentibus: stipite nudo, albido, glabro, excentrico, raro laterali, carnosus farcto : sporis albis ovato-ellipticis. Ad caules et radices emortuas Ferulae communis Linn. autumnno et vere; in Italia.*

(Lanzi, M., 1873, segons transciuen Candusso, M. i Basso, M. T., 1995a):

*Caespitosus pileo carnosus laevi convexo-epanso, ut plurimum integro, e fuligineo fusco expallenti : lamellis albido-subgriseis lanceolato-acutis, postice reliculatim connexis, decurrentibus: stipite nudo, albido, glabro, excentrico, raro laterali, carnosus farcto : sporis albis ovato-ellipticis.*

*Descr. : Pileus carnosus, glaber, integer, raro dimidiatus, junior fusco-fuligineus, convexus, varius, margine integro involuto; inde expallens. Lamellae numerosae, subconfertae, lanceolato-acutae, postice se invicem anastomosantes, decurrentes non raro usque ad stipitis basim, albidae subgriseo-pallescentes. Lamellulae 3-4 postice rotundato-acutae. Stipes glaber, saepius subexcentricus, raro lateralis, exanulatus, longitudine el crassitie varius, supra dilatatus et in pileo diffusus, carnosus, farctus, albus expallens. Hymenophori el stipitis trama cellulo-tubulosa. Sporae albae ovalo-ellipticae, 0,<sup>mm</sup>0143 longae, 0,<sup>mm</sup>0072 latae. Caro candida sub tenax. Sapor gratus; odor debilis fere nullus. Esculentus.*

*Ad caules et radices emortuas Ferulae communis Linn. autumnno et vere; apud Grotta Rossa, Testa di Lepre, Corneto, etc.*

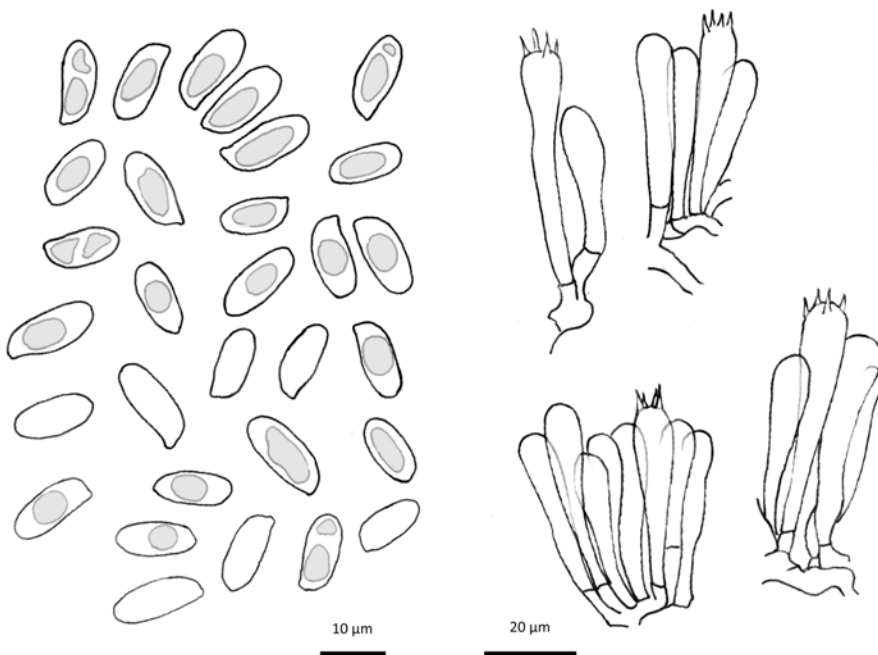
---

<sup>4</sup> Segons s'esmenta a l'Index Fungorum ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)). No hem tingut accés a l'obra original.

**DESCRIPCIÓ ORIGINAL (TRADUCCIÓ DE LA DIAGNOSI):**

Cespitós, amb barret carnós llis convex-aplanat, en la major part sencer, de color fosc fuliginós a pal·lidescent: làmines blanquinoses a grisoses, lanceolades a acuminades, connectades a la base formant un reticle, decurrents: cama glabra, blanquinosa, excèntrica, rarament lateral, carnosa i plena. Espores blanques, ovoidals a el·líptiques.

Descripció: Barret carnós, glabre, enter, rarament en forma semicircular, de jove de color gris fuliginós fosc, convex, variable, amb el marge enter i involut, més tard reflex. Làmines nombroses, lleugerament serrades, lanceolades a acuminades, anastomosades a la base, decurrents, tot i que no és rar que acabin en la base de la cama, i de color blanquinós a grisós pà·lid. Lamèl·lules cada 3-4 làmines, arrodonides, subtils. Cama glabra, normalment quasi excèntrica, rarament lateral, sense anell, de longitud i diàmetre variables, allargat a la part superior i confús amb el barret, carnosa, plena, de color blanquinós pà·lid. Trama de l'himenòfor i de la cama cè·l·lulo-tubulosa. Espores blanques, ovalades a el·líptiques,  $14,3 \times 7,2 \mu\text{m}$ . Carn blanca, tenaç a la base. Sabor agradable, olor dèbil, quasi nul. Comestible. Als peus i rels de *Ferula communis* L., a la tardor i la primavera, a Grotta Rossa, Testa di Lepre, Corneto, etc.



**Fig. 8:** Microscòpia de *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* (UBCC-1499)

### CARÀCTERS DIFERENCIALS RESPECTE LA VARIETAT TIPUS:

A nivell macroscòpic, els nostres exemplars recollits sobre *Ferula sp.* són difícilment diferenciables de la varietat tipus, excepte per la seva tendència a ser bolets més grans.

Espores hialines, subel·líptiques, llises, gutul·lades (8,1)9,9-13,2(17,1) × (4,4)5,0-6,0(6,8) µm Q=(1,6)1,8-2,1(2,5); Me=11,45 ±0,92 × 5,45 ±0,19. Basidis 37,8-48,7 × 7,6-9,1µm. La cutícula també presenta hifes terminals amb la pigmentació característica.

### HOSTES:

Hoste principal: *Ferula communis* L.

Altres hostes descrits:

- *Ferula communis* var. *anatrishes* (Pilát, A., 1935)
- *Ferula cossoniana* (Malençon, G. i Bertault, R., 1975)
- *Ferula verceritensis* (Malençon, G. i Bertault, R., 1975)
- *Ferula longipes* (Malençon, G. i Bertault, R., 1975)
- *Ferula ferulaeoides* (Mou, C., Cao, Y. et al., 1987)
- *Ferulago spp.* (Hilber, O., 1982; Stropnik, Tratnik et al., 1988)
- *Kundmannia sp.* (Malençon, G. i Bertault, R., 1975)
- *Laserpitium latifolium* (Bresadola, G., 1899)
- *Opopanax sp.* (Offner, J. i Heim, R., 1927)
- *Prangos sp.* (Offner, J. i Heim, R., 1927)

Hostes dubtosos:

- *Thapsia garganica ssp. decussata* (Malençon, G. i Bertault, R., 1975)
- *Thapsia villosa* (Malençon, G. i Bertault, R., 1975; Oria de Rueda, J. A., Martínez de Azagra, A. et al., 1991);
- *Elaeoselinum sp.* (Offner, J. i Heim, R., 1927).
- *Ferula spp.*: Diversos autors descriuen troballes de color blanc sobre *Ferula spp.*, i que han estat determinades com a *P. eryngii* var. *ferulae*, però que podrien correspondre a alguna de les varietats blanques més tard incorporades al *complex eryngii*. És el cas de les troballes a les Illes Canàries sobre *Ferula linkii* Webb, *Ferula lancerotensis* Parl. (Rodríguez Armas, L., Beltran Tejera, E. et al., 1998), de color blanc, en cap cas amb tonalitats brunes, i espores 11-15 × 5-6 µm. També és el cas descrit per Malençon, G. i Bertault, R., 1975, "d'un blanc éclatant" sobre *Ferula communis* L., al Marroc.

### ICONOGRAFIA SELECTA:

Macroscòpia: Bresadola, G., 1899

### ALTRES CARÀCTERS I INFORMACIÓ BIBLIOGRÀFICA ADDICIONAL:

- Espores: 14 × 7 µm (Saccardo, P. A., 1887)  
10-14 × 5-6 µm (Bresadola, G., 1899)<sup>5</sup>  
9,6-13 (14) × 4,8-5,5 (6) µm (Malençon, G. i Bertault, R., 1975)  
11-13,5 µm (Battiato, A., Napoli, M. et al., 1987).  
9,6-13,8 × 4,7-6,9 µm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)
- Basidis: 45-50 × 6-8 µm (Bresadola, G., 1899)  
48 × 8 µm (Malençon, G. i Bertault, R., 1975)  
32-48 × 7-10 µm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)
- Ploidia (n): 12 (Slézec, A.-M., 1984)

### LLISTAT DE CITES BIBLIOGRÀFIQUES:

#### ILLES BALEARS

##### *Eivissa*

- Eivissa; Torre de Sal Rosa, UTM\* 31S36430, 12/11/1973, s/*Ferula communis*, herb.: BREM 2144, (Finschow, G., 1984).
- Sant Josep de sa Talaia; Torrent de Ses Eufabies, prop de Cala d'Hort, UTM\* 31S34430, s/*Ferula communis*, (Finschow, G., 1984).
- Sant Josep de sa Talaia; Camí d'Es Coscollar, UTM\* 31S35430, 17/11/1994, s/*Ferula communis*, herb.: JLS I-171B, (Siquier, J. L. i Constantino, C., 1995).
- Sant Josep de sa Talaia; Serra de Sa Cova Santa, UTM\* 31S35430, 11/11/1993, s/*Ferula communis*, herb.: JLS I-80B, (Siquier, J. L. i Constantino, C., 1995).
- Sant Joan de Llabritja; Sant Llorenç de Balàfia, UTM 31S3694322, 50-100 m, 21/03/2010, s/*Ferula communis*, herb.: JEN 186, (Siquier, J. L., Salom, J. C. et al., 2011).
- Santa Eulària des Riu; Can Miquelet, UTM 31S3614318, 150-175 m, 07/12/2008, s/*Ferula communis*, herb.: JLS 2623, (Siquier, J. L., Salom, J. C. et al., 2011).

##### *Illa de Cabrera*

- Palma de Mallorca; Penyal Blanc, UTM 31S4944332, 150-170 m, 19/11/1993, s/*Ferula communis*, herb.: JLS C72B (Siquier, J. L. i Lillo, F., 1994).

##### *Menorca*

- Es Castell; Toraixa, UTM\* 31S61441, s/*Ferula communis*, (Escandell, T. i Escandell, J., 1999).
- Es Mercadal; UTM\* 31S59442, s/*Ferula communis*, (Siquier, J. L. i Constantino, C., 1995).
- Es Mercadal; UTM\* 31S59442, s/*Ferula communis*, (Siquier, J. L. i Constantino, C., 1995).

---

<sup>5</sup> Bresadola considera *Agaricus nebrodensis*, *A. eryngii* i *A. cardarella* com a sinònims de *Pleurotus fuscus*.

1982). • Maó; Morell, UTM 31S6024423, 50 m, 11/12/2004, s/*Ferula communis*, herb.: GM 041211-10 (Mir, G. i Melis, J., 2008).

LLISTAT DE RECOL·LECCIONS I AÏLLATS EN BANC DE CULTIUS:

- ESPANYA -

ANDALUSIA

*Córdoba*

• Carcabuey; Parque Natural de las Sierras Subbéticas, Paraje de Navazuelo, 1300 m, UTM 30S3814149, s/*Ferula sp.*, 18/11/2002, leg.: M. Morcillo, Herb.: UBCC-1025.

CATALUNYA

*Lleida*

• (cf.) Naut Aran; Baguerque, ermita de Sta Margalida, en un prat alpí, 1400 m, UTM 31T3294734, exemplars gairebé blancs, que recorden a *P. nebrodensis* sicilians, s/rel d'umbel·lífera sense determinar (clarament no *Eryngium*), 23/9/2005, leg.: JML, Herb. i C.cult.: UBCC-1273c (mitjana esporal =  $11.3 \times 5.4 \mu\text{m}$  ; Qe = 2.1). (cf.) Ídem, però a 1600 m, leg.: Geli, J. i JML, Herb. i C.cult.: UBCC-1274c (mitjana esporal: Me =  $10,8 \times 5,5 \mu\text{m}$  ; Qe = 2).

ILLES BALEARS

*Menorca*

• Ciutadella de Menorca; Biniatram, UTM 31S5774433, marges d'un alzinar, s/ *Ferula communis*, 13/04/2009, leg.: EG i TM, Herb.: UBCC-1513 i 1514. • Ciutadella de Menorca; Biniatram, Finca Rubió i Tudurí, UTM 31S5774433, s/ *Ferula communis*, 13/04/2009, leg.: EG i TM, Herb.: UBCC-1516, 1518. • Maó, Aeroclub, UTM 31S6074413, 13/04/2009, leg.: EG i TM, Herb.: UBCC-1512. • Maó; Sant Lluís, UTM 31S6074607, Sobre *Ferula communis*, 13/04/2009, leg.: EG i TM, Herb.: UBCC-1515. • Mercadal (Es); Es Toro, 330 m, UTM 31S594426, s/ *Ferula communis*, 14/04/2009, leg.: EG i TM, Herb.: UBCC-1517. Ídem, 15/04/2009, leg.: EG i TM, Herb. i C.cult.: UBCC- 1519 a 1522, 1523c, 1524c, 1525c (Me =  $11,44 \times 5,41 \mu\text{m}$ , Qe = 2,12), 1526c, 1527c, 1528c, 1529c. Ídem, 16/04/2009, leg.: EG i TM, Herb.: 1530 a 1535. • Mercadal (Es), Ses salines de sa Concepció, Fornells, UTM 31T5954431, Vora un camí, amb sòl argilós vermell. Abundant *Ferula communis*, s/ *Ferula communis*, //2001, leg.: Samuel Pons, Herb.: UBCC-0205 a 0211, UBCC-0212 (Me =  $11,24 \times 5,61 \mu\text{m}$ , Qe = 2,00), 0213 i 0214.

## Eivissa

• Sant Antoni de Portmany; Ses tanques den Miquelet (Can Miquelet), a mig camí entre Sta. Gertrudis i St. Mateu, UTM 31S3604320, marges de *Ferula communis* i *Thapsia garganica* barrejades, 23/03/2009, leg.: Toni Serra, Herb. i C.cult.: UBCC-1489c, 1490c, 1491c, 1492c, 1493, 1494c. • Sant Joan de Labritja; Al costat de Benirràs, UTM 31S3664327, camps amb *Ferula communis*, *Phoeniculum vulgare* i *Pistacia lentiscus*, entre d'altres, 23/03/2009, leg.: TM, Herb. i C.cult.: UBCC-1485, 1486c i 1487c. • Sant Joan de Labritja; Benirràs, UTM 31S3664327, entre *Pistacia*, *Ferula* i *Phoeniculum*, 06/04/2009, leg.: TM, Herb. i C.cult.: UBCC-1501, 1502c. • Sant Joan de Labritja; Santa Eulària des Riu, camí que comunica la ctra. de Santa Eulària amb la de Sant Joan, UTM 31S3694316, camp de *Ferula sp.*, 22/03/2009, leg.: TM, Herb.: UBCC-1484. Ídem, 06/04/2009, leg.: TM, Herb. i C.cult.: UBCC-1497c, 1498c, 1499c (Me = 12,66 × 5,58 µm, Qe = 2,27), 1500c. Ídem, 09/04/2009, leg.: TM, Herb. i C.cult.: UBCC-1507c. • Santa Eulària des Riu; S'Argentera, Sant Carles, UTM 31S3714316, entre *Pistacia* i *Ferula sp.*, 09/04/2009, leg.: TM, Herb.: UBCC-1508 i 1509. • Sant Josep de sa Talaia; Cana Masaueta, carretera St. Josep - St.Jordi, UTM 31S3544308, camp amb *Ferula*, *Thapsia*, *Phoeniculum*, *Eryngium* i *Asparagus*, s/ *Ferula communis*, 05/04/2009, leg.: TM, Herb. i C.cult.: UBCC-1495c. • Sant Josep de sa Talaia; Carretera St. Josep - St. Antoni, al costat de la carretera, UTM 31S3524312, camp de *Ferula* al costat de la carretera, s/ *Ferula communis*, 05/04/2009, leg.: TM i Maties Ribas Marí, Herb. i C.cult.: UBCC-1496c. • Sant Josep de sa Talaia; Sant Agustí des Vedrà, Can Toni Torreta, UTM 31S3524311, entre *Ferula sp.*, 06/04/2009, leg.: TM, Herb.: UBCC-1503 a 1506. • Sant Josep de sa Talaia; Can Vicent des Pou, cruïlla entre Cala Vedella i Cala Carbó, UTM 31S3464307, s/ *Ferula sp.*, 09/04/2009, leg.: TM, Herb.: UBCC-1510. • Sant Josep de sa Talaia; Sant Jordi de ses Salines, esplanada al costat dret de la carretera Eivissa-Sant Josep de sa Talaia, Km4, UTM 31S3594306, camp de *Ferula* i garrofers, 11/04/2009, leg.: TM, Herb. i C.cult.: UBCC-1511c.

## ITÀLIA

### SICÍLIA

• Palermo, Corleone; Bosco di Ficuzza, prop de Alpe Cucco, 900 m, UTM 33S 360 4193, Zona de pastura amb molta *Ferula communis*, s/*Ferula communis*, 28/10/2009, leg.: LG, Herb. i C.cult.: UBCC-1385c (Me = 10,45 × 5,19 µm, Qe = 2,02) i 1386. • Palermo, Corleone; Bosco di Ficuzza, camí que puja a Torre del Bosco, 850 m, UTM 33S359 4192, Zona oberta de pastura on hi ha *Ferula*; en molts exemplars no s'observa l'arrel, 29/10/2007, leg.: LG, Herb. i C.cult.: UBCC-1394c, 1395c, 1396c (s/ *Ferula communis*) i 1397. • Palermo, Corleone; Bosco di Ficuzza, turó de davant de l'alberg del Gorgo di Drago, 750 m, UTM 33S361 4195, vessant sud poc pasturat amb *Ferula communis*, *Eryngium campestre* i alguna *Thapsia garganica*, 22/04/2009, leg.: LG i TM, Herb. i C.cult.: UBCC-1560c, 1561, 1562c i 1563 a 1566. • Catania; Entre Randazzo i Bronte, al peu de l'Etna, 1150 m, UTM 33S4904185, camp de *Ferula communis* amb alguna *Thapsia garganica*, s/ *Ferula communis*, 27/04/2008, leg.: EG, Herb. i C.cult.: UBCC-1452c, 1453c, i 1454c.

- AÏLLATS NO GEOREFERENCIABLES -

- Soca comercial de cultiu, a partir de carpòfors comprats al mercat de Randazzo, Sicília, probablement procedents de l'explotació de Linguaglossa, 27/04/2008, leg.: EG, Herb. i C.cult.: UBCC-1451c.

LLISTAT DE CITES ORALS (PRINCIPAT, BALEARS I FRANJA DE PONENT):

CATALUNYA:

*Girona*

- Pals; Boscos de Can Pou, Can Pou de ses Garites, 90 m, UTM 31T5144646, 14/12/2008, leg.: Socis AMJC, SCM i SM André Marchand, (AMJC i Micolist).
- Pals; Els Rodors, Pinedes de Rodors, UTM 31T5154648, 40 m, 31/03/2002, leg.: J. Carbó i R. Vilavedra, (AMJC).
- Pals; Pinedes del Puig Pedrós i del Puig dels Corbs, Riells i Cova del Lladre, UTM, 31T5154647, 50, m, 21/10/2001, leg.: J. Carbó, (AMJC). Ídem, 16/02/2008, leg.: À. Torrent, C. Roqué, M.À. Pérez-De-Gregorio, G. Mir i J. Carbó, (AMJC)

*Lleida*

- (cf.) Bossòst, Portillon, UTM 31T31421, 13/09/2008, leg.: Miquel Bolea, (Miquel Bolea, SCM). Originalment identificat com a *P. nebrodensis*.
- (cf.) Valarties, 1400 m, UTM 31T32472, carpòfors de color quasi blanc, leg.: Joan Montón, (Joan Montón, IEL). Originalment identificat com a *P. eryngii var thapsiae*.

ILLES BALEARS

*Eivissa*

- Eivissa (Carles Constantino)

*Menorca*

- Migjorn Gran (Es); UTM\* 31S59442, (Cristófol Mascaró, Comissió de Botànica GOB-Menorca).
- Ferreries; UTM\* 31S58442, (Cristófol Mascaró, Comissió de Botànica GOB-Menorca).
- Ciutadella; UTM\* 31S57442, (Cristófol Mascaró, Comissió de Botànica GOB-Menorca).
- Mercadal (Es); UTM\* 31S59442, (Cristófol Mascaró, Comissió de Botànica GOB-Menorca).
- Alaior; UTM\* 31S59442, (Cristófol Mascaró, Comissió de Botànica GOB-Menorca).



**Fig. 9:** *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* UBCC – 1652 i 1653, sobre *Ferula communis*.  
Fotos: Laura Ganzer.



**Fig. 10:** *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* UBCC – 1452, sobre *Ferula communis*. Foto: Enric Gracia.



***Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini* Venturella** (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000)

=*Pleurotus hadamardii* Costantin, *nomen invalidum* (Costantin, J., 1923)

=*Agaricus nebrodensis* Inzenga, *pro parte excl. typ.* (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000)

**DIAGNOSI:**

*Basidiomata valida atque robusta. Pileus 5-14 (20) cm, convexus dein explanatus, postremo depressus, perraro reflexo-infundibuliformis. Pilei pellis haud facile separabilis, velutina atque opaca, albida, denique levis, nitida pinguisque, pallide alutacea vel incarnata, saepe areolata, praecipue ad medium, margine tenui acutaque, maxime involuta, in senectute irregulariter plana et interdum lobata. Lamellulae spissae, arcuataecum abundis lamellis, decurrentes, in juventute anastomosantes in supera parte stipitis, albae, in senectute leviter incarnatae, acie concolorata. Stipes 4-7,5 × 1,2-2,8 (3,6) cm, solidus, plenus, irregulariter cylindricus, ad basim attenuatus vel subradicatus, medianus vel excentricus, pileo concolor, in juventute albo pruinatus deinde levis, glaber, in infera parte saepe leviter flavidus. Caro compacta, fibrosa, elastica, alba; odor saporque debiles, vulgares. Sporae 10-14 × 5-7 μm (Q=1,9-2,1), hyalinae (in KOH etiamque in melzer), leves, cylindratae vel irregulariter ellipsoideae, pluriguttulatae, apiculo manifesto praeditae. Basidia 30-50 × 8-12 (14) μm, tetraspora, clavata, cum sterigmatibus 4-6 μm longis. Cheilocystidia 40-65 × 8-12 μm basidiis similia, superne attenuata, interdum acute mucronata. Pileicutis ex hyphis cylindricis radialibus, 5-12 μm latis, constituta. Fibulae praesentes. Locus: gregaria in herbidis locis, cum Elaeoselino asclepio consociata.*

**DESCRIPCIÓ ORIGINAL:**

Basidiomes fermes i carnosos. Píleu 5-14 (20cm), convex, més tard aplanat, finalment deprimit, rarament reflex o amb forma d'embut. Cutícula difícil de separar, vellutada i opaca, blanquinosa, més tard llisa, brillant i greixosa, amb tons de color cuir o del color de la pell; sovint lacerada en petites plaques adherides, evidents en el disc central i que contrasten amb la carn de color blanc ivori de rerafons. Marge prim, agut, molt involut, pla en els basidiomes envellits, i aleshores irregular, de vegades també lobulat. Làmines gruixudes, arquejades, amb nombroses lamèl·lules intercalades, molt decurrents, totalment blanques. El marge de les làmines és enter, del mateix color, amb un lleuger color de pell en els basidiomes vells. Els basidiomes joves presenten anastomosis evidents a l'alçada del píleu, i que poden desaparèixer amb l'edat. Cama 4-7,5 × 1,2-2,8 (3,6) cm, consistent, plena i ferma, irregularment cilíndrica, atenuada a la base, de vegades radicant, central a excèntrica, concolora amb el barret, lleugerament pruïnós en els basidiomes joves, i aleshores llisa, glabra i groguenca a la base. Carn ferma i compacta, fibrosa, elàstica, blanca, amb olor i sabors fúngics. Espores 10-14 × 5-7 μm (Q=1,9-2,1), cilíndriques a irregularment el·lipsoidal, llises, hialines, gutul·lades i amb un

apicle pronunciat. Basidis clavats, tetraespòrics,  $30-50 \times 8-12$  (14) $\mu\text{m}$ , esterigmes  $4-6\mu\text{m}$ . Queilocistidis  $8-12 \times 40-65 \mu\text{m}$ , clavats, amb un àpex prim, a vegades amb un bec agut i prim. Epicutis amb hifes cilíndriques,  $5-12\mu\text{m}$  d'ample, molt denses. Textura que recorda la pell. Fíbules abundants arreu en el basidioma. Basidiòspores, basidis i trama (amb presència ocasional de hifes oleíferes) hialines en KOH aquós i reactiu de Melzer.

Característiques de cultiu en PDA: Absent de pigments, revers del mateix color, colònies dicariòtiques amb miceli poc compacte i miceli aeri moderat, més o menys zonat o radial, marge llis i regular, color blanc a crema. Hifes de paret prima, hialines en KOH aquós i Melzer, amb fíbules abundants. Ocasional producció de microgútu·l·les, individuals en curts esterigmes secretors en hifes aèries (trampes per a nematodes); creixement òptim a  $25-30^{\circ}\text{C}$  (2,4 mm/dia).

#### **MATERIAL TIPUS:**

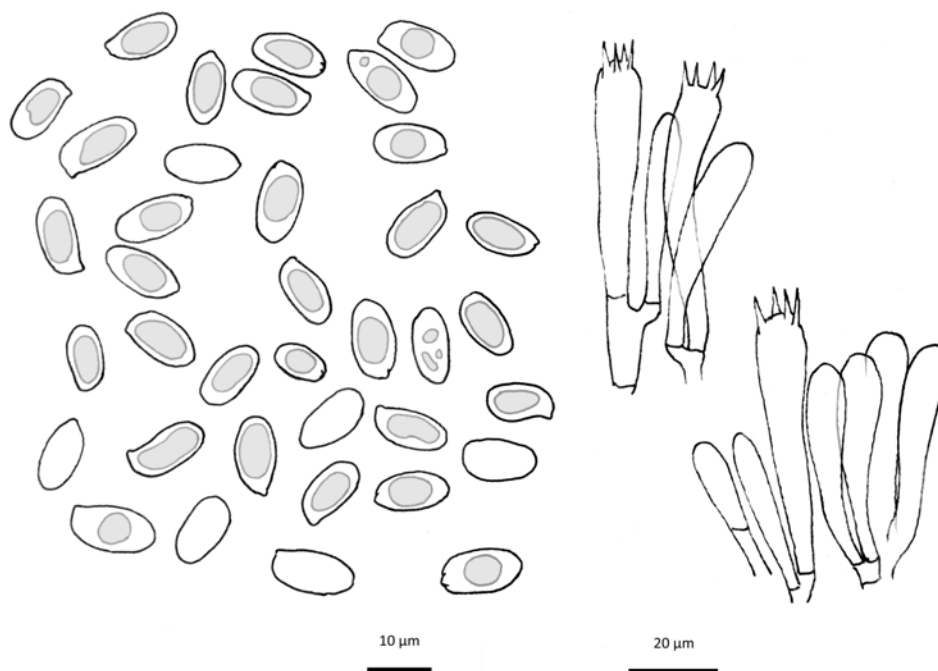
Muntanyes de la Madonie, Casa Crisanti, prop de Scillato (Palermo, Sicília),  $37^{\circ}51'50''\text{N}-13^{\circ}57'06''\text{E}$ , pastures àrides amb *Elaeoselinum asclepium* subsp. *asclepium*, en sòl calcari, 890m, 04/05/1997, Leg. Venturella, Holotip a l'Herbarium Mediterraneum (PAL).

#### **CARÀCTERS DIFERENCIALS RESPECTE LA VARIETAT TIPUS:**

Els nostres exemplars recollits prop de la localitat tipus (Madonie, Sicília) sobre *Elaeoselinum asclepium* són molt similars a la varietat *eryngii*, amb tonalitats de barret de color beige a bru pà·l·lid, però no tant blancs com s'indica a la descripció tipus del bolet. Nogensmenys, les fructificacions en laboratori d'aquests aïllats sobre serradures de fusta ha donat lloc a fructificacions pràcticament de color blanc pur.

Les recol·leccions realitzades a la província de Salamanca sobre *Thapsia villosa*, també coincidents en la microscòpia amb les recol·leccions tipus, presenten un port molt més gran i robust, i també presenten tonalitats de color bru clar en la cutícula, que sovint es troba fortament clivellada, fet que li confereix a l'aspecte general del bolet un color blanquinós.

Les mides esporals de les localitats sicilianes i de la província de Salamanca es corresponen a la publicada a la descripció original: espores hialines, subel·líptiques, llises, gutul·lades  $(7,4) 10,2-12,7$  (15,3)  $\times$  (4,7)  $5,6-6,6$  (7,9)  $\mu\text{m}$   $Q = (1,4) 1,7-2,1$  (2,5)  $Me=11,49 \pm 0,45 \times 6,08 \pm 0,12\mu\text{m}$ . Basidis  $42-52,4 \times 8,9-10,5\mu\text{m}$ . No hem pogut observar hifes terminals a la cutícula amb pigmentació rellevant.



**Fig. 11:** Microscòpia de *Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini* (UBCC-1392).

**ALTRES CARÀCTERS I INFORMACIÓ BIBLIOGRÀFICA ADDICIONAL:**

Espores: 10,1-14,0 × 5,2-7,1 µm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)  
8-12(13) × 4-5,5 µm (Chinan, V.C. i Venturella, G., 2012)

Basidis: 30-50 × 8-12 µm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)  
34-48 × 8-10 µm, esterigmes 4-5 µm (Chinan, V.C. i Venturella, G., 2012)

Queilocistidis: 8-12 × 40-65 µm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)  
40-60 × 8-12 µm (Chinan, V.C. i Venturella, G., 2012)

**HOSTES I ECOLOGIA:**

Hoste típic: *Elaeoselinum asclepium* (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000)

Altres hostes descrits:

- *Laserpitium* spp. (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001),

- *Thapsia villosa* (Venturella, G., 2000).
- *Elaeoselinum gummiferum* (Venturella, G., 2000).

Altitud: 0-1200 m (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000)

#### **OBSERVACIONS:**

La descripció de la varietat *elaoselini* es va publicar uns pocs mesos després d'una nova tipificació de *P. nebrodensis*, publicada pel mateix autor i a la mateixa revista (Venturella, G., 2000).

Tot el treball descriptiu de la varietat *elaoselini* es basa en la comparació de les seves troballes sicilianes amb el material tipus de *P. nebrodensis* recentment tipificat. Venturella assenyala que la var. *elaoselini* es separa de *Pleurotus nebrodensis*, per la mida menor dels carpòfors, la microscòpia (mida esporal i forma dels queilocistidis), i l'ecologia (altitud, hoste i mesos de fructificació).

Segons Venturella, Inzenga originalment considerava *P. nebrodensis* i *P. eryngii* var. *elaoselini* com una única entitat, i per aquesta raó, en un altre dels plecs d'herbari originals de Inzenga que encara es preserven (Herbari E.M. Fries, Upsala), els exemplars es corresponen per la seva microscòpia a la var. *elaoselini* (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000).

En el treball descriptiu per a aquesta nova varietat no es fa cap comparació entre *P. eryngii* var. *elaoselini* i la varietat tipus de *P. eryngii*. Tant sols s'hi fa un breu esment respecte la varietat *ferulae*, de la que se'n diferencia "en base a característiques macroscòpiques (mida del píeu, color, superfície i cutícula) i microscòpiques (mida de les espores, basidis i queilocistidis)". Als materials i mètodes d'aquest treball no hi figura cap mostra de *P. eryngii* var. *eryngii* o *P. eryngii* var. *ferulae*.

Segons un treball posterior del mateix autor, les recol·leccions de *Pleurotus eryngii* de carpòfors blancs a la Península Ibèrica també s'han d'atribuir a aquesta varietat, i no a *P. nebrodensis* (Venturella, G., 2002).

De manera similar, Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001 consideren que les soques de *Pleurotus* que creixen sobre *Laserpitium* spp. a Europa central i nord d'Itàlia (fins ara identificades com a *P. nebrodensis*) mostren característiques microscòpiques idèntiques a les de la varietat *elaoselini*.

Recentment s'ha descrit troballes del complex *eryngii* en una localitat a Rumania, de carpòfor blancs, identificada com a *P. eryngii* var. *elaoselini*, sobre *Laserpitium latifolium* (Chinan, V.C. i Venturella G., 2012). Tot i que els autors afirmen el contrari, les mides esporals citades al treball (8-12(13) × 4-5,5 µm), al nostre entendre es corresponen a les mides clàssiques de les varietats *eryngii* i *ferulae*. Tant l'aspecte macroscòpic com les

mides esporals coincideixen bé amb les nostres recoleccions de color blanquinós a la Vall d'Aran.

Diversos estudis moleculars recolzen el fet de separar filogenèticament els bolet recollits sobre *Elaeoselinum asclepium* com a varietat de *P. eryngii*, d'aquells recollits sobre *Cachrys ferulacea* (com a *P. nebrodensis*). En concret, l'estudi comparatiu mitjançant isoenzims i RAPD d'exemplars del complex *eryngii* recollits sobre *Eryngium*, *Ferula*, *Thapsia*, *Elaeoselinum* i *Cachrys* (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001) agrupen els diferents aïllats en funció dels corresponents hosts. En aquest estudi, el grup de bolets associats a *Elaeoselinum* resten més propers als grups de *Thapsia* i *Ferula* (clades amb un baix suport estadístic), mentre que el grup associat a *Cachrys* es separa de tota la resta. Els resultats obtinguts per seqüenciació parcial dels gens EF1 $\alpha$  i RPB2 – amb tant sols un aïllat identificat com a var. *elaeoselini* – són consistents amb aquestes evidències (Rodríguez Estrada, A. E., Jimenez-Gasco, M. D. M. et al., 2010).

Pel que fa a *Pleurotus hadamardii* Costantin, Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001, consideren que s'hauria de considerar *nomen nudum*, argüint en que la identificació original sobre *Eryngium alpinum* (= *E. bourgatii*) ha estat provada errònia per Heim, R., 1960 i en que les referències posteriors a *P. hadamardii* (Joly, P., Cailleux, R. et al., 1990) es refereixen a troballes sobre *Laserpitium latifolium* que es correspondrien a *P. eryngii* var. *elaeoselini*. Nogensmenys, aquests treballs no esmenten en la seva bibliografia quina era la obra original de *P. hadamardii*.

*Pleurotus hadamardii* Costantin (Costantin, J., 1923) és el nom proposat com a “espècie o varietat nova”, per a un seguit de troballes abundants d'una forma de *P. eryngii* de color blanc, sobre *Eryngium alpinum* (= *E. bourgatii*), i excepcionalment sobre *Laserpitium latifolium*. Les recol·leccions es van fer als Alps, a la regió del “Petit Montblanc” de la Vanoise i pastures veïnes, entre 1450 i 1750 m, a finals d'agost i primers de setembre. Aquestes troballes havien estat esmentades pel mateix autor en un treball anterior (Costantin, J., 1921), a on no es feia cap proposta de nou tàxon. En cap d'aquests treballs ni en treballs posteriors al nostre abast no figura cap altra descripció, pel que estem d'acord amb en considerar-lo *nomen invalidum*.

#### LLISTAT DE RECOL·LECCIONS I AÏLLATS AL BANC DE CULTIUS:

#### - ESPANYA -

##### Castella i Lleó

- Salamanca; Rodalies de Salamanca, 800 m, UTM\* 29T72453, Sobre *Thapsia villosa*, /4/2004, leg.: Luque, Pere, Herb. i C.cult.: UBCC-1221 (Me = 12  $\times$  5,8  $\mu$ m ; Qe = 2,1).
- Yecla de Yeltes; Castro de Yecla de Yeltes, Salamanca, 723 m, UTM\* 29T71453, Sobre *Thapsia villosa*, 07/05/2006, leg.: Luque, Pere, Herb. i C.cult.: UBCC-1312c i 1313c.

-ITÀLIA-

*Sicília*

- Palermo, Corleone; Bosco di Ficuzza, Godrano, a un quilòmetre a l'Oest de l'Albergo diGorgo del Drago, zona Rocca Feliche, just on hi ha un roure molt gran a la vora del Camí, 1000 m, UTM 33S3594196, zona de pastura amb *Elaeoselinum asclepium*, s/ *Elaeoselinum asclepium*, 28/10/2007, leg.: LG, Herb. i C.cult.: UBCC-1387c, 1388c, 1389c (Me = 11,44 × 6,02 µm, Qe = 1,91), 1390c, 1391c, 1392 (Me = 12,08 × 6,25 µm, Qe = 1,93), 1393.
- Palermo, Corleone; Bosco di Ficuzza, Godrano, vora l'Alpe Cucco, per sota de la carretera, UTM 33S3594196, zona de pastura amb *Elaeoselinum asclepium*, s/ *Elaeoselinum asclepium*, 21/04/2009, leg.: LG i TM, Herb.: UBCC-1550, 1551, 1552 (Me = 11,47 × 5,97 µm, Qe = 1,93), 1553 i 1554. Ídem, per sobre de la carretera, Herb. i C.cult.: 1555 a 1557 (Me = 10,98 × 6,07 µm, Qe = 1,81), 1558c i 1559.
- Palermo, Corleone; Godrano, Cozzo Sant'Angelo, vora la carretera, al voltant d'una caseta, 680 m, UTM 33S3604199, s/ *Elaeoselinum asclepium*, 22/04/2009, leg.: LG i TM, Herb. i C.cult.: UBCC-1567, 1568, 1569c, 1570 i 1571c.

-AÏLLATS NO GEOREFERENCIABLES-

- Exemplars comprats en un restaurant a Salamanca, leg.: Pere Luque, Herb. i C.cult.: UBCC-1267c.



**Fig. 12:** *Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini* UBCC – 1221, sobre *Thapsia villosa*. Foto: J. M. Lanau.



**Fig. 13:** *Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini* UBCC – 1551, sobre *Elaeoselinum asclepium*. Foto: Laura Ganzer.



**Fig. 14:** *Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini* UBCC – 1553, sobre *E. asclepium*. Foto: Laura Ganzer.



**Fig. 15:** *Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini* UBCC – 1571, sobre *E. asclepium*. Foto: Laura Ganzer.



***Pleurotus eryngii* var. *thapsiae* Venturella** (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2002).

**DIAGNOSI:**

*Basidiomata valida atque robusta, una, haud saepe luxuriosa. Pileus 2-10 cm, convexus dein explanatus; postremo depressus, perraro reflexo-infundibuliformis. Pilei pellis haud facile separabilis, velutina atque opaca, cerea cum pigmentis, et laxatis squamis, fusca, margine tenui acutaque, maxime involuta, subtilibus venis ornata, in senectute irregulariter plana et interdum lobata. Lamellae, cineraceo colore, spissae, arcuatae, cum lamellulis, decurrentes, anastomosantes in supera parte stipitis, plus minusve evidentes. Stipes 4-7,5 × 1,2-2,8 (3,6) cm, solidus, plenus, irregulariter cylindricus, ad basim attenuatus vel subradicatus, medianus vel excentricus, albus paene pullus colore, inde levis et glaber. Caro compacta, fibrosa, elastica, alba; odor saporque debiles, vulgares. Sporae 10-14 × 5-7 μm (Q = 1,9-2,1), hyalinae (in KOH etiamque in Melzer), leves, cylindraceae vel irregulariter ellipsoideae, pluriguttulatae, apiculo manifesto praeditae. Basidia 32-54 × 6-9 μm, tetraspora, clavata, cum sterigmatibus 4-6 prn longis. Cheilocistidia 8-12 × 40-65 μm, basidiis similia, supeme attenuata, interdum acute mucronata. Pileicutis ex hyphis cylindricis radialibus, 5-12 μm latis, constituta. Fibulae praesentes.*  
*Locus: graegaria in herbidis locis, cum Thapsiae garganicae consociata.*

**DESCRIPCIÓ ORIGINAL:**

Basidiomes fermes i carnosos, individuals, rarament cespitosos. Barret de 2-10 cm, inicialment convex, més tard aplanat, finalment deprimit, rarament reflex o infundibuliforme. Cutícula difícil de separar, vellutada, pruïnosa amb pigments, opaca, amb esquàmules disperses de color bru fosc, més tard llis, amb una aparença brillant i quasi greixosa en carpòfors envellits. Marge prim, agut, molt involut i ornamentat amb costelles primes, més tard aplanat, irregular, i de vegades també lobat. Làmines de color blanc grisenc, gruixudes, arquejades, amb lamèl·lules, fortament decurrents i anastomosades de forma més o menys evident a la base. Aresta de les lamines entera, subconcolora amb el pïeu. Cama 3-5 × 1-3 cm, carnosa, ferma i plena, irregularment cilíndrica, atenuada a la base, de vegades radicant, central i de vegades excèntrica, blanc-brunenca, llisa i glabra. Carn ferma i compacta, fibrosa, elàstica, blanca, amb olor i sabor fúngics. Espores 10-14 × 5-7 μm (Q=1,9-2,1), cilíndriques a irregularment el·lipsoidals, llises, hialines, gutul·lades i amb un apicle pronunciat. Basidis clavats, tetraesterigmats, 32-54 × 6-9 μm i esterigmes 4-6 μm. Queilocistidis 8-12 × 40-65 μm, rars, clavats, amb àpex irregular, agut a subglobós, de vegades amb un bec agut. Epicutis amb hifes cilíndriques, de 5-12 μm de diàmetre, compactes. Textura semblant a la cutícula. Fíbules abundants arreu del basidioma. Basidiòspores, basidis i trama (amb presència ocasional de hifes oleíferes) hialina en KOH aquós i Melzer.

Característiques de cultiu en PDA: Absent de pigments, revers del mateix color, colònies dicariòtiques amb miceli poc compacte i miceli aeri moderat, més o menys zonat o radial, marge llis i regular, color blanc a crema. Hifes de paret prima, hialines en KOH aquós i

Melzer, amb fíbules abundants. Ocasional producció de microgúttul·les, individuals en curts esterigmes secretors en hifes aèries (trampes per a nematodes); creixement òptim a 25°C (2,2 mm/dia).

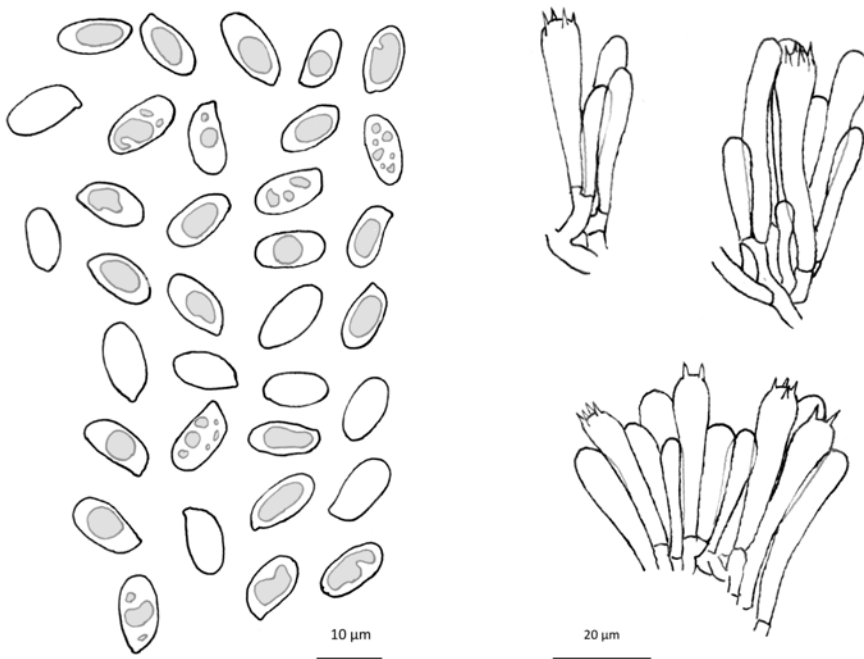
**MATERIAL TIPUS:**

Palerm, Sicília, Muntanyes de Madonie, al Piano Zucchi (37°54'01"N 13°59'40"E), en pastures àrides amb *Thapsia garganica*, en terreny calcari, 1000 m, 11/05/1995, leg. G. Venturella, holotipus a l'Herbarium Mediterraneum (PAL).

**CARÀCTERS DIFERENCIALS RESPECTE LA VARIETAT TIPUS:**

Els nostres exemplars recollits sobre *Thapsia sp.* encaixen dins de la variabilitat macroscòpica observada a la varietat tipus. Sovint (però no sempre) presenten un port robust, i la cutícula de color bru fosc, de vegades amb tonalitats grisènques.

Espores hialines, subel·líptiques, llises, gutul·lades (8,5)9,5-11,9(14,3) × (4,0)5,0-6,0(6,8) µm Q=(1,6)1,8-2,1(2,4); Me= 10,7 ±0,49 × 5,51 ±0,2. Basidis 39,9-46,6 × 7,5-9,2µm . La cutícula també presenta hifes terminals amb la pigmentació característica.



**Fig. 16:** Microscòpia de *Pleurotus eryngii* var. *thapsiae* (UBCC-1539) .

### HOSTES:

Hoste típic: *Thapsia garganica*.

### ALTRES MESURES I INFORMACIÓ BIBLIOGRÀFICA ADDICIONAL:

Espores: 9,8-13,6 × 4,6-7,3 μm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)

Basidis: 32-54 × 6-9 μm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)

Queilocistidis: Rars (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001).

### OBSERVACIONS:

L'autor argumenta que els caràcters que separen la varietat *Thapsiae* de la resta són els carpòfors menors i més foscos, la fructificació primaveral, l'altitud a on fructifica, i l'hoste.

Les il·lustracions de la microscòpia en el treball descriptiu (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2002) són els mateixos dibuixos que els publicats en treball descriptiu de la varietat *elaeoselini* (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000), amb modificacions menors (esborrat o canvi de posició d'alguns elements, voltejat horitzontal o vertical, etc.).

Els resultats moleculars presentats pel mateix autor en altres treballs (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001) recolzarien el separar la varietat *Thapsiae* com a tàxon independent de les varietats *ferulae* i *eryngii*, ja que els arbres filogenètics obtinguts per RAPD i RAPD + isoenzims agrupen els exemplars recollits sobre *Thapsia* en un grup independent. Cal tenir en compte però, que aquest grup resta molt proper amb aquells exemplars associats a *Elaeoselinum asclepium*, i que els valors bootstrap i jackknife dels clades que separen aquest grup són molt baixos (<40%).

No coneixem cap altre treball de taxonomia ni de filogènia molecular d'altres autors que aportin més dades per a aquest tàxon.

### LLISTAT DE RECOL·LECCIONS I AÏLLATS AL BANC DE CULTIUS:

- ITÀLIA -

*Sicília*

- Palermo, Isnello; Parco delle Madonie, Pianno Zucchi, 1100 m, UTM 33S4124194, explanada pasturada amb *Thapsia garganica*., s/*Thapsia garganica*, 23/04/2008, leg.: EG, Herb. i C.cult.: UBCC-1442c, (Me = 10,8 × 5,5 μm ; Qe = 2), 1444c. Íbidem, 24/04/2008, leg.: EG, Herb. i C.cult.: UBCC-1445c (s/*Thapsia garganica*, Me = 10,8 × 5,7 μm ; Qe = 1,9), 1447c

(s/cf *Thapsia garganica*), 1449 (s/cf *Thapsia garganica*). Íbidem, sobre una planta viva sense identificar, amb roseta de fulles semblants a *Malva* o *Alchemilla*, de carpòfor macroscòpicament molt similars a UBCC-1444, 23/04/2008, leg.: EG, Herb. i C.cult.: UBCC-1443 (Me =  $10,6 \times 5,3 \mu\text{m}$  ; Qe = 2). Íbidem, Collit al peu d'una *Cachrys ferulacea*, 24/04/2008, leg.: EG i M.E. Pérez-Bonfils, Herb. i C.cult.: UBCC-1446c (Me =  $10,9 \times 5,2 \mu\text{m}$  ; Qe = 2,1). Íbidem, 1100 m, Zona amb *Thapsia* i *Eryngium*, 19/04/2009, leg.: LG i TM, Herb.: UBCC-1536 i 1537. • (cf.) Palermo, Isnello; Parco delle Madonie, Pianno Zucchi, 1100 m, UTM 33S4124194, sobre rel de al·liàcia, probablement *Allium sp.*, 24/04/2008,; leg.: EG, Herb.: UBCC-1448 (Me =  $11,1 \times 5,2 \mu\text{m}$ , Qe = 2,1). • (cf.) Palermo, Isnello; Parco delle Madonie, Pianno Zucchi, UTM 33S4124194, sobre rel de *Taraxacum sp.*, 24/04/2008, leg.: EG, Herb.: UBCC-1450 (Mitjana esporal  $11,3 \times 5,1 \mu\text{m}$ , Qe = 2,2). • Palermo, Isnello; Parco delle Madonie, Plana de la Montanina, UTM 33S4124193, Zona amb *Thapsia* i *Eryngium*, 19/04/2009, leg.: LG i TM, Herb.: UBCC-1538, 1539 (Me =  $11,03 \times 5,59 \mu\text{m}$ , Qe = 1,98), 1540 i 1541 (Me =  $9,99 \times 5,25 \mu\text{m}$ , Qe = 1,91). • Palermo, Isnello; Parco delle Madonie, més avall de la Plana de la Montanina, UTM 33S4114193, zona amb *Thapsia* i *Eryngium campestre*, 19/04/2009, leg.: LG i TM, Herb.: UBCC-1542 (s/*Thapsia garganica*), i 1543 (Me =  $10,99 \times 5,68 \mu\text{m}$ , Qe = 1,94) a 1545. • Palermo, Isnello; Parco delle Madonie, carretera que baixa del Piano Zucchi cap al refugi Piero Merlino, UTM 33S4144192, prats amb *Thapsia*, 19/04/2009, leg.: LG i TM, Herb. i C.cult.: UBCC-1546c (s/ *Thapsia garganica*, Me =  $10,60 \times 5,52 \mu\text{m}$ , Qe = 1,92), 1547c (s/ *Thapsia garganica*), 1548 i 1549.



**Fig. 17:** *Pleurotus eryngii* var. *thapsiae* (=ferulae) UBCC – 1537, 1538 i 1539, sobre *Thapsia garganica*. Foto: Laura Ganzer.



**Fig. 18:** *Pleurotus eryngii* var. *thapsiae* (=ferulae) UBCC – 1542, sobre *Thapsia garganica*. Foto: Laura Ganzer.



**Fig. 19:** *Pleurotus eryngii* var. *thapsiae* (=ferulae) UBCC - 1446, sobre *Cachrys ferulacea*.  
Foto: Enric Gracia.

***Pleurotus eryngii* var. *tingitanus* Lewinsohn** (Lewinsohn, D., Wasser, S. P. et al., 2002)

**DIAGNOSI:**

*A tipo (P. eryngii var. eryngii) differ: Pileus 6,5-26 cm latus. Basidia tetrasterigmata 23-33 × 8-11 μm, clavate. Cheilocystidia 24-43 × 9-16 μm. Sporae 10-15,8 × 5,0-7,9 μm, cylindratae, ellipsoideae, hyalinae.*

**DESCRIPCIÓ ORIGINAL:**

Barret de 6,5-26 cm de diàmetre, carnós, inicialment hemisfèric, més tard pla i totalment expandit a còncav, lleugerament deprimit al centre, amb marge involut, de vegades persisteix enrotllat, o lobulat o fragmentat; superfície llisa en els exemplars joves, radialment fibril·losa o amb esquàmules adherents, especialment vora el marge, que de vegades esdevé areolada de forma dispersa al marge, de color uniforme, cuir pàl·lid, bru ocraci, crema. Cutícula del barret consisteix en hifes septades de color bru ocraci, crema, de paret prima, cilíndriques i septades, de 3-16μm de diàmetre i amb fíbules.

Làmines: decurrents, sovint lleugerament anastomosades vora la cama, força primes, fins a 10mm de llarg, de color crema a la joventut, crema argilós, més tard de color crema rosat pàl·lid, amb un marge lleugerament brunenc. Trama de es làmines monomítica, amb hifes generatives densament entreteixides, 3-13μm de diàmetre, de paret prima, amb fíbules. Basidis: tetraesterigmats, 23-33 × 8-11 μm, clavats. Queilocistidis: 24-43 × 9-16μm, irregularment clavats, heterogèniament distribuïts (sovint hi ha parts senceres de l'aresta de la làmina que no en tenen). Esporada de color blanc (en fresc), més tard lleugerament ocràcia. Basidiòspores: (10)12-15(15,8) × (3,8)5-7,2(7,9)μm, hialines, oblongues a cilíndriques.

Cama: 1,3-12 × 1,5-3,8 cm, subcentral a excèntrica, rarament central, cilíndrica, afuada de l'àpex a la base, de color blanquinós crema, ocràcia, llisa a subpubescent amb esquàmules. Carn sòlida, elàstica, blanquinosa, que esdevé groguenca; sabor moderat, amb olor semblant a l'anís.

Cultius micelians: Pigments de color rosa a groc taronja, especialment en cultius micelians monocariòtics. Colònies majoritàriament amb un miceli aeri llis i poc compacte. Taxa de creixement del miceli aproximadament de 4,5 mm / dia.

Aquesta nova varietat es troba morfològicament associada a *P. eryngii* var. *ferulae*, però difereix en la mida esporal, les característiques micelians, la taxa de creixement del miceli, l'hàbit dels basidiomes, la planta hoste associada i l'ecologia. Les dades de *P. eryngii* var. *ferulae* emprades en la comparació han estat elucidades a partir de la literatura precedent (Hilber, O., 1982; Hilber, O., 1977; Bas, C. i Boeckout, T., 1998; Krisai-Greilhuber, I. i Voglmayr, H., 1995).

**MATERIAL TIPUS:**

Israel, fonts de Sataf, a les muntanyes de Judea, associat amb *Ferula tingitana*, 02/02/1999, leg. i det.: L. Lewihnsohn, Herb.: INST. Evolution (HAI) N-3399.

**ALTRES CARÀCTERS I INFORMACIÓ ADDICIONAL:**

No coneixem cap altre treball que aporti més informació per a aquesta varietat.

**OBSERVACIONS:**

Segons l'autor, la localitat del tipus és l'única coneguda a on creix *P. eryngii* sobre *Ferula tingitana*, mentre que a tota la resta de localitats prospectades en el treball, l'hoste és *Ferula communis* (Lewinsohn, D., Wasser, S. P. et al., 2002). La descripció està basada en 11 carpòfors recollits en aquella localitat.



***Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* C.J. Mou** (Mou, C., Cao, Y. et al., 1987).

**DIAGNOSI:**

*Pileus spathulatus, flabeliformis, squamulosus 15-5 × 15-9 cm, albus, cum maculis-cremeis passim, margine involutus, in medio convexus, siccus. Contextus albus, crassus. Lamellae 1-2mm distantiae, circa marginem cineraceae, sed circa stipes stramineae, sparsae decurrentes. Limes lamellarum undulatus et laceratus. Stipes gracilis, 7-11 cm longus, 1-3 cm aequicrassus, cylindricus, farctus lateralis. Sporae sine colore, cylindratae vel anguste ellipticae, guttulate, 13.75-8.75 × 5-6.25 μm. Hab: In foliis viis Ferulas, districtus Tuo-liensis, regio autonoma Xinjiangensis, C.J.Mou (K005), 1983 V 9. Typus in XIBSDS (Xingiang Institute of Biology, Soil and Desert Science) conservatur.*

**DESCRIPCIÓ (TRADUCCIÓ DE LA DIAGNOSI, DONAT QUE L'ORIGINAL ÉS EN XINÈS):**

Píleu espatulat a flabel·lat, esquamulós, de 5-15 × 9-15 cm, blanc, amb taques de color cremós. Marge involut, convex al centre, sec. Carn blanca, carnosa. Làmines separades (1-2mm), cendroses prop del marge, de color palla prop de la cama, lleugerament decurrents. Marge de les làmines ondulat i lacerat. Estípit gràcil, 7-11 cm de llarg, 1-3 cm de diàmetre, cilíndric, ple i lateral. Espores hialines, cilíndriques a lleugerament el·líptiques, gutul·lades, 8,75-13,75 × 5-6,25μm. Hàbitat: Entre fèrules.

**MATERIAL TIPUS:**

Districte de Tuo, regió autònoma de Xingjiang, a 850 m, 9/5/1983 sobre *Ferula ferulaeoides* (Steud) Korov. Herb XIBSDS-K005.

**HOSTES:**

Hostes típics:

- *Ferula ferulaeoides* (Steud.) Korov. (Mou, C., Cao, Y. et al., 1987);
- *Ferula sinkiangensis* K.M. Shen (Zhang, J., JinHuang, C. et al., 2006).

Hostes dubtosos:

- *Ferula ovina* (Ravash, R., Shiran, B. et al., 2010, identificats com "*P. nebrodensis* s. lato")
- *Ferula assa-foetida* (Ravash, R., Shiran, B. et al., 2010, identificats com "*P. nebrodensis* s. lato")

**ALTRES CARÀCTERS I INFORMACIÓ ADDICIONAL:**

Espores: 10,8 - 14 × 4,8 - 6 μm (Kawai, G., Babasaki, K. et al., 2008)

## OBSERVACIONS:

Els aïllats de carpòfors blancs recollits sobre *Ferula spp.* a la Xina i altres contrades orientals han estat tradicionalment identificades com a *P. nebrodensis*. Els estudis més recents (Kawai, G., Babasaki, K. et al., 2008) apunten a considerar aquestes recol·leccions com a *P. eryngii* var. *tuoliensis*, en base als resultats d'intercompatibilitat i les seqüències parcials obtingudes dels fragments ITS i IGS.

Els resultats d'aquesta recerca mostren que els aïllats monocariòtics de *P. eryngii* var. *tuoliensis* tenen compatibilitat amb els aïllats de *P. eryngii* var. *ferulae* i *P. eryngii* var. *eryngii* d'origen xinès. En canvi, els aïllats de *P. nebrodensis* de Sicília només tenen compatibilitat amb els aïllats de *P. eryngii* var. *eryngii* d'origen Xinès. Les seqüències de IGS i ITS agrupen els aïllats de *P. eryngii* var. *tuoliensis* en un grup separat de *P. eryngii* i dels *P. nebrodensis* de Sicília (Kawai, G., Babasaki, K. et al., 2008). L'estudi no inclou cap aïllat assignat a *P. eryngii* var. *elaeselini*.

Curiosament, a l'estudi de Kawai, G., Babasaki, K. et al. apareix una soca recollida sobre *Cachrys ferulacea* a la península italiana (soca DS201), de carpòfors blancs en cultiu i que s'agrupa plenament amb la resta d'aïllats assignats a la var. *ferulae*, tant pel que fa a mida esporal, compatibilitat de monocariònt i seqüències ITS i IGS. Aquesta soca presenta compatibilitat parcial amb els aïllats xinesos assignats a la var. *tuoliensis*.

Aquests resultats contrasten amb els resultats de (Bao, D. P., Kinugasa, S. et al., 2004), que mostren incompatibilitat entre els aïllats monocariòtics de *P. eryngii* i *P. cf. nebrodensis* d'origen asiàtic; cal tenir en compte que en aquest estudi només s'empren un únic aïllat de cada varietat, i no es fa referència a l'hoste ni a material en micoteca.

## ***Pleurotus nebrodensis* Inzenga (Inzenga, G., 1863)**

=? *Omphalomyces mutilatus* Batt. (Battarra, G. A., 1759)

### **NOMS POPULARS:**

Italià: Fungiu di dabbisu, fungiu di basiliscu.

### **DIAGNOSI:**

*Ag. magnus caespitosus, albus, vel dilute sub-flavus, pileo carnoso margine revoluta, lamellis confertis lineari-lanceolatis, liberis, decurrentibus in stipile subalterali, versus basim permixtis. Fungi umbilicum exprimentes, simul albi C. B. P. - Fungi plures simul, albi, ad arborum radices, esculenti J.B. - Cup. H. Cath. pag. 80.*

*Pileus junior laevigatus, albus, subumbonatus, demum dilute flavus, irregulari modo ex epidermide diffracta rimoso-tessulatus, gregarius, caespitosus, aliquando ob coacervata in sitaque individua ramosos: 2-5 unc. latus, et ultra . - Stipes rare centralis, supra dilatatus atque in pileo diffusus, brevis, subnullus, basi attenuatus. Lamellae confertae tenues, lineari-lanceolatae, longe decurrentes sub striarum forma versus stipitis basim productae . Lamellulae numerosae, breviores lanceolatae, longiores postice rotundae. Cara fibrosa, subtenax, saporis gratissimi, ac odoris farinae molitae, albida, sicca dilute flava. Sporidia alba.*

*Agarico Eryngii DC. characteribus variis consimilis, sed magnitudine, colore albido pilei sporidiorumque, stipite brevior, lamellis confertis, angustis, lineari-lanceolatis annino distinctus.*

*In montium culminibus Siciliae, Nebrodis magis obvia e radicibus marcescentibus Elaeoselini Asclepii Bert., Opopanacis Chironii Koch. etc . Aprilii, Majo nive dilabente. Esculentus!*

### **DESCRIPCIÓ ORIGINAL (TRADUCCIÓ DE LA DIAGNOSI):**

Bolet gran, cespitós, blanc o de color groguenc pàl·lid, de barret carnós, marge involut, làmines serrades linear-lanceolades, lliures, decurrents, en un estípit sublateral, anastomosades a la base. Bolet umbilicat, de color blanc CBP. – Bolets en pocs exemplars, blancs, a les rels d'arbres, comestible J.B. – Cup H. Cath. pag. 80.

Barret llis a la joventut, blanc, subumbonat, més tard de color groc pàl·lid, i amb l'epicutis clivellada de forma irregular, gregari, cespitós, de vegades units en individus ramificats, de 2-5 unces o més. Cama rarament central, eixamplat a la part superior i confluent amb el barret, curta, subnul·la amb la base atenuada. Làmines subtilment serrades, linear-lanceolades, llargament decurrents i formant estries a la base del barret. Lamèl·lules nombroses, breus i lanceolades, les més llargues arrodonides en l'extrem posterior. Can fibrosa, lleugerament tenaç, de sabor molt agradable, amb olor a farina mòlta, blanca a groc molt pàl·lid. Esporada blanca. *Pleurotus eryngii* D.C. té caràcters molt similars, però es distingeix la mida, el color blanc del píleu i de l'esporada, la cama breu, les làmines serrades, estretes, linears a lanceolades . Es troba als cims de les muntanyes

de Sicília, a les muntanyes del Nebrodi, especialment en rels marcescents de *Elaeoselinium asclepium* Bert., *Opopanax chironium* Koch, per etc., a l'Abril, i Maig si la neu ja és fosa. Comestible!

#### **MATERIAL TIPUS:**

Lectotip (designat per Venturella, G., 2000): "figura núm. 1, il·lustrant la secció de un exemplar de mida mitjana, en Inzenga (1863. 162, f.1)".

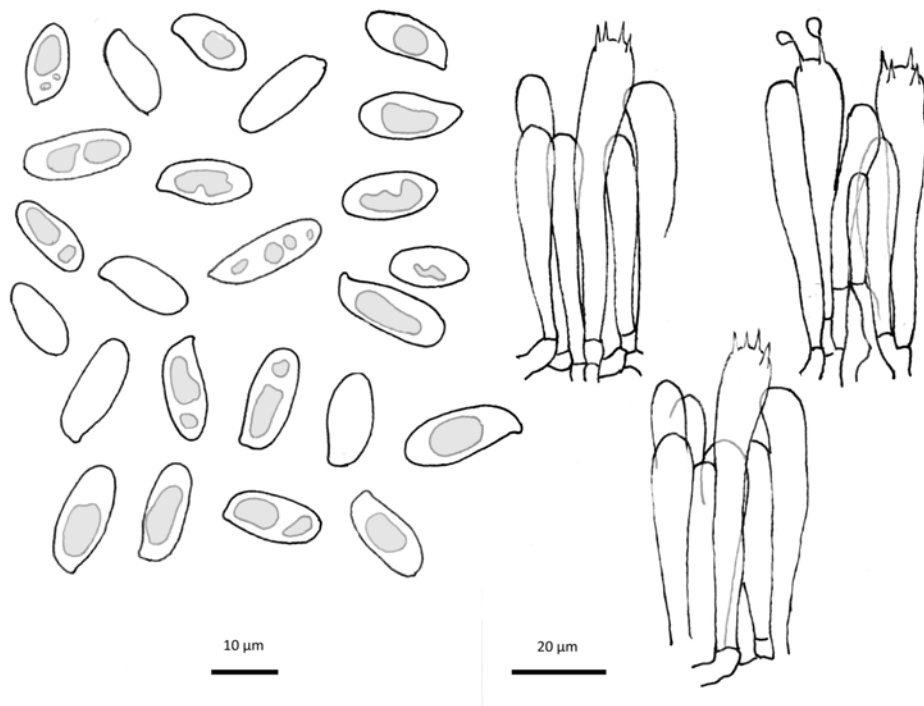
Epítip (designat per Venturella, G., 2000): "*Agaricus nebrodensis* Inzenga, e terra panormitana ex dono Inzenga, Bot. prof. panorm. (Herb. Mus. Paris., *Agaricus nebrodensis* PC)". Herbari: Herbari, Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle France (PC0088600).

Segons Venturella, G., 2000, de Inzenga es coneixen un exemplar determinats com a *P. nebrodensis* a l'Erbario Crittogamico Italiano, ser. II, ("en FI"), un duplicat del mateix dipositat a "GE" (Gènova?), i dos exemplars més dipositats a "GDOR".

#### **DESCRIPCIÓ EN BASE A LES NOSTRES DESCRIPCIONS**

Bolet de color blanc, molsut, carnós. Baret convex, aplanat en la maduresa, amb el marge involut, rarament estès. Cutícula de color blanc llisa, de vegades tenyida de color ocre o bru pàl·lid, fins i tot clivellada en exemplars adults, però mai amb cap traça de les fibril·les radials adnades característiques de *P. eryngii*. Làmines molt decurrents amples, i sovint de perfil irregular, de vegades amb algunes anastomosi a la base, de color blanc a crema pàl·lid, amb lamèl·lules abundants. Cama blanca, plena, cilíndrica, excèntrica a central, unida en el peu amb restes d'una rel en descomposició, generalment *Cachrys ferulacea*. Carn fibrosa, ferma, amb olor suau, agradable, fúngic, i sabor dolcenc. Esporada blanca.

Espores hialines, el·líptiques o dacrioides (en forma de llàgrima irregular), llises, gutul·lades  $(9,2)10,6-16,2(19,2) \times (4,9)6,4-7,8(8,9)\mu\text{m}$   $Q=1,5-2,3$ ;  $Me=13,6\pm 1,7 \times 7,0\pm 0,2$ . Basidis  $47,2-64,3 \times 8,7-10,0\mu\text{m}$ . No hem observat cistidis rellevants.



**Fig. 20:** Microscòpia de *Pleurotus nebrodensis* (UBCC-1331).

**HOSTES I ECOLOGIA:**

Hoste típic: *Cachrys ferulacea* (L.) Calest.

En la descripció original d'Inzenga, *Pleurotus nebrodensis* es troba citat sobre "*Elaeoselinum asclepium*, *Opopanax chironium*, etc". Segons Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000 i Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001, les recol·leccions realitzades sobre aquests altres hostes es corresponen a *P. eryngii* var. *elaeoselini*, al igual com ocorre amb les recol·leccions de carpòfors blancs del complex efectuades a la Península sobre *Thapsia villosa* i *Elaeoselinum gummiferum* (Venturella, G., 2000).

Hostes dubtosos:

- *Diplotaenia cachrydifolia* (Heim, 1960; Saber, 1990, segons cita Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)
- *Elaeoselinum asclepium* (Inzenga, G., 1863)
- *Elaeoselinum gummiferum* (Venturella, G., 2000)
- *Eryngium alpinum* (Offner, J. i Heim, R., 1927)
- *Laserpitium gallicum* (Offner, J. i Heim, R., 1927)

- *Laserpitium latifolium* (Offner, J. i Heim, R., 1927)
- *Laserpitium siler* (Offner, J. i Heim, R., 1927)
- *Laserpitium nestleri* (Oria de Rueda, J. A., Martínez de Azagra, A. et al., 1991),
- *Opopanax chironium* (Inzenga, G., 1863)
- *Prangos ferulacea* (Hilber, O., 1982, segons cita Krisai-Greilhuber, I. i Voglmayr, H., 1995)
- *Thapsia villosa* (Venturella, G., 2000)

Altitud: 1200-2000 m (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000)

**ALTRES CARÀCTERS I INFORMACIÓ ADDICIONAL:**

- Espores:** 10,5-15 × 5-6,5 μm (Battiato, A., Napoli, M. et al., 1987, a partir d'exemplars sobre *Cachrys ferulacea*, entre 1200-1600 m.).  
 9,5-13,5 × 5-6 μm (Candusso, M. i Basso, M. T., 1995b, a partir d'exemplars recollits a Fontanive, Pordenone, Castelbuono, Madonie, Sicília).  
 15-18 × 6-8 μm Q=2.1-2.5 (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000, a partir d'exemplars de l'herbari E.M. Fries, UPS i l'epítip designat pel propi autor).  
 13,2-17,4 × 5,5-8,2 μm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)  
 11-16 × 5-8 μm (Kawai, G., Babasaki, K. et al., 2008)  
 12,5-15,1 (-18) × 5,2-6,1 μm (Gargano, M. L., Saitta, A. et al., 2011, a partir de noves recol·leccions en les localitats tipus de Sicília)
- Basidis:** 40-68 × 7,5-10 μm (Candusso, M. i Basso, M. T., 1995b).  
 33-53 × 7-11 μm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)  
 40-50 × 10-11,5(14) μm (Gargano, M. L., Saitta, A. et al., 2011, a partir de noves recol·leccions en les zones tipus de Sicília)
- Queilocistidis:** Cilíndrics a sinuosos, més o menys nodulosos a protuberants, sovint bífids (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000, a partir d'exemplars de l'herbari E.M. Fries, UPS i l'epítip designat pel propi autor).  
 38-62 × 7-11 μm (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001)  
 50-60 × 6.2-7.5(9) μm, clavats, amb l'àpex mucronat o capitulat (Gargano, M. L., Saitta, A. et al., 2011, a partir de noves recol·leccions en les zones tipus de Sicília).
- Epicutis:** Hifes cilíndriques septades, 43-68 × 3,5-7 μm, amb nombroses fíbules. Hifes terminals 30-65 × 4-5 μm, amb pigment citoplasmàtic de color crema ocraci (Candusso, M. i Basso, M. T., 1995b).
- Ploidia (n):** 13 (Slézec, A.-M., 1984)

## OBSERVACIONS:

Donat que no es conserva el material tipus, el lectotip i l'epítip de *P. nebrodensis* han estat designats per (Venturella, G., 2000), a partir d'altres recol·leccions determinades pel propi Inzenga, per la seva similitud amb una figura del protòleg original.

Les mides esporals de l'epítip no s'esmenten en la seva designació, però sí han estat citades pel mateix autor en la discussió de la descripció de *P. eryngii* var. *elaeoselini*, publicada consecutivament el mateix any (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000). Aquestes mesures – més grans que les típiques per a les diferents varietats de *P. eryngii*, i un dels principals caràcters emprats per a la descripció de la var. *elaeoselini* com a tàxon diferent - són més grans que les citades en la bibliografia preexistent, i que les observades per nosaltres.

Segons Venturella, el plec que conté l'epítip conté dos exemplars mes, la mida esporal dels quals "corresponen al límit inferior de *P. nebrodensis*, però no s'han pogut observar els queilocistidis per tenir erosionada l'aresta de les làmines". Segons aquest autor, Inzenga originalment considerava *P. nebrodensis* i *P. eryngii* var. *elaeoselini* com una única entitat, i per aquesta raó, en un altre dels plecs d'herbari originals de Inzenga que encara es preserven (Herbari E.M. Fries, Upsala), els exemplars es corresponen per la seva microscòpia a la var. *elaeoselini* (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000).

Venturella no cita cap altra mesura esporal ni cap descripció microscòpica de *P. nebrodensis* en la designació del nou epítip, ni tampoc en les descripcions de les varietats *elaeoselini* i *thapsiae*.

Anys més tard, i sense entrar en consideracions taxonòmiques, el mateix Venturella junt amb altres autors, han publicat un nou treball amb una descripció complerta de *P. nebrodensis* a partir de noves recol·leccions en les localitats tipus de Sicília, aportant una mida esporal significativament menor ( $12,5-15,1 (-18) \times 5,2-6,1 \mu\text{m}$ ; Gargano, M. L., Saitta, A. et al., 2011), aquest cop sí coincidents amb les nostres mesures.

Els hostes originalment citats en la descripció de Inzenga són *Elaeoselinum asclepium*, *Opopanax chironium*, etc. Nogensmenys, gairebé tots els treballs posteriors coincideixen en considerar a *Cachrys ferulacea* com a l'hoste típic d'aquest tàxon. Venturella argumenta que Inzenga no va recollir en persona el material original, i que la identificació dels hostes on havia estat recollit és confusa, donat que es va fer a partir dels noms populars de la zona, i la interpretació que apareix en els treballs d'Inzenga no es correspon l'ús actual dels noms populars a Sicília (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000).

Tots els treballs de filogènia molecular coincideixen en separar els aïllats de carpòfors blancs associats a *Cachrys ferulacea* en un grup molt proper però ben diferenciat de la resta, bé sigui mitjançant minisatèl·lits i marcadors RAPD, (Gioia, T., Sisto, D. et al., 2005; Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001) AFLP i RFLP de seqüències associades a lacases i

Mn Peroxidases (Urbanelli, S., Della Rosa, V. et al., 2007), o seqüenciació de gens EF1 $\alpha$  i RPB2 (Rodríguez Estrada, A. E., Jimenez-Gasco, M. D. M. et al., 2010).

#### LLISTAT DE RECOL·LECCIONS I AÏLLATS AL BANC DE CULTIUS:

#### - ITÀLIA -

##### Sicília

• Palermo, Isnello; Parco delle Madonie, Piano Battaglia, 1650 m, UTM 33S4144194, En una dolicea amb *Cachrys ferulacea* i *Opopanax* sp, s/*Cachrys ferulacea*, 25/05/2007, leg.: EG; JML i LG, Herb.: UBCC-1330, 1331 (Me = 15,43  $\times$  7,00  $\mu$ m, Qe = 2,22). • Palermo, Isnello; Parco delle Madonie, camí entre Piano della Madonna i Pizzo Cervi, 1650 m, UTM 33S4104192, s/*Cachrys ferulacea*. Sòl argilòs, s/ *Cachrys ferulacea*, 23/05/2007, leg.: EG; JML i LG, Herb. i C.cult.: UBCC-1332c (Me = 13,48  $\times$  7,32  $\mu$ m, Qe = 1,85). • Palermo, Isnello; Parco delle Madonie, al peu del Pizzo Cervi, 1600 m, UTM 33S4094192, en una vessant rocosa plena de *Cachrys ferulacea*, sòl argilòs., s/ *Cachrys ferulacea*, 23/05/2007, leg.: EG; JML i LG, Herb. i C.cult.: UBCC-1333c, 1334c (Me = 11,33  $\times$  6,92  $\mu$ m, Qe = 1,64), 1336c, 1337c (s/ cf. *Cachrys*) i 1338c (rel no identificable). • Palermo, Isnello; Parco delle Madonie, pujada cap el Pizzo Carbonara, 1800 m, UTM 33S4144194, lloc rocallòs calcari amb *Cachrys ferulacea*. Sòl argilòs. s/ *Cachrys ferulacea*, 24/05/2007, EG; JML i LG, Herb. i C.cult.: UBCC-1340c (Me = 13,96  $\times$  6,79  $\mu$ m, Qe = 2,06). • Palermo, Isnello; Parco delle Madonie, Pianno Zucchi, marges del llac, 1350 m, UTM 33S4084192 s/*Cachrys ferulacea*, 23/04/2008, Leg. EG, Herb.: UBCC-1441.

#### AÏLLATS NO GEOREFERENCIABLES

• Aïllat dicariotitzat a partir de cultius monoesporals de UBCC-1330; C.cult.: UBCC-1460.  
• Aïllats monoesporals de UBCC-1330. C.cult.: UBCC-1461, 1466, 1467, 1468, 1469, 1470 i 1471. • Aïllat dicariotitzat a partir d'espores de UBCC-1331; C.cult.: UBCC-1459. • Aïllats monoesporals de UBCC-1331. C.cult.: UBCC-1462, 1463, 1464, 1465, 1472 i 1473.





**Fig. 21:** *Pleurotus eryngii* var. *nebrodensis* UBCC – 1332, sobre *Cachrys ferulacea*. Foto: J M. Lanau.



**Fig. 22:** *Pleurotus eryngii* var. *nebrodensis* UBCC – 1333 i 1334, sobre *Cachrys ferulacea*.  
Foto: J M. Lanau.



**Fig. 23:** *Pleurotus eryngii* var. *nebrodensis* UBCC – 1340, sobre *Cachrys ferulacea*. Foto: J M. Lanau.



**Fig. 24:** *Pleurotus eryngii* var. *nebrodensis* UBCC – 1340, sobre *Cachrys ferulacea*. Fotos: J.M.Lanau.

***Pleurotus fossulatus* (Cooke) Sacc.** (Saccardo, P. A., 1891)

sub. *Agaricus* (*Pleurotus*) *fossulatus* Cooke (Aitchison, J. E. T., 1888)

= *Dendrosarcus fossulatus* (Cooke) Kuntze, (Kuntze, 1898)

**DIAGNOSI:**

*Baghdis: 115, March 5, 1885.*

*A. pileo carnoso, compacto, subdimidiato, areolato diffracto, ochraceo-albo, glabro; stipite laterali, curvato, deorsum attenuato, longitudinaliter sulcato, subcrasso, solido, lamellis longe decurrentibus, sublatis, distantibus albis. Hab. ad Badghis Affghanistan*

*Pileus 5-7 cm. lat. stipes 4-5 cm long. 12-16 mm cr.*

**DESCRIPCIÓ (TRADUCCIÓ DE LA DESCRIPCIÓ LLATINA SEGONS SACCARDO, P. A., 1891):**

Barret carnós, compacte, subdimidiat, amb una arèola de color diferent, ocraci blanquinós, glabre; cama lateral, corbada, atenuada a la base, longitudinalment solcada, força carnosa, sòlida. Làmines molt decurrents, lleugerament separades, blanquinoses.

Píleu 5-7 cm de diàmetre, estípit 4-5 cm de llargada, i 12-16 mm de gruix.

**HOSTES:**

Les descripcions originals de Cooke i de Saccardo no especifiquen cap mena d'hoste vegetal.

Heim, R., 1960 i Saber, M., 1990 atribueixen a aquest tàxon les seves recol·leccions sobre *Diploaenia cachrydifolia*, a altes elevacions, a Iran.

**OBSERVACIONS:**

Segons Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001, les descripcions de Heim i Saber per a aquest tàxon són morfològicament molt similars a *P. eryngii* var *elaeoselini* i *P. nebrodensis*, i a manca d'un estudi més profund a partir de material recollit sobre aquests hostes, cal considerar-lo un tàxon de validesa dubtosa.

Ravash, R., Shiran, B. et al., 2010 (conjuntament amb G. Zervakis) han reincorporat aquest tàxon a la controvèrsia en un recent estudi de filogènia molecular per RAPD i seqüenciació de la regió ITS. En aquest estudi s'empren diverses seqüències de referència obtingudes de l'NCBI: tres d'elles identificades com a *P. fossulatus* (un d'ells originari de l'Índia), dues identificades com a *P. nebrodensis sensu lato* (aïllats a la Xina sobre *Ferula sinkiangensis* i que per tant correspondrien a *P. eryngii* var. *tuoliensis*), i dues més associades a aïllats europeus sobre *Eryngium*. Els 45 aïllats iranians estudiats es reparteixen en tres grups filogenètics clarament diferenciats; aquells recollits sobre *Ferula ovina* i *Ferula assa-foetida*, s'associen amb les seqüències identificades com a "*P. nebrodensis*

*sensu lato*”, mentre que una part dels aïllats sobre *Cachrys* s’associen amb el les seqüències de *P. fossulatus* i la resta (sobre *Smyrniopsis aucheri*, *Cachrys ferulacea*, *Kellusia odoratissima* i *Ferula ovina*, tots ells presentant tonalitats brunes en major o menor grau) s’associen amb les seqüències europees identificades com *P. eryngii*. Cap dels aïllats ni seqüències emprats s’acompanyen d’una descripció macroscòpica ni estan referides a material de micoteca, pel que és difícil extreure’n cap conclusió .

### 3.4.- Discussió

#### Banc de cultius

Les nostres prospeccions a camp a Catalunya, resta de la península i a Sicília ens han permès aïllar en cultiu pur un nombre representatiu de soques recollides sobre *Eryngium campestre*, *E. maritimum*, *Ferula communis*, *Elaeoselinum asclepium*, *Thapsia spp*, i *Cachrys ferulacea*. Aquests aïllats inclourien totes les varietats europees del complex *eryngii*, incloent-hi exemplars recollits a les localitats originals dels tipus per als tàxons descrits a Sicília. Manquen les varietats tingitanus, tuoliensis i els subgrups fil·logenètics recentment descrits que es troben en contrades orientals com Iran, la Xina o l'Índia.

En total hem pogut realitzar 285 recol·leccions del grup *eryngii*, dels quals s'han pogut aïllar i preservar en cultiu pur 99 aïllats (Taula 1). Malauradament, molts dels aïllats més antics no s'han pogut conservar fins a dia d'avui. Per garantir la continuïtat d'aquest banc de cultius, es pretén conservar tota la col·lecció de cultius per ultracongelació, tècnica que permet conservar-los de forma segura durant un període de temps molt més llarg sense necessitat de repicar-lo.

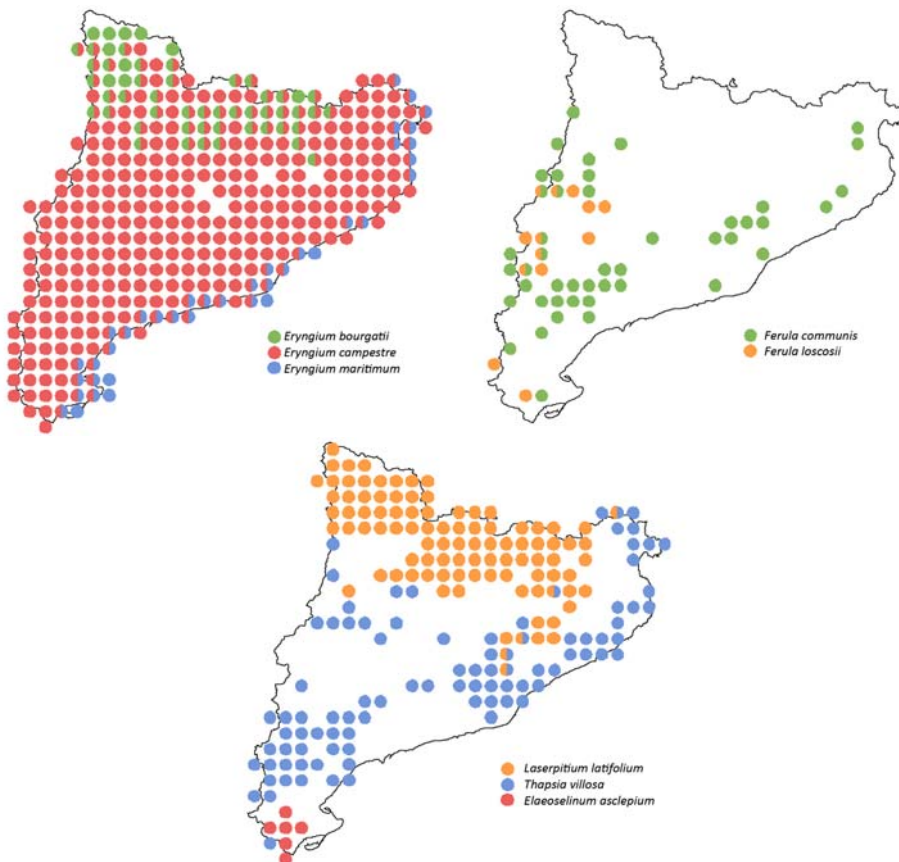
Varietat	Troballes	Localitats	Aïllades i conservades
<i>eryngii</i>	144	40	38
<i>ferulae</i>	82	22	35
<i>elaeoselini</i>	26	5	12
<i>thapsiae</i>	21	4	7
<i>nebrodensis</i>	12	5	7

**Taula 1:** Nombre de troballes associades a cada varietat i nombre d'aïllats conservats en cultiu pur a l'UBCC.

#### Distribució

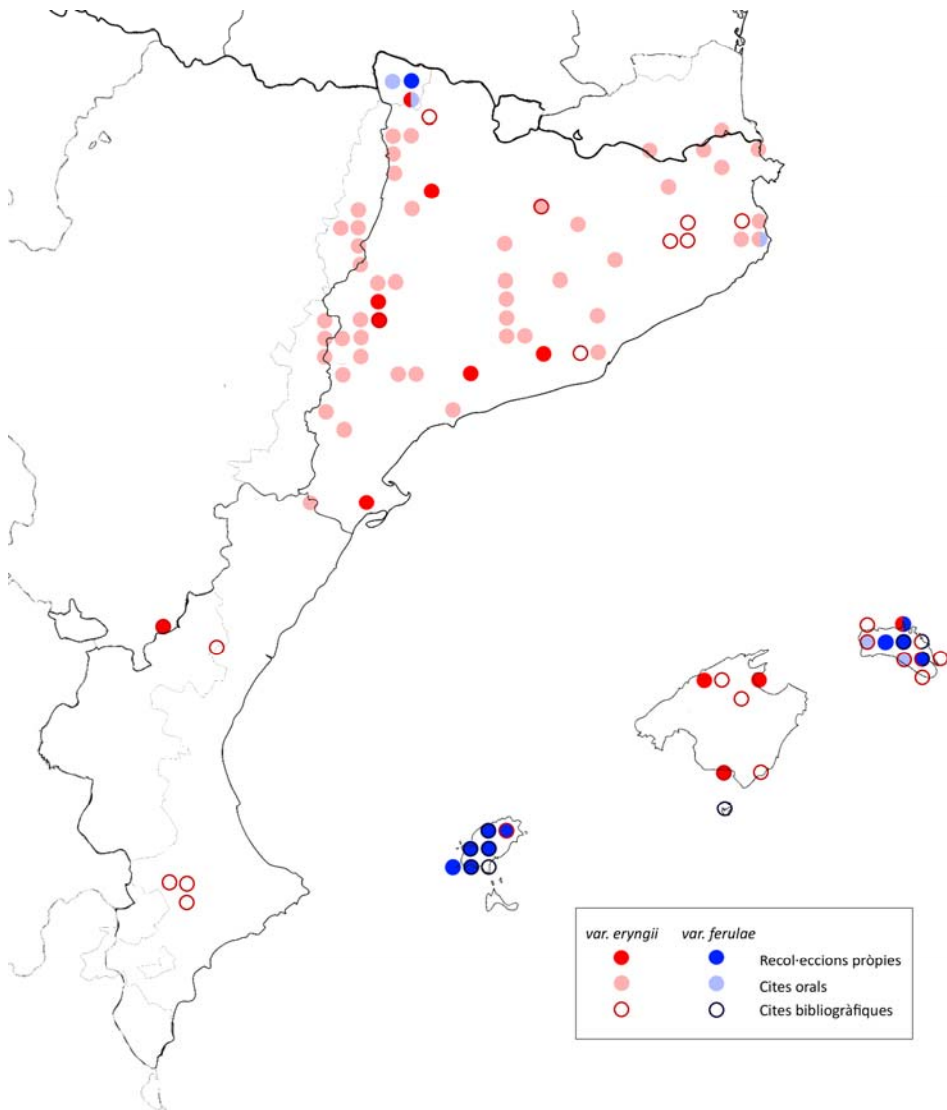
L'escàs nombre de troballes que hem pogut localitzar dins del Principat ens permeten constatar que actualment aquest és un bolet molt poc abundant a casa nostra. Al contrari que al centre de la Península Ibèrica, on el bolet es pot trobar molt més fàcilment i en major quantitat al llarg de grans extensions de terreny, a les nostres contrades el bolet tant sols es troba en localitats concretes. Tot i això, les aportacions d'aficionats que ens han arribat, gràcies als anuncis a través de societats micològiques i d'alguns diaris locals assenyalen que la distribució de la gírgola de panical s'estén força al llarg del principat, (Fig. 26).

Tot i les valuoses aportacions científiques en les darreres dècades, les dades que disposem avui dia pel que fa a corologia de fongs és molt escassa, especialment si es compara amb les dades disponibles de flora vascular. Aquestes dades, generalment publicades en forma de “catàlegs florístics” o llistes de citacions en revistes científiques d’ànbit regional, esdevenen excepcionalment útils per a estudis científics posteriors un cop es concentren en bases de dades públiques, com per exemple el Banc de Dades de Biodiversitat de Catalunya (Llistosella, J., 2012). Malauradament, el nombre de dades publicades per a fongs encara és massa reduït, i els plànols de distribució resultants son incomplets i només expressen un esbós de la distribució i freqüència reals del organisme, molt especialment en els casos de bolets freqüents o banals. Al contrari, nombrosos estudiosos i aficionats, sovint afiliats a societats micològiques recullen un volum substancial d’informació (fins i tot amb material de referència en micoteques particulars) que no necessàriament són publicats i per tant no queden reflectits en aquestes bases de dades.



**Fig. 3.25:** Distribució dels principals hostes del grup *eryngii* a Catalunya: *Eryngium* spp., *Ferula* spp., *Laserpitium latifolium*, *Thapsia villosa* i *Elaeoselinum asclepium* (modificat a partir de Font, X., 2012).

Malgrat que la consulta oberta que hem realitzat (inèdita fins ara) ha estat breu i tant sols circumscrita a les societats micològiques catalanes i a uns pocs diaris locals, hem pogut recollir un volum de cites sorprenent (70 localitats diferents per a la varietat *eryngii* i 11 per a la varietat *ferulae*, la majoria no publicades). Tot i que només podem donar un grau de certesa relativa a una part important d'aquestes cites (ja que generalment no poden ser referides a material en micoteca o a publicacions escrites), entenem que aporten una informació valuosa i prou fiable.



**Fig. 3.26:** Aproximació a l'àrea de distribució de *P. eryngii* var. *eryngii* i var. *ferulae* als Països Catalans (només disposem de cites "orals" per al Principat, Franja de Ponent i Illes Balears).

El principal hoste de la gírgola de panical, *Eryngium campestre* L. és una planta present a la major part del Principat (Fig. 25), i conjuntament amb *E. bourgatii* i *E. maritimum*, cobreixen gairebé tot el rang altitudinal a les nostres contrades.

Tot i no disposar d'un mostreig homogeni al llarg del territori, podem veure com dins de l'àrea dels països catalans, la varietat tipus (*P. eryngii* var. *eryngii*) també es troba força estesa al llarg del territori, de la mateixa manera que ho fa el seu hoste principal, *Eryngium campestre*. També hem localitzat troballes sobre card marí (*Eryngium maritimum*) en dunes ben conservades de Mallorca, però no en altres zones de dunes protegides però menys ben conservades, com les de El Prat o l'Empordà.

Tot i que molt menys freqüents, també hem fet troballes de *P. eryngii* var. *ferulae* sobre *Ferula* spp., en aquest cas localitzades a les illes de Menorca i Eivissa. També ens han estat citades troballes per part de l'Associació de Micologia Joaquim Codina, en determinats punts de l'Empordà. *Ferula communis* i *F. loscosii* també es troben en d'altres localitats del Principat (sempre puntuals), pel que és possible que l'àrea de distribució d'aquesta varietat sigui més estesa.

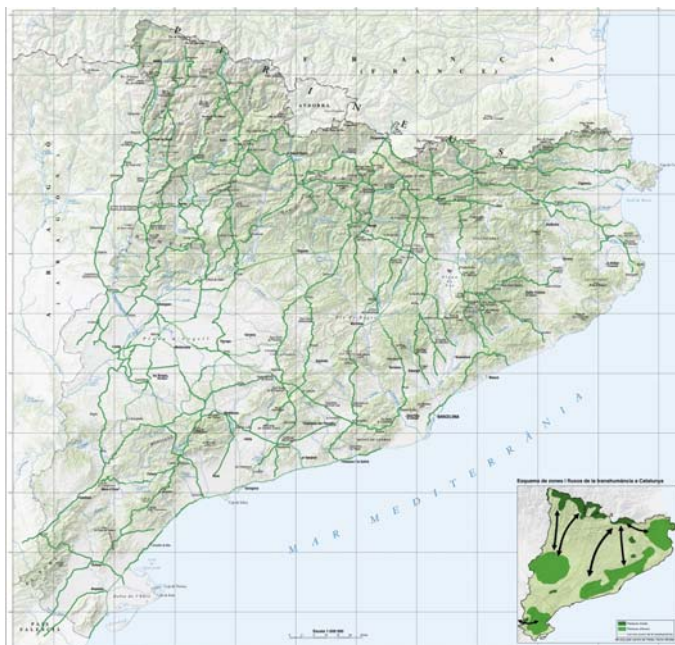
A Catalunya també apareixen altres hostes potencials del complex *eryngii*, en especial *Thapsia villosa*, *Laserpitium latifolium* i en unes poques localitats properes Ports de Beseit, *E. asclepium* (Fig. 25). Nosaltres només hem localitzat puntualment exemplars del complex *eryngii* de color blanc a la Vall d'Aran, concordants amb les troballes comunicades per Joan Montón (Institut d'Estudis Ilerdencs, sub. *P. eryngii* var. *thapsiae*) i Miquel Bolea (Societat Catalana de Micologia, sub. *P. nebrodensis*) a la mateixa regió. Les nostres recol·leccions a la Vall d'Aran recorden les de *P. nebrodensis* sobre *Cachrys ferulacea* - excepte per la presència de traces de color bru molt poc evidents a la cutícula -, però coincideixen microscòpicament amb la varietat *ferulae*, amb espores significativament menors que les observades per a les varietats *elaeselini* o *nebrodensis* (vegis l'apartat recol·leccions crítiques, més endavant).

## **Vincle amb la pastura**

La gran majoria dels llocs on hem realitzat recol·leccions de *P. eryngii* han estat erms, carrerades (camins de transhumància), guarets i conreus en desús, on molt sovint hem observat indicis de pastura, generalment d'oví i cabrum.

Tot i que les dades recollides no ens permeten establir un vincle directe entre la presència del bolet i la pastura, creiem força plausible que aquesta afavoreixi el desenvolupament de *P. eryngii*, tant per l'adob aportat pel bestiar com pel control que exerceix vers la resta de plantes presents, generalment amb més creixement i de caràcter més invasiu que el card panical. En tot cas, l'esbós obtingut en la distribució de la gírgola de panical al Principat sembla força compatible amb el plànol de les principals zones de pastura i carrerades al Principat (Trepal, E. i Vilaseca, A., 2010b).





**Fig. 27:** Plànol de les principals rutes transhumants i zones de pastura a Catalunya. Extret de: Trepat, E. i Vilaseca, A., 2010a.

De ser així, l'abandó de les pràctiques transhumants al Principat podrien explicar en part els indicis de retrocés pel que fa a la presència de la gírgola de panical. Actualment les carrerades es troben protegides per la legislació vigent (Llei 3/1995 de vies pecuàries), que les considera inalienables, però la seva aplicació no ha estat prioritària i resta en entredit (Trepat, E. i Vilaseca, A., 2010b).

### **Taxonomia del grup**

El complex *eryngii* comprèn un conjunt d'organismes que creixen sobre un ampli ventall d'hostes, i que s'han adaptat a sòls i entorns força diferents (dunes de platja, erms i entorns ruderals, prats d'alta muntanya, etc.).

En el cas que ens ocupa, és especialment interessant identificar aquelles entitats genèticament diferenciades que conformen el grup. Probablement aquestes entitats s'han adaptat a uns determinats hostes i entorns i per tant presentaran comportaments biològics marcadament diferents. S'ha comprovat, per exemple, que els aïllats de les varietats *eryngii*, *ferulae* i de *P. nebrodensis* mostren patrons de restricció (RFLP) característics i diferents per als gens de les lacases, mentre que les Mn-peroxidases presenten un polimorfisme específic que diferencia clarament els isoenzims dels aïllats de *P. nebrodensis* de la resta (Urbanelli, S., Della Rosa, V. et al., 2007). Donat que lacases i peroxidases intervenen en els mecanismes de defensa i de degradació de la paret vegetal,

és probable que aquestes diferències expressin adaptacions específiques de cada grup als seus hostes corresponents .

Un cop aquestes entitats hagin estat identificades, i es disposi d'un banc d'aïllats prou representatiu de cadascuna d'elles, serà possible caracteritzar el tipus i necessitats de creixement de cada varietat, fer una selecció de soques, i a la fi poder adaptar el procediment, l'hoste i la soca de *P. eryngii* a les condicions de cada cultiu.

Malauradament, l'actual manca de consens en la classificació taxonòmica de les diferents varietats no ajuda gens en aquest sentit. Tal i com hem pogut observar en les nostres troballes, és difícil poder establir un criteri en base a l'aspecte macroscòpic que discerneixi grups clarament separats entre sí. La varietat tipus de *P. eryngii* té una gran plasticitat pel que fa a mida, forma i coloració del carpòfor que cobreix gairebé tot l'espectre del grup, a excepció de les formes de color blanc. Tradicionalment s'ha emprat l'hoste on creix el bolet com a argument per a diferenciar varietats diferents. Això presumeix com a mínim que existeix un cert grau d'especificitat de cada varietat del grup vers determinats hostes, fet que per ara no ha estat provat. Nosaltres hem observat de forma freqüent la coexistència de diversos hostes del grup (p. ex. *Cachrys*, *Thapsia* i *Eryngium* spp.) en un mateix lloc, pel que és poc probable que aquestes barreres siguin tant estrictes. En tot cas, això dificulta molt la identificació dels exemplars que s'hi recullen.

#### **ESTUDIS D'INTERCOMPATIBILITAT I FILOGÈNIA MOLECULAR**

Estudis precedents mostren que com a mínim existeix un grau d'intercompatibilitat parcial entre les diferents varietats del grup, inclòs *P. nebrodensis* (Zervakis, G. i Balis, C., 1996; Lewinsohn, D., Wasser, S. P. et al., 2002; Kawai, G., Babasaki, K. et al., 2008). Atenent-nos al concepte biològic d'espècie (Mayr, E., 1963), aquest fet recolzaria el considerar que el complex *eryngii* està format per una única espècie. A més, la distància genètica entre els aïllats europeus de les varietats *eryngii*, *ferulae* i *P. nebrodensis* és reduïda, pel que hi ha un consens general en que aquest grup es troba en un procés de diferenciació genètica, promogut per factors ecològics (substrat, clima) i l'aïllament geogràfic, però que encara manté un important flux d'intercanvi genètic entre poblacions (Gioia, T., Sisto, D. et al., 2005; Mang, S. M. i Figliuolo, G., 2010). De tota manera, en el cas de fongs el concepte biològic d'espècies és controvertit i es considera de validesa dubtosa, donat que hi ha casos d'espècies ben definides que presenten intercompatibilitat entre sí (Harrington, T. C. i Rizzo, D. M., 1999). Aquest fet és molt freqüent dins del gènere *Pleurotus*, en el que es coneixen diversos grups d'intercompatibilitat entre espècies diferents, (Zervakis, G., Moncalvo, J.-M. et al., 2004; Bao, D. P., Ishihara, H. et al., 2004; Bao, D. P., Kinugasa, S. et al., 2004).

Els darrers estudis de filogenia molecular mostren que el complex *eryngii* és un grup filogenèticament molt homogeni. El grup *nebrodensis* és l'únic que queda clarament diferenciat de la resta en tots els estudis moleculars , bé siguin en base a RAPD (Zervakis,

G., Venturella, G. et al., 2001), RFLP (Urbanelli, S., Della Rosa, V. et al., 2007) o seqüenciació dels gens ITS, EF1 $\alpha$  i RPB2 (Mang, S. M. i Figliuolo, G., 2010; Rodríguez Estrada, A. E., Jimenez-Gasco, M. D. M. et al., 2010). Tot i això, les distàncies genètiques entre els conjunts *eryngii-ferulae* versus *nebrodensis* són molt petites en comparació amb altres espècies properes. Per exemple, la distància genètica entre els grups *eryngii* i *nebrodensis* són de 0,002 (ITS) i 0,013 (EF1 $\alpha$  i RPB2) substitucions / kpb, mentre que entre els grups *P. eryngii* i *P. ostreatus* (l'espècie més propera del gènere) les distàncies s'estimen en 0,602 (ITS) i 0,055 (EF1 $\alpha$  i RPB2) substitucions / kpb (Mang, S. M. i Figliuolo, G., 2010; Rodríguez Estrada, A. E., Jimenez-Gasco, M. D. M. et al., 2010). Malauradament, no existeix un llinar estadístic consensuat per a diferenciar espècies del gènere *Pleurotus* a partir dels diferents marcadors moleculars, i per aquesta raó no s'arriba a un consens sobre si *P. nebrodensis* ha de considerar-se com a varietat o a nivell d'espècie independent.

Pel que fa a les altres dues varietats clàssiques (*eryngii* i *ferulae*), la majoria d'estudis de filogènia a partir de marcadors tendeixen a separar els diferents grups en clades independents, ja sigui per RAPD i minisatèl·lits (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001; Gioia, T., Sisto, D. et al., 2005), AFLP i RFLP (Urbanelli, S., Della Rosa, V. et al., 2007; Marongiu, P., Maddau, L. et al., 2005) o seqüenciació dels gens EF1 $\alpha$  i RPB2 (Rodríguez Estrada, A. E., Jimenez-Gasco, M. D. M. et al., 2010), tot i que amb distàncies genètiques molt més minses. En canvi, l'ús de marcadors ITS, no separa les varietats *ferulae* i *eryngii* (Mang, S. M. i Figliuolo, G., 2010, Kawai, G., Babasaki, K. et al., 2008), donat que és un marcador poc sensible a nivell varietal (Rodríguez Estrada, A. E., Jimenez-Gasco, M. D. M. et al., 2010).

No coneixem estudis de filogènia molecular que hagin incorporat les varietat *elaeoselini* i *thapsiae*, a banda de l'estudi per RFLP dels mateixos autors que les han designat (Zervakis, G., Venturella, G. et al., 2001), i d'algun estudi recent, que només incorpora una única seqüència de la var. *elaeoselini* a l'estudi (Rodríguez Estrada, A. E., Jimenez-Gasco, M. D. M. et al., 2010). En tots dos casos el grup *elaeoselini* s'intercala de forma independent entre els grups *eryngii* i *ferulae*. Pel que fa a la varietat *tingitanus*, no coneixem cap estudi molecular d'aquesta mena.

Els articles de filogènia molecular disponibles per a les recol·leccions orientals de carpòfors blancs (grups *nebrodensis*, i *tuoliensis*) no resulten massa clarificadors. En un estudi intercompatibilitat recolzat per RFLP i IGS-2 (Zhang, J., JinHuang, C. et al., 2006), s'ha detectat que els carpòfors blancs macroscòpicament similars que es recullen a la Xina sobre *Ferula sinkiangensis*, es separen en dos grups independents i incompatibles entre sí. Els autors van associar aquests grups a *P. eryngii* var *ferulae* i a *P. nebrodensis* (malgrat que l'únic aïllat de referència emprat en el treball va ser una soca de *P. eryngii* var *eryngii*).

Posteriorment, Kawai, G., Babasaki, K. et al., 2008, va realitzar un estudi basat en la seqüenciació de les regions ITS1 i IGS1, a partir d'un grup d'aïllats a partir de carpòfors

blancs recollits sobre *F. sinkiangensis*, en comparació amb soques de *P. eryngii*, *P. eryngii* var *ferulae* i *P. nebrodensis* europees recollides sobre *Eryngium*, *Ferula* i *Cachrys*, respectivament. Els carpòfors blancs xinesos (que l'autor designa com a *P. eryngii* var. *tuoliensis*) es separen en un clade robust i independent respecte *P. nebrodensis* i el complex *eryngii-ferulae*. Aquests resultats semblen consistents amb els obtinguts per Mang, S. M. i Figliuolo, G., 2010, mitjançant seqüenciació ITS i EF1 $\alpha$ . Malgrat això els autors consideren, donada la curta distància genètica entre grups, que les varietats *eryngii* i *ferulae* són un únic tàxon, i que els aïllats xinesos de carpòfors blancs recollits sobre *F. sinkiangensis* pertanyen a *P. eryngii* var *nebrodensis* i divergeixen de la resta d'aïllats europeus a causa de la distància entre poblacions.

### CARÀCTERS MACROSCÒPICS

En base a les nostres recol·leccions, resulta molt difícil poder establir trets macroscòpics que diferenciïn les varietats amb carpòfors de barret bru, principalment recollits sobre *Eryngium campestre*, *Ferula* spp. i *Thapsia* spp.

La varietat tipus de *P. eryngii* té un amplíssim rang de coloració del píleu, que va del brunegre fins a un ocre pàl·lid, en funció de la densitat i pigmentació de les fibril·les radials adherides a la cutícula, tot i que sempre presenta com a mínim traces de color bru sobre un fons ocre pàl·lid. El port i la mida també són molt variables (generalment en funció del grau de desenvolupament de l'hoste), a l'igual que el grau d'excentricitat de l'estípit. Les anastomosis presents a la base de les làmines són un caràcter molt volàtil en la varietat tipus, més freqüent en exemplars joves i molsuts, pel que no es pot emprar com a caràcter descriptiu. El mateix ocorre amb el marge del barret, que en alguns exemplars es mostra lleument costat o fins i tot festonejat, en casos excepcionals.

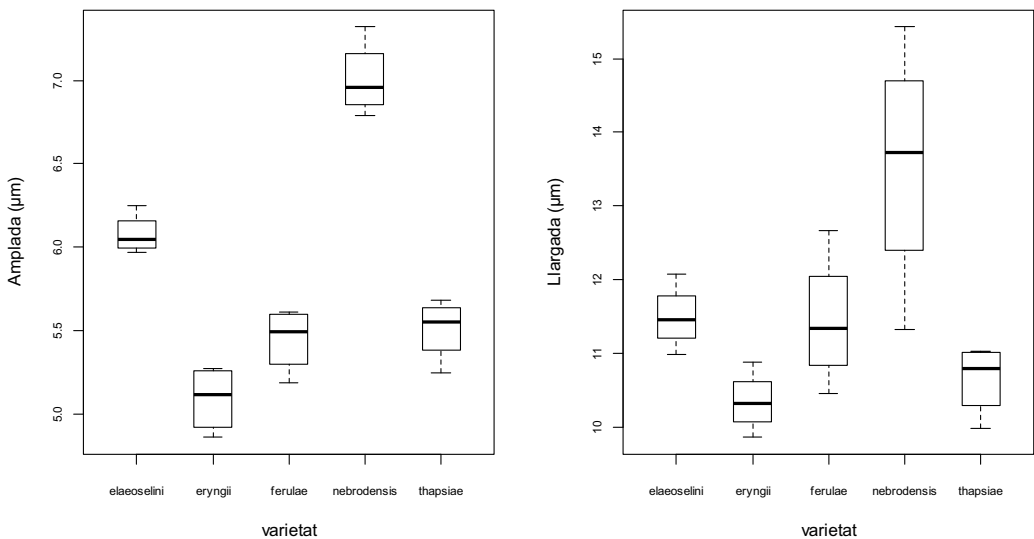
En l'altre extrem, els exemplars de *P. nebrodensis* que hem recollit a la localitat tipus sobre *Cachrys* són de color blanc pur, com a molt tacades de color ocre pàl·lid, amb una cutícula llisa i sense fibril·les radials. La resta de caràcters són molt similars a les de *P. eryngii*, tot i que tendeix a ser un bolet de mida major i amb un port més molsut.

Tots els nostres exemplars inequívocament recollits sobre *Elaeoselinum asclepium* són de color de color bru molt pàl·lid, molt clar, però no blanc pur, tot i que són prou pàl·lids com per ser confosos amb exemplars de *P. nebrodensis*.

### CARÀCTERS MICROSCÒPICS

La mida esporal és un del pocs (si no l'únic) caràcter robust emprat en totes les descripcions recents per a diferenciar cadascuna de les varietats del complex. Tot i això, en cap d'aquestes descripcions s'ha realitzat una comparativa homogènia de les mides esporals de les diferents varietats, fet sorprenent tenint en compte que sovint les mides esporals per a un mateix tàxon presenten variacions significatives al llarg de les diferents publicacions. De fet, algunes de les descripcions de varietats noves han comparat les mesures obtingudes amb les dades bibliogràfiques i no amb material de referència de la varietat tipus (casos de les var. *elaeoselini*, *thapsiae* i *tingitanus*).

Les nostres mesures esporals coincideixen plenament amb les mesures citades per la bibliografia precedent. La figura 28 representa la distribució de les mitjanes de les mides esporals obtingudes per a les diferents varietats.



**Fig. 3.28:** Mitjana de les mesures esporals per a les varietats europees del complex *eryngii*, a partir de quatre recol·leccions diferents sobre el seu hoste típic (vegis materials i mètodes). A excepció de les varietats *eryngii* i *ferulae* (per a les que no hi ha material tipus designat) els exemplars emprats procedeixen de la mateixa localitat del tipus.

	<b>llargada (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>amplada (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>factor de forma (Q)</b>
<i>P. eryngii</i> var. <i>eryngii</i>	10,35 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	5,09 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	2,04 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>
<i>P. eryngii</i> var. <i>elaeoselini</i>	11,49 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	6,08 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	1,89 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>
<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	11,45 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>	5,45 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	2,10 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
<i>P. eryngii</i> var. <i>thapsiae</i>	10,65 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	5,51 $\pm$ 0,19 <sup>c</sup>	1,94 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
<i>P. nebrodensis</i>	13,55 $\pm$ 1,70 <sup>b</sup>	7,01 $\pm$ 0,23 <sup>d</sup>	1,94 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>

**Taula 3.2:** Mitjana de les mides esporals per a les diferents varietats (mitjana de 100 espores, 4 rèpliques de cada varietat), il·lustrat a la fig. 28. Lletres diferents indiquen diferències significatives entre grup

La mida esporal és un caràcter constant que ens permet diferenciar la majoria de varietats europees. L'amplada esporal ha resultat ser un caràcter molt robust, que permet diferenciar totes les varietats del complex (amb p-valors < 0.05 entre les varietats *eryngii* i *ferulae*, i < 0,01 per a la resta), a excepció de la varietat *thapsiae*, que no es diferencia de la varietat *ferulae* a nivell microscòpic (Taula 2). La llargada esporal és un caràcter més variable, que només ens ha permès diferenciar estadísticament a *P. nebrodensis* de tota la resta de varietats. El factor de forma (Q esporal) no ens ha permès detectar diferències significatives entre grups.

Mostrem en la Taula 3 un quadre-resum amb els principals caràcters macro i microscòpics emprats en les descripcions originals per a diferenciar les diferents varietats, en base a les nostres recol·leccions..

	<i>P. eryngii</i> var. <i>eryngii</i>	<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	<i>P. eryngii</i> var. <i>elaoselini</i>	<i>P. eryngii</i> var. <i>thapsiae</i>	<i>P. eryngii</i> var. <i>tingitanus*</i>	<i>P. eryngii</i> var. <i>tuoliensis*</i>	<i>Pleurotus</i> <i>nebrodensis</i>
CARÀCTERS MACROSCÒPICS							
<b>Mida</b>	3-8(12)cm	3-15 cm	3-6 cm	3-6 cm	6,5-26 cm	5-15 cm	4-10(16) cm
<b>Color del pileu</b>	bru pàl·lid a bru fosc	bru fosc	blanc-ocre a bru pàl·lid	bru fosc	bru	blanc	blanc
<b>Cutícula</b>	fibril·les radials	fibril·les radials	llisa a sub pulverulent	fibril·les radials	fibril·les radials	llisa	llisa
CARÀCTERS MICROSCÒPICS (µm)							
<b>Espores (µm)</b>	(7,7)9,0-1,8(13,2) × (4,1)4,6-5,6(6,5) Q=1,8-2,3 Me = 10,35 ± 0,42 × 5,09 ± 0,20 µm	(8,1)9,9-3,2(17,1) × (4,4)5,0-5,9(7,0) Q=1,9-2,4 Me=11,45 ± 0,92 × 5,45 ± 0,19 µm	(7,4)10,2-12,7(15,3) × (4,7)5,6-6,6(7,9) Q=1,7-2,1 Me=11,49 ± 0,45 × 6,08 ± 0,12 µm	(8,5)9,5-11,9(14,3) × (4,0)5,0-6,0(6,8) Q=1,8-2,1 Me=10,7 ± 0,49 × 5,51 ± 0,2 µm	(10)12-15(15,8) × (3,8)5-7,2(7,9)	8,75-13,75 × 5-6,25	(9,2)10,6-16,2(19,2) × (4,9)6,4-7,8(8,9) Q=1,5-2,3 Me=13,6 ± 1,7 × 7,0 ± 0,2 µm
<b>Basidis</b>	30,5-42,4 × 7,4-8,4µm	37,8-48,7 × 7,6-9,1µm	42,0-52,4 × 8,9-10,5µm	39,9-46,6 × 7,5-9,2µm	23-33 × 8-11 µm	N/D	47,2-64,3 × 8,7-10,0µm
<b>Cutícula</b>	Hifes terminals amb pigment en espiral	Hifes terminals amb pigment en espiral	Sense caràcters rellevants	Hifes terminals amb pigment en espiral	N/D	N/D	Sense caràcters rellevants
ECOLOGIA							
<b>Hoste principal</b>	<i>Eryngium</i> spp.	<i>Ferula</i> spp.	<i>Elaeoselinum asclepium</i>	<i>Thapsia</i> spp.	<i>Ferula tingitana</i>	<i>Ferula sinkiangensis</i>	<i>Cachrys ferulacea</i>
<b>Alçada</b>	0 - 1600 m	0 - 1100 m	700-1000 m	1000-1100 m	N/D	800-900 m	1200-2000 m
<b>Fructificació</b>	Primavera i Tardor	Primavera i Tardor	Tardor	Primavera i Tardor	Primavera	Primavera	Primavera

**Taula 3.3:** Taula sintètica amb els caràcters descriptius de les diferents varietats del grup, en base a les nostres recol·leccions. La informació per a les varietats *tingitanus* i *tuoliensis* han estat extretes de les descripcions originals. Tot i que al nostre parer la varietat *thapsiae* és sinònim de la varietat *ferulae*, l'esmentem de forma separada per a facilitar la comparació dels resultats obtinguts. N/D: dades no disponibles.

## RECOL·LECCIONS CRÍTQUES

El nostre gruix de recol·leccions fa pensar que si bé hi ha una clara predilecció de cada varietat per al seu hoste típic, no hi ha una barrera estricta que les impedeixi créixer de forma ocasional sobre hostes característics d'altres varietats del complex *eryngii*, o fins i tot de famílies diferents a les umbel·líferes.

En aquest sentit és especialment interessant la troballa a Sicília de carpòfors bruns sobre *Cachrys ferulacea*, més tard confirmada com a *P. eryngii* var. *ferulae* (= *thapsiae*) en base a la mitjana esporal (UBCC-1446, Fig. 19). Hem trobat un cas similar en el treball de Ravash, R., Shiran, B. et al., 2010, on consten troballes de color bru en major o menor grau, aïllades sobre *Cachrys ferulacea*, a més de *Smyrniopsis aucheri*, *Kellusia odoratissima* i *Ferula ovina*.

En el cas de la varietat *eryngii*, excepcionalment l'hem trobat fructificant sobre hostes diferents a *E. campestre* i *E. maritimum*, com *Carlina* sp. (UBCC 1196), *Malva* o *Alchemilla* sp. (UBCC 1443, vegis fig. 30 i 31), *Allium* sp. (UBCC 1448), *Taraxacum* sp. (1450), i altres hostes no identificats però clarament diferents a *E. campestre*, per la morfologia de la rel i les fulles romanents (UBCC 960 i 1210). També hem trobat la varietat *ferulae* sobre *Salvia berbenaca* (UBCC 1492 i 1493), a més de *Ferula communis* i *Thapsia garganica*. Les identificacions han estat confirmades en base a les mides esporals dels exemplars. En tots els casos on l'hoste no és una umbel·lífera les fructificacions es donen en llocs on també hi ha present com a mínim un hoste típic del grup (*Eryngium*, *Ferula* o *Thapsia*), pel que creiem que en les condicions adequades el miceli pot créixer emprant també rels mortes i en un cert grau la flora viva adjacent. Això li permetria propagar-se d'un hoste a un altre, i excepcionalment fructificar sobre altres plantes, emprant-les de suport i en cas que l'hagi parasitat prou intensament, com a font principal d'aliment.

A l'igual que l'hoste, el color bru de la cutícula no sembla un caràcter del tot fiable per a la identificació de les diferents varietats, molt especialment pel que fa al grup *ferulae-thapsiae*. Els nostres exemplars recollits a la Vall d'Aran (UBCC-1273 i 1274, fig. 29, sobre hoste desconegut, pressumiblement *Laserpitium latifolium*, donat que és l'únic hoste típic del grup descrit en aquell quadrat UTM, segons la base de dades de Biodiversitat de Catalunya, [Font, X., 2012]), així com algunes recol·leccions sicilianes sobre *Thapsia garganica* (UBCC-1445, fig. 32), es corresponen en la mida esporal amb la varietat *ferulae* però presenten una cutícula de color gairebé blanc, tant sols amb traces molt lleus de color bru molt pàl·lid. Algunes recol·leccions properes a aquestes últimes, sobre *Thapsia garganica* (UBCC-1444) i cf. *Malva* spp. (UBCC-1443), presenten un rang esporal idèntic i una cutícula amb tacte vellutat, d'aspecte quasi pulverulent i una tonalitat blanc ocràcia intermèdia (Fig. 30 i 31). Aquestes recol·leccions coincideixen en macroscòpia i microscòpia amb les darreres troballes a Romania citades per Chinan, V.C. i Venturella, G., 2012, que els autors han identificat com a *P. eryngii* var. *elaoselini*, tot i que les mides esporals, al nostre entendre no es corresponen amb la descripció original.



Aquests no serien els primers casos de carpòfors blancs vinculats a les varietats *eryngii* i *ferulae* en la literatura precedent, fet que aporta bona part de la controvèrsia taxonòmica del grup. Ens consten cites a les Illes Canàries (Rodríguez Armas, L., Beltran Tejera, E. et al., 1998), sobre *Ferula spp.* de color blanc, en cap cas amb tonalitats brunes, i espores que es correspondrien a la var. *ferulae* (11-15 × 5-6 µm). Zhang, J., JinHuang, C. et al., 2006, també esmenten carpòfors de color blanc, però filogenèticament vinculats a la var. *ferulae* a Xina. Gargano, M. L., Saitta, A. et al., 2011 esmenten exemplars blancs sobre *Eryngium campestre* a la regió de Apulia, filogenèticament homogenis amb el subgrup *eryngii* / *ferulae*. Finalment, el treball de Abdollahzadeh, J., Asef, M. R. et al., 2007, descriu un gran nombre de recol·leccions de carpòfors blancs en 14 poblacions a Iran, sempre per sobre dels 2000 m, i tots ells intercompatibles entre sí, sobre *Ferula hausnechii* (amb mides esporals que correspondrien a *P. nebrodensis*, 11-13 × 6,5-7,5) i d'altres sobre *Prangos sp.* i *Pimpinella sp.*, amb mides esporals que correspondrien a les varietats *eryngii* - *ferulae* (9,5-11 × 4,5-6 i 9-10 × 4-5 respectivament).

En tot cas, el color blanc del carpòfor no sembla un fenotip del tot ben fixat dins del *pool* genètic del grup de *P. eryngii*. Les diferències en la tonalitat del barret s'esmoreeixen molt o fins i tot desapareixen en carpòfors cultivats sobre fusta, pel que és plausible que existeixin un o més factors en la composició del substrat (presència de micronutrients, etc.) i les condicions ambientals de fructificació que condicionin en part la coloració del barret.



**Fig. 29:** *Pleurotus eryngii* cf. var. *ferulae* UBCC – 1273 i 1274, (Vall d’Aran) sobre hoste desconegut.  
Foto: Josep M. Lanau.



**Fig. 30:** *Pleurotus eryngii* cf. var. *ferulae* (= *thapsiae*) UBCC – 1443, sobre cf. *Malva* o *Alchemilla* sp..  
Foto: Enric Gracia.



**Fig. 31:** *Pleurotus eryngii* cf. var. *ferulae* (= *thapsiae*) UBCC - 1443, sobre cf. *Malva* o *Alchemilla* sp..  
Foto: Enric Gracia.



**Fig. 32:** *Pleurotus eryngii* cf. var. *ferulae* (= *thapsiae*) UBCC - 1445, sobre *Thapsia garganica*.  
Foto: Enric Gracia.

---

### 3.5.- Conclusions

Gràcies a la desinteressada col·laboració de la majoria de Societats Micològiques catalanes, micòlegs i aficionats, hem pogut traçar en aquest treball un primer esbós de la distribució de la gírgola de panical a Catalunya.

El complex *eryngii* es troba representat a casa nostra, com a mínim per les varietats *P. eryngii* var. *eryngii*, i la var. *ferulae*. Tot i que poc freqüent, la varietat tipus és la més ben repartida al llarg del territori, i es mostra força més abundant a la Franja de Ponent. També hem trobat la varietat tipus a les Illes Balears, tant sobre *E. campestre* com sobre *E. maritimum*, en dunes costaneres. Malauradament, només disposem de referències bibliogràfiques per al País Valencià, tot i que sembla que també s'hi troba força repartida, i ens consta que és especialment abundant i coneguda per la població en zones rurals de l'interior, on l'hàbitat d'aquest bolet (erms, conreus en desús...) és més freqüent. Al seu torn, la varietat *ferulae* és molt menys freqüent, i es pot localitzar a l'Empordà i sobretot a Menorca i Eivissa. Assignem a aquesta varietat les troballes de color blanc a la Vall d'Aran, ja que la seva mida esporal es situa lluny de les mides típiques de la varietat *elaeoselini* o de *P. nebrodensis*. Tot i això, la seva identificació encara és dubtosa, ja que podria tractar-se d'un tercer tàxon .

La presència de gírgola de panical sembla estar fortament vinculada a les activitats de pastura, especialment d'oví i cabrum. El retrocés en aquesta mena de ramaderia i de les pràctiques transhumants podrien explicar els indicis de davallada en l'abundància del bolet al Principat.

Les nostres prospeccions a camp han permès recollir, aïllar en cultiu pur i conservar un nombre representatiu d'aïllats de totes les varietats que es coneixen a Europa, incloent-hi exemplars recollits a les mateixes localitats dels tipus per a les varietats *elaeoselini*, *thapsiae* i *P. nebrodensis*. El banc de cultius resultant té un potencial molt interessant per a futurs estudis en taxonomia, bioquímica i fisiologia, entre altres. En el cas que ens ocupa, és especialment interessant per a l'encreuament i selecció de soques, ja sigui de cara al seu cultiu industrial, com per a la posta a punt d'un sistema de cultiu a camp sobre hostes vius. En aquest sentit, els aïllats de les diferents varietats del grup probablement presentin diferències significatives em el seu ventall enzimàtic. Això condicionarà tant l'agressivitat de les diferents soques sobre l'hoste vegetal i la capacitat d'adaptació a les condicions no estèrils d'un cultiu extensiu.

Pel que fa a la taxonomia del grup, les diferents varietats del complex, (incloent *P. nebrodensis*), són tàxons filogenèticament molt propers, que presenten com a mínim una intercompatibilitat parcial entre elles. El grau d'especificitat de cada varietat vers el seu hoste típic és desconeguda, tot i que algunes de les nostres recol·leccions fan pensar que l'hoste no representa necessàriament una barrera estricta, podent-se donar el cas de recol·leccions esporàdiques d'una varietat sobre hostes típics d'altres varietats del grup

(per exemple, carpòfors blancs sobre *E. campestre*, o bruns sobre *Cachrys ferulacea*). Fins i tot hem recollit carpòfors sobre hostes gens típics, com podrien ser, *Allium* sp., *Taraxacum* sp., i *Malva* o *Alchemilla* sp., fet que fa pensar en que *P. eryngii* també pot emprar la flora adjacent com a font d'aliment i com a vehicle de propagació en el sòl.

A més de la preferència per un o altre hoste, en conjunt les varietats del grup *eryngii* tendeixen a diferenciar-se macroscòpicament pel port, el color del barret i l'aspecte de la cutícula. Tot i aquestes diferències globals, els exemplars d'un mateix tàxon poden ser molt variables, fet que fa molt difícil establir caràcters macroscòpics que discernixin de manera fiable les diferents varietats. En el cas de la varietat *elaoselini*, els nostres exemplars presenten una tonalitat de color bru beige clar en la cutícula, i no blanques com s'esmenta a les descripció original (tot i que sí coincideixen en la mida esporal). També hem efectuat recol·leccions en hostes diversos a Sicília i a la Vall d'Aran, de color blanc pur o amb tant sols traces de color bru a la cutícula que en base a la mida esporal correspondrien a la varietat *ferulae*.

Pel que fa a la microscòpia, l'amplada esporal ha resultat ser un caràcter constant que permet diferenciar totes les varietats entre elles (excepte la var. *thapsiae*). Per altra banda, la llargada esporal només ens ha permès separar estadísticament a *P. nebrodensis* de la resta. La presència de pigment en espiral en les hifes terminals de la cutícula també és un caràcter microscòpic constant que permet diferenciar a *P. nebrodensis* i *P. eryngii* var *elaoselini* de la resta.

No hem pogut trobar però cap caràcter constant (macro- o microscòpic) que diferenciï la varietat *thapsiae* de la varietat *ferulae*. Al nostre entendre, l'hoste no pot considerar-se com a un caràcter taxonòmic que permeti separar varietats diferents, al igual com ocorre per a la resta de caràcters distintius esmentats en la descripció original (mida i intensitat del color del carpòfors, altitud i període de fructificació). Per aquesta raó, per la manca d'una comparació explícita amb *P. eryngii* var. *ferulae* en la descripció original, i donada alguna altra irregularitat en la publicació original (p. ex., la iconografia de la microscòpia, copiada i alterada a partir de la iconografia anteriorment publicada per a la var. *elaoselini*), no trobem raons per a no considerar la varietat *thapsiae* com a sinònim de la varietat *ferulae*.

La minsa distància genètica entre *P. eryngii* i *P. nebrodensis* i la presència d'intercompatibilitat (com a mínim parcial) entre els diferents representants del grup fa pensar en primera instància que caldria considerar a *P. nebrodensis* com a una varietat de *P. eryngii*, tal i com proposen alguns autors. Nogensmenys, manca un llindar estadístic pel que fa a filogènia molecular per al gènere, i a més hi ha altres factors que assenyalen el contrari. En primer lloc, segons la bibliografia, *P. nebrodensis* es separa clarament en un clade diferent de tota la resta de tàxons del grup en tots els marcadors moleculars fins ara estudiats. En segon lloc, a més del port, l'hoste i l'ecologia podem establir diversos caràcters morfològics constants que el diferenciïn clarament de la resta (amplada esporal, llargada esporal, presència de pigment a les hifes terminals de la cutícula). Finalment,

existeixen indicis bibliogràfics de diferències en el comportament enzimàtic, com a mínim, a nivell de lacases i Mn-peroxidases (Urbanelli, S., Della Rosa, V. et al., 2007), a més de presentar un patró de creixement in vitro diferenciat tant a nivell morfològic com pel que fa a la taxa de creixement (vegis capítol 4, més endavant). Per totes aquestes raons, i d'acord amb la postura amb més consens en la literatura recent, mantenim la opinió de considerar a *P. nebrodensis* com a espècie independent.

Són especialment interessants les troballes de carpòfors de color blanc de la Vall d'Aran, que presenten mitjanes esporals característiques de la varietat *ferulae*, i no de *elaeoselini* o *nebrodensis* com es podria pensar inicialment. Aquestes recoleccions semblen coincidir amb les recoleccions sobre *Laserpitium* fins ara descrites, (p. ex., Chiran, V.C. i Venturella, G., 2012) i possiblement també es correspondrien a les troballes de Costantin, qui va proposar el nom de *Pleurotus hadamardii* (*nomen invalidum*, Costantin, J., 1923). En qualsevol cas, considerem que un hoste diferent no pot ser un caràcter tingut en compte per a la descripció de noves varietats, com tampoc ho poden ser la coloració del barret i la mida del carpòfor, que com hem vist molt variables en funció del substrat i condicions on creix el fong. Per tant, identifiquem aquestes troballes – i d'atres de característiques similars recollides a Sicília – com a varietat *P. eryngii* cf. var. *ferulae* (= *thapsiae*). La identitat taxonòmica d'aquestes troballes resta en dubte, a l'espera d'aconseguir un nombre significatiu de recol·leccions de carpòfors blancs confirmats sobre *Laserpitium latifolium* que ens permetin validar-ne la identificació.

Al nostre entendre, l'ús tradicional de quantils per a expressar les mides esporals i la omissió sistemàtica de les mitjanes esporals (Me) no permet comparar amb rigor estadístic els resultats propis amb els de treballs aliens, i fa impossible tenir en compte aquelles varietats de les que hom no disposa material. Per aquesta raó encoratgem a que s'inclouin aquestes mitjanes en futures recerques.

Per resoldre quina és la posició taxonòmica de les diferents varietats del grup caldrà consensuar un llindar molecular estadístic per al gènere *Pleurotus* que diferenciï el rang de varietat o d'espècie independent, alhora que és necessari realitzar un estudi de filogènia molecular amb marcadors fiables a nivell subespecífic, (com podria ser la seqüenciació dels gens EF1 $\alpha$  i RPB2), a partir d'un nombre representatiu d'aïllats de totes les varietats, degudament referits a material en micoteca. Al nostre entendre, mancaria també un estudi d'infecció dels diferents hostes típics amb cadascuna de les diferents varietats, per poder corroborar si hi ha barreres ecològiques en aquest sentit i si els caràcters morfològics (p. ex, presència / abundància de pigment en la cutícula) són fenotips deguts al substrat o genotípics. Malauradament, tots aquests estudis queden fora de l'abast d'aquest treball.

Reflectim en la següent clau dicotòmica el criteri que finalment hem emprat a l'hora d'identificar les nostres troballes dins del complex *eryngii*. Donat que no hem pogut disposar de material corresponent a les varietats *tingitanus*, *tuoliensis* ni de *P. fossulatus*, circumscriuim aquesta clau només a les varietats europees descrites fins ara.

## Clau per a la identificació de les formes europees del complex *eryngii*

- 1a. Píleu de color variable, des del bru negre fins al bru pàl·lid, o bé de color blanc, però sempre amb traces de tonalitats de color ocre o bru. Cutícula amb microfibril·les radials adnades i excepcionalment tacte subpulverulent quan és seca.  
Espores cilíndriques a subel·líptiques.  
..... *Pleurotus eryngii*
- 2a. Cutícula de color bru pàl·lid a bru fosc, i amb microfibril·les radials adnades quan és seca. Molt excepcionalment, de color blanc amb traces de clor bru.  
Espores cilíndriques a subel·líptiques.
- 3a. Píleu generalment de mida mitjana, de color bru pàl·lid a bru fosc.  
Espores subel·líptiques a cilíndriques,  $(7,7)9,0-11,8(13,2) \times (4,1)4,6-5,6(6,5) \mu\text{m}$ ,  $Q=(1,5)-1,8-2,3-(2,6)$ ,  $(Me) = 10,35 \pm 0,42 \times 5,09 \pm 0,20 \mu\text{m}$   
Principalment sobre rels d'*Eryngium spp.* en prats secs, timonedes, erms, guarets i zones ruderals, sovint amb pastura d'ovi i cabrum, a la primavera, tardor i principis d'hivern. També en dunes conservades, sobre *E. maritimum*.  
..... *Pleurotus eryngii* var. *eryngii*
- 3b. Píleu generalment de mida mitjana a gran, de color bru a bru fosc, de vegades amb tonalitats grisenques.  
Espores allargades, cilíndriques a subel·líptiques,  $(8,1)9,9-13,2(17,1) \times (4,4)5,0-5,9(7,0) \mu\text{m}$ ,  $Q=(1,6)-1,9-2,4(2,8)$ ,  $Me=11,45 \pm 0,92 \times 5,45 \pm 0,19$ .  
A la primavera, tardor i principis d'hivern, principalment sobre *Ferula spp.* o *Thapsia spp.*  
..... *Pleurotus eryngii* var. *ferulae*  
(= var. *thapsiae*)
- 2b. Píleu de mida mitjana a gran, de color clar, blanquinós a bru pàl·lid, sempre amb restes de color bru. Cutícula de vegades clivellada formant esquames ocràcies sobre un fons blanc, però no amb fibril·les adnades evidents de color fosc.  
Espores el·líptiques a subel·líptiques,  $(7,4)-10,2-12,7-(15,3) \times (4,7)-5,6-6,6-(7,9) \mu\text{m}$ ,  $Q=(1,4)-1,7-2,1-(2,5)$ ,  $Me=11,49 \pm 0,45 \times 6,08 \pm 0,12 \mu\text{m}$   
Principalment sobre *Elaeoselinum asclepium*, a la tardor i principis d'hivern.  
..... *Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini*
- 1b. Píleu de color blanc pur, de vegades tenyit de color ocre en el centre. Cutícula llisa. Fructificacions primaverals en prats d'alta muntanya, per sobre dels 1000 m. Principalment sobre *Cachrys ferulacea*.  
Espores grans, llises, el·líptiques o dacrioides (en forma de llàgrima irregular)  $(9,2)10,6-16,2(19,2) \times (4,9)6,4-7,8(8,9) \mu\text{m}$ ,  $Q=(1,3)-1,5-2,3-(3,5)$ ,  $Me=13,6 \pm 1,7 \times 7,0 \pm 0,2$ .  
..... *Pleurotus nebrodensis*





# 4. Nou procediment per a la caracterització del creixement d'aïllats de bolets mitjançant anàlisi d'imatge.

---

## 4.1.- Introducció

Tota recerca o posta a punt per al cultiu d'una nova espècie, varietat o soca de bolet passa forçosament per una primera fase d'estudi *in vitro*. Tot i que la taxa de creixement micelià d'un bolet no necessàriament es correspon a la productivitat de carpòfors en cultiu (Salmones, D., Gaitán-Hernández, R. et al., 1997), aquesta fase serveix per avaluar-ne els requeriments nutritius, les condicions òptimes per al creixement micelià, caracteritzar la capacitat enzimàtica del fong mitjançant tests bioquímics i realitzar una primera selecció i millora de soques, en la majoria de casos mitjançant l'encreuament d'aïllats monospòrics, la hibridació o la irradiació.

Tradicionalment, aquests estudis preliminars es realitzen en cultiu líquid i sobretot sobre agar, en càpsules de Petri. En aquest últim cas, la mesura del creixement (biomassa) es sol realitzar mesurant el diàmetre o la superfície de la colònia fúngica, bé sigui de forma manual (Salmones, D., Gaitán-Hernández, R. et al., 1997; Reeslev, M. i Kjoller, A., 1995), o mitjançant anàlisi d'imatge amb llum reflectida (de Castro Montini, R. M., de Souza Passos, J. R. et al., 2006). Tots aquests sistemes de mesura de creixement obvien les diferències de densitat de les colònies, que pot variar en funció de la soca o de les condicions de creixement. Per aquesta raó, aquestes mesures solen ser fiables a l'hora d'avaluar la taxa de creixement per a fongs amb patrons de creixement homogenis (p. ex., en la identificació de deuteromicets en medis estàndard), però en fongs amb patrons heterogenis la mesura pot no correspondre's prou amb la biomassa real. Aquest fet és freqüent en el cas de *P. eryngii* (Castelnuovo, G. i Granetti, B., 1996) i molts altres basidiomicets, com *Volvariella volvacea*, o *Polyporus tunetanus* (Lanau, J.M., dades no publicades). Per tant, si es requereix realitzar mesures de creixement acurades en diferents condicions de cultiu o bé es desitja comparar soques o fins i tot espècies diferents, cal recórrer a l'extracció de miceli i la mesura del pes sec o d'un altre indicador de biomassa estàndard, com poden ser la mesura d'ergosterol, quitina, o ATP. Tots aquests procediments són molt tediosos i destrueixen la mostra analitzada.

Per altra banda, la morfologia de la colònia és un caràcter interessant de tenir en compte. En moltes descripcions taxonòmiques es sol incloure una descripció subjectiva del creixement del miceli en cultiu pur sobre medis estàndard (agar extracte de patata, agar extracte de malta, etc.). El patró de creixement micelià pot aportar informació valuosa en estudis taxonòmics i fisiològics. És ben conegut que sovint hi ha una correlació positiva entre la producció d'enzims i metabòlits secundaris amb el patró de ramificació micelià

d'una colònia (Jones, C., 1996) o amb la morfologia dels pèl·lets<sup>6</sup> obtinguts en cultiu líquid (Fu, C. C., Su, C. H. et al., 2010). Malauradament no hi ha tècniques estandarditzades per a l'anàlisi de la morfologia de colònies crescudes en càpsules de Petri, i les descripcions generalment es fan *de visu* i subjectivament, mitjançant adjectius com "cotonós", "flocós", "avellutat", "laxe", "dens", etc (Sánchez, F., Honrubia, M. et al., 2000).

L'anàlisi d'imatge és una tècnica molt valuosa que podria resoldre aquests inconvenients. Les tècniques d'anàlisi d'imatge han evolucionat exponencialment els darrers anys, conjuntament amb el hardware de captura (escàners, càmeres digitals), i l'aparició de programari lliure per al processament d'imatges digitals.

Gràcies a això, l'anàlisi d'imatge s'empra ja en nombroses recerques i automatitzacions industrials relacionats amb el creixement de fongs. Una de les aplicacions clàssiques és el seguiment de la morfologia dels pèl·lets de miceli en fermentacions líquides com a indicador de l'estat de la fermentació (Tucker, K. G., Kelly, T. et al., 1992; Johansen, C. L., Coolen, L. et al., 1998; Lecault, V., Patel, N. et al., 2009; Barry, D. J., Chan, C. et al., 2009). Pel que fa a estudis sobre medis sòlids, la tècnica d'anàlisi d'imatge s'ha emprat sovint a partir d'imatges de microscòpia, per a estudiar el patró de ramificació de les hifes (Ritz, K. i Crawford, J., 1990, Jones, C., 1996), quantificar el creixement (Daniel, O., Schonholzer, F. et al., 1995), estudiar la virulència de fitopatògens (Baum, T., Navarro-Quezada, A. et al., 2011) o fins i tot modelitzar la colonització d'un substrat (Cross, D. i Kenerley, C. M., 2004).

L'aplicació de tècniques d'anàlisi d'imatge en el sòl o altres medis opacs a nivell macroscòpic és difícil, degut a que cal que les hifes s'agreguin en masses prou importants en la seva superfície com per a poder ser captades. Tot i això hi ha alguns estudis sobre el comportament de cultius de fongs sobre substrats sòlids (Couri, S., Mercès, E. P. et al., 2006) amb resultats encoratjadors. La posta a punt d'una tècnica d'aquesta mena sovint permet l'estudi de factors que anteriorment no es podien avaluar; un bon exemple n'és l'ús de l'anàlisi d'imatge per al seguiment de fongs formadors de cordons micelians sobre sòl compactat (Donnelly, D. P., Boddy, L. et al., 1999), que han permès estudiar el comportament del miceli en el sòl en funció de l'assequibilitat de nutrients (Bolton, R. G. i Boddy, L., 1993) o fins i tot de la presència de col·lèmbols que s'alimenten de miceli (Wood, J., Tordoff, G. M. et al., 2006, Tordoff, G. M., Boddy, L. et al., 2006).

Una alternativa és l'ús d'anàlisi d'imatge combinat amb el marcatge radioactiu de les fonts de nutrients, emprat, entre d'altres, per a estudis de translocació en micorizes (Timonen, S., Finlay, R. et al., 1996), fongs sapròfits (Watkinson, S. C., Boddy, L. et al., 2005), o per a l'estudi de canvis en els patrons de creixement en substrats heterogenis

---

<sup>6</sup> Segon ens ha indicat el centre terminològic Termcat, aquesta és la denominació més adequada en català per al mot anglès *pellet*. Pèl·let, adaptació de l'anglicisme al sistema fonogràfic del català, és una forma normativa.

(Tlalka, M., Bebber, D. P. et al., 2008). Tot i que molt precisa, aquesta tècnica està lluny de l'abast dels assaigs de creixement rutinaris pel seu cost.

Hi ha però molt pocs treballs basats en l'anàlisi d'imatge a partir de creixements en cultius estàndard en agar. En bona mesura això és degut a que el medi de cultiu amb agar sòl ser tèrbol i acolorit, cosa que dificulta la presa d'imatges amb llum transmesa. A més, l'extracció del miceli és excessivament tediosa per a tractar-se d'un procediment de rutina. Per aquesta raó la majoria de treballs empenen imatges preses amb llum reflectida (de Castro Montini, R. M., de Souza Passos, J. R. et al., 2006), amb els inconvenients de subestimar el miceli submergit en l'agar i dependre de la homogeneïtat dels coeficients de reflexió / refracció de llum del miceli en les condicions estudiades.

Per a superar l'obstacle de la manca de transparència del medi, alguns treballs empenen membranes de cel·lofana per poder separar el fong del medi de cultiu. Això permet extreure la mostra de l'agar, mesurar el pes sec i analitzar-ne la morfologia mitjançant la presa d'imatges de la membrana amb llum transmesa, alhora que permet analitzar la distribució dels nutrients en l'agar mitjançant un "revelat" del disc d'agar amb reaccions bioquímiques, com la reacció de Fehling (Olsson, S., 1994). La tècnica però segueix sent tediosa i destructiva.

En el present treball proposem un nou procediment d'anàlisi d'imatge per al seguiment de colònies sobre agar. A diferència dels treballs precedents al nostre abast, aquest mètode analitza imatges obtingudes per llum transmesa gràcies al disseny d'un medi de cultiu transparent. Això permet la mesura de la imatge en unitats de densitat òptica i estimar el pes sec de la colònia sense necessitat de destruir les mostres. Un cop calibrada, aquesta tècnica permet realitzar assaigs de cultius de bolets *in vitro* sobre agar i comparar diverses condicions de creixement o fins i tot organismes diferents entre sí de forma automàtica, ràpida i no destructiva. Les imatges resultants ens permeten valorar no només la biomassa total, sinó la seva morfologia i distribució en el medi de cultiu. Presentem a més, una primera aproximació a l'obtenció de paràmetres morfològics de les colònies que serveixin com a descriptors quantitius i objectius de la seva morfologia, i que permetin discernir estadísticament els diferents patrons de creixement.

En el marc de la posta a punt d'un nou procediment de cultiu de *P. eryngii* a camp, aquesta tècnica serà d'utilitat per a poder caracteritzar en un futur, els aïllats del complex *eryngii* incorporats a l'UBCC i fer un triatge d'aquelles soques i híbrids amb un patró de creixement més vigorós i agressiu. Al mateix temps, serà d'utilitat per a caracteritzar *in vitro* els sistemes d'inoculació desenvolupats per a la inoculació a camp (capítol 6) i quantificar-ne la capacitat de producció de miceli.

Els models de treball emprats per a la posta a punt de la nostra tècnica han estat la resposta d'una soca de *Pleurotus eryngii* a diferents concentracions de sucres, i l'anàlisi de la morfologia de creixement en soques de diferents varietats del complex *eryngii*.

---

## 4.2.- Materials i mètodes

### Material biològic

Per a la posta a punt i el calibrat de la tècnica i per a l'estudi de la resposta de *P. eryngii* a diferents concentracions de fructosa, s'ha emprat la soca de *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* UBCC-0125, preservada al Banc de Fongs Comestibles i Medicinals - UBCC (registre a la WFCC núm. 977).

Per a l'estudi comparatiu de la morfologia de les colònies de diferents varietats de *Pleurotus eryngii* s'ha emprat els següents aïllats:

*Pleurotus eryngii* var. *eryngii*: UBCC-0125 (Sòria, Ucero, Castillo de Ucero; sobre *Eryngium campestre*), UBCC-0955 (Tarragona, Valls, aeròdrom de Valls, sobre *Eryngium campestre*), UBCC-1325 (Lleida, Alfés, Timoneda d'Alfés, sobre *Eryngium campestre*), UBCC-1323 (Castelló, Pina de Montalgrao, sobre *Eryngium campestre*), UBCC-1342 (Sicília, Madonie, Bevaio di Faggio, sobre *Eryngium campestre*).

*Pleurotus eryngii* var. *ferulae*: UBCC-1385 (Sicília, Ficuzza, Alpe Cucco, sobre *Ferula communis*), UBCC-1395 (Sicília, Ficuzza, Torre del Bosco, sobre *Ferula communis*), UBCC-1451 (Sicília, Randazzo, soca comercial aïllada de carpòfors de cultiu); UBCC-1453 (Sicília, entre Randazzo i Bronte, al peu de l'Etna; recol·lecta de carpòfors bruns sobre cf. *Ferula communis*). UBCC-1442 (Sicília, Piano Zucchi; recol·lecta de carpòfors clars, sobre *Thapsia garganica*).

*Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini*: UBCC-1312 (Salamanca, Castro de Yecla de Yeltes, recol·lecció de carpòfors blancs, macroscòpicament similars a la descripció de la var. *elaeoselini*, sobre *Thapsia villosa*); UBCC-1389 (Sicília, Ficuzza, sobre *Elaeoselinum asclepium*);

*Pleurotus nebrodensis*: UBCC-1332 (Sicília, Madonie, Piano della Madonna, sobre *Cachrys ferulacea*); UBCC-1334 (Sicília, Madonie, Pizzo Cervi, sobre *Cachrys ferulacea*); UBCC-1459 (dicariont obtingut en laboratori a partir de monospòrics d'una recol·lecció a Sicília, Madonie, Piano Battaglia, sobre *Cachrys ferulacea*).

A més, s'inclouen quatre aïllats més de classificació dubtosa:

*Pleurotus* cf. *eryngii* var. *tuoliensis*: UBCC-1346 (Xina, Nanjin, soca comercial del que aquí es comercialitza amb el nom comercial "Nebrodensis").

*Pleurotus eryngii* cf. var. *ferulae*: UBCC-1446 (Sicília, Piano Zucchi, recol·lecta de carpòfors bruns sobre *Cachrys ferulacea*).

*Pleurotus eryngii* cf. *var ferulae*: UBCC-1273 (Lleida, Vall d'Aran, Baguerque, Ermita de Sta. Margalida, sobre hoste no identificat, potser *Laserpitium* sp. – recol·lecta de carpòfors blancs de port i aspecte molt similar als recollits a Sicília).

*Pleurotus eryngii* cf. *var. thapsiae* (= *ferulae*): UBCC-1443 (Sicília, Piano Zucchi, sobre cf. *Malva* o *Alchemilla*);

## **Disseny d'un medi de cultiu transparent per l'anàlisi**

S'ha formulat un medi de cultiu sintètic (Fructosa-Xg Tartrat Agar, abreujadament FxTA), compatible amb els requeriments de creixement de la majoria de basidiomicets, i que permet realitzar variacions en la composició de fonts hidrocarbonades, N, P, Mn, Mg, i altres micronutrients de forma independent, alterant el mínim possible la resta de components.

La versió estàndard d'aquest medi de cultiu per al creixement i repicat de basidiomicets (Fructosa-20 g Tartrat Agar, F20TA) és el següent: 20 g [JM2] fructosa, 10 g glucosa, 1,18 g tartrat amònic, 0,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4$ , 0,1 g  $\text{CaCl}_2$ , 0,025 g  $\text{NaCl}$ , 1 ml solució elements traça, 1 ml solució vitamines, 15 g agar (grau bacteriològic) i 1 l d'aigua destil·lada.

La formulació de la solució d'elements traça (modificat a partir de Eriksson, T., 1965), per a 200 ml és: 1,9 g EDTA disòdic, 1,40 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 170 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 63 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 287 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 75 mg KI, 2,5 mg  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  i 0,25 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . L'EDTA i el  $\text{FeSO}_4$  es dissolen prèviament en aigua destil·lada calenta (agitador orbital, 300 rpm, 1h) per a la formació d'EDTA fèrric, i retirant el residu insoluble abans d'afegir la resta d'elements.

La formulació de la solució de vitamines (Danell, E., 1994) és la següent: 10 mg tiamina (B1), 10mg piridoxina(B6), 10 mg riboflavina, (B2, E101), 2,5 mg biotina (H, B7, B8), 10 mg nicotinamida (B3), 10 mg àcid p-aminobenzoic (PABA), 10 mg àcid pantotènic i 500 ml d'aigua.

Per a l'aïllament de soques, s'empra una variant del medi, substituint la fructosa per 5 g/l manitol, reduint la glucosa a 1 g/l i el tartrat amònic a 0,85 g/l, i afegint 0,2 g/l cloramfenicol i 0,1 g/l tetraciclina com a antibiòtics d'ampli espectre i 2,5 mg/l benomil, com a antifúngic selectiu.

Realitzant una variació en la concentració d'agar i el grau de puresa d'aquest, el medi obté una gran transparència (variant que anomenarem FTA òptic – FTA.O). Pot ser necessari ajustar la proporció d'agar en funció de les seves propietats de polimerització (sovint varien segons el proveïdor o fins i tot el lot), els requisits de sensibilitat de l'experiment i les necessitats de resistència del medi. En el nostre cas hem emprat 4,5 g/l

d'agar purificat (Cultimed), la mínima concentració necessària per solidificar el medi i fer-lo manejable.

La preparació del medi de cultiu s'ha realitzat esterilitzant per separat l'agar, glucosa i fructosa en 500 ml d'aigua de la resta d'elements, per a evitar reaccions de Maillard que l'embruneixin. L'esterilització s'ha realitzat en autoclau, a 121°C durant 20 min, i les dues solucions han estat combinades i més tard repartides en càpsules de Petri de forma estèril, sota una cambra de flux. Tots els productes químics són Panreac, grau analític, a excepció de l'agar, que és de Cultimed.

## **Dissenys experimentals**

### **ESTUDI DE CREIXEMENT DE *P. ERYNGII* A DIFERENTS CONCENTRACIONS DE FRUCTOSA**

Segons el que hem pogut comprovar en estudis preliminars, la concentració de fructosa és el macronutrient que a diferents concentracions dóna lloc a més diversitat de densitats i àrea de les colònies per a un mateix temps de creixement en el nostre medi de cultiu. Per aquesta raó hem emprat aquest factor com a model de treball per al calibrat de la tècnica en *P. eryngii*.

*Medis de cultiu:* S'ha preparat una bateria de 6 medis de cultiu amb base F20TA.O (F20TA modificat, amb 4,5 g agar purificat /l, sense glucosa ni fructosa) i diferents concentracions de fructosa afegida: 0 g/l, 0,05 g/l, 0,02 g/l, 0,5 g/l, 2 g/l, 20 g/l. El medi s'ha distribuït en càpsules de Petri (Sterilin, 9 cm de diàmetre) a raó de 18 ml/càpsula. El medi s'ha solidificat en repòs total i a temperatura ambient durant un mínim de 12 h.

*Inòcul:* Per a inocular les proves s'ha preparat un cultiu en 125 ml de medi F20TL (F20TA sense agar) en un flascó de 250 ml, en un agitador orbital a 250 rpm. Aquest s'ha inoculat amb quatre fragments d'un cultiu en medi F20TA. Per a reduir i homogeneïtzar la mida dels pèl·lets que se n'obtenen i per evitar la coloració ataronjada que pot provocar *P. eryngii* quan arriba a la fase estacionària, s'ha incorporat al medi carbó activat immobilitzat en perles d'alginat de 3 mm de diàmetre, preparades a partir d'una dissolució d'alginat 10 g/l a la que s'ha afegit 4 g/l de carbó actiu. La immobilització s'ha realitzat per degoteig en 22,2 g/l CaCl. Als 20 minuts de romandre en clorur càlcic, s'han esbaldit durant 10 minuts en aigua destil·lada, i s'han esterilitzat les perles escorregudes en autoclau (121°C, 20 minuts). El líquid excedent degut al procés de sinèresi ha estat descartat, i s'han transferit una trentena de perles a cada ampolla de medi de cultiu.

*Cultiu:* Els pèl·lets obtinguts, d'aproximadament 1 mm de diàmetre han estat transferits al centre de les càpsules de cultiu amb l'ajut d'unes pinces de laboratori, esbaldint breument el pèl·let (2 segons) per duplicat amb aigua destil·lada estèril. La incubació es realitza durant 10 dies a 24°C.

*Rèpliques:* S'ha realitzat un total de 8 rèpliques, mantenint 4 blancs de cada medi de cultiu sense sembrar en les mateixes condicions d'incubació.

Tots els blancs i rèpliques d'aquest assaig han estat congelats (-18°C) immediatament després de la presa d'imatges per a la posterior mesura de pes sec, C i N.

### **ESTUDI DE LA MORFOLOGIA DE COLÒNIES DE DIFERENTS VARIETATS DE *P. ERYNGII*.**

*Medis de cultiu:* s'ha emprat medi de cultiu F2TA.O (F20TA modificat, sense glucosa, amb 2 g de fructosa i 4,5 g d'agar purificat/l), distribuït a raó de 16 ml en càpsules de Petri de plàstic estàndard (Sterilin, 9 cm diàmetre). El medi s'ha deixat solidificar en repòs total i a temperatura ambient durant un mínim de 12 h.

*Inòcul i cultiu:* Totes les soques de cultiu abans esmentades s'han inoculat a partir d'un fragment circular d'agar (7 mmØ) del marge d'una colònia crescuda també en medi F2TA. La incubació es realitza durant 15 dies a 24°C.

*Rèpliques:* S'ha realitzat un total de 5 rèpliques de cada soca, mantenint 20 blancs sense sembrar en les mateixes condicions d'incubació.

### **Captura d'imatges**

S'ha capturat les imatges en condicions de fosc, amb una camera Nikon D70 amb òptica AF-S Nikkor DX 18-70mm 1:3,5-4,5G disposada en un suport d'alçada regulable per obtenir imatges zenitals. La font de llum ha estat una pantalla TFT d'ordinador portàtil (Acer Aspire 9420), disposada horitzontalment, amb una imatge en blanc a pantalla sencera i màxima brillantor. La càpsula de Petri s'ha disposat sense tapa entre la font de llum i la càmera mitjançant un suport opac de color negre, a 90 mm respecte la font de llum.

Les condicions de la presa d'imatges són les següents: RAW 12 bit sense pèrdues, mida 3008×2000 px, longitud focal 70 mm, exp. 1.3 seg. F/20, compensació d'exposició 0EV, ISO 200, mode de color Ia(sRGB), reducció de soroll desactivat, ajust de to 0°, saturació normal, nitidesa: cap. S'ha pres el punt de focus sobre la superfície de l'agar, emprant com a referència un disc de paper situat a la superfície d'una càpsula de Petri control (amb medi, sense inocular). El balanç de blancs s'ha realitzat en mode manual, a partir de la mesura d'una altra càpsula de Petri control en mode P, exp. 1/25 f/4,5. Tot el procés s'ha realitzat mitjançant control remot amb el software Nikon Camera Control Pro v.1.3.0

Per al calibrat dels valors de grisos de la imatge a densitat òptica s'ha emprat una tarja transparent amb 21 increments de 0,15 DO (tablet Stouffer TP35C, calibrada pel fabricant). Tots els controls s'han fotografiat de nou amb la tarja de calibrat disposada

just a sobre de la placa, emprant una tapa de càpsula de Petri perforada com a suport (s'ha comprovat que la profunditat de camp cobreix tot el gruix de l'agar i la distància fins la tapa).

S'ha pres la imatge de cada rèplica intercalant la presa d'imatges de les mostres amb els diferents blancs amb i sense la tarja de calibrat, per a uniformitzar qualsevol variació en les condicions de presa d'imatges.

## **Processat d'imatges**

El processat d'imatges ha estat realitzat íntegrament amb el programari lliure ImageJ v.1.43f (Rasband, W.S., 1997).

*Neteja d'imatges:* Les imatges han estat netejades automàticament amb l'ajut de macros programades per l'autor (vegeu l'Annex 9.1 per al codi emprat). El procés de neteja s'ha aplicat a totes les imatges, blancs i taules de calibrat inclosos, mantenint còpia de les imatges originals. Breument, s'ha convertit totes les imatges a format Tiff 8 bit, en escala de grisos, sense compressió. A continuació s'ha invertit totes les imatges, i s'ha aplicat un filtre *Median* a 1 px de diàmetre. S'ha generat una imatge a partir de la mitjana de totes les imatges (invertides) dels blancs i aquesta ha estat restada mitjançant la funció *image calculator* a totes les imatges, blancs i taules inclosos, eliminant d'aquesta manera bona part del soroll de fons i qualsevol gradient originat per la font de llum. Les imatges resultants, s'han invertit de nou, i s'ha eliminat la part corresponent al suport i la resta de soroll de fons. En aquest punt les imatges han estat revisades individualment per evitar errors en el processat automàtic i eliminar qualsevol taca residual. En el cas dels blancs, no s'ha netejat la zona ocupada per les colònies en els diferents tractaments per a reflectir-hi l'error per soroll de fons.

*Calibrat i escalat:* S'ha mesurat en les 20 imatges dels controls amb tarja de calibrat la mitjana del valor de gris (0-255) d'una selecció rectangular de 50×100 px per a cada increment de DO de la tarja. El calibrat s'ha realitzat mitjançant l'aplicació del programa d'anàlisi d'imatge, a partir de la regressió logarítmica de cada increment de DO de la tarja vers la mitjana del valor de gris corresponent en les 20 imatges [ $DO = a + b \times \ln(\text{valor de gris} - c)$ ]. L'escalat (conversió de píxels a mm) s'ha realitzat mesurant la mitjana de la llargada lineal en píxels de la taula de calibrat (40 mm) a quatre imatges diferents, i aplicant el factor de conversió resultant a la funció d'escalat del programari. Calibrat i escalat han estat aplicats a totes les imatges prèviament a les mesures.

*Mesura de la biomassa:* La mesura de la biomassa per anàlisi d'imatge s'ha realitzat mesurant la densitat integrada (àrea × DO mitjana) de tota la imatge, dins d'un interval de grisos (*threshold*) entre 0 i 250. El procés s'ha automatitzat mitjançant macros (vegeu Annex 9.2).



*Mesura de paràmetres morfològics:* S'ha mesurat a tota la imatge (en l'interval de valors de gris 0-250) l'àrea total, densitat òptica màxima, DO mitjana i densitat integrada.

A més, s'ha mesurat en cadascun dels intervals compresos entre els llistats de densitat de gris 0-50, 50-100, 100-150, 150-200 i 200-250 les següents variables: àrea, densitat òptica mitjana, desviació estàndard de la DO, i la densitat integrada. També s'ha mesurat entre els llistats 0-50, 0-100, 0-150, 0-200, 0-250 l'àrea (àrea integrada), DO mitjana, densitat integrada, perímetre (suma de perímetres de totes les partícules més grans de 3x3 píxels), i la dimensió fractal del contorn. Finalment s'han mesurat l'àrea, el perímetre, i la longitud màxima de l'embolcall convex<sup>7</sup> (mitjançant la rutina Convex Hull Plus, Landini, G., 2004).

A partir d'aquestes variables s'ha calculat els següents indicadors de forma: circularitat ( $4\pi(\text{àrea integrada} / \text{perímetre}^2)$ ), circularitat de l'embolcall convex, convexitat (perímetre de l'embolcall convex / perímetre), concavitat (àrea de l'embolcall convex - àrea integrada), coeficient de variació (desv. estàndard<sup>2</sup> / DO Mitjana), solidesa (àrea integrada / àrea de l'embolcall convex), i la compacitat ( $((4/\pi) \times \text{àrea integrada})^{0.5} / \text{distància màxima}$ ) (Russ, J., 2007).

Tot el procés de mesura dels paràmetres morfològics també s'ha automatitzat mitjançant l'ús de macros (Annex 9.3).

*Mesura del perfil radial:* La mesura del perfil radial s'ha realitzat de manera semiautomàtica amb l'ajut de macros (Annex 9.4). S'ha realitzat un centrat previ de totes les imatges, de manera que el centre de masses de la zona central (porció de la colònia amb densitat de gris 0-60) coincideixi amb el centre de la imatge. Totes les imatges d'un mateix tractament han estat combinades en una imatge multicapa (*stack*) i se n'ha mesurat una selecció circular de la màxima àrea possible mitjançant el connector *Radial Profile Extended* v.1.0 (Carl, P., 2006).

## **Mesura de pes sec, C i N**

El calibrat de la tècnica ha estat realitzat a partir de les mostres de l'assaig a diferents concentracions de fructosa, emprant la mesura de pes sec, C total i N total com a mesures de referència.

*Mesura de pes sec:* La mostra congelada ha estat trosdejada i traslladada a un flascó Erlenmeyer, amb 100 ml d'aigua destil·lada i 1 ml HCl 2N. El flascó ha estat escalfat amb un forn microones a màxima potència i agitant la mostra fins a fondre l'agar, sense arribar al punt d'ebullició. La mostra ha estat filtrada en un filtre de fibra de vidre (Whattmann GF/C, Ø 25 mm, Ø porus 1,2 µm), prèviament tarat, mullat i escalfat amb

---

<sup>7</sup> Segons hem consultat al Centre de Terminologia (TermCat), embolcall convex és la denominació catalana adequada, equivalent de la forma anglesa *convex hull*.

aigua destil·lada a 90°C. La mostra ha estat rentada 3 vegades amb 50 ml d'aigua destil·lada a 90°C. Filtre i mostra s'han assecat en un recipient tancat amb gel de sílice deshidratat, durant un mínim de 48 h, i pesat en una microbalança de precisió (resolució 1 µg).

*Mesura de C i N:* Filtres i mostra han estat analitzats per a C i N total mitjançant anàlisi elemental per combustió en un analitzador elemental EA-1108 C.E. Instruments (Thermo Fisher Scientific) en les condicions de treball estàndard recomanades pel fabricant de l'instrument. S'ha utilitzat pentòxid de vanadi com a additiu per facilitar la combustió, i atropina com a patró.

## **Tractament estadístic**

Les dades obtingudes han estat importades i processades mitjançant Microsoft Excel. Totes les anàlisis estadístiques han estat realitzades amb el paquet estadístic R 2.9 (R Development Core Team, 2009).

Per al calibrat de la tècnica d'anàlisi d'imatge s'ha emprat una regressió lineal entre les mesures de densitat integrada [ $DO \times \text{àrea (mm}^2\text{)}$ ] i pes sec. La normalitat dels residus del model s'ha comprovat gràficament, segons Verzani, J., 2002.

Per a avaluar diferències significatives entre tractaments diferents per a una variable (densitat integrada, paràmetres morfològics, etc.), s'ha emprat una anàlisi de la variància d'un factor (nivell de significació  $\alpha = 0,05$ ).

Per a comprovar si es poden reconèixer les soques en funció dels paràmetres morfològics obtinguts amb l'anàlisi d'imatge s'ha emprat anàlisi d'agrupaments de k-mitjanes (*k-means*). Els paràmetres seleccionats per a l'anàlisi són la densitat integrada -com a indicador de la biomassa-, DO màxima i DO mitjana de tota la imatge. A més, com a descriptors de la forma de la colònia s'ha emprat les mesures de l'àrea, densitat integrada, perímetre de l'àrea, compacitat, concavitat i circularitat entre els l·lindars de gris 0-50, 50-100, 100-150, 150-200 i 200-250, i la mesura de l'àrea integrada entre els l·lindars 0-50, 0-100, 0-150, 0-200, 0-250.

El tractament i visualització de conjunts de dades multivariats és complex, i requereix d'eines estadístiques apropiades per a condensar i mostrar de manera entenedora els patrons presents en les dades. Per aquesta raó el conjunt de descriptors de les colònies van ser sotmesos al mètode d'escalat multidimensional de Kruskal. Aquest mètode és considerat usualment com el mètode d'ordenació no ponderat més robust (Minchin, P. R., 1987). Aquest mètode, a partir d'una matriu de distàncies obtinguda mitjançant una mètrica adequada a les variables sota estudi, redueix les dades a unes poques dimensions mentre intenta preservar el màxim de la variabilitat de les dades originals, i per tant faciliten la representació gràfica i la interpretació dels patrons en uns pocs eixos. Per a les

mesures de les colònies hem usat un escalat multidimensional de Kruskal amb dues dimensions a partir d'una matriu de distàncies euclidianes (paquet R "MASS").

Tos els valors d'error expressats en aquest treball corresponen a la desviació estàndard de la mesura.

## 4.3.- Resultats

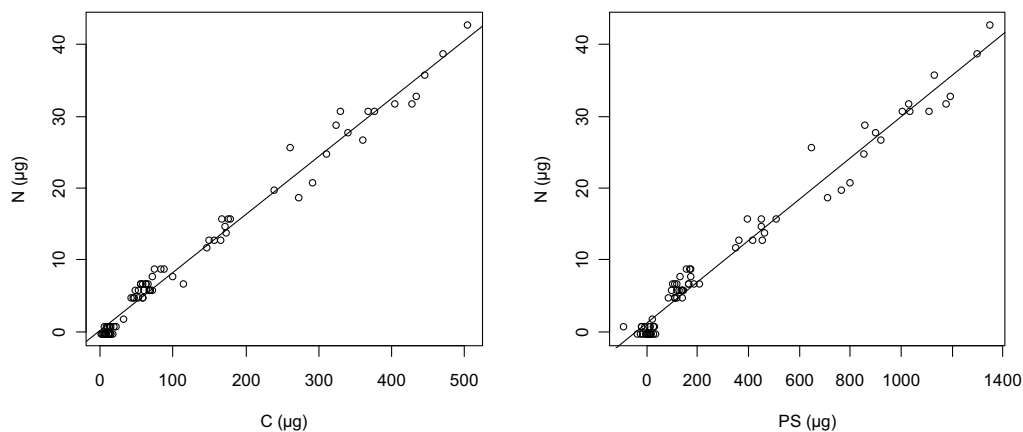
### Captura d'imatges

El sistema de captura d'imatges ha permès una resolució de 22,65 px/mm (1 píxel equival a un requadre de 44,2 µm de costat). La captura d'imatges permet realitzar la captura d'aproximadament 2 imatges per minut, un cop s'ha instal·lat el sistema.

L'ús d'una pantalla TFT combinat amb les càpsules de Petri de plàstic d'un sol ús, genera problemes de soroll de fons, deguda a la difracció de la llum dels punts RGB en la càpsula de Petri. Aquest soroll de fons es millora mitjançant l'ús d'un plàstic translúcid que actua de difusor i ajustant la profunditat de camp de la càmera. L'ús de filtres Median, conjuntament amb la subtracció del blanc de fons en el processat han resolt l'inconvenient sense problemes.

### Calibrat

La mesura de pes sec (PS) ha donat lloc a un error de mesura important (mitjana de -157,65 ±26,69 µg en els blancs). Aquest error probablement ha estat degut a l'erosió dels filtres en el procés d'extracció del miceli. Per al calibrat, s'ha estandarditzat la mesura de pes sec, restant aquest valor a totes les mesures.

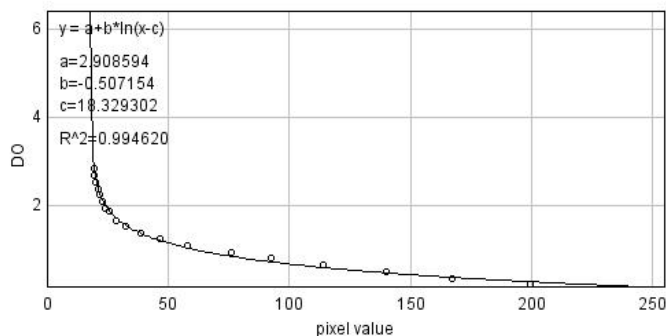


**Fig. 4.1:** Correlació entre N i C ( $R^2=0,9823$ ) i entre N i el pes sec (PS,  $R^2=0,9755$ )

La mesura de N té una forta correlació positiva amb les mesures de C i PS (fig. 1), pel que es pot descartar la presència d'errors significatius deguts a una mala extracció de l'agar (donat que el tartrat amònic és molt fàcilment soluble, i l'agar no és un component

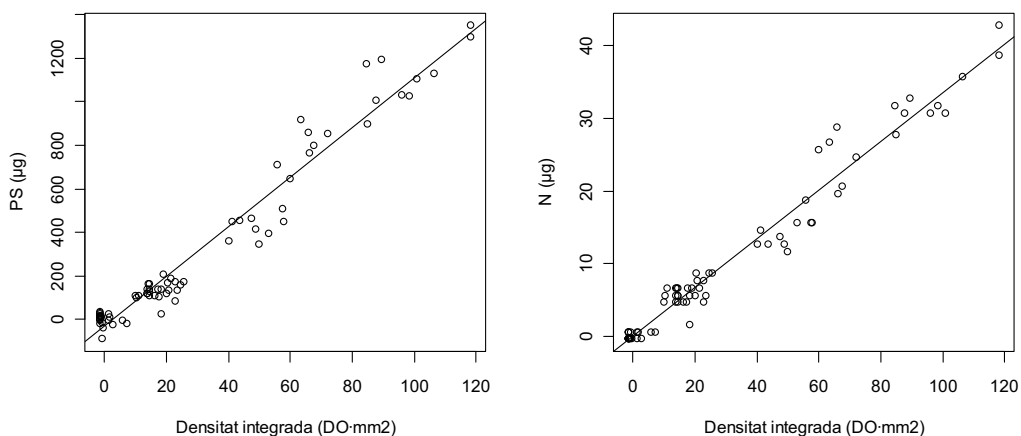
nitrogenat, una mala extracció de l'agar resultaria en alteracions significatives en la proporció C:N).

La corba de calibrat dels valors de gris de píxel a DO es correspon a una funció logarítmica (Russ, J., 2007). Aquesta funció és la que ofereix el millor ajust als valors obtinguts amb la mesura de la tarja calibrada ( $R^2=0,9946$ , fig. 2). Els valors màxims de DO de les colònies en cap cas no arriben a una DO màxima superior als llindars de saturació en la corba de calibrat (valor de gris 19, equivalent a 3,1112 DO).



**Fig. 4.2:** Corba de calibrat de valor de píxel a densitat òptica (DO).

Les mesures de densitat integrada es corresponen de forma lineal amb les mesures de PS, C i N ( $R^2=0,9574$ ,  $0,9569$  i  $0,9669$ , respectivament). En les condicions de l'estudi, la recta patró resultant del calibrat és  $y$  (PS ( $\mu\text{g}$ )) =  $-32,773 + 11,424 \text{ DO} \cdot (\text{mm}^2)$  (fig. 3).



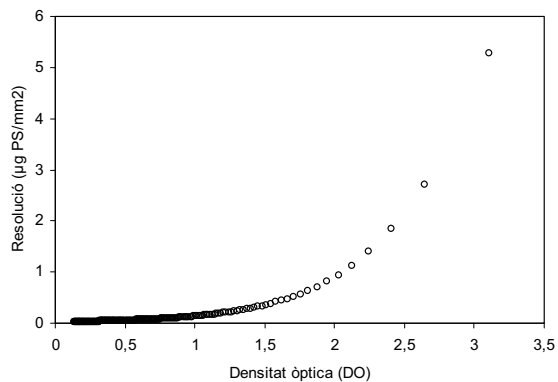
**Fig. 4.3:** Correlació lineal entre els valors de densitat integrada ( $\text{DO} \cdot \text{mm}^2$ ) respecte les mesures de pes sec i N ( $R^2=0,9574$  i  $0,9669$ , respectivament).

## Llindars de la mesura, sensibilitat, i resolució teòrics.

A partir de les rectes patrons de calibrat (Densitat integrada – PS), la mesura del soroll de fons (mesura de la densitat integrada en els blancs) i la corba de calibrat a DO (valor de gris de píxel – DO), s’ha realitzat una estimació teòrica dels llindars de detecció i la sensibilitat de la mesura (mínim mesurable) de la tècnica.

Els llindars de mesura de la tècnica en les nostres condicions de treball es situen dins de l’interval 1,6780 i 35,5408  $\mu\text{g PS} / \text{mm}^2$ . Per sota d’aquesta densitat, la tècnica no té sensibilitat per a discernir la presència de miceli del soroll de fons causat pel medi de cultiu, i per sobre del límit superior, la mesura de DO satura. Tenint en compte la resolució de la imatge (22,65 px/mm), la sensibilitat teòrica de la tècnica (mínim mesurable) en les nostres condicions de treball és de 0,0741  $\mu\text{g PS}$ .

La resolució de la tècnica (mínim increment de biomassa mesurable en un punt de la colònia), és variable en funció de la densitat de la colònia en aquell punt. Donat que la corba de calibrat de valor de píxel a DO és una funció logarítmica, l’increment de pes sec mesurable en una unitat d’àrea donada augmenta exponencialment en funció de la DO (fig. 4).

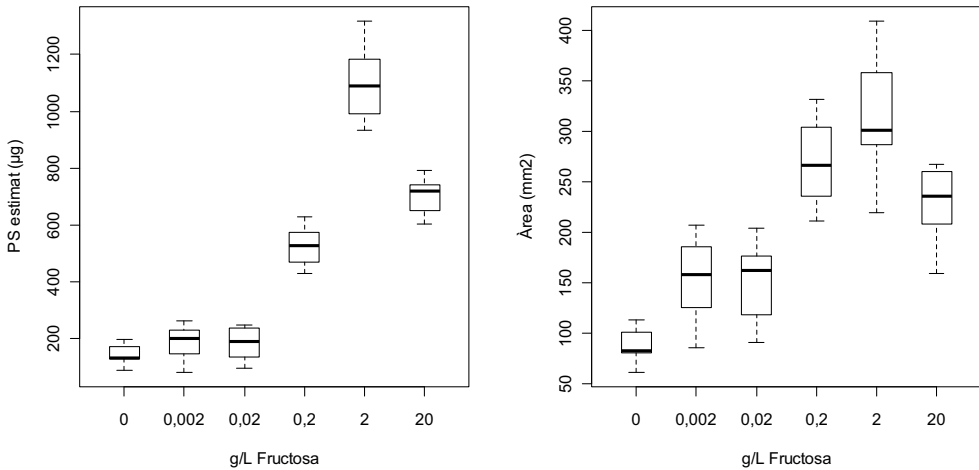


**Fig. 4.4:** Resolució (mínim increment mesurable de PS per  $\text{mm}^2$ ) en funció de la densitat de la colònia en un punt.

## Efecte de la concentració de fructosa en el creixement micelià de *P. eryngii*

L’assaig de creixement de la soca UBCC-125 de *Pleurotus eryngii* a diferents concentracions de fructosa en el nostre medi de cultiu mostra un creixement màxim al voltant de 2 g/l de fructosa. La manca de fructosa en el medi no ha impedit un cert creixement del miceli, a partir de les seves reserves.

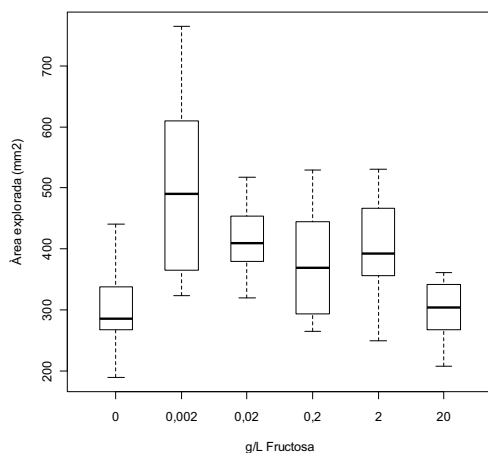
En comparar l'Àrea i el PS estimat per anàlisi d'imatge s'observen diferències significatives en els resultats, especialment a les concentracions 0,002, 0,02 i 0,2 g/l fructosa, ja que la correlació entre pes sec i àrea no es manté constant en els diferents tractaments (han donat lloc a colònies de densitat molt diferent, fig. 5). A més, en tots els casos, les desviacions estàndard són proporcionalment molt més grans si emprem l'àrea de la colònia com a indicador de biomassa.



**Fig. 4.5:** Comparació dels resultats obtinguts mitjançant la mesura de PS i d'Àrea estimats per anàlisi d'imatge a diferents concentracions de Fructosa 7 dies de creixement).

Els tractaments amb menys concentracions de sucre han donat lloc a creixements micelians molt tènues, amb prou feines perceptibles a ull nu i molt propers als mínims detectables per la tècnica.

En termes generals, els descriptors morfològics indiquen que es formen colònies més denses, arrodonides i compactes a més concentració de fructosa. També és de destacar en aquest assaig la mesura de l'àrea de l'embolcall convex, que podria emprar-se com a indicador de l'àrea explorada pel miceli, i presenta àrees similars o fins i tot més grans en les concentracions de sucres molt baixes (fig. 6).



**Fig. 4.6:** Àrea de l'embolcall convex (descriptor de l'àrea explorada per la colònia) a diferents concentracions de Fructosa.

## Perfils radials de les colònies

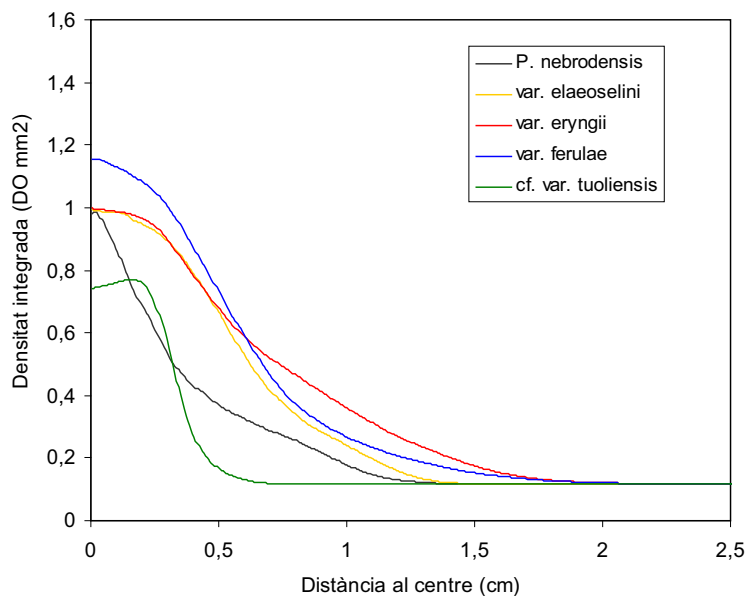
Els perfils radials obtinguts mostren una distribució de la biomassa força similar a una campana de Gauss. S'observa una gran variabilitat en els perfils radials de biomassa entre les diferents soques d'una mateixa varietat, que fa que no podem definir un patró característic en els perfils radials per a les varietats de *Pleurotus eryngii* estudiades.

Els aïllats de *P. nebrodensis* han donat lloc a creixements clarament més reduïts, fet que queda reflectit en el seu perfil radial. Hem considerat com un cas a banda la soca UBCC-1459 (també *P. nebrodensis*) que ha donat lloc a un tipus de creixement molt menys dens però molt invasor, molt diferent de tota la resta de soques estudiades (figs. 7 i 8).

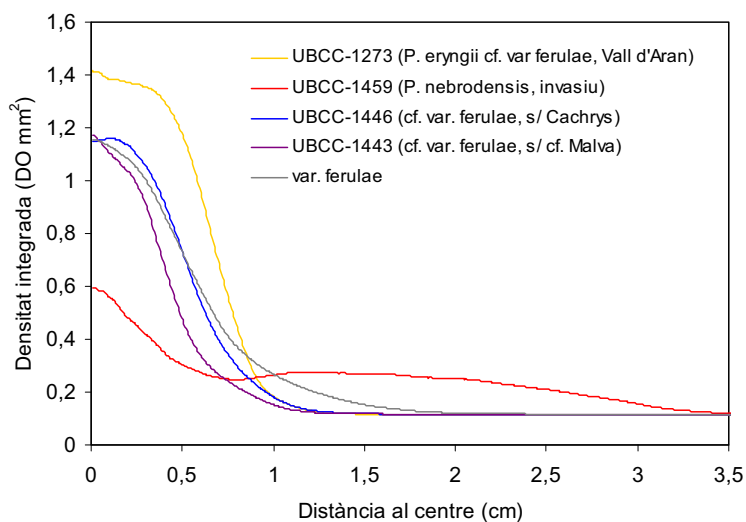
La soca comercial UBCC-1346 (assignat com a cf. *var tuoliensis*) presenta un creixement mínim en comparació amb la resta de soques, i molt concentrat a la zona del punt d'inòcul.

Pel que fa a la resta de soques de determinació dubtosa, les soques UBCC-1446 i UBCC-1443 (cf. *var. ferulae*) donen lloc a un perfil radial molt similar a la mitjana de la varietat corresponent. La soca UBCC-1273, aïllada a partir de carpòfors blancs a la Vall d'Aran, presenta un creixement diferent a la resta, molt més dens i uniforme.





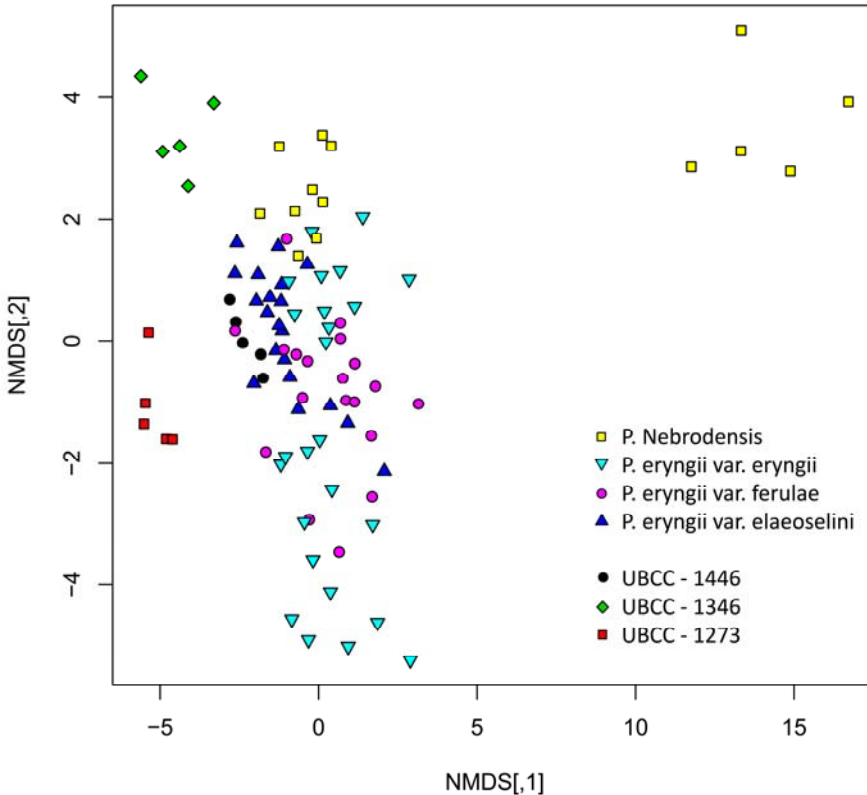
**Fig. 4.7:** Mitjana dels perfils radials de les diferents varietats estudiades.



**Fig. 4.8:** Perfil radial de les soques d'identificació dubtosa i de la soca UBCC-1459, que presenta un patró de creixement invasiu. S'afegeix en gris la mitjana de la varietat *ferulae*.

## Comparació morfològica de diferents soques del complex *eryngii*

La tècnica d'anàlisi d'imatges ens ha permès mesurar un centenar paràmetres relatius a la morfologia macroscòpica de les diferents soques estudiades. D'aquests, se n'ha seleccionat els paràmetres que recullen millor la variabilitat morfològica de les imatges obtingudes, que són els emprats en l'anàlisi.



**Fig. 4.9:** Representació multidimensional en dos eixos de la matriu de distàncies obtinguda a partir d'una selecció de descriptors morfològics de cada colònia. Es representen en colors i figures diferents les diferents varietats estudiades. Les tres soques d'identificació dubtosa es representen separatament en negre, vermell i verd.

La figura 9 mostra una representació gràfica en dos eixos de la matriu de distàncies obtinguda. La soca UBCC-1459 (*Pleurotus nebrodensis*), de creixement invasiu i una mida molt més gran, resta molt separat de la resta (quadrats grocs en l'extrem superior dret). Els patrons de creixement de les soques UBCC-1273 (recol·lecció de *Pleurotus cf. nebrodensis* a la Vall d'Aran, quadrats vermells) i UBCC-1346 (*Pleurotus eryngii* cf. var

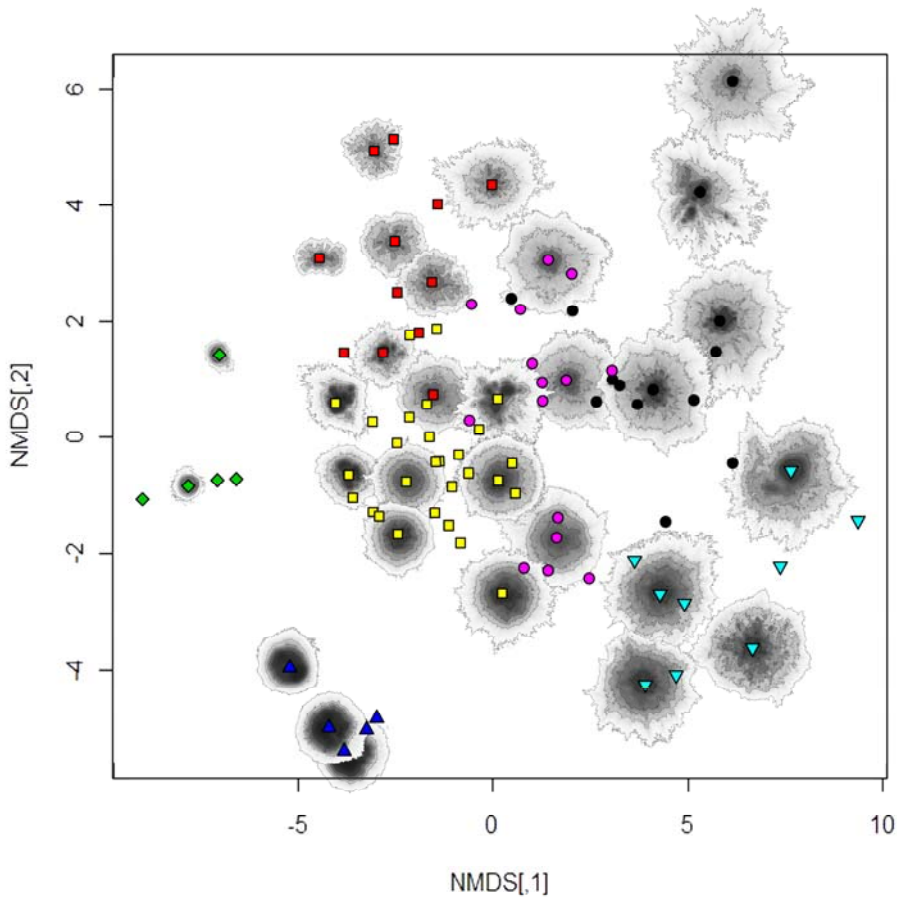
*tuoliensis*, rombes verds) també resten clarament separades de la resta en grups independents.

A banda d'aquestes tres soques de creixement diferenciat, la resta d'aïllats inclosos en l'estudi s'agrupen en un únic conjunt, heterogeni i relativament ampli. Aquest conjunt inclou representants de tots els tàxons, que tendeixen a agrupar-se en sectors dins del conjunt.

L'anàlisi d'agrupaments de k-mitjanes ens permet classificar les colònies en grups o patrons de creixement per la seva similitud, a partir dels paràmetres morfològics mesurats. Una anàlisi de k-mitjanes en 7 grups a partir dels paràmetres morfològics seleccionats dóna el resultat il·lustrat en la figura 10 i la taula 1. La soca UBCC-1459 ha estat retirada d'aquest anàlisi, donat que la gran diferència de mida en distorsiona els resultats. El nombre de grups s'ha augmentat de 5 (el nombre de varietats estudiades) a 7, ja que com podem observar al la figura 9, el grup *eryngii* és molt més heterogeni que la resta de varietats dividint-se en dos grups clarament separats, i perquè la soca aranesa UBCC-1273 es separa clarament de la resta en un grup independent.

VARIETAT	UBCC	HOSTE	GRUP K-MITJANES						
			1 cyan	2 magenta	3 negre	4 groc	5 roig	6 blau	7 verd
<i>P. nebrodensis</i>	1332	<i>Cachrys</i>					4		
	1334	<i>Cachrys</i>					5		
<i>P. eryngii</i> var. <i>eryngii</i>	125	<i>Eryngium</i>	5						
	955	<i>Eryngium</i>		4	1				
	1323	<i>Eryngium</i>	4				1*		
	1325	<i>Eryngium</i>		5					
	1342	<i>Eryngium</i>		4			1*		
<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i> (=thapsiae)	1385	<i>Ferula</i>		2					
	1395	<i>Ferula</i>			4	1			
	1451	Cultivada			4	1*			
	1453	<i>Ferula</i>				5			
	1442	<i>Thapsia</i>			3	2*			
<i>P. eryngii</i> var. <i>elaeoselini</i>	1312	<i>Thapsia</i>				5			
	1389	<i>Elaeoselinum</i>				5			
<i>cf. var tuoliensis</i>	1346	cultivada							5
<i>cf. ferulae</i>	1273	<i>cf. Laserpitium</i>						5	
<i>cf. ferulae</i>	1443	<i>Malva/ Alchemilla</i>				4	1		
<i>cf. ferulae</i>	1446	<i>Cachrys</i>				5			

**Taula 4.1:** Agrupació de les soques estudiades en 7 patrons de creixement mitjançant anàlisi de k-mitjanes (els colors es corresponen a la figura 10). Les soques de classificació dubtosa es representen per separat. Els números a cada casella corresponen al número de rèpliques agrupades en aquell cluster o patró de creixement assignat per l'anàlisi de k-mitjanes. Es ressalta en gris el grup representatiu per a cada soca, i s'assenyala amb un asterisc les rèpliques amb un creixement significativament reduït.



**Fig. 4.10:** Representació gràfica en dos eixos de la matriu de distàncies obtinguda a partir dels paràmetres morfològics. Es representen en colors i figures diferents els 7 grups o patrons morfològics diferenciats mitjançant anàlisi de k-mitjanes (vegis taula 1). A títol informatiu, es representen algunes imatges de les colònies (centrades al punt corresponent, a escala, invertides i amb cadascun dels llindars establerts perfilats en negre).

A la taula 1 podem observar com la majoria de soques es poden assignar a un dels patrons de creixement diferenciats per l'anàlisi d'agrupaments (80-100% de les rèpliques), a excepció de les soques 1385 i 1442, que presenten les seves rèpliques repartides entre dos grups diferents. No s'observa una relació unívoca entre els agrupaments i les diferents varietats (un grup per a cada varietat), però sí una tendència de cada tàxon a créixer seguint un o dos dels 7 patrons de creixement diferenciats (grups 1 i 2 per a la varietat *eryngii*, 3 i 4 per a la varietat *ferulae*, grup 4 per a la varietat *elaoselini*, i el grup 5 per a la varietat *nebrodensis*).

La majoria de colònies de la varietat *eryngii*, generalment amb una taxa de creixement alta, i de contorn irregular, queden agrupades als conglomerats 1 i 2 (en cyan i magenta respectivament, que agrupen el 88% de les rèpliques). Aquests conglomerats o patrons es tenen diferències significatives per la seva biomassa total ( $4460 \pm 971,6 \mu\text{g}$  i  $2959,7 \pm 485,9 \mu\text{g}$  de pes sec estimat per als grups 1 i 2, respectivament), pel que entenem que l'anàlisi d'agrupaments ha discriminat les soques d'aquesta varietat en dos grups principalment per la seva taxa de creixement.

Les soques que pertanyen a la varietat *ferulae* resten en bona part repartides entre els grup 3 i 4 (en negre, 91,6% de les rèpliques). Aquesta varietat és la que ha donat lloc a més variabilitat, tant pel que fa a la seva taxa de creixement com a la seva morfologia. De fet, moltes de les rèpliques són impossibles de discernir *de visu* de les de la varietat *eryngii* (sobretot en rèpliques els aïllats UBCC-1385 i 1395), mentre que d'altres aparenten, un patró més irregular (sobretot en rèpliques de les soques 1451 i 1453). Tot i això, l'anàlisi d'agrupaments de k-mitjanes separa aquestes soques com a morfològicament diferents d'aquells de la varietat tipus (a excepció de la soca 1385, que queda a cavall entre ambdues). Com ocorre en el cas dels aïllats de la varietat *eryngii*, la gran diversitat morfològica fa que l'anàlisi d'agrupaments divideixi aquest tàxon en dos grups, significativament diferents pel que fa a la seva taxa de creixement ( $2057,3 \pm 533,8$  i  $3762,6 \pm 726,2 \mu\text{g}$  pes sec estimat, respectivament).

Les soques assignades a la varietat *elaeoselini* han donat lloc a colònies força similars a les soques de la varietat *ferulae* amb una taxa de creixement reduïda. Les dues soques incorporades a l'anàlisi de k-mitjanes, s'agrupen en el grup 4 (en groc, 100% de les rèpliques).

Finalment, i a banda de la soca UBCC-1459, retirada de l'anàlisi, les dues soques de *P. nebrodensis* presenten un creixement moderat a lleu, amb colònies arrodonides i de marge irregular en totes les densitats, i queden agrupades en el grup 5 (en vermell, 100% dels casos).

Pel que fa a les soques de classificació dubtosa, els aïllats UBCC-1273 (carpòfors blancs, Vall d'Aran) i UBCC-1346 (cf. *tuoliensis*), presenten patrons patró de creixement marcadament diferenciat i es corresponen en exclusiva als conglomerats 6 (en blau) i 7 (en verd), respectivament. Les altres dues soques de determinació dubtosa (UBCC-1446 i 1443) es corresponen al patró núm. 4, consistent amb la varietat *ferulae*, tal i com les havíem identificat en base a la morfologia del carpòfor i la seva mida esporal.

## CORRESPONDÈNCIA DEL L'ANÀLISI DE K-MITJANES AMB PATRONS SUBJECTIUS (DE VISU)

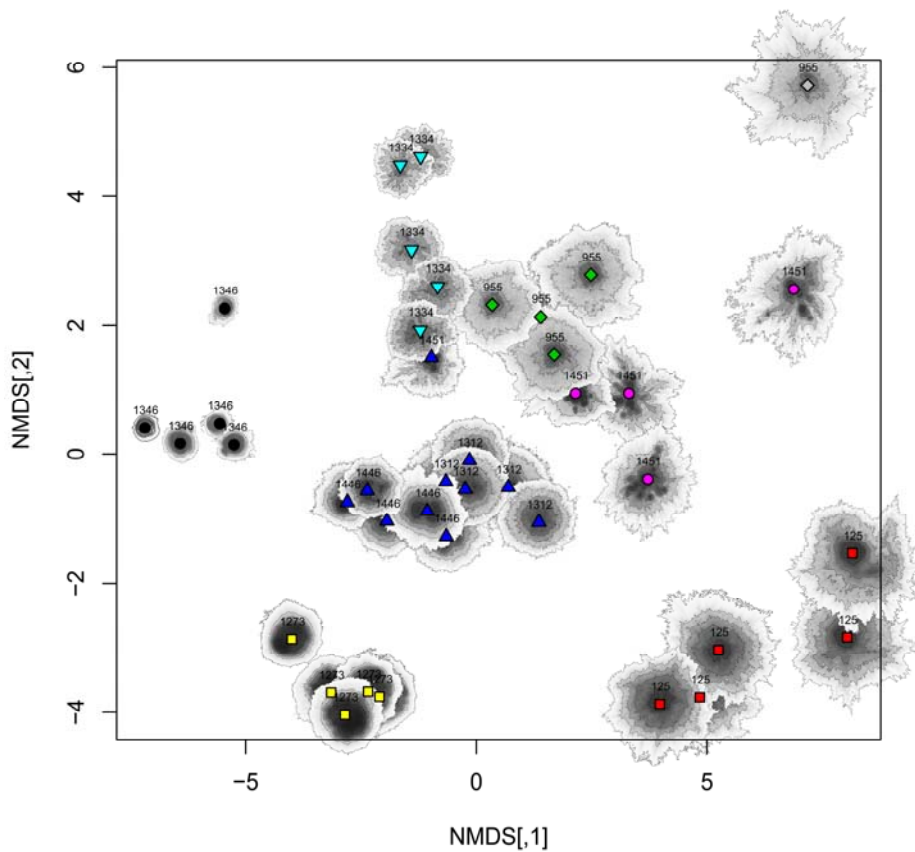
Deixant a banda de la soca UBCC-1459 (*P. nebrodensis*) amb un patró de creixement invasiu, al inspeccionar visualment totes les colònies obtingudes (sense conèixer la identitat de cada rèplica en el moment de la tria) hem pogut classificar-les en un màxim de 8 grups o patrons de creixement diferents en base a la seva mida i el seu aspecte. Aquesta identificació visual és molt subjectiva, i per tant resulta molt difícil descriure quins són els criteris que hom emprà a l'hora de classificar les colònies, més enllà de la seva mida. A més, la variabilitat obtinguda fa molt difícil delimitar aquests patrons: en molts casos les rèpliques d'una mateixa soca es troben a cavall entre dos o més d'aquests patrons i resulta difícil assignar-les a un d'ells.

Per a comprovar si els descriptors morfològics mesurats ens permetrien discernir aquests grups d'una forma objectiva, hem dut a terme una anàlisi k-mitjanes simplificada, seleccionant un aïllat representatiu de cadascun d'aquests patrons subjectius. La selecció s'ha realitzat de manera que totes les varietats hi quedessin representades i que totes les rèpliques de l'aïllat haguessin estat classificades *de visu* en el mateix grup subjectiu. Les soques seleccionades són UBCC-125 (var. *eryngii*), UBCC-955 (var. *eryngii*), UBCC-1273 (cf. var. *ferulae*), UBCC-1312 (var. *elaeoselini*), UBCC-1334 (var. *nebrodensis*), UBCC-1346 (cf. var. *tuoliensis*), UBCC-1446 (cf. var. *ferulae*) i UBCC-1451 (var. *ferulae*).

Una anàlisi d'agrupaments en 8 grups mitjançant k-mitjanes (fig. 11 i taula 2) ens permet identificar 7 de les 8 soques triades. Els diferents aïllats se separen en grups diferents, a excepció d'una rèplica de les soques UBCC-1451 i 955. Les soques UBCC-1312 i 1446 queden agrupades en un únic grup per ser molt similars i homogènies en comparació amb la resta, tot i que com es pot veure a la figura 11, les diferents rèpliques es concentren en extrems diferents dins del grup. L'augment del nombre de grups de l'anàlisi no permet discernir aquests dos aïllats sense retirar de l'anàlisi les soques amb més variabilitat.

<b>AGRUPAMENT K-MITJANES</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>UBCC-125</b> (var. <i>eryngii</i> )	5							
<b>UBCC-955</b> (var. <i>eryngii</i> )		4						1
<b>UBCC-1273</b> (P. cf. <i>ferulae</i> )			5					
<b>UBCC-1312</b> (var. <i>elaeoselini</i> )				5				
<b>UBCC-1446</b> (cf. var. <i>ferulae</i> )				5				
<b>UBCC-1334</b> (P. <i>nebrodensis</i> )					5			
<b>UBCC-1346</b> (cf. var. <i>tuoliensis</i> )						5		
<b>UBCC-1451</b> (var. <i>ferulae</i> )				1			4	

**Taula 4.2:** Agrupació mitjançant anàlisi de k-mitjanes de les varietats seleccionades en 7 patrons de creixement. Els números a cada casella corresponen al número de rèpliques agrupades en aquell cluster o patró de creixement.



**Fig. 4.11:** Representació gràfica en dos eixos de la matriu de distàncies obtinguda a partir de descriptors morfològics. Es representen en colors diferents els 8 grups o patrons morfològics obtinguts mitjançant anàlisi de k-mitjanes. Darrere de cada punt es representa la imatge corresponent a escala (invertides i amb cadascun dels llinars perfilats en negre per a més claredat).

---

## 4.4.- Discussió

L'ús de la mesura de l'àrea com a indicador de creixement de colònies *in vitro* pressuposa que la densitat mitjana de les colònies en tots els tractaments de l'estudi és constant. Aquest no és el cas de la majoria de bolets comestibles, que no sempre donen lloc a colònies rodones i de marge ben definit com sí ho fan la majoria de deuteromicets.

Aquest fet queda palès en els resultats obtinguts a partir de creixements de *Pleurotus eryngii* en diferents concentracions de fructosa, que ha donat lloc a colònies amb densitats i patrons de creixement ben diferents. La necessitat al nostre laboratori d'un sistema rutinari per a la mesura fiable de creixements *in vitro* ha resultat en el procediment de mesura aquí proposat.

El fet que la captura de la imatge sigui amb llum transmesa i no reflectida, converteix el sistema en un densitòmetre a escala macrosòpica, donat que la mesura resultant és la densitat òptica de les colònies al llarg de la seva superfície. Això permet una mesura estimada del pes sec, i per tant, estandarditzada.

Per aquest motiu, la tècnica permet la comparació de creixements entre tractaments i/o organismes diferents. A més, la tècnica no és destructiva, i permet una mesura objectiva de la morfologia de les colònies. A coneixement de l'autor, aquest és el primer procediment estandarditzat per a la mesura i caracterització de creixement de basidiomicets *in vitro* a nivell macrosòpic, fins ara descrit, per als cultius rutinaris en càpsula de Petri.

### **Disseny d'un medi de cultiu transparent.**

El medi de cultiu emprat s'ha dissenyat per a obtenir una total transparència i alhora, poder modificar les proporcions dels principals macronutrients, micronutrients i vitamines sense afectar la resta de components. Això permet realitzar assaigs que requereixen incidir en aquest sentit (per exemple, estudis sobre els requisits nutricionals bàsics) i a més el fa compatible com a medi base per a l'avaluació de les capacitats enzimàtiques d'un aïllat mitjançant mètodes colorimètrics. En tot moment s'ha evitat l'ús d'extractes (extracte de malta, llevat, peptona...) degut a la seva composició complexa, variable segons el lot i proveïdor, i a la coloració que sovint confereixen al medi.

La transparència del medi de cultiu és un factor clau per a poder realitzar la captura d'imatges per llum transmesa, i per aquesta raó s'ha emprat agar purificat. Malauradament, també és necessari reduir la concentració d'agar en el medi de cultiu per tal que aquest sigui prou transparent com per registrar els creixements més tènues. Altres estudis han mostrat que hi ha diferències significatives en el comportament del creixement i en la morfologia del miceli a nivell microscòpic segons l'agent gelificant



emprat i la presència o absència d'una membrana de cel·lofana que separi la colònia del medi (Reeslev, M. i Kjoller, A., 1995). Els resultats, doncs, no seran extrapolables a assaigs *in vitro* en medis estàndard de cultiu (amb concentracions d'agar entre 10 i 15 g/l). Aquest inconvenient es pot resoldre augmentant la concentració d'agar emprada fins als 10 g/l, sempre que no es requereixi mesurar creixements molt poc densos, que quedaran emmascarats pel soroll de fons de la imatge degut a la turbidesca del medi.

## **Inòcul**

S'ha pogut comprovar que el sistema d'inoculació emprat pot afectar notablement la morfologia de les colònies resultants. El sistema estàndard d'inoculació *in vitro* consisteix en traslladar un disc troquelat del marge d'una colònia crescuda en el mateix medi de cultiu que s'emprarà en l'assaig. Aquest sistema és el més senzill, i dona lloc a resultats relativament homogenis, tot i que pot donar a variacions importants si els cultius mare tenen diferents graus de colonització, o aquesta no és homogènia –p. ex., degut a taxes de creixement notablement diferents-, a la depleció de nutrients, o als eventuais metabòlits secundaris excretats pel propi fong.

En els assaigs en diferents medis de cultiu, aquest procediment d'inoculació pot aportar una quantitat significativa de components que alterin els resultats. Per aquesta raó, en el nostre assaig a diferents concentracions de sucres hem emprat pèl·lets obtinguts en cultiu líquid, esbaldits en aigua destil·lada per a eliminar qualsevol aportació de sucres. L'ús de carbó actiu encapsulat en alginat -no descrit en la literatura- afavoreix en *P. eryngii* la homogeneïtat en la mida dels diferents pèl·lets, alhora que adsorbeix possibles metabòlits secundaris que puguin afectar l'assaig. Aquest procediment s'ha mostrat prou eficaç, tot i que cal prendre cura en la manipulació del pèl·let, que es pot malmetre accidentalment per abracció amb les pinces o l'ansa de sembra i afectar el patró de creixement resultant.

## **Captura i processat d'imatges.**

La captura d'imatges ha estat dissenyada amb la intenció de minimitzar els recursos necessaris, emprant aparells habituals i assequibles en qualsevol laboratori (càmera digital, trípod i pantalla TFT). Originalment, la tècnica es va dissenyar i posar a punt per a la captura d'imatges amb escàners que permetien la captura per llum transmesa mitjançant una safata interna (p. ex., Agfa, Duoscan T2000-XL). Tot i ser un sistema perfectament vàlid, darrerament, aquests models han estat progressivament descatalogats, i l'aparició i millora exponencial de la resolució de les càmeres rèflex digitals en els darrers anys les fan una opció més universal.

Les imatges obtingudes han donat lloc a un soroll de fons important, en bona part degut a la difracció dels colors emesos per la pantalla TFT en el plàstic injectat de la càpsula de Petri. Aquest soroll de fons es pot reduir en gran mesura amb l'ús de difusors de llum,

un transil·luminador homogeni de llum en comptes de la pantalla TFT, o emprant càpsules de Petri de vidre o recipients alternatius amb més qualitat òptica (o tot alhora).

Les colònies de *P. eryngii* UBCC-125 crescudes amb poc o gens de fructosa, han donat lloc a creixements laxes molt propers o fins i tot inferiors a la sensibilitat mínima. En aquest sentit cal prendre molta cura en el procés de neteja del soroll de fons al processar les imatges, ja que pot afectar sensiblement la morfologia del perfil de la colònia, i fa molt recomanable aplicar es mesures abans esmentades per a reduir al màxim el soroll de fons.

El processat d'imatges, tant pel que fa al procés de neteja com a la mesura, ha estat dissenyat de forma que es pugui automatitzar mitjançant l'ús de macros, si bé és recomanable una inspecció visual després de la neteja i prèvia la mesura, per evitar errades. Això permet pre-processar i mesurar centenars d'imatges en molt poc temps.

### **Calibrat de la tècnica**

La densitat integrada ha resultat en una bona correlació amb els indicadors de biomassa mesurats (PS, C i N), especialment tenint en compte el considerable error de base obtingut en aquestes mesures de referència. La funció de resposta entre les mesures de DO obtinguts i la biomassa real és lineal.

Els fongs filamentosos presenten certes dificultats en les mesures de densitometria, ja que les hifes queden agregades i no donen lloc a una terbolesa homogènia fàcilment mesurable, com sí ho fan bacteris i llevats. Banerjee, U. C., Christi, Y. et al., 1993 varen comprovar que la relació entre DO (450nm) i biomassa en suspensions de miceli fragmentat és lineal, però amb variacions significatives en la sensitivitat segons la mida a la que es fragmenti el miceli. Això en limita les possibilitats, donat que tal com reconeix l'autor, en les mateixes condicions de fragmentació, tractaments o tàxons diferents poden donar lloc a fragmentacions també diferents. Langvad, F., 1999, va desenvolupar una tècnica per a mesurar microcolònies senceres crescudes en càpsules tipus ELISA, també obtenint una correlació lineal entre la densitat òptica i el pes sec, aquest cop amb una correlació força constant per a colònies d'espècies diferents. Aquesta tècnica, però, només permet la mesura de microcolònies.

En el nostre cas s'eviten aquestes limitacions, ja que la mesura es realitza sobre colònies senceres. És necessari realitzar calibrats independents per al cas de tàxons diferents, ja que la relació DO-biomassa podria variar (p. ex., en cas de fongs amb hifes de diàmetre significativament diferent o amb una paret cel·lular més engruixida). La mesura de C i N han resultat ser indicadors prou fiables per al calibrat, que a més, permeten comprovar que la mesura de biomassa no està alterada per una mala extracció de l'agar. En estudis previs hem posat punt l'extracció i mesura de quitina per colorimetria, i la d'ergosterol mitjançant HPLC, per a emprar-los com a mesures de referència en el calibrat (resultats no presentats). Aquests indicadors de biomassa han donat lloc a resultats amb un error

de mesura més gran que en el cas de la determinació del PS, C i N, a banda que comporten un procediment molt més car, llarg i tediós.

La sensibilitat i resolució teòrics de la mesura de creixement per anàlisi d'imatge mostren que aquesta té un potencial enorme per a la mesura de petites variacions de la biomassa. La sensibilitat i resolució reals obtinguts són difícils de quantificar i probablement encara disten d'aquest valor teòrics, ja que ha calgut restar la mitjana dels blancs a les imatges i emprar filtres Median. Tot i això, són més que suficients per a la majoria d'assaigs in vitro. En qualsevol cas, la reducció del soroll de fons pels mètodes ja assenyalats i l'opció d'emprar càmeres digitals amb més resolució, permetran arribar fàcilment a resolucions reals molt elevades.

## **Descriptors morfològics**

El cervell humà està molt ben preparat per a diferenciar visualment formes i textures diferents. Malgrat això, ens és molt difícil expressar-ho acuradament a través del llenguatge, ja que disposem de relativament pocs adjectius, i aquests solen ser aproximatius (allargat vs. arrodonit, llis vs. rugós, etc.). Per aquesta raó, ens sol ser necessari l'ús d'un referent per a la descripció de la forma d'un objecte (cotonós, vellutat, com "tal" objecte, etc.).

Per aquesta raó que ens és necessari l'ús de descriptors morfològics per a quantificar l'aspecte d'un objecte, en el nostre cas, per a descriure el patró de creixement dels nostres aïllats i fins i tot classificar-los. Malauradament, aquests descriptors sovint no es corresponen a la apreciació subjectiva, molt més complexa (Russ, J., 2007).

La tècnica desenvolupada ens ha permès mesurar una vintena de descriptors de la forma de la colònia, els uns mesures directes, (com l'àrea, el perímetre, etc.) i d'altres, indicadors adimensionals derivats d'aquests primers (circularitat, etc.). També ens permet dividir la colònia en diversos llandars de densitat i mesurar-los separatament. En el nostre cas, hem dividit les colònies en cinc llandars, categoritzats com a zona de creixement molt lax (ML), lax (L), mig (M), dens (D) i molt dens (MD) (fig. 12) – tot i que es pot triar un nombre diferent de llandars si es desitja més o menys resolució segons la uniformitat de les colònies a estudiar. Això permet diferenciar colònies no només per la seva àrea, biomassa i contorn extern, sinó també segons la distribució de la biomassa dins de la colònia.

Cal tenir en compte que per a un tipus d'objecte o forma donats, alguns paràmetres poden donar informació redundant, especialment en el cas dels descriptors adimensionals. Per altra banda, a la bibliografia sovint es troben inconsistències en la nomenclatura i fins i tot la fórmula matemàtica dels descriptors de forma més comuns, per exemple, definint els paràmetres com l'invers ( $1/x$ ), o ometent constants com el nombre  $\pi$  (Russ, J., 2007).

Llistem a continuació els descriptors de forma mesurats, amb les fórmules per al seu càlcul i una breu descripció del que aquests representen en el nostre cas, si s'escau. Aquesta llista de paràmetres no és limitant, ja que es poden mesurar molts d'altres paràmetres i factors derivats a partir de les imatges obtingudes.

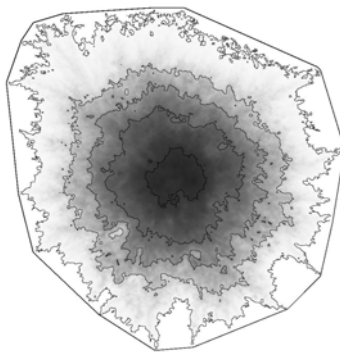
### MESURES DIRECTES:

- Àrea de la colònia (Area, A)

- Àrea de l'embolcall convex (àrea explorada) (HullArea, Ac)

L'embolcall convex (en anglès *Convex hull*) és el polígon convex més petit que pot inscriure una forma. Es tracta d'un polígon que té per vèrtexs els punts més externs de la colònia, de manera que el perfil d'aquest nou polígon no presenta cap convexitat.

L'àrea de l'embolcall convex en imatges de colònies fúngiques es pot emprar com a indicador de l'àrea efectiva que ha estat explorada per la mateixa.



**Fig. 12:** Imatge d'una colònia (*P. eryngii* var. *eryngii*). S'ha perfilat cadascun dels llindars de valor de gris. El polígon extern correspon a l'embolcall convex.

- Densitat mitjana de la colònia (D).

Mitjana dels valors de densitat òptica de tots els píxels dins la colònia. Aquest valor es situa entre 1-255 per a imatges no calibrades (valor de densitat de píxel).

- Densitat màxima (D0max)

Valor màxim de densitat òptica dins de l'àrea de la colònia. Correspon al valor de densitat en el centre de la mateixa.

- Desviació estàndard de la densitat de la colònia ( $\sigma_b$ )
- Perímetre de la colònia (P)
- Perímetre de l'embolcall convex (àrea explorada) (Pc)
- Longitud màxima de la colònia<sup>8</sup> ( $\emptyset_{max}$ )
- Dimensió Fractal (Df):

Mesura de l'autosimilaritat del contorn de la colònia.

### MESURES INDIRECTES

- Concavitat del àrea (Conc): Conc =  $A_c - A$

Àrea efectiva explorada per la colònia que no ha estat físicament envaïda pel miceli de la mateixa

- Densitat integrada (IntDen): IntDen = A D

Suma de tots els valors de densitat òptica de tots els píxels dins la colònia, o el que és el mateix, producte de l'àrea per la densitat mitjana. Aquest valor és l'indicador de biomassa en la colònia.

- Coeficient de variació de la densitat ( $V_D$ ):  $V_D = \sigma_D^2 / D$

Defineix el grau d'homogeneïtat de la densitat de la colònia.

### FACTORS ADIMENSIONALS

En aquest estudi hem emprat quatre descriptors de forma classics. Poden dur a una certa confusió que poden aportar informació molt similars per a un determinat tipus de forma.

- Circularitat (Circ): Circ =  $4 \pi A / P$

També anomenat factor de forma, és la proporció del quadrat del perímetre d'un cercle amb la mateixa àrea de la colònia respecte el quadrat del perímetre real. Dóna lloc a un valor entre 0 i 1 que defineix la circularitat del contorn de la colònia, aproximant-se a 1 per a un cercle perfecte, i allunyant-se'n per a

---

<sup>8</sup> En anglès, *Feret diameter*.

figures amb el perímetre més irregular. S' ha mesurat tant pel conjunt de la colònia com per a l'embolcall convex.

- Solidesa (S):

$$S = A / A_c$$

Proporció de àrea de l'embolcall convex (àrea explorada) respecte l'àrea de la colònia (àrea colonitzada). És un valor entre 0 i 1 que defineix el grau de convexitat de l'objecte en funció de la seva àrea. Un objecte amb un contorn totalment convex resulta amb un valor proper a 1.

Una colònia sòlida indica un creixement més característic de fongs que creixen en medis equilibrats, mentre que un creixement en medis deficients solen donar lloc a un contorn de miceli laxos, de marge irregular i amb forma d'estrella (poc compactes) .

- Compacitat (K, ang: Compactness):

$$K = \bar{\varnothing} / \varnothing_{\max}$$

Proporció entre la mitjana de diàmetres i el diàmetre màxim de la colònia. Resulta en un indicador entre 1 i 0 que descriu el grau de compacitat del contorn de la mateixa. Difereix de la solidesa pel fet que un objecte sòlid (amb el contorn totalment convex) pot ser allargat, i per tant no compacte. Difereix també de la circularitat per obviar la irregularitat del contorn, al ponderar la mitjana del diàmetre (calculat a partir de l'àrea de la colònia) amb el diàmetre màxim.

- Convexitat (Conv.):

$$\text{Conv.} = P_c / P$$

Proporció entre el perímetre de l'àrea explorada i el perímetre de la colònia. Dona una mesura entre 0 i 1 que reflecteix l'aspror del contorn de la colònia, independentment de si a grans trets aquesta és allargada, irregular o circular. De nou, un objecte amb un contorn totalment convex resulta amb un valor proper a 1.

## Perfils radials

Com a complement a les mesures de paràmetres morfològics, les tècniques d'anàlisi d'imatge ens permet realitzar la mesura dels perfils radials de les soques estudiades. Tot i no ser un descriptor morfològic en sí, això resulta en un gràfic que ens dona una idea global de la distribució de la biomassa en funció de la distància al centre. Aquesta aplicació pot ser especialment útil en l'estudi de formació d'halos de creixement.

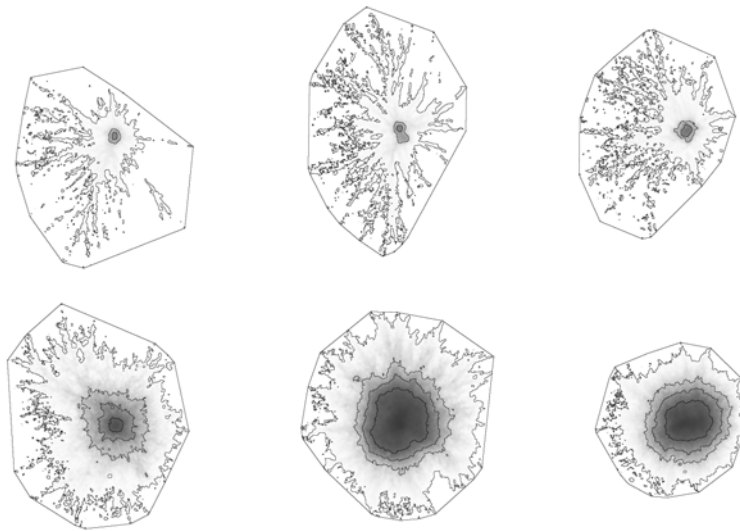
En el nostre cas d'estudi, els perfils radials de les soques típiques del complex *eryngii* han donat lloc a perfils radials molt similars. Tot i això, els perfils radials expressen amb claredat les diferències en la distribució del miceli d'algunes de les soques estudiades,

especialment en la soca 1459 (*P. nebrodensis*), amb un creixement poc dens i molt invasiu, i en la soca 1273, (cf. *ferulae*, de carpòfors blanquinosos, Vall d'Aran), molt més dens i compacte.

### **Efecte de la concentració de sucre en el patró de creixement de *P. eryngii***

La posta a punt de la tècnica d'anàlisi d'imatge ha permès d'observar el canvi en el patró de creixement de *Pleurotus eryngii* en funció de la concentració de sucres fàcilment assimilables en el medi, establint a més la concentració òptima per a creixement d'aquest bolet (2 g/l).

Els resultats mostren un canvi de comportament evident davant la manca de fructosa, formant colònies amb una densitat molt baixa, incrementant així l'eficiència de la prospecció de l'entorn. Per contra, el patró de creixement del fong es torna molt més arrodonit i compacte a concentracions més elevades de sucre. En aquest sentit, és especialment interessant el paràmetre de l'àrea de l'embolcall convex, que reflecteix com l'àrea efectiva explorada per la colònia és similar i fins i tot més gran en aquells tractaments amb una quantitat basal de sucre (Vegis figures 6 i 13). La mesura de la circularitat mostra també com aquest patró més "explorador" té un punt d'inflexió evident a partir dels 0,2 g/l de fructosa en el medi.



**Fig. 4.13:** Imatges de colònies de *P. eryngii* crescudes a diferents concentracions de fructosa en el medi (de dreta a esquerra i de dalt a baix: 0g/l, 0.002 g/l, 0.02 g/l, 0.2 g/l, 2 g/l i 20 g/l. Els llindars de densitat de miceli es troben perfilats en negre. El polígon exterior representa l'embolcall convex. El miceli menys dens es troba al límit de detecció de la tècnica, i s'ha perdut una part de la informació al costat dret de la imatge degut al procés de neteja del soroll de fons, fet especialment visible en les tres imatges superiors.

## Comparació morfològica de colònies d'aïllats del complex *eryngii*

La diversitat i la variabilitat obtinguts en la morfologia dels diferents aïllats inclosos en l'estudi fa molt difícil classificar-los visualment segons el seu patró de creixement. Si bé s'ha pogut diferenciar morfologies prou diferents, resulta impossible establir *de visu* llinars que en delimitin els diferents grups amb criteris objectius.

Les tècniques d'anàlisi d'imatge es mostren molt útils en aquest sentit. L'anàlisi d'agrupaments de k-mitjanes dels paràmetres morfològics obtinguts permet classificar les colònies obtingudes en funció de la seva similitud. L'assaig realitzat amb aquelles soques que es poden discernir *de visu* pel seu patró de creixement, ha establert grups que es corresponen en gran mesura amb les diferents soques seleccionades. Això fa pensar que la tècnica permet classificar objectivament morfologies de creixement *in vitro*, com a mínim, amb una resolució similar a la descripció visual.

Al nostre parer, aquesta aplicació de la tècnica d'anàlisi d'imatge pot ser un complement molt útil en un ampli ventall d'estudis. El fet que el medi de cultiu sigui estandarditzat i que la descripció de la forma de les colònies sigui quantificable ens permet tenir en compte aquest caràcter de cara a la classificació taxonòmica. Sens dubte, aquesta informació també pot ser útil en la majoria d'estudis *in vitro*, especialment aquells on tradicionalment només es podia mesurar la taxa de creixement. En el nostre cas, el principal interès per desenvolupar aquesta tècnica ha estat poder realitzar, en un futur, selecció de soques de *Pleurotus eryngii* segons el comportament del miceli en determinades condicions de creixement. Alhora, també ens permet estudiar el comportament del miceli emergent en els inòculs dissenyats per a substrats no estèrils (vegis capítol 6).

Hem obtingut una variabilitat morfològica important entre les diferents rèpliques per a un mateix aïllat. En futurs estudis caldrà prendre especial atenció al procediment d'inoculació del medi i augmentar el nombre de rèpliques en el disseny experimental, per a evitar l'aparició de rèpliques poc desenvolupades, probablement per manca d'homogeneïtat de l'inòcul (marcats amb asterisc a la taula 1). També fóra interessant augmentar el temps d'incubació (10-14 dies), per tal que les colònies assoleixin una mida més gran, reduint d'aquesta manera l'efecte que la heterogeneïtat en la colonització dels disc d'inòcul pugui tenir sobre la morfologia final de la colònia. En el nostre cas, ens hem vist obligats a reduir el temps de creixement a 7 dies per tal que la soca UBCC-1459, amb un creixement molt més invasiu que la resta, no ultrapassés els límits de la càpsula de Petri.

Els patrons de creixement de la majoria de varietats del complex són molt similars i les diferents varietats s'encavalquen entre sí pel que fa a la seva morfologia. Aquest fet no és sorprenent, ja que totes elles són genèticament molt properes i habiten substrats pràcticament idèntics. Per aquesta raó, no hem pogut establir llinars per a uns pocs paràmetres que discernixin els tàxons entre sí, fet que permetria classificar taxonòmicament una determinada soca de cultiu amb poc marge d'error.



Nogensmenys, l'assaig il·lustra bé el potencial de la tècnica, i ens dona una idea general del comportament dels aïllats del grup *eryngii* pel que fa a la morfologia de les seves colònies *in vitro*. Les soques assignades a una varietat concreta tendeixen a agrupar-se seguint uns patrons de creixement determinats, que hem pogut diferenciar estadísticament mitjançant anàlisi de k-mitjanes. És força probable que en estudis de soques a nivell d'espècie, les diferències fossin molt més marcades i sí es puguin determinar llinars en determinats descriptors morfològics que determinin espècies diferents.

Tres de les 19 soques estudiades han donat lloc a creixements singulars, marcadament diferents de la resta. Per una banda, la soca UBCC-1346, aïllada a partir de bolets de cultiu venuts en un mercat de Nanjin, Xina, ha donat lloc a un creixement molt reduït en F2TA. Segons (Kawai, G., Babasaki, K. et al., 2008), la majoria de soques allí comercialitzades sota la denominació de "Bai-Ling-Gu", i que comencen a arribar als mercats occidentals com a "Nebrodensis" pertanyen a la varietat *Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* C.J. Mou. Les soques de cultiu comercials sovint han estat seleccionades i hibridades amb d'altres varietats i fins i tot espècies per a augmentar la producció (Kawai, G., 2006, Patent JP2006067930-A). És plausible que la taxa de creixement anormalment reduïda que presenta aquesta soca es degui a requisits nutricionals de vitamines o d'altres components, com ocorre en el cas de les soques i híbrids de *P. pulmonarius*, que poden requerir de la presència de vitamina B6 i B12 en el medi de cultiu. En qualsevol cas, la morfologia macroscòpica d'aquesta soca no ajuda a esbrinar-ne l'origen taxonòmic.

En segon lloc, la soca UBCC-1273, recollida a la Vall d'Aran, de carpòfors gairebé blancs, ha donat lloc a un patró de creixement arrodonit i dens, molt diferent de la resta de soques, que no ajuda a aclarir la seva posició taxonòmica. L'hoste sobre el qual creixia no va poder ser identificat, tot i que es descarta que fos del gènere *Eryngium* pel diàmetre de l'arrel i l'aspecte de les bràctees del coll de la rel. De la mateixa manera difícilment pertany a cap dels hostes típics (*Cachrys*, *Ferula*, o *Elaeoselinum*), que en cap cas no han estat descrits per a aquella localitat (Banc de Dades de Biodiversitat de Catalunya, Font, X., 2012). És possible que el patró de creixement vingui en part condicionat per la mena d'hàbitat i hoste sobre el qual creix, fet que explicaria una morfologia clarament diferent de la resta. Malauradament, aquest extrem no pot ser demostrat sense obtenir més aïllats i identificar-ne l'hoste o hostes sobre els quals creix aquesta varietat a la Vall d'Aran.

La tercera soca que ha donat lloc a un creixement diferenciat és la soca UBCC-1459, amb una taxa de creixement molt superior a la resta de *P. nebrodensis*. A diferència de tota la resta, aquesta soca ha estat obtinguda per encreuament d'aïllats monospòrics d'un mateix carpòfor (F<sub>1</sub>), pel que probablement es tracta d'un cas d'heterosi o vigor híbrid. De fet, aquest fenomen d'heterosi aparent no és infreqüent i es troba descrit a la bibliografia (Stockton, M. i Horgen, P., 1993), essent sovint emprat com a tècnica per seleccionar soques amb més creixement micelià i més productivitat (Yan, P. S. i Jiang, J. H., 2005).

El reduït nombre de soques emprades en l'anàlisi i la variabilitat morfològica de les colònies no permet arribar a resultats concloents pel que respecta a la seva posició taxonòmica, i encara menys permet debatre la validesa dels tàxons del grup, però sí permet observar una tendència de cada tàxon a seguir determinats patrons de creixement, que agrupen per separat les varietats *eryngii*, *ferulae-elaoselini* i *P. nebrodensis*, a excepció d'unes poques rèpliques. La mida de les colònies (tant en àrea com en densitat integrada) adquireix un pes molt important en l'anàlisi d'agrupaments, tal i com es pot veure reflectit en l'eix de les abscisses (NMDS1, figures 10 i 11). En conjunt, la resta de paràmetres morfològics també juguen un paper important en l'anàlisi d'agrupaments, però cap d'aquests resulta determinant per si sol.

Descartant la soca UBCC-1459 per un possible efecte de vigor híbrid, els resultats obtinguts són consistents amb separar *P. nebrodensis* com a espècie diferent de la resta, donat que l'anàlisi d'agrupaments les ha separat en un grup independent. De la mateixa manera, les soques assignades a *P. eryngii var. elaoselini*, també queden ben diferenciades de les soques assignades a la *var. eryngii* i a *P. nebrodensis*. En canvi, l'anàlisi d'agrupaments no discerneix prou el patró de creixement dels aïllats d'aquest grup amb els de la varietat *ferulae*. També és interessant observar que no hi ha indicis d'una relació directa entre els patrons de creixement observats i l'hoste sobre el que s'ha aïllat cada soca. En qualsevol cas, seria necessari ampliar l'estudi amb més rèpliques i aïllats de les diferents varietats per poder obtenir resultats més concloents.

### **Limitacions de la tècnica. Perspectives.**

La tècnica que presentem pressuposa que el miceli de la colònia analitzada té una absorció òptica constant i independent del seu grau de desenvolupament. Aquest sol ser el cas de la majoria de bolets sapròfits, que generalment presenten un miceli hialí, i no esporulen en cultiu. Nogensmenys, en molts d'altres casos aquest fet no és necessàriament cert, pel que cal tenir present algunes consideracions.

La principal limitació de la tècnica rau en el fet que no necessàriament podrà ser aplicada a cultius de fongs que esporulen en cultiu (p. ex deuteromicets). En general, els conidis o altres estructures reproductores que es formen en cultiu són acolorides, i les colònies resultants sovint són quasi opaques. Fins i tot en el cas d'espores hialines, l'índex d'absorció de DO dels conidis no té perquè ser el mateix que el del miceli. A més, el grau d'esporulació sol variar molt segons les condicions de cultiu (llum, temperatura, nutrients...) i augmenta amb l'edat del cultiu.

La tècnica també pot donar lloc a errors de mesura per a fongs amb miceli acolorit. La concentració dels pigments intracel·lulars sol ser més gran en les hifes més madures, i a més pot variar segons les condicions de creixement. De la mateixa manera, molts fongs alliberen metabòlits secundaris que coloreixen directa o indirectament el medi de cultiu (p. ex. fenoloxidasas), interferint en la mesura de la DO.

La problemàtica deguda a la formació de pigments, sobretot en el cas de pigments extracel·lulars, podria ser esmenada mitjançant l'aplicació de filtres (ja sigui mitjançant filtres òptics físics, mitjançant el mateix processat informàtic d'imatges o projectant el color del pigment en la font de llum emissora), descartant de la imatge aquells colors associats als pigments.

La possibilitat d'aplicar filtres que permetin discernir el miceli d'una determinada coloració en el medi obre perspectives molt interessants, donat que permetria aplicar la tècnica a assaigs bioquímics realitzats en cultius sobre agar. En general, aquests tests generen una coloració en el medi en cas de positiu per a determinada activitat enzimàtica, o bé donen lloc a un halo de decoloració per desaparició d'un pigment incorporat al medi, o donen lloc a un viratge en el color d'un indicador afegit (p. ex, per un canvi de pH) (MacFaddin, J. F., 2000). Fins ara, aquests tests aplicats a cultius en agar només permeten una anàlisi qualitativa (positiu / negatiu per a determinada activitat ligninàsica) i cal realitzar l'assaig en medis líquids per poder realitzar una anàlisi quantitativa (retirant el miceli del medi i sotmetent aquest a una mesura a una longitud d'ona determinada).

El medi FXTA ha estat dissenyat de forma que sigui compatible com a medi base universal per a aquests assaigs, donat que és incolor i permet retirar de la composició un nutrient concret sense afectar la resta (per exemple, permet retirar la font hidrocarbonada i /o de nitrogen, per a realitzar tests sobre l'activitat ligninàsica). Les tècniques d'anàlisi d'imatge aquí presentades, combinades amb l'aplicació de filtres, permetrien discernir el creixement micelià de la coloració en el medi, quantificant tant el creixement com el grau d'activitat enzimàtica a partir d'un patró del pigment corresponent.

Arribats a aquest punt, resultaria prou senzill definir un protocol estàndard per a la caracterització bioquímica de soques de bolets, mitjançant una bateria d'assaigs estandarditzats. Avui dia no existeix cap procediment estàndard d'aquesta mena per a bolets, fet sorprenent si es té en compte que si que existeix, tant per a bacteris com per a llevats. Aquests assaigs, combinats amb la tècnica aquí presentada, permetrien avaluar de forma quantitativa les condicions òptimes de creixement (p. ex, temperatura, pH...), xerotolerància (mesurant el creixement a diferents concentracions de polietilenglicol), la capacitat d'emprar determinades fonts de nutrients (p. ex, amoni, nitrats, nitrits i urea per posar com a exemple el cas del nitrogen), i mesurar les activitats enzimàtiques bàsiques, (p. ex, l'activitat ligninàsica, cel·lulàsica, etc.), entre d'altres.

Per acabar, una altra de les limitacions de la tècnica és el límit de saturació en la mesura de la DO, que pot fer que en colònies massa denses el sistema no pugui mesurar increments de biomassa. Aquesta limitació pot ser resolta augmentant o bé l'exposició de la presa de la imatge, o bé la potència de la font de llum, en sacrifici de les densitats més petites, que quedaran sobreexposades i per tant fora del rang dinàmic de la imatge. Donat el cas, es pot augmentar el rang de densitat mesurable a partir de dues o més captures amb exposicions diferents (amb un diafragma constant), i realitzant la mesura de

les zones poc denses a partir de la imatge amb menys exposició i les zones més denses a partir de la imatge amb més resolució.

Tot i que els programaris d'anàlisi d'imatge actuals només permeten realitzar aquest procés de forma manual, els darrers anys s'està desenvolupant molt la tecnologia de processat d'imatges HDR (High Dynamic Range) aplicat a fotografia digital, que combinen diverses exposicions d'una mateixa imatge estàtica donant lloc a una única imatge d'alt rang dinàmic. És força previsible que en un futur proper apareguin eines d'anàlisi d'imatge que permetin calibrar aquest tipus d'imatges, i fins i tot, càmeres fotogràfiques o altres dispositius de captura que les obtinguin directament. En el nostre cas, aquesta tecnologia no només resultarà interessant per eliminar els límits de densitat de la colònia, sinó que també augmentaria la resolució de la tècnica en les densitats elevades.

---

## 4.5.- Conclusions

Proposem en aquest treball un procediment estandarditzat d'anàlisi d'imatge dissenyat per a mesurar el creixement de colònies fúngiques sobre agar. A diferència de les tècniques precedents, aquest procediment és estandarditzable i pot estimar una mesura de biomassa en pes sec, cosa que permet la comparació de diferents tractaments i fins i tot organismes en un mateix estudi. La tècnica no és destructiva, és ràpida, automatitzable, i molt econòmica, donat que es pot realitzar a partir d'aparells d'ús freqüent (càmera digital, trípode i pantalla TFT).

La tècnica es diferencia de les propostes anteriorment publicades per treballar amb llum transmesa sense necessitat d'extreure el miceli del medi de cultiu. Aquest medi de cultiu, s'ha formulat expressament per a maximitzar la seva transparència, alhora que pot emprar-se com a medi base estàndard per a la majoria d'assaigs bioquímics i d'ús de fonts de nutrients.

La tècnica ha estat dissenyada per l'estudi de soques de bolets sapròfits, que no esporulen en cultiu, i generalment tenen miceli hialí. Tot i que també pot emprar-se en estudi d'altres fongs filamentosos, cal tenir en compte que pressuposa que la colònia fúngica té una absorció òptica constant. Per aquesta raó, no és necessàriament vàlida per a fongs que esporulen en cultiu o amb miceli acolorit.

Les mesures realitzades mitjançant anàlisi d'imatge resulten més fiables que la mesura de l'àrea de les colònies, tradicionalment emprada en estudis *in vitro*, ja que tenen en compte les possibles variacions en la densitat de la colònia. Els llimars de mesura de la tècnica en les nostres condicions d'estudi es situen entre 1,68 i 35,54  $\mu\text{g PS}/\text{mm}^2$ , i té una sensibilitat mínima (teòrica) de 0,074  $\mu\text{g PS}$ .

La tècnica, a més, permet la mesura de més d'una vintena de paràmetres relatius a la morfologia de la colònia, que poden ser mesurats en els diferents nivells de densitat de la mateixa. Les mesures resultants recullen d'aquesta manera la informació de la morfologia de la colònia, no tant sols pel que fa al seu contorn, sinó també a la distribució de la biomassa al llarg de la seva superfície. Aquestes mesures morfològiques poden ser emprades per a realitzar una descripció quantitativa i objectiva de la morfologia d'una soca fúngica determinada. Per aquesta raó poden ser de vàlua, tant en estudis taxonòmics com per a estudiar les variacions en el patró de creixement de fongs *in vitro* en diferents condicions d'estudi, entre d'altres.

Pel que fa als models emprats a l'estudi, la soca de *Pleurotus eryngii* UBCC-0125 mostra un creixement òptim en FXTA al voltant dels 2g fructosa /l. També presenta un canvi significatiu en el seu patró de creixement entre els 0,2 i 0,002 g fructosa /l, donant lloc a un comportament més invasiu a concentracions baixes (amb colònies molt menys denses i més ramificades). En canvi, no s'observen diferències significatives en l'àrea explorada.

Les mesures de la morfologia en diferents soques de *Pleurotus eryngii* no han permès establir límits en els paràmetres morfològics que separin les diferents varietats estudiades. Tot i això, al nostre parer aquest procediment té un potencial interessant com a eina de suport en taxonomia, especialment a nivell d'espècie. En el cas estudiat, hem observat una tendència de les soques atribuïdes a una mateixa varietat del complex *eryngii* a agrupar-se en patrons de creixement estadísticament diferenciats mitjançant anàlisi d'agrupaments de k-mitjanes. Tot i que l'assaig no permet extreure resultats conclouents, si s'analitzen els paràmetres morfològics en conjunt, els resultats obtinguts mostren que els aïllats de *P. nebrodensis* presenten un patró de creixement força ben diferenciat de la resta de varietats del complex. Les morfologies de creixement que presenten els aïllats de la varietat tipus de *P. eryngii*, també es diferencien força de la resta, mentre que els aïllats assignats a la *var. elaeoselini* són força similars a aquells aïllats de la varietat *ferulae* amb una taxa de creixement reduïda.

Algunes de les soques estudiades han donat lloc a un patró de creixement molt diferent de la resta, entre les que destaca la soca UBCC- 1273, de carpòfors blanquinosos però mida esporal similar a *P. eryngii var ferulae* i aïllada a la Vall d'Aran, sobre hoste desconegut.

# 5. Caracterització de la germinació de llavors d'*Eryngium campestre*.

---

## 5.1. Introducció

El procediment de cultiu de la gírgola de card que proposem en el present treball, requereix de la presència d'un hoste de *Pleurotus eryngii* en el terreny de cultiu. Excepte en el cas de parcel·les on aquest hoste ja hagi crescut de forma natural, caldrà implantar-lo abans de la inoculació amb *P. eryngii* per tal d'obtenir una massa radicular prou important que actui de substrat.

Gràcies a la descripció de les diferents varietats del complex *eryngii*, disposem d'un ventall d'espècies de plantes relativament ampli que es podrien emprar com a hoste de cultiu. Els principals gèneres a escollir serien *Eryngium*, *Ferula*, *Thapsia* o *Cachrys*, tot i que com hem vist, la llista podria ampliar-se a hostes menys típics, com *Laserpitium*, *Opopanax*, *Prangos*, i força d'altres. Malauradament cap d'aquests hostes descrits són plantes habitualment cultivades per l'home, i per tant serà indispensable la posta a punt del seu cultiu.

Aquesta posta a punt compta amb una dificultat afegida: el substrat final sobre el qual s'haurà desenvolupat la planta haurà de ser compatible amb el creixement del miceli de *P. eryngii*. Actualment la biologia i els requeriments per al desenvolupament de *P. eryngii* en el sòl ens són del tot desconeguts. Els terrenys naturals on viu la gírgola de panical solen ser erms i terrenys incultes, relativament poc agraïts per al cultiu de plantes. A més, la majoria de pràctiques agronòmiques que afavoreixen aquest procés (adobat, llaurat, addició de matèria orgànica, etc.), alteren molt la composició, estructura i flora microbiològica del sòl, cosa que pot afectar al desenvolupament del miceli i l'agressivitat del mateix. La flora acompanyant en les comunitats vegetals on viu *P. eryngii* també podria jugar un rol important en la supervivència i la propagació del fong a través del sòl.

Si bé hostes com *Ferula communis* o *Thapsia villosa*, són plantes amb rels de mida notable, i per tant susceptibles de ser més productives, hem escollit a *Eryngium campestre* com a primer model de treball. Les raons per fer-ho han estat, en primer lloc, el card panical es troba més amplament distribuït que la resta, fet que presumptament el fa més versàtil i adaptable a més tipus d'entorns i sòls. En segon lloc, al ser més freqüent n'ha facilitat l'obtenció de material - tant d'aïllats de *P. eryngii* var. *eryngii* com de card panical - i la localització de poblacions d'*Eryngium campestre* amb i sense presència de *P. eryngii*.

Finalment, *a priori* sembla una planta de fàcil maneig per la seva mida, freqüència i elevada producció de llavors.

Malgrat aquests avantatges, al llarg d'aquesta recerca hem topat amb un seguit de dificultats a l'hora de cultivar aquesta planta, fruit de la manca d'informació respecte la seva biologia. Com veurem més endavant, els nostres primers intents de cultiu d'*E. campestre* mitjançant propagació de rels o a partir de llavors van donar lloc a resultats irregulars i molt inferiors als esperats, sovint nuls. Això ens va fer considerar la necessitat d'una recerca sobre la germinació de llavors de card panical.

### ***Eryngium campestre* L.**

#### DESCRIPCIÓ:

L'*Eryngium campestre* (popularment conegut com a card panical, panical, card girgoler, o centcaps) és un hemcriptòfit (la part aèria de la planta és anual, mentre que la rel persisteix durant anys). Primordialment viu en erms, prats secs de muntanya, zones ruderals, guarets i conreus en desús. Les fulles, de color verd grisenc pàl·lid i de fins a 10-25 cm de llargada a la maduresa, són coriàcies, pinnatipartides, amb la nervadura marcada i els lòbuls lleugerament superposats en diferents plans. El marge és densament espinoso-dentat. El pecíol és tant llarg com el limbe foliar i eixamplat a la base. Les fulles es disposen en forma de roseta basal arran del coll de a rel.

Les primeres fulles adultes de la planta són diferents, tendres, indivises, obovades a el·líptiques, amb un limbe foliar d'uns 1,5-3 cm, amb el marge inicialment dentat i més tard serrat, no punxant. De tant en tant, aquesta morfologia i les formes intermèdies també es poden observar en exemplars adults (Aedo, C. et al, 2003).

*E. campestre* té un corm carnós, molt pivotant, que arriba amb facilitat a més de dos metres de profunditat. Les ramificacions en la rel principal són rares i sempre segueixen l'eix perpendicular al sòl. Aquesta estructura vertical emet fines rels laterals en sentit horitzontal (<1mmØ), en les que es poden observar micorizes arbusculars (Harley, J. L. i Harley, E. L., 1987). El coll de la rel, que pot arribar als 2 cm de gruix d'amplada, es troba densament recobert per les restes fibroses i persistents dels pecíols de les fulles.

Floreix de juny a setembre, produint una tija coronada amb una inflorescència en forma d'umbel·la (20-80 cm d'alçada), al seu torn acabada en glomèruls aproximadament esfèrics de petites flors blanques. Umbel·la, glomèruls i flors es troben protegits per bràctees i bractèoles punxents. Les flors són principalment pol·linitzades per dípters i himenòpters (Bylebyl, K., Poschlod, P. et al., 2008).

Les inflorescències d'*E. campestre* inicien la senescència al voltant d'agost, assecant-se conjuntament amb la resta de la part aèria de la planta. Produeix nombrosos fruits, que són dispersats a partir de mitjans de setembre.



El fruit d'*E. campestre*, protegit per un sèpal linear-lanceolat, és un esquizocarp format per dos mericarps monosperms (als que també ens referim al parlar de llavors, donat que són indehiscents). L'apex de cada mericarp acaba ornamentat amb dues o tres dents del calze, que són persistents, lanceolades i també punxents. De mitjana, els mericarps d'*E. campestre* tenen un pes sec de  $0,655 \pm 0,32g$ , i un volum de  $0,582 \pm 0,113 mm^2$  (Sánchez, A. M., Azcárate, F. M. et al., 2002). El pericarp es troba densament recobert per esquames menudes i lanceolades a la part arrodonida i és llis –sense ornamentació - a la part plana. La testa (exosperma) es troba molt poc diferenciada, i roman adherida al pericarp. L'endosperma, blanc i arrodonit, envolta totalment l'embrió, que és linear i poc desenvolupat.

La inflorescència seca resta dempeus durant setmanes, fins que es trenca per una zona d'abscisió basal. Hom considera que l'*Eryngium campestre* dispersa els fruits principalment per geonemocòria: la inflorescència és estepicursora, pel que l'alliberament dels fruits es produeix progressivament, a mida que és transportada pel vent. En un estudi de l'efecte de la zoocòria en pastures a Darmstadt, Alemanya, Wessels, S. C., 2007 va recuperar llavors d'*E. campestre* en les femtes de bestiar oví, però aquestes en cap cas germinen, pel que la possibilitat de la zoocòria per ingesta queda en entredit. La recol·lecció de llavors d'*E. campestre* per part de formigues ha estat prèviament descrita en conreus en desús per Buisson, E., Dutoit, T. et al., 2006.

#### INTERÈS ECONÒMIC:

Actualment no tenim coneixement de cap aplicació d'*E. campestre* que hagi donat lloc a la necessitat del seu cultiu extensiu. La existència de llavors comercials és rara, sempre d'origen silvestre, bàsicament destinada a l'aplicació en mescles de llavors arvenses per a la fixació de sòls, i tenen una demanda quasi nul·la (Semillas Silvestres S.A., com. pers.). Per altra banda, *E. campestre* té una mínima incidència en cultius intensius, i per tant no ha estat gaire estudiada com a mala herba. Degut a això és poc o gens el que es coneix sobre la biologia reproductiva i la biologia de poblacions d'*E. campestre*.

### **Coneixements previs sobre la germinació de llavors d'*E. campestre* i espècies properes.**

#### ERYNGIUM CAMPESTRE

Els estudis que actualment disposem sobre *E. campestre* es limiten als estrictament taxonòmics i corològics. Amb anterioritat a la nostra recerca tant sols tenim constància un treball (Cailleux, R., Cerceau-Larrival, M. Th. et al., 1983) que aporti alguna dada respecte la germinació del card panical, en base a observacions a camp i intents de cultiu d'unes poques plantes. Segons aquest autor, *Eryngium campestre* presenta una taxa de germinació molt reduïda, però més gran en poblacions afectades per *P. eryngii*. En aquest

mateix treball, Cailleux realitza un estudi de la ontogènia del pol·len del card panical, i conclou que la infecció de *P. eryngii* a la planta li indueix una esterilitat masculina parcial.

Amb posterioritat als nostres experiments ha aparegut un nou treball científic en línia (Jesske, T. i Brandes, D., 2012), en el que s'estudia la germinació de les llavors d'*E. campestre* a partir de mostres recollides al jardí botànic de Göttingen (Alemanya). Els autors obtenen germinacions que oscil·len entre el 60 i el 90%, i observen un òptim en la germinació al voltant dels 10-20°C, mentre que no germinen per sota de 10°C i ho fan amb dificultat per sobre de 26°C. També detecten una sensibilitat a concentracions de sal sòdica i al nitrat de potassi, ja que la germinació s'inhibeix en el medi per sobre del 0,1% NaCl, i 0,01 M KNO<sub>3</sub>. També hi descriuen taxes de germinació significativament superiors en vegetacions alterades.

#### FENÒMENS DE DORMÀNCIA EN LLAVORS DE UMBEL·LÍFERES

Seguint el criteri de classificació dels diferents tipus de dormància descrits per Nikolaeva, M. G., 1977, (tal i com han estat descrits a la revisió de Baskin, C. C. i Baskin, J. M., 1998), els fenòmens de dormància en llavors poden ser causats per raons fisiològiques, morfològiques, morfofisiològiques, físiques o bé químiques.

Segons la classificació proposada per Martin, A. C., 1946, basada en l'anatomia de la llavor, les llavors d'*E. campestre* i les umbel·líferes en general, són de tipus linear, és a dir, estan formades per un embrió relativament allargat, petit i totalment envoltat d'endosperma. Segons l'autor, en aquest tipus de llavors els fenòmens de dormància més freqüents són de tipus fisiològic, morfològic o morfofisiològic.

La dormància fisiològica és independent del tipus de morfologia de llavor de que es tracta. Els agents més freqüents en la bibliografia per a trencar la dormància fisiològica són l'addició de giberel·lines o bé la estratificació mitjançant un tractament tèrmic, habitualment per fred en el cas de llavors de zones temperades. Les giberel·lines poden trencar les dormicions no profundes i intermèdies, mentre que són ineficaces per a les dormicions profundes. L'estratificació per fred sí pot trencar la dormància fisiològica profunda.

La dormància de tipus morfològic ocorre en llavors amb embrions que precisen un desenvolupament previ a la germinació. L'embrió de tipus linear és un dels tipus que pot presentar aquesta dormància, i de fet, es troba documentada per a alguns membres de les umbel·líferes de zones temperades, com *Apium graveolens* (Jacobsen, J. V. i Pressman, E., 1979), *Conium maculatum* (Baskin, J. M. i Baskin, C. C., 1990) o *Pastinaca sativa* (Baskin, J. M. i Baskin, C. C., 1979). Per a moltes de les espècies que presenten aquest tipus de dormància, i més en el cas de zones temperades, la temperatura òptima per al desenvolupament de l'embrió sol trobar-se entre els 15 i els 30°C. Alguns casos, com A.

*graveolens* i *C. maculatum*, requereixen de llum per a germinar (Pressman, E., Negbi, M. et al., 1977).

La dormància de tipus morfofisiològic ve donada per combinació de fenòmens de dormància dels dos tipus anteriors. Sol trencar-se mitjançant tractaments d'estratificació en fred, combinats o no amb tractaments d'estratificació a més de 14°C.

### ESPÈCIES PROPERES

Dins del gènere *Eryngium*, trobem d'altres espècies en les que sí s'ha estudiat les condicions de germinació. Tot i que la majoria d'espècies vegetals, solen germinar igualment bé en condicions de llum que de foscor (Baskin, C. C. i Baskin, J. M., 1998), *Eryngium creticum* germina millor en foscor que en presència de llum (Hammouda, M. R. i Bakr, Z. Y., 1969), amb una temperatura òptima de 15°C.

La dormància de tipus morfològic o morfofisiològic és un fenomen ja descrit per a llavors d'altres espècies del gènere *Eryngium*. És el cas del card marí, *Eryngium maritimum*, que germina després d'un tractament de estratificació per fred de 122 dies. La germinació es produeix en un règim òptim de temperatures dia/nit de 20/10°C (Walmsley, C. A. i Davy, A. J., 1997). Tot i això, aquest tractament només aconsegueix un 40% de llavors viables germinades.

*Eryngium yuccifolium* també presenta una dormància morfofisiològica que es trenca per estratificació en fred, en aquest cas de 150 dies. La germinació es produeix en un rang òptim de 18-21°C (Green, H. C. i Curtis, J. T., 1950; Shutte, B. J., 2002).

Finalment, les llavors d'*Eryngium foetidum* (un dels pocs *Eryngium* conreats, principalment pel seu ús com a condiment) presenten una dormància de tipus morfològic, i requereixen un període de com a mínim 6 mesos que permeti la maduració de l'embrió per a poder donar lloc a germinacions significatives (Fuentes, V. R., Rodríguez, N. et al., 1996). Passat aquest temps, les llavors triguen uns 15 dies a germinar.

### **Experiències preliminars**

En aquest estudi hem considerat tres sistemes per al cultiu de la planta a camp: propagació per arrels, producció de planter, i sembra directa. La propagació mitjançant fragments de rels ha resultat del tot ineficaç (resultats no presentats). Només hem obtingut trasplantaments reeixits a partir del fragment superior de la rel, en la que es troba el brot apical. El procediment amb més èxit (vora el 65%) per a propagar la planta a test, ha estat trasplantant els fragments superiors de la rel de més de 10 cm de llarg, recollits a camp, i a finals d'hivern. Els fragments sense la gemma apical traslladats a test en cas han rebrotat.

En diverses experiències pilot s'ha realitzat sèmbrs directes de parcel·les amb llavors d'*Eryngium campestre* de taxa de germinació coneguda, amb la intenció de disposar de cultius densos i homogenis de card panical a on realitzar proves per a la inoculació de la gírgola de card. Tant les sèmbrs realitzades a primers de primavera (Parque Natural de las Sierras Subbéticas, Córdoba, avantprojecte "Cussta"; Pina de Montalgrao, Castelló, proyecto "Micorural") com les realitzades a primers de tardor (Soto del Cerrato, Palència, avantprojecte conjunt amb ITAGRA; Rubió, Anoia), han donat resultats inviàbles (menys del 5% de l'esperat, en el millor dels casos). Aquests resultats coincideixen amb els de Constantin, J., 1926, qui ja es va topar amb serioses dificultats al intentar cultivar aquesta planta mitjançant la sèmbr de llavors.

---

## 5.2. Materials i mètodes

### Mostres d'estudi: recol·lecció i conservació.

Les llavors emprades en aquest treball han estat recollides a camp per l'autor, a excepció d'un lot adquirit a una empresa especialitzada en la recollida i selecció de llavors silvestres (Semillas Silvestres, S.L., Còrdova). El departament tècnic d'aquesta empresa assegura no haver realitzat cap pretractament químic a les llavors. Aquest lot va ser recollit de forma semimanual, mitjançant aspiradors industrials, i s'ha netejat mitjançant una garbelladora automàtica, rebutjant les partícules i llavors de calibre excessivament baix. Aquesta neteja resulta en una lleugera abrasió del pericarpi del fruit. Hem pogut comprovar que la conservació de les llavors a l'empresa es realitza en envasos de vidre hermètics, a 4°C, i en condicions de foscor.

En el cas de la resta de lots, s'han recollit els fruits a partir d'inflorescències totalment seques, sempre abans que aquestes es trenquin per la base. Un cop separats els fruits de les inflorescències, es deixen assecat a temperatura ambient.

La relació de localitats i mostres de llavors d'*Eryngium campestre* emprades és la següent:

- EC1: Còrdova, Sierra Morena. Llavors comercials comprades a Semillas Silvestres S.L., lot SS-EC2000, recollides l'any 2000.
- EC2: Còrdoba, t.m. Navazuelo, Carcabuey, /11/2003, parcel·la productora de *Pleurotus eryngii*. UTM 30S42424.
- EC3: Valladolid, camp de tir de Villarmentero, /10/2002, parcel·la productora de *Pleurotus eryngii*. UTM 30T36461.
- EC4: Osca, Benasc, Vall de Benasc, 1000 m, /09/2005. UTM 31T29471.
- EC5: Castelló, Pina de Montalgrao (La Cañada), UTM 30T70443, parcel·la productora de *Pleurotus eryngii*. 27/11/2006.
- EC6: Barcelona, Anoia, Rubió. UTM 31T38461. Població natural de card panical a les rodalies del nucli urbà, en antigues feixes de cultiu actualment en desús. Aquesta població està ben caracteritzada per l'autor com a no productora de *Pleurotus eryngii*. Terreny calcari, de sòl argilós.
  - EC6-2002: Recollit el 26/12/2002.
  - EC6-2003: Recollit el 22/08/2003.
  - EC6-2004: Recollit el 21/11/2004.

- EC6-2005: L'any 2005 es van recollir mostres de forma aproximadament quinzenal, des del moment en que la inflorescència presenta símptomes evidents de senescència i comença a assecar-se. Els mostreigs van finalitzar als 70 dies (22 d'agost – 30 d'octubre), donat que al mostreig següent vam considerar que el nombre de llavors que ja havien caigut dels glomèruls era prou elevat com per esbiaixar els resultats. El mostreig d'aquests sublots s'ha realitzat barrejant llavors de com a mínim 50 glomèruls pertanyent a 10 inflorescències diferents recollides a l'atzar, i extraient amb unes pinces totes les llavors dels glomèruls:
  - EC6-2005 R1: Recollides el 22/08/2005.
  - EC6-2005 R2: Recollides el 03/09/2005.
  - EC6-2005 R3: Recollides el 10/09/2005.
  - EC6-2005 R4: Recollides el 25/09/2005.
  - EC6-2005 R5: Recollides el 15/10/2005.
  - EC6-2005 R6: Recollides el 30/10/2005.
- EC6-2006: Recollides el 01/10/2006.

En tots els experiments s'ha emprat el lot EC1 com a lot de referència, donat que és una mostra homogènia, gran, i amb l'índex de germinació més alt d'entre les estudiades, gràcies al garbellat industrial al que ha estat sotmès. En la majoria d'assaigs hem contrastat els resultats obtinguts amb aquest lot incorporant algun dels lots recollits per nosaltres, obtenint sempre resultats proporcionalment similars. Donat que en tots els casos els resultats són redundants i que la reduïda taxa de germinació d'aquests altres lots sovint no permet discernir tant bé les diferències entre tractaments, no presentarem aquestes dades, per a major claredat.

### **Conservació de llavors d'*E. campestre***

Un cop els fruits han estat assecats a temperatura ambient, han estat conservats en fred (4°C) dins d'envasos hermètics i amb un agent deshidratador (gel de sílice amb indicador de clorur de cobalt, 5-15% HR) al seu interior.

Prèviament a tota la resta d'experiments, s'ha avaluat en cambra humida la germinació de llavors del lot comercial d'*Eryngium campestre* (EC1) als 0, 3 i 9 mesos de conservació per a verificar que la conservació a 4°C no en minva la viabilitat.

### **Condicions generals per als assaigs de germinació**

Per als assaigs de germinació en cambra humida, s'ha disposat les llavors sobre un paper de filtre absorbent embegut amb aigua, dins de càpsules de Petri (no segellades). Periòdicament s'ha reposat l'aigua evaporada, afegint aigua desionitzada a les càpsules.

Si no s'especifica el contrari, la resta de llavors han estat sembrades sobre sòl calcari recollit en una població natural d'*Eryngium campestre*, sedassat amb un sedàs de 1mm de llum per a evitar una possible contaminació per llavors d'*Eryngium* presents al sòl, i esmenat amb perlita (3:1 p/p) per augmentar-ne la capacitat de camp (pH final: 8,2-8,6). El substrat s'ha disposat en safates de plàstic blanc (15x30x4 cm), plenes fins a la meitat. Dins de les safates s'han disposat separadors de plàstic transparent per tal de separar les diferents rèpliques. La safata s'ha embolcallat en una bossa de plàstic transparent no segellada, per tal de garantir la ventilació i reduir la deshidratació del substrat. La germinació s'ha realitzat en cambres de germinació amb alternança de 12h dia (espectre de llum de dia) a 25°C i 12h nit (foscor) a 10°C. La humitat del substrat s'ha reposat setmanalment regant-lo amb aigua desionitzada.

Tots els assaigs s'han realitzat amb 4 rèpliques de 100 llavors cadascuna. Les llavors han estat seleccionades a mà, rebutjant aquelles massa petites o amb algun defecte macroscòpic. Els recomptes s'han realitzat periòdicament, un o dos cops per setmana, retirant-ne les llavors germinades per a evitar errors de mesura. Els recomptes es mantenen des de la sembra fins que no s'observa un increment de llavors germinades durant dos recomptes consecutius a cap de les rèpliques. Es considera que la llavor ha germinat quan se'n pot diferenciar clarament la radícula (>3mm).

### **Germinació de poblacions silvestres d'*E. campestre***

Per a avaluar la taxa de germinació d'*Eryngium campestre* en poblacions silvestres, s'ha avaluat simultàniament la germinació dels lots EC2 (Córdoba, Navazuelo, 2003), EC3 (Valladolid, Villarmentero, 2002), EC4 (Osca, Benasc), EC5 (Castelló, Pina de Montalgrao), i EC1 (Lot comercial, com a control) en sòl esmenat amb perlita.

Per a avaluar la variabilitat en la taxa de germinació de llavors d'una mateixa població d'*Eryngium campestre* en diferents anys consecutius, s'ha avaluat conjuntament amb els anteriors la germinació dels lots EC6-2002, EC6-2003, EC6-2004, EC6-2005-R5 i EC6-2006, també en sòl esmenat amb perlita.

### **Efecte del substrat en la germinació d'*E. campestre***

#### GERMINACIÓ EN DIFERENTS SUBSTRATS

S'ha comparat les germinacions obtingudes per al lot EC1 en cambra humida, en torba neutralitzada a pH 6,5 amb CaCO<sub>3</sub>, sobre sòl esmenat amb torba (3:1 p/p), i sobre sòl esmenat amb perlita (3:1 p/p). El pH d'aquests dos últims tractaments oscil·la al voltant de pH 8,6-8,9.

#### GERMINACIÓ A DIFERENTS PH EN TAMPÓ FOSFAT

S'ha comparat la taxa de germinació del lot comercial EC1 a 6 pH diferents. Les llavors s'han disposat en cambra humida, embevent els filtres de paper amb una solució amortidora de pH Sörensen. Les diferents solucions amortidores s'han preparat a partir de la barreja de dues solucions mare (Sol. A:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,96 g/L i Sol. B:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,368 g/L). Les proporcions A:B per a cada pH són: pH 5,4 3:97; pH 6 12:88; pH 6,4 26,5:73,5; pH 7,0 61,1:38,9; pH 7,4 80,4:19,6; pH 8,0 94,5:5,5. S'ha realitzat dos controls, un amb aigua desionitzada i un altre sobre sòl esmenat amb perlita. Després de prehidratar les llavors durant 12h en els seus corresponents tampons, s'ha embegut el filtre a saturació amb cadascuna de les solucions amortidores. Després de cada recompte s'ha realitzat un rentat amb la solució amortidora corresponent (o aigua desionitzada, per al control) per a garantir l'estabilitat del pH i de la concentració de sals. També s'ha mesurat el pH final del medi en tots els tractaments.

#### **Avaluació de possibles fenòmens de dormància en les llavors**

##### EFFECTE DE LES GIBEREL·LINES EN LA GERMINACIÓ.

S'ha estudiat l'efecte de giberel·lines en la germinació del lot EC1 en cambra humida, embevent el filtre amb una dissolució de fungicida Benomil 50 mg/L (Benlate®, Dupont) i àcid giberèl·lic  $10^{-3}\text{M}$  (Fluka). El filtre s'ha mantingut sempre humit mitjançant l'addició periòdica d'àcid giberèl·lic  $10^{-3}\text{M}$  al llarg de tot l'assaig. S'ha realitzat un tractament de control amb aigua desionitzada.

##### EFFECTE D'UN PRETRACTAMENT D'ESTRATIFICACIÓ PER FRED

S'ha assajat els lots EC1 (Lot comercial) per a l'estudi de l'efecte de l'estratificació per fred sobre sòl esmenat amb perlita. Un cop sembrades les llavors i efectuat el primer rec, s'ha mantingut les llavors a  $4^\circ\text{C}$  i en condicions de foscor durant 15 i 30 dies. Passat el període corresponent, s'ha traslladat les llavors a la cambra de germinació. S'ha realitzat un tercer tractament de control, sembrat el mateix dia, i que s'ha disposat directament a la cambra de germinació sense tractament de fred.

##### GERMINACIÓ EN CONDICIONS DE LLUM O FOSCOR

S'ha realitzat un assaig per a avaluar els requeriments de llum d'*E. campestre*, germinant el lot EC1 sobre torba neutralitzada amb  $\text{CaCO}_3$  a pH 6,5 com a substrat. Per al tractament de foscor s'han embolicat curosament les safates amb paper d'alumini, disposant-les en el mateix cicle de temperatures que els controls, mantenint les llavors en foscor al llarg de tot l'experiment. El recompte del tractament de foscor s'ha iniciat als 14 dies.



## **Evolució de l'estat i la viabilitat de les llavors d'*E. campestre* al llarg de la maduració i senescència de la inflorescència.**

Aquest estudi s'ha realitzat amb tots sis sublots de la mostra EC6-2005. S'ha estudiat quatre rèpliques de cada lot, cadascuna d'elles de 100 llavors triades a l'atzar, prèvia homogeneïtzació de la mostra. Els fruits s'han rehidratat a temperatura ambient en cambra humida durant 12 h a 25°C. Cada fruit ha estat observat sota l'estereoscopi, i se n'ha separat el pericarpí amb l'ajut de pinces i una ganiveta per observar l'estat de la llavor.

Les llavors han estat classificades i recomptades en les següents categories:

1. **Llavors barrinades:** A ull nu o sota un estereoscopi, i sense manipular el fruit, s'observa que aquest ha estat corcat per un insecte des de l'exterior. En general la lesió afecta una part sencera de la llavor, o bé la traspasa totalment.
2. **Llavors corcades:** A ull nu, o sota un estereoscopi, i sense manipular el fruit, s'observa que la llavor ha estat corcada per un insecte que probablement es trobava a l'interior. Es tracta de fruits que presenten un únic forat, generalment a la part plana i glabra del mericarpí i sovint lateralitzat cap a un costat i cap a la part basal. El forat mai traspasa tot el fruit. Mai es troba l'insecte o larva a l'interior.
3. **Llavors parasitades:** El fruit es troba externament intacte, però en escindir-ne el pericarpí sota l'estereoscopi, s'observa que està barrinat per dins, descompost en engrunes, o bé hi ha presència d'una larva, una exúvia o un insecte adult. D'aquestes se'n recompten les larves i els adults que es puguin observar.
4. **Llavors florides:** La colonització per fongs impedeix esbrinar la causa de la mort d'aquesta.
5. **Llavors en descomposició microbiana:** La llavor s'ha desenvolupat en part, però es troba estovada o liquidificada, i es desfà en manipular-la.
6. **Llavors avortades o necrosades:** En general es tracta de llavors que necrosen o bé que no arriben a iniciar el desenvolupament. Es tracta de fruits aplanats, en els que en escindir el pericarpí observem un residu deshidratat del que hauria estat la llavor, sovint necrosat, o bé, de llavors en procés de formació o plenament formades, amb símptomes de necrosi o degeneració tissular (ennegriment o embruniment massiu).
7. **Llavors immadures:** Llavors que han iniciat el seu desenvolupament però no han arribat a formar una llavor madura. Es tracta de llavors de mida molt variable segons l'estat de desenvolupament, que com a mínim es rehidraten en part i que no presenten símptomes d'avortament (no s'han ennegrit ni embrunit). Per la falta de desenvolupament, són més o menys toves en rehidratar-se, i donen positiu al TTC a tota la llavor, tant l'embrió com l'endosperma. Sovint l'embrió no s'ha diferenciat.

8. **Llavors madures:** Llavors madures i ben desenvolupades, sense lesions importants, que tenen un embrió clarament diferenciat. D'aquestes se'n diferencien les viables (l'embrió dóna positiu al TTC en 1-2 h) o inviables.

Les larves i insectes adults paràsits trobats en bon estat s'han conservat en etanol al 70% per a una posterior determinació.

#### ESTUDI DE LA VIABILITAT PER REACCIÓ AMB SALS DE TETRAZOLI (TCC)

L'assaig de viabilitat mitjançant tetrazoli s'ha posat a punt a partir del procediment descrit a Moore, R. P., 1985. La concentració de TTC i el temps de reacció s'han optimitzat per a minimitzar el temps de durada del procediment. L'assaig s'ha validat amb el lot comercial EC1 per comparació entre tres tractaments: control, tractament de calor (70°C) sobre llavors deshidratades i el mateix tractament de calor sobre llavors rehidratades (12h en cambra humida). No s'ha obtingut cap fals positiu en el tractament de 70°C sobre llavors rehidratades. El tractament de calor sobre les llavors deshidratades no ha afectat la viabilitat de les llavors, obtenint resultats similars amb els controls.

Les llavors senceres i ben desenvolupades es processen per a l'assaig de viabilitat amb tetrazoli. De cada fruit se n'ha eliminat el pericarpí, i s'ha exposat l'embrió de la llavor mitjançant una incisió sota l'estereoscopi amb una ganiveta esmolada. La incisió es practica en sentit perpendicular a l'eix longitudinal de la llavor i propera a la part apical d'aquesta, seguida d'un moviment de palanca. Això esquinça part de l'endosperma que cobreix l'embrió, exposant-lo a l'exterior (Moore, R. P., 1985). Un cop al descobert es disposa l'endosperma amb l'embrió en un vial amb 0,5 ml d'una dissolució de clorur de trimetiltetrazoli al 1% en tampó fosfat pH 7. El tampó fosfat es prepara a partir de dues solucions mare: dissolució A:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  9,08 g/l; dissolució B:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  23,87g/l. Les dues solucions es barregen a proporció A:B 2:1.

Les llavors s'incuben a temperatura ambient durant 1-2 hores. Passat aquest temps s'examinen de nou sota l'estereoscopi. Es considera la reacció positiva (viable) en cas que l'embrió tenyeix de color rosat o vermell, de forma diferenciada de la resta de la llavor.

#### GERMINACIÓ

S'ha realitzat un assaig de germinació de tots els sublots de EC6-2005, descrits més amunt. Com a control s'ha afegit el lot comercial EC1 a l'assaig.

#### **Efecte de la mirmecocòria en el banc de llavors al sòl.**

S'ha dut a terme un assaig per avaluar l'impacte de la depredació de les formigues en el banc de llavors d'*E. campestre* dins de l'àrea de la població de card panical de la localitat de Rubió (L'Anoia) ja descrita. Per a aquest estudi s'han emprat els lots EC1, com a

mostra de llavors amb una alta viabilitat (>50%), i el lot EC3, per tractar-se d'un lot amb una viabilitat reduïda (<5%).

Dins de la parcel·la s'ha traçat dos transectes paral·lels, separats per 5 metres. A cada transecte s'ha establert vuit punts d'estudi, a intervals regulars de 5 m. De forma alterna, s'han disposat a cada punt 100 llavors d'*Eryngium campestre*, dels lots EC1 o del lot EC3, escampades en una superfície de 20 cm<sup>2</sup>. Les llavors han estat prèviament ruixades superficialment amb pintura fluorescent (extreta d'un Stabilo Luminator groc per al lot EC1 i vermell per al lot EC3), prèviament diluïda amb aigua (1:10), i a la que s'ha afegit un 1% d'etanol com a agent mullant. Aquestes pintures, ambdues reactives a la llum ultraviolada però amb freqüències d'emissió diferents, no afecten a la depredació per les formigues que habiten la parcel·la, tal i com s'ha pogut observar en proves preliminars. Cada rèplica ha estat protegida amb una malla de plàstic per a evitar una possible depredació per ocells.

Les llavors han estat disposades a primera hora del matí. Cada 24 hores s'ha realitzat un recompte nocturn de les llavors que queden dins dels quadrats d'estudi, il·luminant cada rèplica amb un lot portàtil de llum UV. El recompte s'ha realitzat a partir d'una fotografia digital (Nikon D70) presa a cada rèplica amb aquesta mena d'il·luminació.

### **Anàlisi estadístic dels resultats**

Per a l'anàlisi de diferències significatives entre tractaments s'ha emprat l'anàlisi ANOVA d'un factor mitjançant el programari R (R Development Core Team, 2009), discriminant amb un p-valor de 0,05. En tots els casos s'empra la desviació estàndard per a expressar l'error de la mesura.

### 5.3. Resultats

#### Efecte de la conservació en fred en la germinació d'*E. campestre*

No s'ha detectat diferències significatives en els índex de germinació del lot EC1 entre els tractaments de conservació en fred a 4°C durant 0, 3 i 9 mesos. En tots tres casos, la germinació en cambra humida es situa al voltant del 40% (39 ±2,9%; 36 ±6,8% i 40 ±10,5%).

Els experiments posteriors realitzats sobre sòl esmenat amb perlita permeten corroborar que no hi ha una pèrdua de viabilitat en les llavors d'*E. campestre* conservades a més llarg termini, si bé la taxa de germinació obtinguda en sòl és sempre més gran que la obtinguda en cambra humida (vegis els resultats de l'efecte del tipus de substrat, més endavant). No s'han observat diferències significatives en la taxa de germinació sobre aquest substrat a tres anys vista (62,7 ±1,53% el 2003 i 65,3 ±2,75% el 2006).

#### ÍNDEX DE GERMINACIÓ EN POBLACIONS NATURALS D'*E. CAMPESTRE*

Hem observat que existeix una variabilitat important en els percentatges de germinació de llavors d'*E. campestre* recollides en diferents localitats i anys (taula 4.1). En general, les taxes de germinació són molt baixes. Les taxes de germinació per a les llavors d'una mateixa localitat en anys diferents presenten una variabilitat similar (vegis taula 4.2), amb anys amb taxes de germinació molt baixes i anys amb un índex de llavors sanes i viables superiors al 40%.

Lot	Localitat	Any	Mes	% germinades	Desv. estàndard
EC3-2003	Lot comercial (control)	2000	-	65,3	2,8
EC2-2002	Villarmentero, Valladolid	2002	Octubre	3,8	1,8
EC2-2003	Navazuelo, Còrdova	2003	Novembre	12,7	3,1
EC2-2004	Pina, Castelló	2004	Novembre	20,8	4,4
EC2-2005	Benasc, Oasca	2005	Setembre	6,3	1,7

**Taula 4.1:** Germinació de llavors d'*Eryngium campestre* recol·lectades en diferents poblacions en diferents anys i mesos de recol·lecció.

Lot	Any	Mes	% germinades	Desv. estàndard
EC3-2002	2002	Desembre	15,8	6,8
EC1-2003	2003	Agost	3,8	2,5
EC1-2004	2004	Novembre	43,0	7,7
EC1-2005 / R5	2005	Octubre	6,3	3,4
EC1-2006	2006	Setembre	36,3	4,6

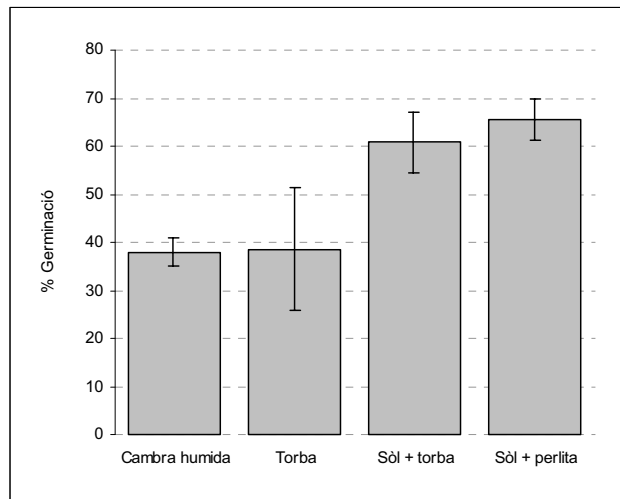
**Taula 4.2:** Germinació de llavors d'*Eryngium campestre* recol·lectades en una mateixa població al llarg de diferents anys.

## Efecte del substrat en la germinació d'*E. campestre*

### GERMINACIÓ EN DIFERENTS SUBSTRATS

S'ha detectat diferències significatives en la germinació d'un mateix lot d'*E. campestre* segons el substrat en el que germinen les llavors (*Figura 1*). L'ús de sòl esmenat amb perlita ha donat lloc a una taxa de germinació de  $62,7 \pm 1,5\%$ , molt superior a la obtinguda en cambra humida ( $38,0 \pm 2,9\%$ ). En la majoria d'assaigs realitzats en cambra humida s'ha observat una abundant proliferació de fongs en el pericarpí dels fruits, que acaba estenent-se a través del paper de filtre, i que podria ser la principal raó d'aquesta diferència en els resultats.

Per altra banda, el tractament amb torba també ha donat lloc a un percentatge de germinació reduït i amb una important variabilitat entre rèpliques ( $38,5 \pm 12,8\%$ ). En canvi, l'addició de la mateixa torba neutralitzada al sòl no dona lloc a diferències significatives en la taxa de germinació registrada ( $60,8 \pm 6,3\%$ ).

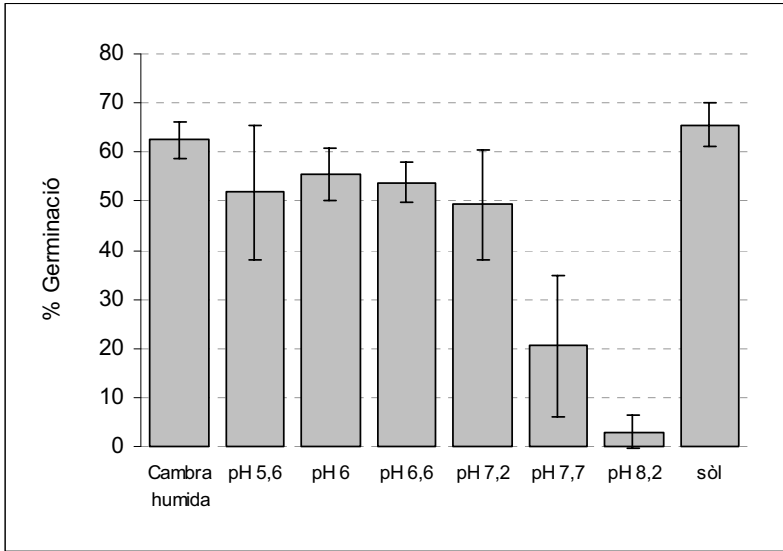


**Fig. 5.1:** Percentatges de germinació per al lot EC3-2003 en diferents substrats.

### GERMINACIÓ A DIFERENTS PH EN TAMPÓ FOSFAT

Els valors de germinació a diferents pH mitjançant solució amortidora de pH Sørensen (fosfat) ha donat lloc a valors inferiors als controls en tots els tractaments (*Figura 2*). La taxa de germinació davalla significativament a pH 7,5, obtenint germinacions inferiors al 10% per a pH 8,2.

El control realitzat en sòl esmenat amb perlita, de pH similar (pH 8,6), han donat lloc a les germinacions habituals ( $65,0 \pm 4,4\%$ ). Sorprenentment, el control realitzat en cambra humida ha donat lloc a una taxa de germinació similar, molt superior a la resta de controls en cambra humida realitzats en altres assaigs per al lot EC1. La proliferació de fongs en el pericarpi dels fruits ha estat molt menor que en altres ocasions. Cal fer notar que el procediment de rec en aquest assaig ha estat diferent de la resta, més freqüent i realitzant un rentat del paper de filtre, en comptes de simplement afegir l'aigua necessària per a restablir la pèrdua d'aigua.



**Fig. 5.2:** Efecte de la solució amortidora de pH - fosfat (Sörensen) a diferents pH, respecte germinacions en cambra humida (efectuant rentats, pH 7,2) i sòl esmenat amb perlita (pH 8,6). Els pH reflectits en el gràfic són els valors reals de la solució tampó en el moment de ser administrada.

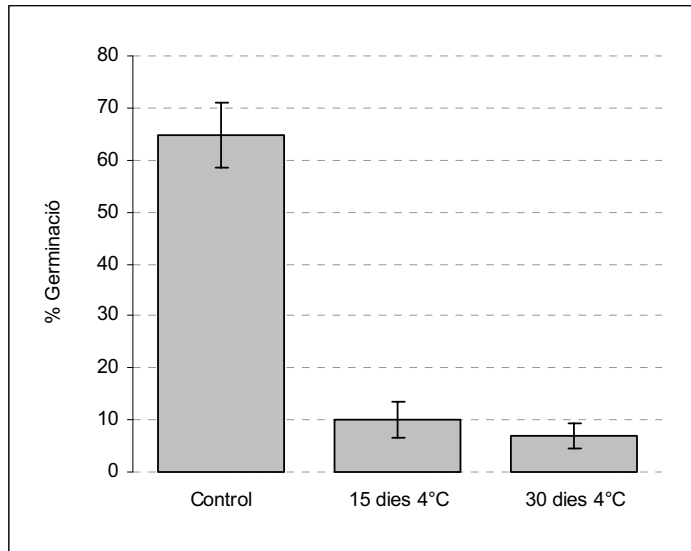
### Avaluació de possibles fenòmens de dormància en les llavors

No s'ha detectat diferències significatives entre el tractament amb àcid giberèl·lic ( $38,0 \pm 5,2\%$  llavors germinades) respecte el controls en cambra humida ( $33,0 \pm 6,8\%$ ). Els assaigs es van realitzar sense efectuar rentats del filtre de paper.

Tampoc no s'ha observat diferències en la germinació sobre torba neutralitzada en condicions de foscor. Les germinacions per al lot EC3-2003 són de  $37,0 \pm 13,2\%$  en el tractament de llum amb fotoperíode i del  $28,0 \pm 9,8\%$  en condicions de foscor.

## EFFECTE D'UN TRACTAMENT D'ESTRATIFICACIÓ PER FRED

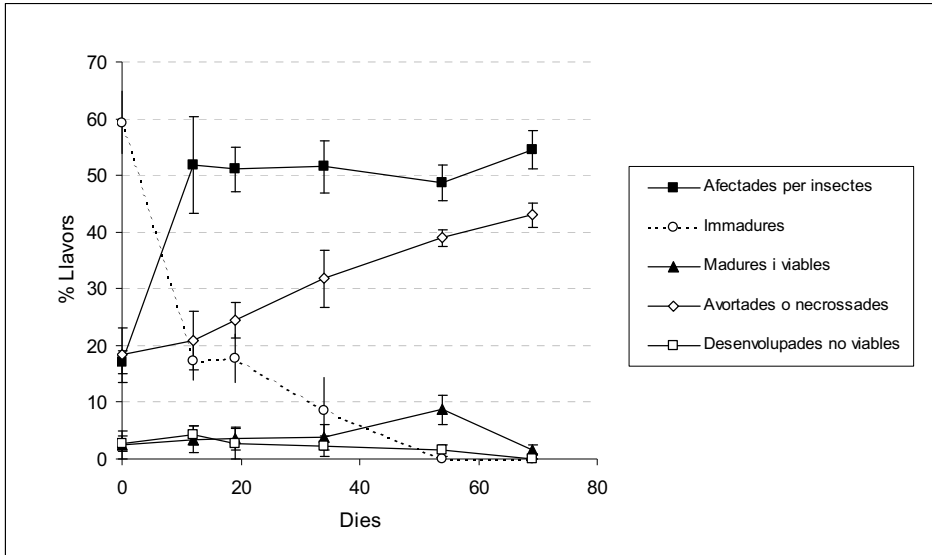
Els dos tractaments d'estratificació per fred (llavors hidratades, durant 15 i 30 dies a 4°C) han donat lloc a germinacions molt més reduïdes ( $10 \pm 3,5\%$  i  $6,8 \pm 2,4\%$ ) a les del tractament control ( $64,8 \pm 6,3\%$ , vegis la Figura 3). L'experiment ha estat repetit per a validar aquests resultats. L'estudi de la viabilitat de les llavors no germinades mitjançant tetrazoli en acabar l'experiment mostren que el percentatge de llavors que no han germinat respecte el control segueixen essent viables.



**Fig. 5.3:** Efecte de dos tractaments d'estratificació a 4°C en la germinació d'*E. campestre*.

### **Evolució de l'estat i viabilitat de les llavors d'*E. campestre* al llarg de la maduració i senescència de la inflorescència.**

L'any 2005, la població d'*E. campestre* objecte d'estudi ha donat lloc a un banc de llavors amb un percentatge de viabilitat molt baix. En l'estudi realitzat s'observa com la majoria de les llavors en els glomèruls o bé avorten o bé són afectades per insectes. A la figura 4 es representen de forma resumida els valors globals de l'assaig.



**Fig. 5.4:** Estat de les llavors en inflorescències d'*E. campestre* al llarg del temps. Els resultats de l'assaig s'han resumit en 5 categories: Afectades per insectes (barrinades + corcades + parasitades); immadures; madures i viables; avortades o necrosades i desenvolupades no viables. Els valors per les llavors florides o descompostes han estat omesos per a més claredat.

Al llarg de tot el període estudiat el percentatge de llavors sanes i viables es manté estable, fins i tot des del principi de la senescència de la inflorescència, amb valors propers al 3,5%. Tant sols hem registrat un valor superior, del  $8,7 \pm 2,5\%$  de llavors viables, marcant un màxim a la vuitena setmana des de l'inici de la senescència. A partir d'aquest moment, la proporció de llavors viables en el glomèrul disminueix fins a valors propers a zero. Els resultats obtinguts en els assaigs de germinació es corresponen en tot moment amb la proporció de llavors viables observada a l'assaig amb tetrazoli.

A l'inici de la senescència de les inflorescències, el nombre de llavors immadures és molt elevat ( $59,3 \pm 5,5\%$ , figura 4). Tal com era d'esperar, aquest valor davalla ràpidament al llarg del procés de senescència, fins a un valor proper a zero.

Les llavors desenvolupades però inviables representen un percentatge molt baix (valor màxim de  $4,2 \pm 1,7\%$  a la segona setmana). La proporció d'aquestes llavors també decreix amb el temps fins a valors zero a la setena setmana. Pràcticament totes les llavors que es mostren inviables són més petites que les llavors viables. El nombre de llavors que assoleixen la mida normal per a les llavors viables però que donen un valor negatiu a l'assaig de viabilitat amb TTC és desestimable, i generalment es correspon a llavors amb petites lesions mecàniques.

Per altra banda, el nombre de llavors avortades o malmeses augmenta progressivament al llarg de la senescència de la inflorescència, assolint el  $43,7 \pm 2,7\%$ . Al ser el fruit



indehiscent, aquestes llavors avortades no són evidents a nivell macroscòpic, donat que el pericarpi es desenvolupa correctament i els dona una aparença sana. La única diferència morfològica d'aquests fruits amb aquells que contenen llavors ben desenvolupades és que tendeixen a ser menys engruixits.

La proporció de llavors amb símptomes de descomposició per fongs o bacteris han resultat força minses (màxims registrats de  $0,5 \pm 1,0$  i  $2,3 \pm 2,0\%$ , respectivament) en comparació amb la resta de categories. Per aquesta raó aquests valors no han estat representats als gràfics.

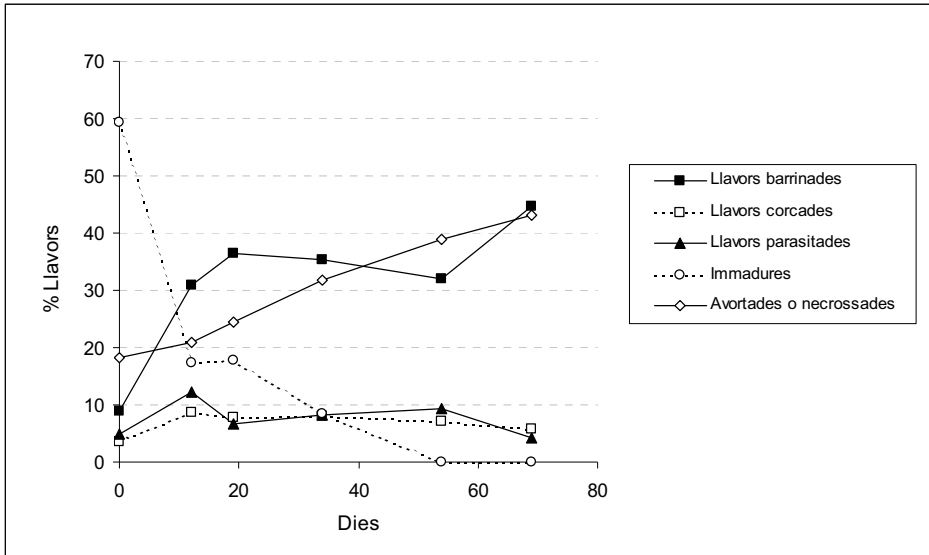
La incidència d'insectes en els glomèruls d'*Eryngium campestre* ha resultat ser molt elevada. La proporció de llavors afectades per insectes ascendeix en pocs dies assolint valors al voltant del 52%, i roman estable a partir d'aleshores. El màxim registrat s'assoleix al final de l'estudi, vora el  $54,6 \pm 3,4\%$ .

A la figura 5 podem observar la incidència dels insectes desglossada en les tres categories descrites a materials i mètodes: llavors barrinades (rosegades o foradades per un barrinador), corcades (que presenten un forat únic a la part plana) i parasitades (fruits externament intactes però amb presència d'un insecte a l'interior o amb la llavor desfeta en engrunes). Les llavors barrinades ascendeixen ràpidament a un valor que oscil·la al voltant del 30-40%, assolint el seu valor màxim al final del mostreig ( $44,6 \pm 8,6\%$ ).

Malgrat que l'atac per insectes resulta evident a simple vista, l'impacte resulta ser més gran del que és d'esperar a nivell macroscòpic. S'ha detectat la presència de larves a l'interior dels fruits, els quals no presenten cap orifici d'entrada. Sovint la larva ocupa la totalitat de l'espai que correspondria a la llavor. En casos puntuals s'ha pogut trobar exúvies o adults dins la llavor, en algun cas amb presència del forat d'emergència. A més, una proporció significativa de llavors sense símptomes externs es troben descompostes en engrunes en el seu interior, deduïm, per l'activitat d'una larva d'insecte prou menuda com per no ser detectada. Tots aquests casos queden recollits en la figura 5 dins de la categoria de llavors parasitades. La proporció de llavors incloses en aquesta categoria roman força estable al llarg de tot l'estudi, registrant-ne un lleuger màxim de  $12,3 \pm 4,5\%$  a la segona setmana.

La inspecció de les larves d'insectes que s'han trobat dins dels fruits ens ha permès identificar amb l'ajut d'un entomòleg (Dr. Juli Pujade, dept. de zoologia, fac. Biologia, UB) les larves com a himenòpters, però no s'ha pogut assolir una identificació a nivell de gènere d'aquestes. Els escassos adults recuperats (dos mascles, una femella i una exúvia) presenten taques grogues al llarg del cos i de bona part de les extremitats, i s'han pogut identificar com a membres dels eulòfids, probablement del gènere *Aprostocetus* (*Hymenoptera*, *Chalcidoidea*, *Eulophidae*).

Les llavors classificades en la categoria de llavors corcades (probablement llavors parasitades en les que ja ha emergit el paràsit fitòfag) segueixen un patró pràcticament idèntic al de les llavors classificades com a parasitades, oscil·lant prop del 8%.

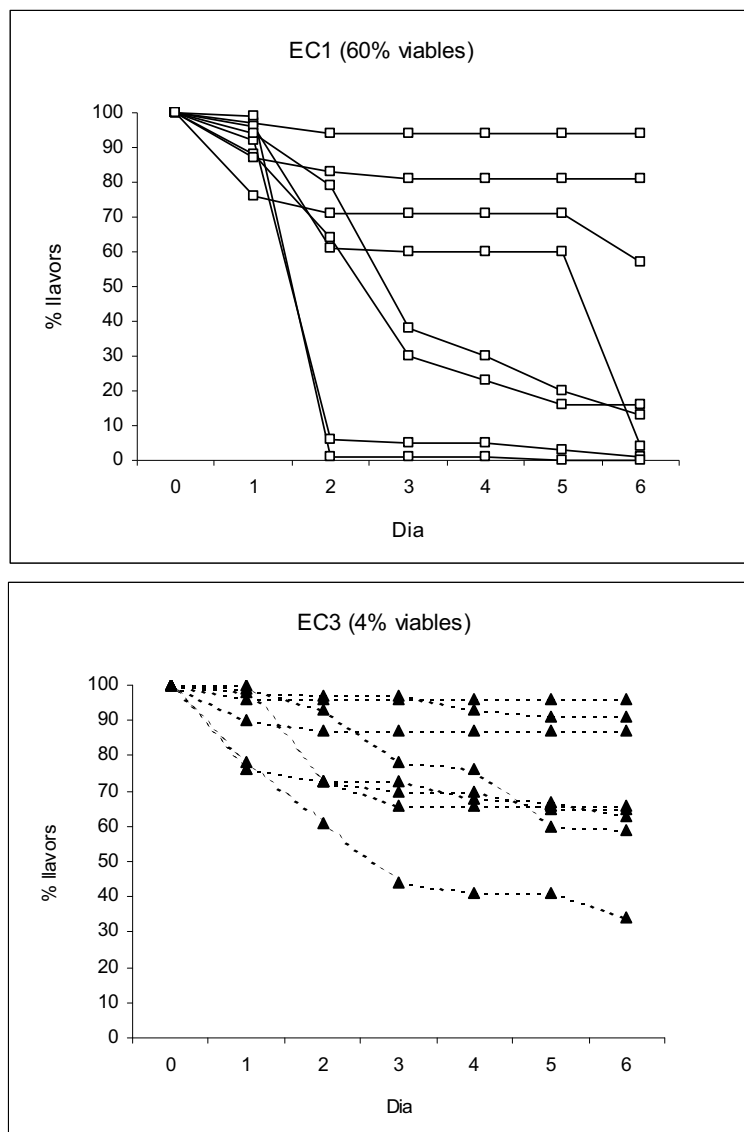


**Fig. 5.5:** Incidència dels insectes en llavors d'*E. campestre* al llarg del temps, desglossats en les categories barrinades, corcades o parasitades (vegis materials i mètodes per a les descripcions de cada categoria). També s'hi representen les freqüències corresponents a les llavors immadures i les avortades, per a facilitar la interpretació dels resultats. Les barres d'error s'ometen per a més claredat.

### Efecte de la mirmecocòria en el banc de llavors al sòl.

La tècnica desenvolupada per a avaluar l'impacte de la mirmecocòria en el banc de llavors del sòl s'ha mostrat prou fiable i efectiva a l'hora de realitzar els recomptes de llavors.

La figura 6 mostra els resultats obtinguts en aquest assaig. Una bona part de les rèpliques associades al tractament de llavors viables (EC1,  $66,8 \pm 38,3\%$  de llavors absents) han estat molt minvades en comparació amb el lot EC3 ( $38,3 \pm 20,4\%$  de llavors absents), obtenint diferències significatives entre ambdós tractaments al sisè dia d'estudi tot i les importants desviacions estàndard. No totes les rèpliques han estat espoliades per igual, i mentre algunes han estat minvades gairebé per complet, d'altres romanen intactes. En algunes rèpliques del tractament de llavors viables, la disminució en el nombre de llavors és sobtada, en un o dos dies.



**Fig. 5.6:** Evolució de cadascuna de les rèpliques en l'estudi de mirmecocòria, per a un lot de llavors amb un alt índex de viabilitat (EC1, línies contínues) i per a un lot amb poques llavors viables (EC3, línies discontinües).

---

## 5.4. Discussió

### Observacions de camp de la biologia d'*Eryngium campestre*

Al llarg aquest estudi hem pogut recollir nombroses observacions de camp respecte el procés de desenvolupament d'*E. campestre*. Malgrat que no podem recolzar aquestes observacions mitjançant un tractament estadístic, creiem que tenen prou valor com per ésser esmentats en aquest apartat, bé sigui per no trobar-se descrits a la bibliografia al nostre abast, bé per contradir o corroborar fets publicats de forma puntual en treballs anteriors.

En la nostra experiència, la variació de la forma de les fulles lligada al desenvolupament (fulles enteres en plantes de primer any *versus* fulles partides en plantes madures) no és un bon indicador de l'edat de la planta. Cailleux, R., Cerceau-Larrival, M. Th. et al. esmenten en els seus treballs que les plantes de primer any no perden les fulles durant el primer hivern, i que les fulles enteres comencen a retallar-se progressivament a partir del segon any. En els nostres cultius, però, hem observat tant plantes de primer any que desenvolupen fulles partides després d'uns mesos, com plantes de dos i tres anys que rebroten i mantenen les fulles senceres o molt poc partides. Aedo, C. et al, 2003 ja esmenta que hi ha formes adultes d'*E. campestre* amb les fulles monofil·les típiques de plantes joves, un fet probablement degut a condicions ambientals i que han donat lloc fins i tot a la descripció de falsos tàxons nous. Aquest fenomen ha estat molt freqüent en els nostres cultius –sobretot al créixer en test, sobre substrats pobres i / o en llocs poc assolats- i hem observat com aquesta resposta segueix un patró força homogeni per a les plantes que han crescut en condicions similars. Aquest patró sembla estar més vinculat a l'abundància de reserves disponibles en la rel que no pas a la edat real de la planta, tot i que no hem confirmat de forma experimental aquest supòsit. De confirmar-se aquest extrem, es podria emprar el grau desenvolupament de la roseta de fulles adultes com a indicador de que la planta ha desenvolupat una rel amb prou reserves com per a ser inoculada amb *P. eryngii*.

En segon lloc, en totes les poblacions visitades (productores o no de *Pleurotus eryngii*) hem observat una molt baixa freqüència de plantes de primer any. Aquesta observació es basa en la mida del coll de l'arrel i de la presència de les característiques restes fibroses dels pecíols de les fulles en el mateix. En canvi, hem observat que els peus adults romanen fidels any rere altre durant un període indefinit, en gairebé tots els casos superior als 3 anys.

Hem observat en plantes adultes d'*Eryngium campestre* que la rel penetra en el sòl a més de dos metres de profunditat, fins i tot en sòls amb perfils molt compactes i en el cas de rels de diàmetre petit (inferior a 5 mm). La rel és vertical i sense ramificacions principals, i tant sols emet rels laterals molt fines (menys d'un mil·límetre de diàmetre). Això fa pràcticament impossible el arrencar-les senceres. A més hem observat una gran capacitat

de ressorgir en cas de rels soterrades per grans quantitats de sòl (fins i tot més d'un metre). Per altra banda, *E. campestre sol* apareixer en conreus abandonats o en guaret a partir del segon any des del darrer llaurat i en canvi és molt rar en camps que es llauen anualment. Aquestes observacions fan pensar que el llaurat anual d'un terreny pot ser suficient per eliminar la presència d'aquesta planta, sense necessitat de l'aplicació d'herbicides. Aquesta podria ser una de les principals raons per les que a les zones on es practica majoritàriament cultiu intensiu, la gírgola de panical és molt infreqüent o absent, al contrari de les zones on abunden els erms o encara es practica el guaret.

Tampoc no hem observat en les poblacions d'*E. campestre* amb absència de *P. eryngii* l'alternança de floracions (any si, any no) citada per Cailleux, R., Cerceau-Larrival, M. Th. et al., 1983. Sí és cert que en certs anys el nombre de peus en floració d'una població pot variar dràsticament. Fóra plausible que aquest fet estigui molt lligat a un factor climatològic (règim de pluges, etc.).

Pel que fa a la senescència de la planta, generalment s'asseca en primer lloc la roseta basal de fulles, seguida dels glomèruls de la inflorescència, que ho fan segons el grau de ramificació en que es troben de menys a mes (és a dir; primer s'asseca el glomèrul central, seguits dels situats en ramificacions de primer ordre, segon ordre i així successivament). Finalment s'asseca tota la inflorescència, que roman dempeus durant força mesos abans de trencar-se per la zona d'abscisió present vora el coll de la arrel.

La dispersió dels fruits s'inicia un cop tota la inflorescència és seca, però encara amb la inflorescència en peu. En primera instància, bona part de les llavors es dispersen per l'acció del vent, a poca distància de la inflorescència. Excepte en el cas de zones força transitades o pasturades, a on és probable que la inflorescència es trenqui i actui com a estepicursor, l'abscisió de la inflorescència podria estar vinculada a un fenomen de descomposició microbiana, donat que generalment només té lloc de forma espontània quan les condicions d'humitat al sòl han estat elevades durant un temps. Especialment en les tardors poc plujoses, la inflorescència no es trenca per la base fins a principis d'hivern, i sovint arribats a aquest punt la majoria de les llavors ja han estat dispersades pel vent.

### **Conservació de llavors d'*Eryngium campestre* a 4°C.**

Al contrari del que esmenta Cailleux en les seves publicacions – en les que l'autor obtenia pèrdues de viabilitat al llarg d'un any de conservació de les llavors d'*E. campestre* – no hem observat pèrdues significatives en la viabilitat de llavors conservades a 4°C i humitat relativa inferior al 10%. Sí hem observat però lleugeres diferències pel que fa a la sincronia en la germinació, que atribuïm a artefactes metodològics.

Aquests resultats han permès dur a terme els nostres assaigs de germinació a partir de lots recollits en diferents anys sense necessitat de factors de correcció per pèrdua de viabilitat. Per a preservar les llavors d'*E. campestre* a molt llarg termini, seria recomanable

optar per la ultracongelació en recipients hermètics, procediment amb el que es pot preservar la viabilitat un mínim de 8 anys (Montezuma-De-Carvalho, J., Paiva, J. et al., 1984). Per tant, és viable la recol·lecció, selecció i conservació de material vegetal a llarg termini, de cara a la sembra de terrenys per a la producció de rels de card.

### **Taxa de germinació en poblacions naturals d'*Eryngium campestre***

Les taxes de germinació de llavors de poblacions naturals d'*Eryngium campestre*, són molt minses i variables, en molts casos inferiors al 10% dels fruits macroscòpicament sans, i en la nostra experiència, sempre per sota del 50% de germinació. En aquest cas no considerem representatiu el lot EC1 d'origen comercial, ja que va ser garbellat en origen.

Aquesta variabilitat no sembla lligada a la localitat d'origen del material, ni al moment de recol·lecció de les llavors (sempre que es recullin les llavors un cop la inflorescència es troba totalment seca, que és quan les llavors es desprenen per sí soles dels glomèruls).

Els valors de germinació per a una mateixa localitat es mostren molt variables d'un any a l'altre. Aquests resultats serien coherents amb un cicle bianual (any productiu de llavors viables – any no productiu), tot i que a jutjar pels resultats obtinguts en la resta d'experiments, creiem que els anys amb una baixa proporció de llavors germinables probablement es deuen a la incidència de insectes fitòfags en els glomèruls al llarg d'aquella temporada.

### **Substrat i pH**

Com ja hem comentat, amb anterioritat als estudis aquí presentats vàrem realitzar diverses sèmbrs d'*E. campestre* a camp, a partir de lots de llavors amb un índex de germinació conegut, per tal d'aconseguir plantacions homogènies de card panical properes als 25 peus / m<sup>2</sup> que servissin de base per a estudis de eficàcia en la inoculació de *P. eryngii*. Sorprenentment, en totes elles hem obtingut un nombre de plantes d'*E. campestre* molt inferior als valors esperats en base als assaigs de germinació en cambra humida, que han fet inviable l'ús d'aquestes parcel·les en els nostres estudis.

Per tal d'esbrinar si existeix algun factor edafològic (físicoquímic o microbiològic) que pugui causar aquesta diferència de resultats, hem comparat en un mateix experiment la taxa de germinació obtinguda en sòl natural d'una parcel·la amb card panical amb aquelles obtingudes en cambra humida i sobre torba. La germinació en cambra humida és probablement el procediment més emprat a nivell de recerca per a avaluar les taxes de germinació en llavors (Baskin, C. C. i Baskin, J. M., 1998). Per altra banda, la germinació sobre torba neutralitzada amb CaCO<sub>3</sub> és un dels procediments estàndard emprat per les empreses especialitzades en pretractaments de llavors que hem visitat.

Sorprenentment, les taxes de germinació que hem obtingut mitjançant aquests procediments estàndard són notablement inferiors als que obtenim sobre sòl calcari autòcton. La mescla de torba amb sòl autòcton no ha donat lloc a diferències significatives respecte el sòl sense torba, pel que sembla poc probable que la reduïda germinació sobre torba estigui vinculada a la presència de compostos orgànics del substrat (p. ex., substàncies húmiques) que actuïn com a inhibidors de la germinació. A la llum d'aquests resultats, hem emprat la terra calcària esmenada amb perlita com a substrat en tots els assaigs posteriors que ho han permès. Tots els controls sobre sòl en aquests assaigs han donat lloc a resultats molt estables.

La proliferació de fongs presents en el pericarpí dels fruits de les llavors (*Alternaria spp.*, *Chaetomium spp.*, i d'altres deuteromicets) ha estat un fet comú a tots els assaigs sobre torba i sobretot en cambra humida, en el que el paper humit ha afavorit el creixement i transmissió dels fongs d'una llavor a l'adjacent. Probablement aquesta proliferació ha afectat també una proporció significativa de llavors inicialment sanes, fet que explicaria la diferència entre resultats. Aquests fongs arriben a afectar fins i tot a les plàntules establertes, especialment si es condensa aigua en la seva superfície (per aquesta raó cal retirar les llavors germinades al fer els recomptes, per tal de no subestimar els resultats per culpa de baixes en el nombre de plàntules). Aquesta proliferació és molt menys evident en els tractaments sobre sòl, fet que probablement explicaria les diferències amb la resta de procediments emprats. És conegut que el sòl no estèril sovint presenta un efecte supressor en la germinació esporal i en el desenvolupament de fongs, un fenomen conegut com a *fungistasi* (Dobbs, C. G. i Hinson, W. H., 1953) o també *micostasi*, i que està molt vinculat a composició i les interaccions amb la comunitat microbiològica del sòl (Garbeva, P., Hol, W. H. G. et al., 2011). Al capítol 6 tractarem aquest fenomen amb més profunditat, ja que també afecta al desenvolupament micelià de *P. eryngii*.

No és de descartar però, que existeixin altres factors tipus fisicoquímics que també puguin ser responsables d'aquest fenomen, ja que la terra emprada no és un substrat inert i aporta una gran quantitat de macro- i micronutrients, alhora que té una gran capacitat amortidora de pH per ser molt rica en carbonats. L'assaig de germinació en diferents condicions de pH es va realitzar amb la intenció de comprovar si aquest paràmetre podria ser el responsable les variacions en les taxes de germinació observades. Els resultats en els tractaments amb tampó fosfat Sørensen han donat lloc a germinacions menors respecte als controls en totes les condicions testades, amb una forta davallada en el rang de pH bàsic (7,7-8,2). Donat que el pH del control en sòl esmenat amb perlita és de 8,6, entenem que aquesta davallada és causada per un efecte d'inhibició de la germinació per part del  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  emprat en la solució A. Molt probablement aquest efecte inhibidor sigui causat per la sensibilitat de les llavors d'*E. campestre* al sodi (recentment descrita per Jesske, T. i Brandes, D., 2012), ja que en el nostre experiment es repeteix aquest efecte amb el  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , però no per al  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . En tot cas, les germinacions obtingudes per als pH 5,6 – 6 –6,6 són força properes als controls (pH 7,2 i 8,6), pel que concloem que les llavors d'*Eryngium campestre* germinen correctament dins

del rang de pH entre 5,5 i 8,5, i que el pH del substrat de cultiu no ha estat el responsable directe de les diferències en la germinació.

Resulta especialment sorprenent el fet que la germinació per al control en cambra humida en aquest assaig ha resultat en una taxa de germinació molt similar a la del control en sòl (propera al 60%), al contrari que la resta de controls en cambra humida (sempre al voltant del 40%). També hem observat que la proliferació de fongs en aquest control ha estat menor. La única diferència d'aquest assaig amb la resta ha estat el procediment de rec, més freqüent, i en el que s'ha efectuat un rentat del filtre i les llavors amb aigua desionitzada, retirant-ne l'excés, per comptes de restaurar l'aigua evaporada simplement per addició. Donat que l'aigua emprada en tots dos procediments era desionitzada, cal descartar l'acumulació de sals com la causa d'aquestes diferències. És possible que el rec mitjançant rentats saturi més el paper de filtre (fet que retardaria el creixement micelià dels fongs), alhora que retira bona part de la càrrega esporal i possibles metabòlits secundaris (àcids orgànics, enzims... ) en el pericarpi, limitant d'aquesta manera la incidència d'aquest desenvolupament fúngic sobre la llavor.

### **Cerca de possibles fenòmens de dormància en les llavors d'*E. campestre***

Les reduïdes taxes de germinació observades per a les llavors de card panical, i la incoherència entre els resultats de germinació en laboratori respecte els obtinguts en sèmbras directes a camp, també van fer considerar la possible existència de fenòmens de dormància associats a la llavor d'*E. campestre*.

Els fruits d'*E. campestre* tenen una pericarpi prim i relativament tendre, que permet que les llavors que contenen s'hidratin en poques hores. Això fa descartar qualsevol fenomen de dormància morfològica vinculada a la impermeabilitat de la llavor, que per altra banda seria més aviat típic de llavors amb l'embrió molt més desenvolupat. Així ho corroboren les proves preliminars d'escarificació realitzades al principi de la nostra recerca (dades no presentades), en les que a més vàrem constatar que la lesió o abrasió de les ornamentacions del fruit, no n'afecta negativament la germinació. De la mateixa manera, tampoc no hem observat canvis evidents en el comportament de llavors a les que s'ha extret el pericarpi (germinació en medi Ingestad-agar, vegis al capítol 6).

Les proves de tractament amb giberel·lines, llum / foscor, i d'estratificació per fred, han estat plantejades per a descartar els fenòmens de dormància fisiològica més freqüents, en el cas de les giberel·lines i la germinació en condicions de foscor, amb resultats negatius. És rellevant el fet que la germinació sigui indiferent a la presència o no de llum, ja que això permet l'aplicació industrial de recobriments inerts sobre la llavor (dades no presentades). Aquests tractaments industrials, a més d'augmentar el pes de la llavor i per tant facilitar-ne la sembra automatitzada, permeten incorporar altres productes (adobs, fungicides, repel·lents per animals, etc.) que millorin el rendiment en la sembra.



Al contrari del que era d'esperar, els tractaments de fred (15 i 30 dies a 4°C), han donat lloc a una davallada en la taxa de germinació d'aproximadament un ordre de magnitud. Al nostre parer, el tractament de fred, lluny d'interrompre cap fenomen de dormància, l'indueix. El fet que les llavors a priori germinables segueixen essent viables al tetrazoli després del tractament a 4°C, descarta una possible mort de la llavor i recolza aquesta conclusió.

La inactivació de la germinació a causa d'un tractament de fred és un fenomen molt menys freqüent que el de trencament de dormància per estratificació. En el cas de la família de les umbel·líferes, només coneixem un sol cas descrit, per a *Conium maculatum* (Baskin, J. M. i Baskin, C. C., 1979). Aquest fenomen podria explicar en bona mesura la manca d'èxit en sèmbrs directes a camp, ja que les baixes temperatures nocturnes podrien induir la dormància a bona part de les llavors sembrades. En proves posteriors hem constatat que com a mínim, una part de les llavors a les que s'ha induït la dormància mitjançant fred arriben a germinar a l'any següent. Desconeixem però quina taxa de supervivència a llarg termini tindrien aquestes llavors a camp, especialment si no es mantenen les condicions de humitat.

A la llum d'aquests resultats, i donat que les proves de viabilitat amb TTC en els nostres assaigs mostren que no hi ha diferències significatives entre el nombre de llavors viables i les germinables abans del tractament per fred en cap dels controls, concloem que *E. campestre* no presenta fenòmens de dormància rellevants en el moment de la dispersió de les llavors, però que poden ésser induïts per un període de fred un cop la llavor s'ha hidratat.

### **Evolució de l'estat i viabilitat de les llavors en poblacions naturals.**

Com hem observat, la taxa de germinació de llavors d'*Eryngium campestre* en poblacions naturals és molt variable i sovint inferior al 10% en el moment de la seva dispersió. Això ens ha fet plantejar un disseny experimental per al seguiment de l'estat de les llavors al llarg del procés de senescència de les inflorescències, amb l'objectiu d'identificar quines son les principals causes d'aquesta variabilitat, i el moment òptim per a la recollida de llavors.

L'any 2005, la població d'*Eryngium campestre* objecte d'estudi ha donat lloc a un banc de llavors amb un percentatge de llavors viables molt reduït. Els resultats indiquen que la causa principal ha estat una important incidència d'insectes fitòfags que afecten als glomèruls de la inflorescència, i directa o indirectament, a la llavor.

Com era d'esperar, a mesura que la inflorescència s'asseca el nombre de llavors immadures davalla progressivament en el temps. En canvi, la proporció de llavors madures no augmenta en contraposició d'aquestes, i o bé són afectades per insectes (vora el 50%) o bé, avorten progressivament i no arriben a desenvolupar-se (fig. 4). Cal esmentar que molts glomèruls mostraven símptomes de barrinat a la base, fet que també

podria haver aturat el desenvolupament de les llavors que contenen de forma prematura. Com ja hem comentat, moltes d'aquestes llavors que no arriben a desenvolupar-se es confonen amb llavors sanes, donat que el pericarpi es troba completament desenvolupat, i a ull nu els fruits només es diferencien per ser lleugerament més engruixits.

La incidència de descomposició per fongs o bacteriana són mínims. Al nostre entendre, l'elevada incidència de fongs observada en els assaigs de germinació en cambra humida és secundari a l'avortament de la llavor o la degradació d'aquesta per insectes.

La deterioració causada per insectes es dona principalment al llarg dels últims dies de la maduració de les llavors i a l'inici de la senescència de la inflorescència, i la proporció de llavors malmeses s'estabilitza a partir d'aquest punt. Els principals responsables són larves no identificades i petits coleòpters barrinadors que han afectat el 30-40% del total de llavors produïdes per la planta. Aquesta afectació per barrinadors sol ser evident a nivell macroscòpic, però no sempre, doncs sovint el barrinat es localitza a la base del glomèrul que suporta les llavors, que només en resulten lleugerament lesionades a la base.

Per altra banda, també s'ha detectat la presència de com a mínim un himenòpter fitòfag paràsit de llavors en la població estudiada, que malauradament no ha estat possible identificar per manca de material adult. Els fruits parasitats, amb una larva dins, tenen un aspecte macroscòpic idèntic al d'un fruit sa.

Els pocs adults observats, també himenòpters, probablement del gènere *Aprostocetus* (*Hymenoptera*, *Chalcidoidea*, *Eulophidae*), no són fitòfags. Com la majoria de calcidoïdeus, els membres del gènere *Aprostocetus* solen ser ectoparàsits que ataquen ous, larves o pupes de tota mena de grups d'insectes, inclosos altres himenòpters, i fins i tot altres calcidoïdeus (Juli Pujade, dpt. de Zoologia, UB, com. pers.), però sempre de manera específica. Deduïm que les larves d'himenòpter que hem trobat ocupant l'espai de la llavor corresponen a l'hoste característic dels exemplars d'*Aprostocetus* que hem trobat.

El grup dels *Chalcidoidea* també inclou unes poques espècies fitòfagues estrictes, entre les que trobem a *Systole bipunctata* Erdös (*Hymenoptera*, *Chalcidoidea*, *Eurytomidae*), una espècie descrita com a fitòfag específic de llavors d'*E. campestre* (Zerova, M. D. i Seryogina, L. Ya., 1994). Segons la iconografia detallada en la bibliografia al nostre abast, aquest dípter emergeix a través d'un forat lateralitzat a la part plana de la llavor, lesió idèntica a les que hem pogut observar en un bon nombre de llavors, que inicialment hem classificat com a llavors "corcades", pel que considerem que *Systole bipunctata* n'és el candidat més probable.

Per tant, el més plausible és que el percentatge de llavors afectades per himenòpters fitòfags es correspongui en realitat a la suma d'aquestes dues categories (parasitades + corcades), i representin entre el 15,5 i el 21,0% de les llavors malmeses. Aquest valor es

manté més o menys constant al llarg del període estudiat, fet consistent amb que els ous del paràsit siguin dipositats en els estadis de quallat del fruit.

Habitualment aquest grup d'insectes tenen un cicle vital simple, pel qual les larves d'himenòpters que es troben dins la llavor hi romanen fins al final del cicle anual, quan hi torni a haver inflorescències a on dipositar els ous, i rarament realitzen un segon cicle de reproducció en un hoste secundari (Juli Pujade, dpt. de zoologia, UB, com. pers.).



**Fig. 5.7:** Fruit rehidratat i escindit sota l'estereoscopi, en el que es pot observar un himenòpter adult, probablement del gènere *Aprostocetus* sp., ocupant l'espai que corresponia a la llavor. S'ha respectat la posició original de l'insecte, que es trobava encarat cap a un orifici de sortida per la part glabra del fruit.

### **Mirmecocòria.**

La tècnica emprada per a l'estudi de la mirmecocòria sobre llavors d'*E. campestre* ha resultat molt eficaç a l'hora de facilitar el recompte de llavors en el sòl. La tècnica (millorable mitjançant l'ús de pintures transparents també UV-sensibles) permet un recompte ràpid i estandarditzable mitjançant anàlisi d'imatge. Només hem trobat, amb posterioritat, un únic treball a la bibliografia que empra aquesta mena de pintures per a traçar bioencapsulats de *Beauveria bassiana* aplicats per al biocontrol de tèrmits (Bextine, B. R. i Thorvilson, H. G., 2002), i cap en estudis de banc de llavors. La opció de poder emprar pintures reactives a diferents longituds d'ona – no descrita – fa que la tècnica sigui molt versàtil, i permet l'estudi simultani de diferents tractaments o diferents llavors sense risc de confusió.

Amb anterioritat a l'experiment, ja havíem observat que algunes espècies de formigues recollien llavors d'*Eryngium campestre* quan aquestes eren sembrades prop d'un formiguer. També hem observat que és freqüent trobar nius de formigues prop de la base de cards panicals adults i ben desenvolupats, o fins i tot formiguers en els que creix un bon nombre de plàntules de primer any, agrupades gairebé de forma cespitosa, pel que hem d'incloure la mirmecocòria com un altre dels mecanismes de dispersió de llavors de *E. campestre*. En canvi, no hem vist formigues recollint les llavors en la inflorescència.

El disseny experimental que presentem és molt simple, donat que no té en compte les espècies de formigues presents, la distribució dels formiguers en la zona d'estudi, la disponibilitat o no d'altres llavors, etc. Nogensmenys, és suficient per demostrar que la depredació per formigues és un factor a tenir en compte a l'hora de realitzar sèmbras de card panical directament a camp. És interessant observar que una part de les rèpliques del lot EC1 sofreixen una minva sobtada fins a valors propers a zero, mentre que aquest fet no s'observa en cap de les rèpliques del lot EC3. Entenem que aquesta minva es deu a un efecte esquer causat per l'agrupació de llavors ben desenvolupades en una superfície reduïda (un cop localitzada una de les rèpliques, les formigues hi van massivament fins a esgotar-la, recollint tant les llavors germinables com les que no ho són).

Les rèpliques del lot amb un baix índex de germinació també minven, tot i que menys, i de forma molt més progressiva. No és de descartar que aquesta davallada progressiva sigui un artefacte degut al vent, ja que tot i que les rèpliques s'han disposat en punts arrecerats en part, podria endur-se amb més facilitat les llavors poc desenvolupades, i per tant, més lleugeres. En qualsevol cas, les diferències observades entre tractaments indiquen que les formigues podrien discernir les llavors ben desenvolupades de la resta, i que només aquestes llavors ben desenvolupades actuen d'esquer.

---

## 5.5. Conclusions

El sistema de cultiu de *Pleurotus eryngii* proposat en aquest treball requereix del cultiu previ d'una planta hoste compatible, que un cop desenvolupada, serà inoculada amb el fong. L'hoste de la varietat tipus, *Eryngium campestre*, és un candidat interessant per emprar en aquest sistema de cultiu, entre d'altres raons, per ser l'hoste més freqüent i amplament distribuït dels que es coneixen per al complex *eryngii*, i per tant el més fàcilment adaptable a llocs i entorns diferents.

Malauradament, tant *Eryngium campestre* com la resta d'hostes descrits són plantes que fins ara no han tingut interès en ser cultivades, i no es coneixen quins són els principals requisits fisiològics que en permetrien optimitzar el creixement. Cal afegir a més que també es desconeixen els requisits de *Pleurotus eryngii* per a propagar-se i desenvolupar-se a camp, i per tant, les pràctiques agronòmiques que alterin la estructura i composició del sòl podrien afectar negativament el desenvolupament del bolet. En qualsevol cas, hem observat que el desenvolupament de *E. campestre* en sòls molt poc alterats és molt lent, pel que caldrà fer una recerca molt extensiva per a posar a punt el cultiu de la planta i alhora, ampliar el nostre coneixement pel que fa al desenvolupament del miceli en el seu entorn natural.

La sembra directa de llavors d'*Eryngium campestre* a camp semblaria *a priori* el sistema més rentable per a cultivar la gírgola de panical a camp, sobretot perquè estalviaria la necessitat de fer planter, i per tant es reduirien sensiblement els costos del procés. Les nostres primeres temptatives de sembra i cultiu de la planta han fet palès que la sembra directa a camp pot donar lloc a rendiments molt inferiors als esperats o fins i tot fracassar amb facilitat. Curiosament, en poblacions naturals de card panical, el nombre de plàntules noves també és mínim, fet que no es correspon amb l'elevat nombre de llavors que produeix la planta.

Els resultats de la nostra recerca fan pensar que hi ha diversos factors que, en conjunt, serien la causa d'aquests resultats. En primer lloc, les poblacions silvestres d'*Eryngium campestre* produeixen un banc de llavors amb una proporció de llavors viables força reduït i molt variable d'un any per l'altre. Els resultats obtinguts assenyalen la presència d'insectes fitòfags que ataquen els glomèruls com a principals responsables d'aquesta variabilitat. En la majoria dels casos es tracta d'insectes barrinadors que o bé malmeten directament la llavor, o bé afecten la base del glomèrul i interrompen la maduració del fruit. També s'ha detectat un percentatge significatiu de llavors afectades per himenòpters, que dipositen els ous durant la floració o el quallat del fruit i que es desenvolupen dins d'un dels mericarps, consumint la llavor per dins. Els fruits afectats d'aquesta manera no són discernibles a ull nu.

En segon lloc, les llavors sanes i madures d'*E. campestre* que hem estudiat no presenten cap fenomen de dormància en el moment de la seva dispersió. En canvi, els nostres

resultats indiquen que s'indueix una dormància morfofisiològica a la llavor quan se la sotmet a un període de fred, un cop ha estat hidratada de nou. Les llavors que han entrat en aquest estat es mantenen viables i podrien germinar al llarg de les temporades següents. Desconeixem quins factors poden trencar aquesta dormància i quin percentatge sobreviu d'una temporada a l'altra. Aquesta dormància induïda (fins ara no descrita per a *E. campestre*) podria ser la principal causa dels nostres resultats en les primeres sèmbras a camp, ja que les llavors hauran estat sotmeses a temperatures nocturnes força baixes.

La depredació de llavors per part de formigues i d'altres animals és el tercer factor presumptament responsable del baix èxit en les nostres sèmbras a camp. Hem demostrat que les llavors d'*E. campestre* que cauen a terra són fàcilment depredades per formigues, i es confirma que la mirmecòria s'hauria d'incloure també com a estratègia de dispersió de llavors per a *E. campestre*. Els nostres resultats apunten a més que les formigues podrien discernir les llavors viables i ben desenvolupades de la resta, i que l'agrupació d'aquestes llavors en una àrea reduïda (per exemple, al peu d'una inflorescència) actuarien d'esquer, fent que les formigues en recullin la majoria de llavors, indistintament de si són viables o no.

A efectes pràctics, el moment òptim de recol·lecció de llavors d'*Eryngium campestre* és indiferent, sempre i quan tota la part aèria de la planta s'hagi assecat completament, i el vent no n'hagi iniciat la dispersió dels fruits (de setembre a novembre, aproximadament). Serà necessari però un control curós de la possible afectació per insectes al llarg de la floració, i en el període que va des de la senescència de la inflorescència fins al moment de la recollida dels fruits. Les llavors recollides poden preservar-se durant anys en condicions de baixa humitat relativa (5% HR) i a una temperatura propera a 4°C.

D'escollir la sembra a camp com a procediment de treball, aquesta es realitzaria a finals de primavera, un cop les temperatures nocturnes no davallin per sota dels 10°C, per tal d'evitar que se les indueixi la dormància per fred. En la sembra, caldrà prendre mesures per evitar la depredació per part de formigues i ocells. Donat que les llavors d'*E. campestre* no tenen requeriments de llum per a germinar, es poden alleujar aquests problemes soterrant les llavors a una certa fondària, i aplicant recobriments inerts a la llavor (Grasskote®, GTG - Germaines Technologies Group, resultats no presentats), que permeten la sembra mitjançant maquinària, a més d'afegir al recobriment altres productes que protegeixin la llavor o en millorin el rendiment (repel·lents per animals, fungicides, adobs, etc.).

En el cas de la sembra per a la producció de planter, a més del control de les temperatures mínimes, caldrà tenir en compte la mena de substrat, incorporant preferentment una proporció de sòl calcari no estèril a una base relativament inert (torba, perlita, vermiculita...) que n'augmenti la capacitat de camp. *E. campestre* és força tolerant al pH del substrat, com a mínim en un rang de pH entre 5,5 i 8,5.

En la nostra experiència, les plàntules d'*E. campestre* són molt sensibles a la sequera fins que no han desenvolupat una arrel madura, pel que caldrà vetllar per la humitat del substrat en els primers mesos de desenvolupament. Al nostre entendre, la plantació de cards hauria de fer-se a densitats elevades (unes 25-100 plantes / m<sup>2</sup>), per tal de compensar la baixa taxa de creixement. Aquest cultiu hauria de durar un mínim de 3 anys, fins a obtenir rels prou desenvolupades. La formació d'una roseta de fulles plenament adultes podria ser un bon indicador de que la planta ha arribat a un desenvolupament radicular suficient per a ser inoculada amb *P. eryngii*.

Els resultats d'aquest treball són un primer pas per a poder realitzar cultius extensius d'*Eryngium campestre*, però encara resta molta recerca pendent abans de disposar d'un sistema que produeixi de forma ràpida i fiable prou biomassa radicular com per plantejar un cultiu rentable de *Pleurotus eryngii*. Aquesta recerca haurà d'optimitzar les condicions de cultiu (marc òptim de plantació, adob, règim de rec, control de plagues i males herbes...) però també fer-ho de manera que les característiques finals del terreny de cultiu siguin les adients per a la inoculació del bolet. Els adobs foliars poden ser una eina valuosa en aquest sentit, ja que alterarien molt poc la composició química del terreny.

Tampoc cal oblidar la resta d'hostes descrits per al complex *eryngii* (*Ferula*, *Cachrys*, *Thapsia*, etc.), dels que tampoc en coneixem els paràmetres de cultiu, però que podrien suposar una alternativa amb valor afegit, per exemple, per créixer més, per adaptar-se millor a les condicions d'una regió, o per donar lloc a bolets amb un calibre superior.





# 6. Inoculació en entorns no estèrils.

## *Comportament de P. eryngii en el sòl i infecció de plantes d'E. campestre.*

---

### 6.1.- Introducció

L'home ha desenvolupat sistemes de cultiu de fongs per a extreure'n profit, adaptant-los a les particularitats de cada organisme i en les condicions més controlades possibles per tal d'optimitzar-ne el rendiment. Com hem vist, en el cas del cultiu de bolets sapròfits es sol treballar sobre substrats amb base lignocel·lulòsica, formulats a partir de subproductes vegetals de baix cost. Donat que sovint els basidiomicets són menys competitius que d'altres microorganismes en medis de cultiu rics en nutrients, el substrat sol rebre un tractament de compostatge, esterilització o pasteurització per a eliminar possibles competidors i/o colonitzar-lo amb una flora microbiològica favorable.

La majoria dels sistemes d'inoculació per a bolets han estat expressament dissenyats per a aplicar-los sobre aquests substrats optimitzats. En tots els casos, la correcta colonització del inòcul i l'absència de contaminants en el substrat són els factors crítics per a l'èxit del procés. En canvi, els sistemes d'inoculació en un entorn no estèril com pot ser el medi natural, es troben poc desenvolupats. En aquest sentit, el sòl resulta un entorn especialment hostil, entre d'altres, per la manca de nutrients assequibles i per la gran càrrega microbiana que conté.

*Pleurotus eryngii* té algunes característiques que el fan un cas peculiar. Es tracta d'un basidiomicet ligninolític, amb un aparell enzimàtic tant agressiu com la resta de *Pleurotus* que habiten sobre fusta. Tot i això, a la natura mai no habita sobre fusta. Paràsit estricte de rels de plantes vives per a poder fructificar a la natura, també es pot comportar com a sapròfit i al laboratori fructifica amb normalitat en substrats lignocel·lulòsics estèrils. A més, aquest parasitisme és força específic vers a un grup concret d'umbel·líferes. A diferència de la majoria de *Pleurotus*, al habitar en prats secs, erms, guarets, i conreus en desús, té la necessitat de poder-se desenvolupar en el sòl per poder arribar a l'arrel de nous hostes, com ho fan altres basidiomicets d'hàbit pràcticola i/o que creixen sobre matèria orgànica i restes vegetals en descomposició. Contràriament, en les condicions de laboratori i/o de cultiu industrial, *P. eryngii* és força sensible a les contaminacions i es mostra menys agressiu que altres *Pleurotus* davant els organismes competidors a l'hora de créixer en substrats pasteuritzats, pel que *a priori* no semblaria un candidat molt competitiu a l'hora de colonitzar restes vegetals en descomposició en un entorn no estèril com és el sòl. Es tracta doncs d'un organisme ligninolític i sapròtrof però molt especialitzat vers determinats hostes i sempre en uns hàbitats molt concrets.

En conjunt, la gírgola de panical té característiques que la situarien a cavall des fongs lignícoles, paràsits, sapròtrofs i práticoles. Donat que la biologia del desenvolupament de *P. eryngii* en el seu entorn natural i els mecanismes que el regeixen encara resten totalment desconeguts, hom ha de prendre com a referent l'escàs coneixement disponible per a tots aquests grups de bolets.

## **Desenvolupament de basidiomicets ligninolítics en el sòl.**

Al llarg dels darrers 50 anys s'ha realitzat nombrosos estudis encarats a la introducció de fongs al·lòctons al sòl, com a supressors de patògens vegetals, per a millorar el desenvolupament de plantes, i en el cas de basidiomicets, sobretot per a bioremediar contaminants com hidrocarburs, olis minerals o metalls pesats, entre d'altres (Baldrian, P., 2008). Malgrat que existeixen alguns treballs exitosos a l'hora de desenvolupar basidiomicets ligninolítics en el sòl, encara avui dia no s'ha aconseguit dur a la pràctica aquestes estratègies de forma regular i efectiva (Gramss, G., 2010).

La gran majoria de basidiomicets ligninolítics estan adaptats al creixement en un substrat lignocel·lulòsic, sovint amb una càrrega microbiana molt reduïda o fins i tot parcialment estèril, com podria ser l'interior d'un tronc d'arbre (o l'arrel d'una planta, en el cas de *P. eryngii*). En canvi, el sòl conté una font limitada de carboni, els nutrients s'hi troben fixats en formes molt diverses, és heterogeni, conté una càrrega microbiana molt elevada i també es troba modulats pels exsudats de les plantes que hi creixen (Gramss, G., 2010). Al ser un entorn tant complex, i donada la gran diversitat pel que fa a les seves característiques físico-químiques, proporció de matèria orgànica, textura, tipus i quantitat de biomassa microbiana autòctona, el comportament d'espècies diferents o d'un mateix fong en sòls diferents és molt variable (Baldrian, P., 2008).

### **REQUERIMENT D'UNA FONT DE C I N**

La manca d'una font de carboni i nitrogen assequibles solen ser el primer factor limitant a l'hora d'aconseguir introduir un fong de caire ligninolític al sòl. Fins i tot en aquells sòls prou rics en C i N (principalment fixats en forma de substàncies húmiques), sol ser necessària una font externa de nutrients per al seu desenvolupament (Boyle, C. D., 1995). Aquesta generalment ve proporcionada pels fragments de restes vegetals presents al terreny i/o pel propi inòcul, i en aquest darrer cas, la mida del mateix condiciona en bona part el grau d'extensió del miceli i la seva supervivència (Zakaria, A. J. i Boddy, L., 2002).

En condicions naturals, els fongs sapròfits de podriment blanc i / o bru poden envair una part del sòl circumdant a la fusta que descomponen (p. ex., un tonc o la soca d'un arbre), i extreure'n nutrients, principalment minerals. Aquest miceli que envaeix el sòl circumdant sovint degenera amb el temps encara que es mantingui la viabilitat del miceli dins la fusta, i en tot cas no hi pot sobreviure si es retira la fusta que actua de suport nutricional (Gramss, G., Voigt, K. D. et al., 1999; Gramss, G., 2010). La dificultat a l'hora

d'inocular el fong esdevé doncs, doble: a més d'aconseguir que el miceli es desenvolupi en el sòl, cal garantir que aquest s'hi podrà establir i perviure-hi.

Aquesta font de C i N també es pot incorporar en forma d'esmenes al sòl. En condicions estèrils, s'han emprat amb èxit tota mena de subproductes agrícoles, com poden ser espigots de blat de moro, palla de cereal i farratgeres, estella de fusta i molts d'altres (Morgan, P., Lee, S. A. et al., 1993). De fet, el desenvolupament d'aquests grups de fongs en el sòl consisteix en la cerca de focus de nutrients (restes vegetals colonitzables) i la creació d'una xarxa miceliana que els connecta i permet la translocació de nutrients (Fricker, M. D., Bebbler, D. et al., 2008; Heaton, L., Obara, B. et al., 2012). Els fongs que formen cordons micelians o bé rizomorfs presenten un clar avantatge vers la resta, donat que els permet un transport ràpid de nutrients i d'aigua a llarga distància (Boddy, L., Hynes, J. et al., 2009). Per altra banda, qualsevol font de nutrients amb una proporció volum/superfície molt alta (palla, serradures, estella ...) és molt més susceptible a ser contaminats per la flora autòctona del sòl, i no necessàriament afavorirà el creixement del basidiomicet en condicions reals (Vajna, B., Nagy, A. et al., 2010, Gramss, G., 2010).

#### **FACTORS FÍSICO-QUÍMICS I MICROBIOLÒGICS. FUNGISTASI.**

Si disposen d'una font adequada de C i N, la majoria de fongs ligninolítics tenen capacitat per a colonitzar la majoria de sòls en condicions estèrils. En aquest cas, els factors limitants per al desenvolupament micelià (i l'eficiència a l'hora de degradar possibles contaminants, en el cas d'estudis de bioremediació) són principalment fisicoquímics, com la temperatura, el pH, i la seva textura i composició de sorres i argiles (Okeke, B. C., Smith, J. E. et al., 1996; Tucker, B., Radtke, C. et al., 1995).

La principal dificultat a l'hora de dur a la pràctica la inoculació de fongs a camp apareix a l'hora de treballar amb sòls no esterilitzats. La majoria d'estudis per a la colonització de sòls no estèrils en laboratori necessiten emprar quantitats massives de substrat per a aconseguir resultats. Els treballs amb un cert èxit solen emprar entre el 10 i el 60% p/p d'inòcul, i tot i així no totes les espècies aconsegueixen colonitzar-lo (Lang, E., Eller, G. et al., 1997, Boyle, C. D., Wiesner, C. et al., 1998). Afegir un antifúngic selectiu com benomil al sòl pot millorar significativament la colonització (Boyle, C. D., 1995). Els treballs realitzats a camp també empren quantitats similars d'inòcul (vora el 5-10% en pes sec), i sovint també afegint fusta no colonitzada com a esmena (2-5%) (Morgan, P., Lee, S. A. et al., 1993, Davis, M. W., Glaser, J. A. et al., 1993, Lamar, R. T., Evans, J. W. et al., 1993; Lamar, R. T., Davis, M. W. et al., 1994).

Aquestes quantitats d'inòcul són econòmicament poc viables si es pretén aplicar aquest procediment a escala real. Per aquesta raó força estudis avaluen la possibilitat d'aplicar en bioremediacions el substrat esgotat procedent del cultiu de bolets comestibles (Purnomo, A. S., Mori, T. et al., 2010, Ayotamuno, J. M., Okparanma, R. N. et al., 2010), disponible en grans quantitats i a baix cost.

A aquest fet cal afegir la capacitat supressora que mostren molts sòls vers al desenvolupament de mols basidiomicets sapròfits. A tall d'exemple, en un intent d'introduir 15 espècies de *Agaricus*, *Coprinus*, *Lepista*, *Macrolepiota*, *Marasmius* i *Stropharia* en sòls diferents, només 2 de 17 menes de sòls varen permetre el desenvolupament micelià de basidiomicets, independentment del seu pH o C orgànic, essent el més favorable un sòl extret de les rodalies d'un erol de *Lepista nuda* (Gramss, G., 1981). Aquesta capacitat supressora del creixement micelià i/o la germinació de propàguls de fongs, generalment es denomina fungistasi o biostasi d'un sòl (Dobbs, C. G. i Hinson, W. H., 1953, Watson, A. G. i Ford, E. J., 1972), i tant pot ser de tipus generalista com afectar només a determinats organismes. Tot i que aquest fenomen ha estat amplament estudiat al llarg de les darreres dècades - principalment en la recerca de sòls supressors de patògens vegetals -, els mecanismes que el regulen no resten del tot esclarits.

En el cas de basidiomicets ligninolítics que habiten en fusta s'ha comprovat que la capacitat de colonitzar sòl no estèril varia molt segons l'espècie de basidiomicet que es tracti. En el cas de fongs degradadors de fusta s'ha comprovat que determinades espècies (p. ex. *Pleurotus spp.*, *Phanaerochaete spp.*, *Trametes versicolor*) són més competitives que d'altres (p. ex. *Ganoderma sp.* o *Dichomitus squalens*) a l'hora de fer-ho; tot i això, fins i tot aquest grup d'espècies més competitives no sempre aconseguen colonitzar el sòl (Lang, E., Kleeberg, I. et al., 1997, Steffen, K. T., Schubert, S. et al., 2007, Andersson, B. E., Welinder, L. et al., 2000, Baldrian, P., 2008). En alguns casos, els fongs que no són capaços de penetrar en el sòl formen com a protecció una barrera miceliana en la frontera del substrat amb el sòl (Steffen, K. T., Schubert, S. et al., 2007), i menys sovint els competidors del sòl envaeixen l'inòcul de forma immediata, desplaçant el basidiomicet (Martens, R. i Zadrazil, F., 1998).

Pel que fa a basidiomicets amb activitat ligninolítica que habiten prats, fullaraca i restes vegetals en descomposició, també trobem diferències de comportament segons l'espècie. En un estudi de creixement amb 24 espècies de basidiomicets ligninolítics (Gramss, G. i Bergmann, H., 2007) en 12 sòls originaris de prats, cultius o boscos, només 4 espècies (*A. aestivalis*, *A. macrocarpus*, *M. procera* i *S. rugosoannulata*) van créixer normalment en tots els sòls. En l'altre extrem, bona part dels fongs associats a la formació d'erols en prats (*A. arvensis*, *A. fissuratus*, *A. langei*, *A. lanipes*, *A. pilatianus*, i *M. oreades*), i els dos representants del grup *Lyophyllum* (*L. decastes*, *L. loricatum*) que descomponen restes de fusta soterrades, només van oferir creixement al esterilitzar el sòl. La resta d'espècies estudiades (diversos membres dels gèneres *Agaricus*, *Agrocybe*, *Clitocybe*, *Coprinus*, *Lepista*, *Macrolepiota* i *Stropharia*) o bé presenten creixement retardat en tots els sòls estudiats o bé presenten diferències de comportament segons el sòl emprat, creixent bé en uns i de forma retardada o nul·la en d'altres. En termes generals, el creixement (quan n'hi ha) es correspon de forma positiva amb la concentració de  $C_{total}$ , Ca, K i Mg, però en canvi el fenomen de supressió no presenta cap relació aparent amb la composició del sòl ( $C_{org}$ , N, P, K, Ca i Mg). La fungistasi dels sòls es suavitzava al pasteuritzar i desapareix al esterilitzar el sòl, excepte en el cas d'un grup d'espècies sensibles a sòls àcids (pH 4-5,4), que empitjoren al esterilitzar, fet que es resol al neutralitzar el sòl amb  $CaCO_3$ .

prèviament a l'esterilització. També és interessant observar que la pervivència del miceli en sòls no estèrils és limitada (en la majoria de sòls entre 3 i 35 setmanes), mentre que s'incrementa a més de 200 setmanes al esterilitzar-los.

Els processos implicats en el fenomen de fungistasi per part de sòls depenen de molts factors i encara no resten clars avui dia, tot i que sí és clar que la flora microbiològica hi juga un paper clau (Garbeva, P., Hol, W. H. G. et al., 2011), fet que explica bona part dels resultats de Gramss, G. i Bergmann, H., 2007, abans esmentats. En la majoria d'estudis l'esterilització del sol fa desaparèixer el fenomen de fungistasi, però no sempre. L'addició dels nutrients adequats també pot fer desaparèixer el fenomen de supressió. En l'estudi de De Boer, W., Verheggen, P. et al., 2003, la modificació de la composició de la comunitat microbiana mitjançant esterilització parcial (un cop la biomassa i la taxa de respiració del sòl s'han recuperat) o l'aplicació de nutrients en el sòl resulta en molts casos en la reducció o desaparició de la fungistasi sobre diversos deuteromicets. En treballs posteriors el mateix autor va demostrar que la coexistència de microorganismes que separadament no resulten antagonistes per a un fong (en el cas d'estudi, *Rhizoctonia solani*) poden causar supressió, possiblement a causa dels metabòlits secundaris que alliberen al coexistir i interactuar en el mateix entorn (De Boer, W., Wagenaar, A. M. et al., 2007, Garbeva, P. i De Boer, W., 2009). Posant el cas d'un basidiomicet ligninolític, la fungistasi observada en *Phanaerochaete* spp., es deu en bona part a la presència de diversos microorganismes que n'inhibeixen el creixement amb l'alliberació de compostos aromàtics, antibiòtics (sovint per part de representants del grup *Pseudomonas fluorescens*) o per micofàgia; el grau d'aquest antagonisme pot ser variable segons el pH i la disponibilitat de macronutrients com C i N (Tucker, B., Radtke, C. et al., 1995; De Boer, W., Folman, L. B. et al., 2005; Radtke, C., Cook, W. S. et al., 1994).

Arrel dels resultats obtingut en aquests i d'altres treballs, avui dia es considera que la fungistasi en sòls és causada per la competència per les fonts de nutrients fàcilment assequibles entre el fong i la flora microbiana autòctona, i en major grau per la producció d'agents inhibidors (compostos volàtils, antibiòtics, fungistàtics, etc), ja sigui fruit de les interaccions pròpies de la flora microbiana existent o com a resposta d'aquesta a la presència del fong (Garbeva, P., Hol, W. H. G. et al., 2011). Els factors fisicoquímics del sòl i la presència d'organismes antagonistes específics també intervenen en el procés.

La interacció amb microorganismes existents en el sòl no ha de ser necessàriament perniciosa per al desenvolupament del basidiomicet; es coneixen casos de sinèrgia entre el basidiomicet i microorganismes (*helper bacteria*) que faciliten a fongs micorízics la infecció i micorizació de la planta hoste i n'estimulen el creixement (Miransari, M., 2011). Les interaccions d'aquesta mena en el sòl es troben poc documentades per a fongs saprotròfics; tot i això, es coneix que determinats bacteris (*Pseudomonas* grup *fluorescens*) aïllats a partir de mostres de sòl poden estimular el creixement micelià i la formació de primordis en cultius industrials de *P. eryngii* i altres bolets (Dong, X., Zhou, W. et al., 2010), fet que fa pensar que determinat tipus de flora bacteriana pot afavorir el creixement de *P. eryngii* en el sòl.

## EFECTES DEL DESENVOLUPAMENT DE BASIDIOMICETS LIGNINOLÍTICS EN EL SÒL

Els fongs ligninolítics també poden modular la composició microbiològica del sòl. El desenvolupament en el sòl de *Pleurotus ostreatus* i d'altres fongs ligninolítics sovint ve acompanyat d'una davallada en la biomassa bacteriana - en alguns casos de diversos ordres de magnitud (Lang, E., Eller, G. et al., 1997; Andersson, B. E., Welinder, L. et al., 2000; Andersson, B. E., Lundstedt, S. et al., 2003) - i de la composició d'aquesta, promovent la presència de determinats microorganismes (Tornberg, K., Baath, E. et al., 2003; Snajdr, J. i Baldrian, P., 2006). Aquest fenomen és molt variable segons la mena de sòl i la composició bacteriana que l'acompanya i sovint depèn de l'addició d'esmenes lignocel·lulòsiques (Snajdr, J. i Baldrian, P., 2006).

També hi ha troballes en el sentit oposat; el creixement de *P. pulmonarius* en sòls no desinfectats, origina un increment en la diversitat i la biomassa bacteriana adjacent (Federici, E., Leonardi, V. et al., 2007). Un fet similar ocorre amb diversos fongs descomposadors de virosta que habitualment creixen al sòl com *Hypholoma fasciculare* o *Stropharia rugoso-annulata*, que afavoreixen l'increment de biomassa bacteriana (Gramss, G., Voigt, K. D. et al., 2005; Tornberg, K., Baath, E. et al., 2003) i modulen d'aquesta manera la composició bacteriana en el sòl al seu favor, alhora que redueixen per competència la flora bacteriana present en la fracció lignocel·lulòsica que colonitzen (Folman, L. B., Klein Gunnewiek, P. J. A. et al., 2008).

## MECANISMES ENZIMÀTICS IMPLICATS EN LA COLONITZACIÓ DE SÒLS: ROL DEL SISTEMA LIGNINOLÍTIC

Els mecanismes bioquímics que determinen la capacitat de colonització de sòl per part de fongs ligninolítics encara són desconeguts avui dia. Per una banda, la capacitat enzimàtica per a degradar lignina i cel·lulosa resultaran clau per a poder obtenir la font de nutrients necessària per al creixement micelià. La colonització del sòl per part de fongs ligninolítics ve acompanyada d'un increment en la producció del seu ventall d'enzims ligninolítics, principalment lacases i hemo-peroxidases (Mn-peroxidases), però també aril-alcohol oxidases (Lang, E., Nerud, F. et al., 1998; D'Annibale, A., Ricci, M. et al., 2005; Snajdr, J. i Baldrian, P., 2006). La descomposició de les restes vegetals en el sòl augmenta amb la concentració de Mn (Berg, B., Steffen, K. T. et al., 2007), generalment imprescindible per al funcionament de les Mn-peroxidases. Les hemo-peroxidases descrites per a *P. eryngii*, no són estrictament dependents del ió Mn, però aquest segueix essent un component clau en el procés de degradació de lignina i un dels diversos reguladors a nivell transcripcional, com també ho són el Fe<sup>2+</sup> i probablement els ions Cu<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup>.

Es considera que l'increment d'activitat de les lacases és una resposta habitual de fongs ligninolítics a factors d'estrès, com podria ser la presència d'organismes competidors del sòl. És conegut que l'activitat de les lacases donen lloc de forma indirecta a compostos antibacterians (Baldrian, P., 2006), tot i que no s'ha pogut establir una relació directa d'aquesta activitat enzimàtica amb la davallada en la biomassa bacteriana provocada per

*P. ostreatus* al colonitzar el sòl (Baldrian, P., 2004). Les lacases també interaccionen de forma complexa amb les substàncies húmiques, (Zavarzina, A. G., Leontievsky, A. A. et al., 2004), - el seu rol en aquest sentit no resta del tot esclarit -, poden tenir un efecte detoxificador de compostos antifúngics, degradar compostos vegetals que actuïn com a fitoalexines (Baldrian, P., 2006), i participen en altres processos, com per exemple en l'adhesió cel·lular de les hifes al formar cordons micelians (Burke, R. M. i Cairney, J. W. G., 2002). A pH bàsics - com el dels sòls on habitualment creix *P. eryngii* -, l'activitat i l'estabilitat de les lacases disminueixen notablement (Muñoz, C., Guillen, F. et al., 1997a). L'esmena excessiva amb una font de nitrogen també pot resultar contraproduent per a l'activitat de les lacases i peroxidases en sòls, fet que ve acompanyat d'una davallada de la biomassa fúngica en favor de la bacteriana (Gallo, M., Amonette, R. et al., 2004).

El paper d'altres grups enzimàtics en el cas de basidiomicets és molt menys conegut. Tot i que la cel·lulosa i les hemicel·luloses són els principals recursos energètics per al creixement de fongs ligninolítics, el cas de les cel·lulases roman molt poc estudiat. S'ha comprovat però que l'activitat dels enzims cel·lulolítics al sòl queda molt restringida dins del compartiment lignocel·lulósic (Baldrian, P., Wiesche, C. et al., 2000), i és regulada per l'assequibilitat del propi substrat (Baldrian, P., 2008). Altres mecanismes dels fongs ligninolítics per a competir amb la flora bacteriana autòctona en el sòl podrien ser la producció de radicals hidroxil (com els produïts per les aril-alcohol oxidases que formen part del mateix sistema ligninolític), o d'altres metabòlits secundaris que actuïn d'antibiòtic.

#### **MICROORGANISMES ANTAGONISTES: TRICHODERMA SP.**

Diversos estudis mostren que determinats organismes poden actuar com a supressors específics (antagonistes) per a un o diversos patògens vegetals. Entre d'altres, s'ha confirmat aquest antagonisme vers a fongs patògens com *Rhizoctonia* o *Fusarium* en representants dels gèneres *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Serratia*, *Streptomyces*, i els deuteromicets *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Sporidesmium*, i *Fusarium* no patògens (Berg, G., Roskot, N. et al., 2002, Cotxarrera, L., Trias-Gay, M. I. et al., 2002, Garbeva, P., van Veen, J. A. et al., 2004, Rothrock, C. S. i Gottlieb, D., 1984).

Existeix molta menys bibliografia que descriu antagonistes per a basidiomicets en sòls, donat que aquests generalment no suposen un problema econòmic en cultius vegetals. Com ja hem vist, diversos representants del gènere *Trichoderma*, com *T. harzianum* o *T. viride* poden causar estralls en cultius industrials de bolets, ja que actua com a competidor i com a patògen gràcies a la seva habilitat de degradar la paret cel·lular del basidiomicet. En aquest sentit s'ha comprovat que representants del gènere *Trichoderma* poden actuar com a supressors de *Armillaria spp.* en el seu entorn natural, i que l'addició d'esmenes (polpa de cafè) al terreny millora l'efecte de biosupressió (Otieno, W., Jeger, M. et al., 2003). *P. eryngii* tampoc no n'és una excepció, i rarament arriba a tolerar un cultiu enfrontat amb aquests deuteromicets, registrant-se un fort increment de les lacases (250% vers *T. harzianum*, Baldrian, P., 2004). El gènere

*Trichoderma* és ubicu en sòls i climes de tota mena, molt especialment en sòls de boscos i prats, a on poden constituir fins al 3% i 1,5% dels propàguls fúngics que hi són presents, respectivament (Danielson, R. M. i Davey, C., 1973; Brewer, D., Calder, F. W. et al., 1971, Klein, D. i Eveleigh, D. E., 1998), pel que els seus representants són un bon candidat a actuar com fong antagonista vers el desenvolupament de *P. eryngii* en el seu hàbitat natural.

Les característiques físico-químiques o microbiològiques del sòl podrien jugar un rol important en aquesta possible interacció. Per exemple, el creixement de *Trichoderma harzianum* en dunes de costa correlaciona inversament amb el pH del sòl (De Boer, W., Klein Gunnewiek, P. J. A. et al., 1998). Per altra banda, s'ha aïllat soques bacterianes en l'escorça de l'arrel de *Ferula communis* que inhibeixen el creixement micelià de soques agressives de *Trichoderma viride* però no de *P. eryngii*, *P. eryngii* var *ferulae* o *P. nebrodensis* (Castelnuovo, G. i Granetti, B., 1996).

#### **PAPER DELS MICROINVERTEBRATS.**

Els invertebrats presents en el sòl també poden jugar un paper important en el desenvolupament micelià en el sòl. Multitud d'invertebrats (àcars, col·lèmbols i nematodes, entre d'altres) poden alimentar-se del miceli dels basidiomicets que creix a partir de l'inòcul o de la font lignocel·lulòsica, retardant o fins i tot impedit-ne l'emergència, i accelerant-ne la degradació (Crowther, T. W., Jones, T. H. et al., 2011a). Les hifes disperses són més sensibles que els cordons micelians (Harold, S., Tordoff, G. M. et al., 2005). Alguns d'aquests invertebrats (col·lèmbols) poden afectar el desenvolupament micelià de basidiomicets no només per micofàgia, sinó també per secreció de compostos antifúngics (A'bear, A. D., Boddy, L. et al., 2010). Aquesta interacció també pot condicionar l'expressió enzimàtica del basidiomicet (Crowther, T. W., Jones, T. H. et al., 2011b).

La interacció amb invertebrats no ha de ser necessàriament perniciosa per al fong; l'estudi de Crowther, T. W., Boddy, L. et al., 2011 mostra com mentre uns grups d'invertebrats (generalment els de mida més gran) afecten negativament el creixement micelià, d'altres grups de meso- i microinvertebrats poden estimular-ne el creixement. Per altra banda, s'han descrit en *P. eryngii* estructures compatibles amb trampes per a nematodes (Venturella, G., Zervakis, G. et al., 2000, Krisai-Greilhuber, I. i Voglmayr, H., 1995) com les que es troben en *P. ostreatus*; malgrat la presència d'aquestes trampes, determinades espècies de nematodes encara podrien alimentar-se del basidiomicet, com ha estat provat en el cas de *P. ostreatus* (Okada, H., Harada, H. et al., 2005).



## INTERACCIÓ AMB VEGETALS

Les rels de les plantes vives exsuden un ample ventall de compostos, com sucres, àcids orgànics, aminoàcids, amides, compostos fenòlics, enzims, proteïnes, esterols, sideròfors, purines, vitamines, hormones i biosurfactants (Faure, D., Vereecke, D. et al., 2009, Read, D. B., Bengough, A. G. et al., 2003). Aquests compostos regulen el creixement de la planta, modulen i seleccionen el creixement de la microbiota adjacent, promouen la formació de micorizes i actuen com a defensa de la planta, entre d'altres. Poden romandre en el mucíl·lag de l'arrel, o bé difondre en el medi, donat que una part molt important d'aquests són compostos solubles en aigua i/o volàtils.

Mitjançant aquests exsudats, les plantes presents al sòl poden condicionar la capacitat supressora d'un sòl. Com a exemple, en un estudi de Gramss, G., 1981 la presència de determinades lleguminoses i gramínies afavoreix el creixement micelià de basidiomicets descomposadors de matèria orgànica (*Agaricus*, *Coprinus*, *Macrolepiota*, *Lepista* sp.) en sòls, mentre que inhibien altres fongs degradadors de fusta, com *Agrocybe* i *Stropharia*. Aquests efectes poden variar amb l'edat i l'estat fisiològic de la planta; en el mateix estudi, la capacitat supressora disminuïa després de la floració i fructificació de les plantes. Aquest efecte d'activació i/o supressió del creixement s'ha pogut observar en altres estudis, amb resultats variables (activació/supressió/indiferència) segons la combinació de tipus de sòl, plantes o gespes incorporades al sistema i el basidiomicet estudiats; en alguns casos (*Agaricus macrocarpus*, *Clitocybe* sp.) s'ha observat un increment en el creixement micelià però una forta inhibició de la formació de primordis per part dels exsudats de la rel (Gramss, G., 2010).

Els exsudats de plantes també poden induir reaccions en basidiomicets colonitzadors de sòls. Els exsudats radiculars de *Medicago sativa* indueixen la producció de lacases de diversos fongs colonitzadors de restes vegetals en el sòl (*A. arvensis*, *A. porphyrizon*, *Lepista nebularis*, *S. rugosoannulata* i *H fasciculare*), però no de *A. bisporus* ni dels dos micorízics inclosos a l'estudi (*Hebeloma crustuliniforme* i *Suillus granulatus*) (Gramss, G. i Bergmann, H., 2008; Gramss, G. i Mascher, R., 2011).

### **Mecanismes implicats en el parasitisme de plantes.**

A banda del rol fonamental dels enzims lítics que participen en la degradació de la paret cel·lular vegetal, - principalment ligninases, cel·lulases, hemicel·lulases i pectinases - (Aro, N., Pakula, T. et al., 2005), els basidiomicets també poden expressar altres components fitotòxics que participen directa o indirectament en el procés d'infecció.

En destaquen les hidrofobines, proteïnes de vora 100 aminoàcids exclusivament produïdes per fongs, que confereixen repel·lència a l'aigua a les estructures fúngiques i al medi circumdant, i permeten, entre d'altres, l'adhesió de les hifes a les estructures hidrofòbiques vegetals, o evitar el reconeixement per part de l'hoste com a agent patògen

(Bayry, J., Aïmanianda, V. et al., 2012). Aquestes substàncies poden ser fitotòxiques, i alhora poden elicitar respostes d'estrès en les plantes (Wösten, H. A. B., 2001).

Un altre mecanisme característic d'alguns fongs és la producció d'àcid cianhídric (cianogènesi) que té un efecte antibiòtic i fitotòxic. La producció d'àcid cianhídric mata o debilita prou les plantes circumdants per a poder colonitzar-ne les arrels, i és el principal responsable del cremat en erols com el de *Marasmius oreades* (Knowles, C. J., 1976; Knowles, C. J., 1988); Blenis, P. V., Chow, P. S. et al., 2004; Gramss, G. i Mascher, R., 2011).

Finalment, l'excreció d'agents quelants (principalment sideròfors i àcids orgànics) també pot jugar un paper important en el procés. Els basidiomicets com *Marasmius oreades* solubilitzen els elements minerals del sòl al desenvolupar-s'hi, però poden impedir que aquestes restin assequibles a la planta i a altres microorganismes competidors, probablement gràcies a aquests agents quelants (Gramss, G., Voigt, K. D. et al., 2005). En el cas de basidiomicets, el paper dels sideròfors encara roman molt poc estudiat; tot i això, s'ha comprovat en d'altres fongs fitopatògens (*Alternaria*, *Fusarium*...) que els sideròfors extracel·lulars poden desenvolupar papers importants en les interaccions hoste-patògen, i fins i tot condicionar la virulència del patògen (Johnson, L., 2008).

En el cas de *P. eryngii*, a data d'avui encara es desconeix quins són els mecanismes clau que li permeten parasitar les rels dels seus hostes naturals, i encara més quines raons fan que sigui de forma tant específica en aquest grup d'umbel·líferes i no d'altres hostes. Generalitzant, molts vegetals basen el seu mecanisme de defensa en el reconeixement de molècules associades a patògens (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) mitjançant receptors específics (*PAMP Recognition receptors*, PRRs) que desencadenen mecanismes de defensa d'ampli espectre (*PAMP-triggered immunity*, PTI). La quitina, i diverses proteïnes riques en cisteïna són PAMPs reconeguts en nombrosos casos de patògens vegetals d'interès agronòmic. Al llarg de les darreres dècades s'ha demostrat que per superar aquesta barrera de defensa, el patògen pot produir proteïnes efectores (*effector proteins*) que inhibeixen de forma més o menys específica aquestes respostes de defensa (PTI), i li permeten al patògen afectar la planta (Stergiopoulos, I. i De Wit, P. J. G. M., 2009). Al seu torn, les plantes han arribat a desenvolupar altres receptors (proteïnes R) que desencadenen reaccions d'immunitat (*effector-triggered immunity*, ETI) i de hipersensibilitat (*hyperensitive response*, HR) vers aquell patògen (De Wit, P. J. G. M., Mehrabi, R. et al., 2009). La coevolució d'hoste i patògen fa que ambdues parts desenvolupin successivament estratègies de defensa i atac que condueixen a una especialització del patògen vers determinat(s) hostes. Hipotetitzant, és probable que en el cas de la gírgola de panical es basi en estratègies similars; per exemple, el peculiar mecanisme ligninolític propi de *P. eryngii* (amb peroxidases Mn independents i lacases estables a pH elevats i molt diferents a les d'espècies properes com *P. ostreatus* i *P. pulmonarius*, Muñoz, C., Guillen, F. et al., 1997b; Ruiz-Dueñas, F. J., Martínez, M. J. et al., 1999) podrien formar part d'aquests mecanismes específics.

## **Antecedents en la inoculació de *P. eryngii* al sòl**

Tant sols coneixem dos antecedents pel que fa a la inoculació de *Pleurotus eryngii* a camp amb l'objectiu de cultivar-lo, ambdós amb resultats poc reeixits. L'estudi pioner en aquest sentit és el de Costantin, J., 1926, que va realitzar diversos intents d'inoculació del bolet a camp, amb un molt baix índex d'èxit en la infecció. També va realitzar inoculacions en plàntules d'*Eryngium campestre* i *E. maritimum* en condicions de laboratori, amb un major índex d'èxit (10%), sense aconseguir fructificacions. En base a aquests resultats, l'autor hipotetitzava un possible antagonisme entre el paràsit i les micorizes de la planta. Malauradament no hem pogut tenir accés al text complert d'aquest treball, i desconeixem la metodologia emprada en els seus experiments. El sistema d'inoculació emprat per Constantin molt probablement sigui similar al emprat per Cailleux, R., Cerceau-Larrival, M. Th. et al., 1983, que dipositen un bloc de substrat de cultiu amb base de palla colonitzat per *P. eryngii* directament a tocar del coll de la rel, per a provocar la infecció de la planta, també amb èxits molt discrets.

Malauradament no disposem d'antecedents més recents al respecte. Els estudis realitzats amb *P. eryngii* per a bioremediació de sòls s'han limitat a l'avaluació de la capacitat ligninàsica del bolet per a degradar compostos tòxics i recalitrants, sempre in vitro (Rodríguez, E., Nüero, O. et al., 2004, Cohen, R., Persky, L. et al., 2002).

D'altres treballs sobre el cultiu de la gírgola de card "a camp" poden donar lloc a confusió, donat que en realitat tracten una modalitat de cultiu en la que es soterra parcialment grans quantitats de substrat industrial de cultiu i es recobreix amb una capa de cobertura de terra per reduir la deshidratació i modular la fructificació (Ferri, F., 1977).

## **Sistemes d'inoculació de fongs filamentosos**

A continuació presentem una revisió de les principals formulacions descrites a la bibliografia per a la inoculació de fongs filamentosos.

### **INOCULACIÓ MITJANÇANT ESPORES**

La formulació més bàsica per a inocular fongs en un medi és l'ús d'espores o estructures de resistència. Aquesta estratègia és la més emprada a l'hora d'introduir fongs productors de conidis, donat que se'n poden obtenir grans quantitats en cultius, i es conserven amb facilitat per liofilització.

Per tal de facilitar l'aplicació, és habitual que les espores s'immobilitzin dins d'una matriu, o sobre algun suport físic (Bennett, J. W. et al, 2001). Connick, W. J., Boyette, C. D. et al., 1991 va desenvolupar una tècnica basada en l'extrusió i deshidratació d'un cultiu sobre el qual s'ha fet créixer prèviament l'organisme a inocular. Aquest inòcul consisteix

en l'englobament de propàguls en una matriu de gluten de blat i caolí, que s'extrusiona, deshidrata i fragmenta, emulant el procés de fer pasta italiana (d'aquí el seu nom, "pesta"). El gluten de blat, a més d'actuar de matriu, també fa la funció de nutrient, afavorint el desenvolupament de l'agent de biocontrol. A aquesta formulació es poden afegir adjuvants per a augmentar la viabilitat de l'inòcul en el temps. L'èxit d'aquesta mena de formulacions rau en que permet l'administració de quantitats de propàguls prou grans respecte als organismes competidors com per a que el microorganisme pugui proliferar, i i ha estat emprada com a tècnica d'aplicació en diversos treballs, principalment en control biològic (Shabana, Y. M. et al., 2003). Aquest sistema d'inòcul es troba limitat a l'ús d'espores o de conidis, donat que es tracta d'un suport deshidratat dispersable en aigua, i per tant no permet la supervivència del miceli durant l'elaboració.

La inoculació mitjançant espores també és habitual en el cas de basidiomicets micorízics, que es solen inocular directament sobre l'arrel nua de la planta simbiot amb suspensions esporals o per espolvorejat, tot i que no sol ser el procediment amb millors resultats (Benucci, G. M. N., Gógán Csorbai, A. et al., 2012). Molts fongs micorízics presenten fenòmens d'autoinhibició en la germinació esporal (Fries, N., 1978) que desapareixen emprant una dilució esporal suficient, en les proximitats de determinats microorganismes, o en presència d'agents adsorbents com el carbó actiu (Fries, N., 1966).

Tot i això, en el cas de fongs no productors de conidis l'ús d'espores com a inòcul presenta un seguit d'inconvenients a tenir en compte. En primer lloc, l'obtenció neta de grans quantitats d'espores (sense restes de l'himeni) a partir de carpòfors amb làmines o porus és força més difícil que en el cas de fongs productors de conidis. En segon lloc, es perd el control sobre les característiques i productivitat de la soca en cultiu, al no emprar directament un miceli secundari seleccionat. En tercer lloc, la viabilitat esporal (sobretot en presència d'humitat o en una suspensió líquida i a temperatura ambient) davalla ràpidament en el temps. Finalment, la taxa de creixement i la competitivitat per un substrat per part d'un miceli primari és molt més reduïda. Per aquests motius, aquest procediment no s'empra per a la inoculació de bolets sapròfits en els cultius industrials, i només uns pocs treballs (p.ex. Morgan, P., Lee, S. A. et al., 1993) l'empren en aplicacions directes a camp.

### **SUSPENSIONS MICELIANES (CULTIUS LÍQUIDS)**

Les suspensions micelians (generalment procedents d'un cultiu líquid) s'empren com a sistema d'inòcul principalment en fermentadors i ocasionalment, en cultiu industrial de bolets, donat que facilita l'automatització. També és un sistema habitual per a micorizar de plantes amb basidiomicets, aplicant la suspensió miceliana sobre les arrels (Díaz, G., Carrillo, C. et al., 2009). Aquest sistema rarament s'empra en inoculacions de fongs sapròtrofs sobre entorns no estèrils, donat que la viabilitat del miceli és reduïda, i és força més sensible a contaminacions que en la resta de procediments.

## SUBSTRATS SÒLIDS CONVENCIONALS

El procediment clàssic per a la inoculació de basidiomicets consisteix en fer créixer el fong sobre un substrat lignocel·lulòsic fàcilment dispersable que actuï com a suport i alhora com a font de nutrients per al seu creixement. En el cas del cultiu industrial de bolets aquest suport sol ser gra de cereal (sovint sègol o mill), serradures o tascons de fusta (aquests últims especialment en el cas del cultiu sobre troncs). Aquest suport, prèviament esmenat i hidratat, normalment és esterilitzat. Donat que el substrat sol ser molt ric en nutrients per tal d'optimitzar la capacitat d'emergència del miceli, l'esterilitat del substrat emprat com a inòcul és un punt crític del procés, ja que esdevé més sensible a contaminacions exteriors. En el cas del cultiu sobre troncs sencers de fusta (p. ex. de xiitake, *Lentinula edodes*), generalment més exposat, es recomana l'ús de tascons o de didals de serradures de fusta compactades com a suport, per ser menys ric en nutrients i per tant, menys sensible a contaminacions respecte el gra de cereal (Oei, P., 1996).

Degut a aquesta sensibilitat a les contaminacions, aquests tipus d'inòculs han estat dissenyats i són més eficaços a l'hora d'inocular basidiomicets en substrats compostats, pasteuritzats o estèrils. Tot i això, també són els que s'han emprat de forma majoritària en treballs d'inoculació de basidiomicets en el sòl, tant a nivell de laboratori com en aplicacions a camp, generalment emprant gra de cereal, estella de fusta, palla o altres subproductes agrícoles com a suport. Com hem vist, les aplicacions en sòls no estèrils per aquests sistemes donen lloc a resultats molt heterogenis en funció de la mena de sòl i les espècies que s'hi introdueixen, i en la majoria d'ocasions els treballs amb millors resultats treballen amb quantitats enormes d'inòcul en proporció al volum de substrat inoculat.

A coneixement de l'autor, la única variant específicament dissenyada per a la inoculació de basidiomicets en sòls - i per extensió en altres entorns no estèrils - és el desenvolupat per Lestan, D. i Lamar, R. T., 1996 per al seu ús en bioremediació de sòls, que també ha donat lloc a una patent (Lamar, R. T. et al., 2000, Patent US/6143549). Aquest sistema es basa en la producció de pèl·lets de fusta (grànuls comprimits a pressions elevades, a partir de serradures de fusta seques i un adjuvant que les adhereix entre sí, sovint emprats com a combustible de biomassa), que posteriorment són recoberts amb una pel·lícula d'alginat que conté espores o miceli de l'organisme a inocular. Aquests pèl·lets es deixen incubar fins a que el miceli en colonitza totalment la superfície, i en aquest punt, s'empenen en la inoculació. El grau de colonització i el perfil d'humitat que s'obté en l'interior del grànul són els principals paràmetres crítics per a l'èxit d'aquesta tècnica (Lestan, D. i Lamar, R. T., 1999). La principal avantatge d'aquest procediment respecte els inòculs sòlids convencionals rau en que es promou la formació d'una capa densa de miceli a la part exterior del pèl·let, que dificulta l'accés d'organismes competidors als nutrients de l'interior. Els autors empenen amb èxit una dosi d'inòcul del 3% ps/ps (elevada, però molt inferior respecte la bibliografia precedent), en sòls no estèrils i en condicions de laboratori, per a *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus* i *Berkjandera adusta*.

## ENCAPSULACIÓ EN HIDROGELS

Les tècniques d'immobilització o encapsulació<sup>9</sup> en hidrogels consisteixen en l'englobament d'una substància, organisme o objecte dins d'una matriu de polímer gelificat, amb la finalitat d'immobilitzar-lo, facilitar la seva administració o millorar-ne el seu funcionament. Aquestes tècniques s'empren en aplicacions molt diverses, com l'administració de fàrmacs (Tahtat, D., Mahlous, M. et al., 2013), per a reduir el rebuig i administrar cèl·lules en trasplantaments (Mazumder, M. A. J., Burke, N. A. D. et al., 2009), per a immobilitzar organismes o enzims en reactors (Wang, F., Guo, C. et al., 2013, Sanlier, S. H., Gider, S. et al., 2013), per a produir llavors artificials (Standardi, A. i Micheli, M., 2013) o per a inocular microorganismes (Bextine, B. R. i Thorvilson, H. G., 2002), entre molts d'altres.

La matriu sol ser un polímer orgànic inert gelificat, sovint agar, carragenat, gelatina, i més freqüentment alginat. En resulten perles esfèriques toves de mida variable segons la tècnica emprada (des de 50 µm a uns pocs mm de diàmetre) i amb un elevat contingut d'aigua. En el cas de preparació de sistemes d'inoculació, el polímer d'elecció sol ser l'alginat, ja que és inert, estable, esterilitzable - tant abans com després de la polimerització -, no és degradat per l'activitat enzimàtica del fong, i es pot industrialitzar a gran escala.

En el cas de l'alginat, les perles s'obtenen típicament per degoteig d'una solució d'alginat sòdic en una solució aquosa "donadora" d'ió calci, generalment CaCl<sub>2</sub>. La reacció dona lloc a clorur sòdic i alginat càlcic, que polimeritza i gelifica ràpidament, de manera que conserva la forma de la gota d'alginat, gairebé esfèrica. Per a obtenir perles de mida molt petita (microencapsulació, <500µm de diàmetre, generalment només apta per immobilitzar conidis o espores), cal emprar sistemes més complexos (Winder, R. S., Wheeler, J. J. et al., 2003). Les perles resultants immobilitzen l'organisme viu que s'hagi incorporat en suspensió en l'alginat sòdic, i el protegeixen de l'exterior, alhora que permeten que el miceli emergeixi. Les perles d'alginat contenen una gran proporció d'aigua que pot actuar de reservori, i s'hi poden incorporar additius (tant solubles com sòlids, en forma de suspensió) que millorin el rendiment del procés (p. ex., afegint nutrients, antibiòtics...).

Les característiques de resistència mecànica de la perla, i la permeabilitat del polímer per a la difusió de compostos solubles també es poden modular variant la composició i la llargada de les cadenes de glucurònic de l'alginat emprat (Martinsen, A., Skjak-Braek, G. et al., 1989), afegint partícules inerts que actuïn de farciment (anglès: "*fillers*"), o mitjançant l'ús de sals donadores d'ions divalents alternatius al Ca<sup>2+</sup> a l'hora de gelificar la perla, com poden ser BaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub> o MnCl<sub>2</sub>.

---

<sup>9</sup> El terme més habitual emprat en anglès és *encapsulation*.

L'encapsulació d'espores o propàguls en hidrogels s'ha emprat principalment en la inoculació de deuteromicets, en la majoria de casos per al biocontrol d'insectes i patògens vegetals (Bextine, B. R. i Thorvilson, H. G., 2002), en micoherbicides (Winder, R. S., Wheeler, J. J. et al., 2003) i en bioremediació de sòls (Loomis, A. K., Childress, A. M. et al., 1997). En el cas del cultiu de bolets comestibles existeixen uns pocs antecedents en l'ús d'aquestes tècniques per a la inoculació del bolet (Romaine, C. P. i Schlagnhauser, B., 1992), i per a l'administració de suplementos nutritius d'alliberació lenta (Romaine, C. P. and Marlowe, A., 1994, Patent 5291685). Tot i això, l'aplicació d'aquesta mena de tècniques en el cultiu de bolets sapròfits es troba poc explorada, probablement pel seu cost elevat en comparació amb el gra de cereal convencional. En canvi, l'ús de perles d'alginat és més freqüent en la bibliografia existent a l'hora d'inocular fongs micorízics (Da Silva Rodrigues, L., Kasuva, M. C. M. et al., 1999; Vassilev, N., Vassileva, M. et al., 2001).

La inclusió del fong en les perles es pot fer per englobament de miceli fragmentat en condicions estèrils o fent créixer el miceli sobre perles estèrils que continguin els nutrients necessaris. Tot i que la fragmentació mecànica del miceli prèvia a la seva encapsulació pot repercutir en la viabilitat i capacitat de desenvolupament del miceli, aquest efecte no ha de ser necessàriament significatiu, i pot variar en funció de l'edat del cultiu i l'espècie estudiada (Lestan, D., Lestan, M. et al., 1998).

## **Recobriments per a inòculs**

En el present estudi hem tingut en compte la possibilitat d'aplicar recobriments sobre la matriu de l'inòcul (ja sigui sobre una llavor colonitzada, una perla d'alginat, etc.) amb la finalitat de protegir-lo i/o poder-hi incorporar esmenes. Aquesta opció ha estat poc o gens explorada fins ara en la bibliografia al nostre abast. En aquest estudi explorem dues menes de recobriment diferents.

### **PEL·LETITZAT DE LLAVORS AMB MATRIU SÒLIDA**

El pel·letitzat de llavors és una tècnica habitualment emprada en llavors de plantes, que consisteix en recobrir la llavor amb una matriu densa. Aquest recobriment permet regular-ne la hidratació, induir una pre-germinació (*seed priming*), facilitar-ne la sembra amb maquinària (fet especialment necessari en el cas de llavors molt lleugeres, irregulars o de mida molt petita), protegir-la de condicions adverses, i incorporar-hi esmenes com nutrients, fungicides, pesticides, rodenticides i microorganismes beneficiosos com micorrizògens, o antagonistes de patògens vegetals (Taylor, A., Klein, D. E. et al., 1998; Halmer, P., 2008; Farooq, M., Wahid, A. et al., 2012).

Generalitzant, el procediment consisteix en adherir progressivament una pols inert (generalment argiles, feldespat, sílica, talc micronitzat, bentonita, caolí o estearats, entre d'altres) barrejada amb els additius abans esmentats sobre la superfície de la llavor, arrebossant-la. En acabat, la llavor en queda totalment recoberta, i d'aquesta manera

guanya resistència mecànica, pes, volum, i se n'arrodoneix la forma. Aquest procés es realitza en tambors industrials (semblants a una formigonera), en els que s'afegeix progressivament el recobriment en forma de pols, conjuntament amb les esmenes d'interès i un agent adherent en forma líquida, (p. ex., carboximetilcel·lulosa, polietilenglicol, midó, goma argàbiga etc.). El moviment rotatiu del tambor, conjuntament amb l'assecat amb aire a pressió i/o temperatura fa que les argiles s'adhereixin a les llavors, creant un recobriment uniforme de fins a un o dos mil·límetres de gruix. El resultat és un recobriment porós però resistent, que en condicions d'humitat s'hidrata i s'estova de forma controlada (p. ex., mantenint la forma, desengrunar-se per complet, o bé fracturar-se pel mig, exposant la llavor a l'exterior). Les dues empreses consultades (Germaines-GTG i Technoseeds, S.L.) mantenen els components emprats i els seus procediments com a *know-how* intern de l'empresa.

En el nostre cas, creiem interessant explorar la possibilitat d'aplicar aquestes tècniques al recobriment de llavors colonitzades per *P. eryngii*. D'aquesta manera, s'obtidria un recobriment permeable a l'aigua i als gasos, que actuaria de protecció, permetria afegir esmenes, i facilitaria la seva manipulació en el moment de la sembra, alhora que es tracta d'un procediment industrializable. Al nostre coneixement, fins ara aquesta mena de procediments no han estat considerats per a la inoculació de basidiomicets.

### **RECOBRIMENTS PLÀSTICS**

Per altra banda, tampoc coneixem que s'hagi avaluat l'aplicació d'un recobriment plàstic de caire hidrofòbic en la superfície d'un inòcul fúngic dissenyat per a ser sembrat a camp. Al nostre entendre, una pel·lícula fina d'un component plàstic i/o hidrofòbic en la superfície de l'inòcul actuaria de barrera contra contaminacions externes. Al ser hidrofòbic, l'inòcul ric en nutrients esdevindria poc assequible per als organismes externs, alhora que es reduiria l'alliberació de metabòlits i nutrients des de l'inòcul cap al medi. A més, actuaria de barrera contra la deshidratació de l'inòcul. En tot cas, aquest recobriment hauria de ser prou prim com per a permetre l'emergència del miceli de *P. eryngii* cap a l'exterior, i hauria de ser com a mínim parcialment permeable als gasos.

Existeixen nombrosos productes (compostos inorgànics, ceres, greixos, resines, silicones, acrilats i molts d'altres polímers plàstics), que podrien resultar adients per aquesta finalitat. Malauradament un estudi en profunditat de tots ells resta fora del nostre abast. Alguns d'aquests productes s'empren habitualment per al recobriment de llavors naturals i llavors artificials encapsulades, com el cas de resines d'etilè vinil acetat (Elvax®) barrejat amb ceres (Redembaugh, M. K. and Reyes, Zoila, 1987, Patent US4715143). Aquests productes presenten l'inconvenient d'haver d'aplicar-los a partir d'una dissolució en dissolvents orgànics apolars (hexà, tetràhèdric, etc.), i en calent, que en el nostre cas probablement resultarien excessivament tòxics per al fong. Entre tots ells, les silicones i els productes acrílics semblen els millors candidats, ja que no calen dissolvents tant tòxics per a la seva aplicació. Les silicones s'empren habitualment com a recobriment en llavors, plàntules, teixits meristemàtics i embrions vegetals per a conferir-



los protecció alhora que segueixen sent força permeables al vapor d'aigua i l'oxigen (Ryan, J. W. and Juen, D. R., 1988, Patent US4753035).

### **Requisits per a un sistema d'inoculació de *P. eryngii* a camp**

Malauradament, gairebé no disposem d'informació pel que fa al desenvolupament del miceli de *P. eryngii* en el seu entorn natural, i per tant ens hem de remetre al coneixement derivat del cultiu industrial de fongs sobre substrats lignocel·lulòsics.

A nivell estrictament teòric, un sistema idoni per a la inoculació de *P. eryngii* a camp ha de tenir una mida i quantitat de nutrients suficients per a que el miceli creixi fins la rel del card panical o bé rels i altres restes de matèria orgànica que li actuïn de pont. En el sistema de cultiu proposat la inoculació dirigida (en contacte directe amb la rel de la planta hoste) seria econòmicament poc rendible, de manera que convé triar un sistema d'inoculació que permeti al miceli desenvolupar-se una certa distància a través del sòl.

En segon lloc, una unitat individual de l'inòcul ha de tenir capacitat de generar prou miceli per colonitzar o atravesar el sòl i infectar la/es plantes adjacents, de forma que no sigui necessari aplicar quantitats massives d'inòcul al terreny.

En tercer lloc, aquest inòcul ha de tenir una certa capacitat de resistència a ser colonitzat per competidors i/o antagonistes presents al sòl. Els sistemes estàndard d'inoculació sobre gra de cereal semblarien *a priori* molt més susceptibles a la contaminació per fongs i bacteris presents en el sòl, tant per l'elevada quantitat de nutrients fàcilment assequibles com per la seva permeabilitat a l'aigua, que facilitaria l'entrada de bacteris i llevats arrossegats per capil·laritat fins l'interior de l'inòcul (tot i com es veurà més endavant, no necessàriament ha de ser així). L'ús d'un suport menys ric en nutrients fàcilment assimilables com la fusta, o d'un procediment d'encapsulació o de recobriment que protegeixi parcialment el miceli semblen doncs tècniques més favorables. Aquestes tècniques a més, permeten incorporar esmenes interessants a l'inòcul (bé sigui en forma de nutrients, antibiòtics, o fins i tot microorganismes cooperants).

En quart lloc, l'inòcul aplicat a camp podrà estar sotmès a condicions adverses pel que fa a la humitat i temperatura. Per aquesta raó, l'ús de tècniques d'encapsulació amb hidrogels i de recobriments hidrofòbics també podrien resultar interessants a l'hora de reduir la deshidratació de l'inòcul i perllongar-ne la viabilitat en condicions hostils.

Finalment, aquest inòcul ha de poder-se preparar de forma industrialitzada, en quantitats prou importants com per inocular conreus sencers amb uns costos raonables. A més, l'inòcul hauria de poder-se conservar durant un període suficient de temps que en permeti l'aplicació, i tenir un format prou resistent com per poder-se aplicar al terreny amb maquinària agrícola, com per exemple, una sembradora.

---

## 6.2.- Materials i mètodes

### Anàlisi de minerals en sòls on creix *P. eryngii*.

S'ha analitzat el pH, i el contingut en C (total i orgànic), N (total i descarbonatat), K, Ca, Fe, S, Mg, P, Zn, Mn i Cu de 18 mostres de terra recollides vora troballes de *P. eryngii* i *P. nebrodensis* en diferents localitats de la Península, Illes Balears i Sicília.

Les mostres recollides en erms i cultius abandonats, vora *P. eryngii* var *eryngii* es corresponen als següents registres (vegis capítol 3-Material biològic, per a les dades complertes): UBCC-0981 (Palencia, t.m. Tariego; Tariego, Mesón del Cerrato, 750 m, erm), UBCC-0955 (Tarragona, t.m. Alió, erm), UBCC- 0860 (Mallorca, t.m. Escorca; Bassa de Cúber, erm), UBCC – 0957 (Soria, t.m. Burgo de Osma, conreu en desús), UBCC – 978 (Sòria, t.m. Soto de Cerrato; Soto de Cerrato, erm), UBCC-954 (Soria, t.m. Pozalmuro, Puerto del Madero, erm), UBCC 0985 (Valladolid, t.m. Castronuevo de Esgueva; El Páramo, erm), UBCC-1222 (Castelló, t.m. Pina de Montalgrao; Pina de Montalgrao, conreus en desús); UBCC-0014 (Lleida, t.m. Alfés; Timoneda d'Alfés, erms vora el marge del canal d'Urgell) i UBCC-1325 (Lleida, t.m. Alfés; Timoneda d'Alfés, rodalies del "Reial Aeroclub de Lleida", erm). També s'ha analitzat una mostra corresponent a una recol·lecció sobre *Eryngium maritimum* en dunes de platja, corresponent a la mostra UBCC-0985 (Mallorca, t.m. Campos; Es trenc, dunes arran de mar).

Pel que fa a *P. nebrodensis*, S' ha analitzat mostres de sòl de les recol·leccions sicilianes sobre *Cachrys ferulacea* corresponents als registres UBCC 1334 i 1335 (Sicília, Palermo; Parco delle Madonie, al peu del Pizzo Cervi, en prat de muntanya) i UBCC-1340 i 1341 (Sicília, Palermo; Parco delle Madonie, pujada cap el Pizzo Carbonara).

També s'ha analitzat una mostra de sòl corresponent al registre UBCC-1273, de color blanc i identificat com a cf. *P. eryngii* var. *ferulae* (Naut Aran, t.m. Baguerque, sobre hoste desconegut).

Les mostres es corresponen a l'horitzó superior del sòl (0-20 cm de profunditat), un cop se n'ha descartat tota la capa de material vegetal i la major part de rels. La mostra s'ha conservat deshidratada a temperatura ambient fins al moment de la seva anàlisi, previ sedassat (<2mmØ) i molturat.

La mesura de C i N s'ha realitzat mitjançant anàlisi elemental per combustió en un analitzador elemental EA-1108 C.E. Instruments (Thermo Fisher Scientific), en les condicions de treball estàndard recomanades pel fabricant de l'instrument. S'ha utilitzat V<sub>2</sub>O<sub>5</sub> com a additiu per facilitar la combustió, i atropina com a patró. Per a la mesura de C i N orgànics s'ha analitzat una rèplica de la mostra prèvia descarbonatació, segons ISO 10694:1995). Breument, s'ha pesat 0,5g de cada mostra amb una balança de precisió i s'ha descarbonatat amb 1,5ml HCl 4M (4h). Passat aquest temps s'ha assecat la mostra a 60°C

durant 16h i s'ha pesat de nou, previ a la mesura del %C total en l'analitzador, tal i com s'ha descrit. El %C orgànic es calcula com a % C x (pes de mostra final / pes de mostra inicial).

La resta d'elements s'han mesurat mitjançant espectrometria òptica de plasma induït per alta freqüència (ICP-OES) a partir d'una digestió total i d'un extracte de la fracció de bescanvi catiònic. Per a la digestió total, s'han tractat 0,5mg de cada mostra amb 2 ml d'HNO<sub>3</sub> concentrat durant 3 h a temperatura ambient. Acabat aquest temps, s'han atacat de nou en un digestor, amb 1ml d'HClO<sub>4</sub> concentrat a 150°C durant 2,5h. El líquid sobrenedant s'ha transferit i enrasat a un matràs aforat de 25 ml per a la seva anàlisi.

Per a l'anàlisi de la capacitat de bescanvi catiònic, s'ha emprat el mètode de Mehlich, A., 1938, modificat segons Lax, A., Roig, A. et al., 1986. Breument, s'incuben 2,5g de mostra de terra en 25 ml BaCl 0,2 N i trietilamina (TEA) 0,1 N durant 4h a temperatura ambient. La mostra, centrifugada i decantada es renta un cop amb 25 ml BaCl 0,1 N (30 min), i 2 cops mes (30 min) amb 20 ml d'aigua desionitzada. Tots quatre sobrenedants s'acumulen i enrasen a 100 ml, per la seva anàlisi mitjançant ICP.

Les mesures dels atacs totals en HNO<sub>3</sub> i HClO<sub>4</sub> s'han realitzat amb un espectròmetre d'emissió òptica Perkin Elmer, model Optima 3200RL. Les mostres procedents de l'extracció amb BaCl<sub>2</sub> s'han mesurat amb un espectròmetre d'emissió òptica Thermo Jarrell Ash model ICAP 61E. En tots dos casos, els aparells es van calibrar amb blanc i 4 solucions patró preparades en l'interval de concentració de les mostres. Les solucions patró s'han preparat per dilució a partir de solucions patró comercials de 1g/l (High Purity Standards). Els patrons es varen preparar en medi HNO<sub>3</sub> 1% + HClO<sub>4</sub> 1% o en BaCl<sub>2</sub> 0,075N, respectivament. En el cas de les digestions totals, les solucions d'atac varen ser mesurades en dilució 1/10. Les longituds d'ona (en nm) mesurades per a cada element són: K 766.490, Ca 317.933, Fe 259.939, S 181.975, Mg 279.077, P 178.221, Zn 213.857, Mn 257.610 i Cu 324.752.

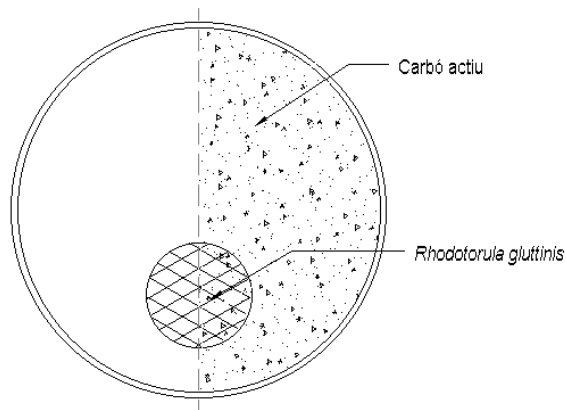
### **Estudi de fenòmens d'autoinhibició esporal en *P. eryngii*.**

Per a comprovar l'absència de fenòmens d'autoinhibició esporal, s'ha realitzat el test de Fries (Fries, N., 1978) a partir d'espores de *P. eryngii*.

Per a l'obtenció d'espores s'ha cultivat i fructificat la soca en laboratori. El substrat emprat (serradures de faig, segó de blat (10% PS), 65% H<sub>2</sub>O) ha estat esterilitzat en bosses de 3Kg esterilitzables amb filtre tipus Tyvek per a l'intercanvi de gasos a 121°C 1h, i inoculat a partir d'un cultiu pur de la soca UBCC-0125 sobre medi F20TA (20g Fructosa – tartrat agar, vegis capítol 4 per a la formulació). L'incubació (temperatura ambient) i fructificació (18°C, 70-90%HR) s'han realitzat en una càmera amb temperatura i humitat controlades. Les espores s'han obtingut a partir de carpòfors madurs en cambra humida (12h), assecades a temperatura ambient i conservades a 4°C durant 3 setmanes, fins al moment de l'assaig.

El test de Fries s'ha realitzat en còpsules de Petri de 9cm de diàmetre amb medi agar aigua (12 g agar/l). S'hi ha dispersat uniformement 1 ml d'una suspensió d'espores de *P. eryngii* en aigua estèril (ajustada a  $10^6$  i  $10^7$  espores / ml, mitjançant recompte en càmera de Neubauer i dilució). A continuació s'ha espolvorejat lleument la meitat de la superfície de l'agar amb carbó actiu estèril (121°C, 20 minuts) i s'ha sembrat una soca de *Rhodotorula glutinis* (CECT - Colección Española de Cultivos Tipo, ref. CECT-10143) en la frontera del carbó actiu, entre els quadrants inferiors de la càpsula (fig. 1).

Als 2 dies s'ha recomptat la proporció d'espores germinades amb l'ajut d'un microscopi òptic en cinc rèpliques (camps de visió equivalents a una àrea de 1,327 mm<sup>2</sup>) escollits a l'atzar. El recompte s'ha realitzat a partir de les imatges preses amb l'ajut d'una càmera digital (Nikon Coolpix) acoblada a l'ocular. S'ha realitzat un recompte dins de cada quadrant de la càpsula, dins i fora de les zones d'influència del carbó actiu, dels marges de la colònia de *Rhodotorula* i les seves corresponents combinacions.



**Fig.6.1:** Esquema de la distribució dels tractaments en el test de Fries.

### **Efecte del carbó actiu en la interacció *P. eryngii* vers *Trichoderma harzianum*.**

S'ha realitzat un assaig de creixement per a *P. eryngii* (UBCC-0125) i una soca de *Trichoderma harzianum* aïllada a partir d'una contaminació en un cultiu industrial de Xitake (*Lentinula edodes*). L'assaig s'ha realitzar en dos medis de cultiu, l'un ric en nutrients (F20TA) i l'altre sense fonts hidrocarbonades (F0TA idèntica formulació sense glucosa ni fructosa), ajustat a pH 7,5 amb KOH i repartit en còpsules de Petri de 9 cm de diàmetre a raó de 12 ml per càpsula. A cada medi s'ha espolvorejat carbó actiu (activat i esterilitzat a 121°C 30 min) només en una meitat de la càpsula. Cada tractament ha estat inoculat separatament amb *Pleurotus eryngii* (UBCC-0125) o amb *Trichoderma harzianum*. L'inoculació s'ha realitzat a la banda sense carbó actiu, a 1 cm del centre de la càpsula, a partir de discs d'agar (5mm Ø) extrets del marge d'una colònia en F20TA. En el cas de

*Trichoderma* els discs s'han esbaldit breument dins d'un vial amb aigua destil·lada estèril, per a evitar dispersió d'espores en el medi de cultiu. A cada combinació de tractaments (4 rèpliques) s'ha mesurat el radi en direcció al carbó actiu i el seu radi oposat (el carbó actiu és opac i no permet aplicar tècniques d'anàlisi d'imatge). Donada la gran diferència en la taxa de creixement, les mesures s'han realitzat als 7 dies per a *T. harzianum* i als 14 dies per a *P. eryngii*.

Paral·lelament s'ha realitzat un altre assaig on s'ha inoculat tots dos organismes a la vegada a banda i banda de la càpsula de Petri. En aquest cas, el carbó actiu s'ha disposat en una franja de 2 cm a mode de barrera entre les dues colònies. L'inoculació amb *P. eryngii* s'ha realitzat 7 dies abans per a tal de permetre un creixement inicial, donat que possiblement el ràpid creixement de *Trichoderma* no hauria permès observar el desenvolupament de *Pleurotus*.

### **Disseny de sistemes d'inoculació per a *P. eryngii***

En el present estudi hem dissenyat diversos sistemes d'inoculació per a *P. eryngii*, amb l'objectiu d'explorar quins sistemes d'inoculació poden ser els més idonis per a aplicar directament a camp. S'han produït a escala de laboratori diversos sistemes, principalment basats en suspensions líquides de miceli, emprant substrats sòlids com a suport (tant fusta com llavors), o immobilitzats en hidrogels.

Entre aquests, s'ha realitzat una primera tria dels procediments més factibles. Aquells sistemes que es contaminen amb facilitat, amb una preparació complexa o difícilment industrialitzable, o que donen lloc a un suport poc consistent i per tant difícil d'aplicar a camp amb un utilatge agrícola han estat descartats en primera instància. En tots els casos s'ha realitzat proves preliminars inoculant sòls naturalment productors de *P. eryngii* disposat en càpsules de Petri, o bé, si així s'indica, sobre fragments d'*Eryngium campestre* adults arrelats en test. Aquells que han donat lloc a un creixement prou vigorós en aquestes proves preliminars han estat escollits per als assaigs posteriors sobre sòl.

En tots els casos la soca emprada ha estat la soca de *P. eryngii* var. *eryngii* UBCC-0125 (Sòria, Ucero). Si no s'esmenta el contrari, totes les formulacions s'han inoculat a partir de cultius en medi F20TA (mateixa formulació base per al medi FTA – vegis capítol 4 – amb 20g/L de Fructosa, 2g/l de glucosa, i 15g/l d'agar), traslladant de forma asèptica diversos fragments d'agar del marge d'una colònia de més de 14 dies en una cambra de flux.

En el cas d'inoculació a partir de medis líquids, s'ha obtingut una suspensió miceliana de *Pleurotus eryngii* UBCC-0125 a partir d'un cultiu líquid en 250 ml de medi F20TL, (mateixa formulació per al F20TA, sense agar), en agitació orbital dins de flascons Pyrex de 500 ml. L'inoculació d'aquest es realitza transferint-hi de forma asèptica 3 fragments d'agar (0,5x0,5 cm) d'un cultiu en F20TA. El cultiu ha crescut durant 21 a 30 dies en un agitador orbital, a 300 rpm i temperatura ambient.

Esmentem a continuació els procediments emprats per a produir aquests inòculs.

#### **INÒCULS PER SUSPENSÍO LÍQUIDA DE MICELI**

S'ha decantat en condicions estèrils la suspensió de miceli obtinguda en un cultiu líquid en F20TL, s'ha esbaldit i decantat de nou amb 25 ml d'aigua destil·lada estèril i s'ha resuspès en 0,5 litres d'alginat sòdic 2,5g/l estèril (121°C, 20 min). La suspensió resultant s'ha homogeneïtzat per agitació i administrat immediatament sobre el coll i l'arrel i de 10 plantes *Eryngium campestre* adultes arrelades, desenterrant-ne la part superior, amb una xeringa de 50 ml. L'alginat sòdic reacciona ràpidament a alginat càlcic amb el sòl calcari, gelificant al voltant de l'arrel, que es torna a cobrir amb terra.

#### **INOCULACÍO MITJANÇANT SUBSTRATS SÒLIDS: FUSTA**

S'ha esterilitzat (115°C, 20 min) depressors linguals de fusta de pollancre de 1x15 cm, sencers i tallats en fragments de 3 cm, prèviament amarats en medi F2TL (formulació FxTA, 2g de fructosa/ litre) per immersió durant 1 hora. Un cop refredats s'han inoculat de forma asèptica. la incubació es realitza a 25°C fins a la completa colonització dels depressors, sacsejant el contenidor cada 7 dies per a evitar que s'adhereixin entre ells. Un cop colonitzats, s'han inoculat plantes adultes d'*E. campestre* arrelades en test (10 rèpliques). Els depressors grans s'han clavats directament al terra a 1 cm de distància de l'arrel. Els fragments petits s'han inoculat inserint-los en un tall practicat a l'arrel nua, a uns 2 cm de profunditat.

#### **INOCULACÍO MITJANÇANT SUBSTRATS SÒLIDS: LLAVORS**

S'ha preparat inòculs a partir de llavors de sègol (*Secale cereale* (L.) M. Bieb.) colza (*Brassica napus* L.) i veves (*Vicia sativa* L.). S'ha esbaldit per duplicat 250 g de llavors sanes en aigua i s'han bullit de 2 a 5 minuts en aigua desionitzada. Transcorreguts aquest temps el recipient de cocció s'ha deixat refredar tapat i a temperatura ambient, de forma que les llavors s'hidratin lentament entre 8 i 12 hores. Les llavors escorregudes s'esmenen amb 1% CaCO<sub>3</sub> i 1% guix i s'esterilitzen en autoclau (121 °C, 1 h) en envasos de 500 g . Els continguts d'aigua finals han estat de 46% per a les veves, 45% per a la colza i 56% per al sègol. Un cop refredades de nou, les llavors s'han inoculat amb *P. eryngii* i s'han incubat a temperatura ambient durant 30 dies, moment en que queden colonitzades.

#### **INOCULACÍO MITJANÇANT HIDROGELS:**

##### *Encapsulació de pèl·lets micelians:*

Els pèl·lets resultants d'un cultiu en medi líquid s'han decantat i resuspès de forma asèptica en na solució estèril d'alginat 7,5 g/l (121 °C, 20 min.). L'encapsulat s'ha realitzat fent degotar la suspensió de miceli en una dissolució de CaCl<sub>2</sub> 22,2 g/l estèril. Les perles

d'alginat resultant s'han mantingut 20 minuts en clorur càlcic i esbaldit dues vegades (5 minuts) en aigua desionitzada estèril.

#### *Encapsulació de medi F20TL.*

S'ha preparat una solució d'alginat sòdic 7,5g/l en medi de cultiu líquid F20TL. S'han format perles a partir d'aquesta solució per degoteig en CaCl<sub>2</sub> 22,2 g/l. Després de 20 minuts en CaCl<sub>2</sub>, s'han esbaldit en aigua destil·lada (2 minuts), escorregut i esterilitzat en autoclau (121°C, 20 min). Després de decantar el lixivat de sinèresi que es forma al esterilitzar les perles, aquestes s'han inoculat amb *P. eryngii* i incubat a temperatura ambient fins a total colonització, sacsejant l'inòcul periòdicament per a evitar l'adhesió de les perles.

#### *Encapsulació en hidrogels: serradures i segó.*

S'han preparat perles d'alginat a partir d'una suspensió de 100 g de serradures de faig molturades i sedassades a menys de 150 µm de diàmetre, 16,6 g de segó (també < 150 µm), i 15 g d'alginat sòdic en 1 litre d'aigua. L'immobilització es realitza per degoteig en CaCl<sub>2</sub> 22,2 g/l Donada l'alta viscositat de la suspensió cal emprar un capçal relativament ample (vora 3-4 mm de diàmetre). Després de 20 minuts en CaCl<sub>2</sub>, s'han esbaldit les perles en aigua desionitzada per a eliminar restes de clorur (3 rentats de 10 minuts) i un cop escorregudes, s'han esterilitzat en autoclau (115°C, 20 min.). Un cop decantat el lixivat de sinèresi, s'han inoculat a partir d'un cultiu en F20TA i incubat a temperatura ambient fins a total colonització.

*Variant amb glicerina:* S'ha preparat també una variant del inòcul anterior, afegint glicerina al 10% a la suspensió de serradures i segó en alginat sòdic.

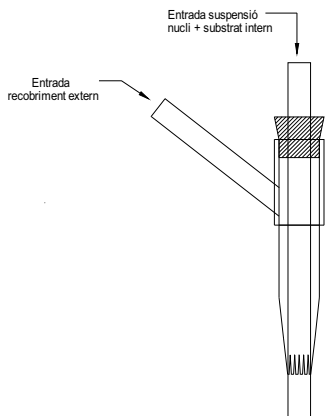
*Variant amb perles poroses:* S'ha preparat una variant de les perles amb serradures i segó modificat amb el procediment de Choi, B. Y., Park, H. J. et al., 2002, per a obtenir perles amb nombroses bombolles buides al seu interior. El procediment ha estat el mateix que l'anteriorment descrit, però amb 20 g/l d'alginat sòdic i 10g/l NaHCO<sub>3</sub>, a més del segó i serradures. El degoteig s'ha realitzat en una solució de CaCl<sub>2</sub> 20g/l i 100 ml/l d'àcid acètic glacial. Les perles generades reaccionen amb l'acètic donant lloc a bombolles de CO<sub>2</sub> que queden retingudes per l'alginat, i per tant suren. Transcorreguts 20 minuts es realitzen tres rentats en aigua desionitzada a 1, 10 i 30 minuts, comprovant que el darrer esbaldit tingui un pH estable proper a pH 7. Les perles obtingudes s'han esterilitzat i inoculat com hem descrit anteriorment.

#### *Encapsulació en hidrogels: llavors*

S'ha preparat una suspensió de llavors de colza (*Brassica oleracea*) a raó de 60,6 g/l en una dissolució d'alginat sòdic 30g/L, glucosa 30 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,726 g/L i 5,45g/l de farina de ploma (200µm diàmetre) en suspensió. Les llavors han estat prèviament esbaldides en

aigua desionitzada. A banda s'ha preparat una dissolució d'alginat sòdic 12g/l i cantaxantina (colorant vermell) 0,5 g/L. L'immobilització s'ha realitzat per coacervació mitjançant un capçal expressament dissenyat (fig. 2) de manera que un cop esterilitzades, les perles resultants estiguin formades per dues capes concèntriques. El nucli de la perla, de 2-3mm Ø, conté la suspensió de llavors i la capa exterior, d'uns 0,5 mm de gruix, només està composta d'alginat i colorant (el colorant serveix per a controlar millor el procés). L'entrada del recobriment extern es realitza mitjançant una bomba peristàltica. L'entrada de la suspensió de llavors es realitza per gravetat.

Les perles s'han preparat per degoteig sobre una dissolució de  $\text{CaCl}_2$  22,2 g/L (20 minuts) i tres rentats (10 minuts) en aigua desionitzada. Les perles s'han esterilitzat (120 °C, 20 minuts) i s'han inoculat amb *P. eryngii*.



**Fig.6.2:** Esquema del capçal emprat per a l'encapsulació de dues solucions d'alginat per coacervació. Bàsicament consta de dos tubs concèntrics per on circulen les dues solucions. El tub exterior s'estreny en el seu extrem fins a tocar les parets del tub interior i acaba en forma de punta, de manera que el recobriment extern en surt pels forats recobrint de forma homogènia el tub interior. És necessari poder regular de forma acurada el flux de les dues solucions i també la distància que sobresurt el tub interior. Tot l'aparell es pot construir de forma econòmica amb material habitual de laboratori (tubs de plàstic i silicona, punta de pipeta i tap de silicona). Si la solució interna conté llavors o qualsevol altre objecte sòlid, el diàmetre del tub interior ha de ser igual o superior a 2,5-3 vegades el diàmetre d'aquest.



## **Recobriments:**

### **PEL·LETITZAT DE LLAVORS COLONITZADES**

Per a valorar la possibilitat d'aplicar les tècniques de pel·letitzat sobre llavors colonitzades, s'ha preparat llavors de colza colonitzades amb *P. eryngii* segons el procediment ja esmentat. Aquestes s'han pel·letitzat amb dos recobriments amb matriu sòlida comercials ("Europill" i "Tomato") per una empresa especialitzada en el pretractament de llavors (Technoseeds S.L.), fins a quadruplicar i duplicar respectivament el pes final de cada llavor, i sense afegir additius al recobriment. En el cas del tractament Europill -el recobriment "tomato" ha estat finalment descartat en base als resultats- una submostra ha estat recoberta amb un film plàstic no determinat ("Color sintètic") que *a priori* hauria de reduir la deshidratació de la perla i impedir-ne una hidratació sobtada.

Donat que la composició exacta dels recobriments aplicats per l'empresa ens és desconeguda, s'ha avaluat *in vitro* si el recobriment pot donar lloc a algun efecte d'inhibició del creixement i/o actuar com a substrat de *P. eryngii*. S'ha preparat medi M5TA (mateixa formulació per al medi F20TA, amb 5 g maltosa/l per comptes de fructosa) i medi agar aigua (AA, agar 20 g/l) als quals s'hi ha afegit 5 g/l del recobriment extret a partir dels inòculs pel·letitzats (Europill, amb i sense recobriment). Els dos medis s'han esterilitzat (120°C, 20 min.), solidificat en càpsules de Petri i sembrat amb discs d'agar (4 mm Ø) amb *P. eryngii* UBCC-0125, a partir d'un cultiu en F20TA. Donat que el recobriment enterboleix el medi, només se n'ha pogut avaluar el creixement per extensió del miceli (àrea).

Per a avaluar la capacitat de produir miceli de *P. eryngii* a partir de les llavors colonitzades i pel·letitzades, s'ha disposat llavors amb recobriment Europill, Europill + coating, i control (sense recobriment) en medi AA i en càpsules de Petri amb una mostra de sòl d'una localitat productora de *P. eryngii* (Alfés, Lleida, Timoneda d'Alfés), prèviament assecada, i rehidratada (10% H<sub>2</sub>O final, p/p). A més de llavors recobertes, s'ha sembrat llavors tractades a les que s'ha retirat el recobriment, i llavors sense tractar, com a control. S'ha realitzat 6 rèpliques de cada combinació de tractaments, sembrant 10 llavors a cada rèplica. Als 7 i 14 dies s'ha comptabilitzat el nombre de llavors que donen lloc a un miceli de *P. eryngii* prou vigorós com per sobrepassar les possibles contaminacions presents en la superfície. S'ha descartat l'ús de tècnica d'anàlisi d'imatge per a avaluar la producció de biomassa dels inòculs, donat que els recobriments aplicats sobre les llavors no són estèrils i a excepció dels controls, no donen lloc a colònies pures.

### **RECOBRIMENT PLÀSTIC**

Per al recobriment de llavors colonitzades amb una pel·lícula plàstica s'ha emprat pintura acrílica base (Recobriment A: Acrylic Medium Mate, Vallejo, dissolt a 8:1 acrilat:aigua per a reduir la viscositat) a raó de 35 ml / 100 g de llavors, o bé un producte

acrílic per a ús sanitari en aerosol (Recobriments B: Nobecutan®, Inibsa), a raó de 30 pulsacions de 1 s / 100 g de llavors. No ha estat possible recobrir amb aquests productes els prototips d'inòcul amb base d'hidrogels, ja que no s'adhereixen correctament en la seva superfície.

Els productes s'han aplicat per pulverització sobre les llavors, mentre són sacsejades en un cossi semiesfèric (25cmØ) adaptat en un agitador vòrtex a 1400 rpm. L'aplicació s'ha realitzat amb pulveritzacions curtes i separades en el temps, projectant aire estèril amb una bomba d'aquari per a accelerar-ne l'assecat.

S'ha avaluat la corba de deshidratació de les llavors de colza recobertes amb l'acrilat A en diferents condicions d'humitat relativa disposant solucions sobresaturades en recipients hermètics (43%, 33% i 8% HR amb KNO<sub>2</sub>, CaCl i KOH respectivament, O'Brien, M. A., 1948, Greenspan, L., 1977). S'ha mesurat durant 18 dies l'evolució del pes de 3 rèpliques de 10 g de llavors (amb i sense recobriments) disposades en càpsules de Petri (45mmØ) destapades. S'ha sembrat una darrera mostra dels mateixos lots en medi M5TA amb 0,2g/l cloramfenicol, 0,1g/l tetraciclina i 2,5 mg/l benomil i en F20TA sense antibiòtics ni antifúngics (10 rèpliques de cada) per a observar si el recobriment impedeix la capacitat d'emergència de miceli de *P. eryngii*.

## **Comportament dels inòculs seleccionats en sòl**

En aquest disseny experimental s'ha avaluat el comportament de diferents inòculs seleccionats com a millors candidats per a inocular *P. eryngii* en sòls no estèrils. El disseny experimental inclou 7 inòculs emprant llavors com a base: veves (amb recobriment acrílic A, B o sense recobriment), llavor de colza (amb recobriment acrílic A, B o sense recobriment), i llavor de sègol (sense recobriment, com a control). També s'ha incorporat un vuitè tipus d'inòcul, aquest encapsulat en alginat amb serradures i segó, per ser el que millors resultats ha donat entre els dissenys amb base d'hidrogel.

Tots els inòculs s'han preparat segons el procediment abans esmentat i s'han esterilitzat en ampolles estàndard per al cultiu de bolets, de 0,75 litres i amb un tap especial amb filtre d'escuma per a permetre l'intercanvi de gasos. Tots els tractaments s'han inoculat simultàniament amb el mateix cultiu de *P. eryngii* UBCC-0125 crescut en medi F20TA, i incubats durant el mateix període de temps, fins que tots els inòculs han estat completament recoberts pel miceli (4 setmanes). Els recobriments plàstics s'han aplicat sobre les llavors ja colonitzades.

Per una banda, s'ha avaluat la capacitat de cada model per a generar biomassa a partir del propi inòcul. L'assaig s'ha realitzat en càpsules de Petri, sobre agar aigua (agar purificat, 6 g/l), sembrades amb una unitat d'inòcul cadascuna en el centre (7 rèpliques per tractament). La biomassa s'ha mesurat als 10 dies mitjançant el nostre procediment d'anàlisi d'imatge calibrat (vegis materials i mètodes detallats en el capítol 4). S'ha

descartat l'àrea que correspon a cada llavor o inòcul, mesurant només el miceli que n' emergeix radialment.

Per altra banda, també s'ha sembrat els mateixos inòculs en sòl en càpsules de Petri, curulles amb sòl d'una localitat productora de *P. eryngii* (Alfés, timoneda d'Alfés). El sòl ha estat prèviament deshidratat a temperatura ambient i sedassat, per a eliminar pedres i fragments de rel superiors a 2 mm Ø. S'ha analitzat la presència de *Trichoderma spp.* en una mostra d'aquest sòl, mitjançant banc de dilucions i identificació de les colònies crescudes en medi agar extracte de malta amb antibiòtics (5 g extracte de malta, 1 g glucosa, 0,2 g peptona, 0,1 g cloramfenicol, 0,05 g tetraciclina i 7,5 g d'agar per a 500 ml H<sub>2</sub>O).

Les càpsules s'han omplert amb 70 g de terra lleugerament compactada, i després hidratades amb 15 g d'aigua desionitzada estèril per càpsula. L'experiment s'ha duplicat esterilitzant prèviament el sòl en autoclau (ampolles de 500 g, 2 h a 121°C). Cada tractament consisteix de 4 càpsules (rèpliques), cadascuna inoculada amb 10 unitats separades entre sí i precintades (Parafilm) per a evitar la deshidratació però garantir l'intercanvi de gasos. S'ha conservat 8 càpsules sense inocular, com a control. El creixement s'ha realitzat a temperatura ambient i en condicions de foscor. Totes les rèpliques s'han fotografiat des de la mateixa posició (Nikon D70, sense filtres ni ajustos, previ ajust de blancs manual per a compensar l'il·luminació) als 10 dies i als 3 mesos. En les imatges preses als 3 mesos no es va poder retirar la tapa de les càpsules de Petri, per risc d'afectar el miceli en la mostra.

La superfície recoberta pel miceli s'ha mesurat a partir d'aquestes imatges amb el software ImageJ. Breument, s'ha extret el canal blau de la imatge, convertint-lo en una nova imatge en escala de grisos. A aquesta imatge s'ha aplicat un filtre *Median* d'1×1px per a reduir el soroll de fons i s'ha eliminat tot el contorn que no correspon al sòl (fons negre). Amb la funció *threshold* s'ha seleccionat manualment el rang de grisos que defineix millor el contorn de les colònies (el mateix per a totes s imatges de la mateixa sèrie) i s'ha mesurat l'àrea i la densitat mitjana de gris a cada imatge, inclosos el controls (blancs). La mitjana obtinguda per als blancs s'ha restat dels valors obtinguts a la resta d'imatges al tracta les dades.

## **Infecció de plàntules i plantes adultes**

### **INFECCIÓ DE PLÀNTULES IN VITRO. EFECTE DEL CARBÓ ACTIU EN L'AGRESSIVITAT DE *P. ERYNGII*.**

S'ha preparat medi agar d'Ingestad modificat, a partir de la formulació de Hall, I. R. i Wang, Y., 1998. La formulació emprada per a un litre de medi és: 0,245 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,149 g NaNO<sub>3</sub>, 0,114 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml HNO<sub>3</sub> 0,1 M, 0,052 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 ml dissolució A, 1 ml dissolució B i 15 g agar grau bacteriològic. Les solucions estoc tenen la següent composició per 100 ml d'aigua: dissolució A: 0,757 mg FeCl<sub>6</sub>H<sub>2</sub>O, 0,573 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,204 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; dissolució B: 0,413 g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,384 g ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,032 g

NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. El pH final és de 6,5. S'ha realitzat un segon tractament corregint el medi a pH 8 (més habitual en sòls on creix *P. eryngii*), afegint carbonat potàssic.

El medi de creixement ha estat esterilitzat a 121°C durant 20 minuts i distribuït en càpsules de Petri (32 ml per càpsula, doble volum de l'habitual). Un cop solidificat s'ha practicat en condicions estèrils un tall recte en l'agar al llarg de la corda de la circumferència de la càpsula (a uns 2cm del marge), i s'ha retirat el fragment d'agar resultant. Les càpsules es disposen de manera vertical amb l'ajut d'un suport, amb el tall a la part superior.

En la superfície del tall s'ha sembrat dues llavors d'*Eryngium campestre*, prèviament desinfectades. El sistema òptim per a la desinfecció ha estat hidratar prèviament les llavors (24h en aigua desionitzada), submergir-les en aigua oxigenada al 33% (5 minuts) i esbaldint-les en aigua desionitzada estèril (1 min) just abans de la seva sembra. Per aquest mètode el percentatge de contaminacions és nul, obtenint una germinació propera al 50%, independentment del pH del medi Ingestad. És possible retirar el pericarp del fruit i desinfectar les llavors durant menys temps en aigua oxigenada sense minvar la capacitat de germinació de la llavor.

Les càpsules es disposen dretes, en un suport, dins d'una cambra de germinació 12 h nit 10°C – 12 h. dia (amb llum) 25°C, durant un mínim de 15 dies. Per a les proves es trien només les càpsules amb una plàntula germinada, sense contaminacions, i que hagin desenvolupat com a mínim 1 cm de rel.

Un cop la planta s'ha desenvolupat, s'inocula el medi amb un disc de 6mm de diàmetre, procedent del marge d'una colònia de *P. eryngii* BEMF-125 crescut en medi F20TA durant 15 dies. El disc es situa a uns 10 mm de l'arrel, amb el miceli aeri en contacte amb l'agar. El disseny experimental consta de tres tractaments, amb 5 rèpliques cadascun: pH8, pH8 amb carbó actiu, pH 6,5, control (sense inocular). Per al assaig amb carbó actiu s'espolvoreja carbó activat estèril (20 min, 121°C) en la superfície de l'agar. Els tractaments inoculats s'analitzen als cap de 7,14, 28 i 35 dies des que el front micelià arriba a l'arrel.

Es mesuren tres radis, a partir dels quals s'infereix l'àrea aproximant la colònia a una el·lipse. Un dels radis es mesura en direcció des del tac d'agar a l'arrel i un altre en la direcció oposada. Es realitza un seguiment descriptiu del procés d'infecció mitjançant observació sota l'estereoscopi.

#### **INFECCIÓ DE PLÀNTULES EN SÒL**

Per a caracteritzar macroscòpicament el procés d'infecció de *P. eryngii* sobre plàntules, s'ha preparat càpsules de Petri plenes de sòl no estèril, tal i com s'ha descrit més amunt. En aquest cas, s'ha practicat un orifici d' 1x1 cm en el marge de la càpsula de Petri, i s'ha trasplantat plàntules d'*Eryngium campestre* obtingudes de llavor, de forma que el coll de

l'arrel es situa en l'orifici, amb la part aèria a l'exterior i l'arrel queda visible en l'interior de la càpsula. Les càpsules s'han mantingut 10 dies en una cambra de germinació amb règim de llum-fosc (12 h fosc 10°C – 12 h dia 25°C).

Un cop arrelades s'ha inoculat *P. eryngii* a uns 3 cm de distància de la plàntula amb dues llavors de sègol colonitzades. S'ha preparat un tractament control seguint el mateix procediment sense afegir la planta. S'ha realitzat 6 rèpliques per tractament.

#### **INFECCIÓ DE RELS ADULTES EN TEST**

Per a validar la possibilitat d'infectar plantes adultes arrelades en sòl i obtenir-ne carpòfors, s'ha arrelat 16 fragments de rel d'*Eryngium campestre* adults en testos quadrangulars de 25x15x15 cm, a partir del fragment superior de plantes adultes (més d'un any). El sòl prové d'una zona productora d'*Eryngium campestre* i ha estat prèviament deshidratat, sedassat per a eliminar pedres i fragments grossos de rels mortes (sedàs de 0,5 cm de llum) i esmenat amb 2g de resina retenidora d'aigua per test (polímer de poliàcrilamida, subministrats per Micologia Forestal Aplicada, S.L.). Els *Eryngium* procedeixen d'una localitat no productora de gírgola de panical (t.m. Rubió, Anoia). Les plantes s'han deixat arrelar i produir part aèria durant un any.

Aquelles plantes que han arrelat i desenvolupat fulles durant l'any s'han inoculat a la tardor següent, un cop ja han perdut la part vegetativa, emprant llavors de sègol colonitzades (aprox. 2-4g), disposant-les a uns 5 cm de distància de l'arrel i uns 5 cm de fondària. La humitat s'ha mantingut per capilaritat, disposant esponges molles sota els testos, per a evitar l'entollament a la part inferior del test.

Els testos s'han mantingut a l'exterior des de setembre fins al abril, a recer de gelades. Les rels s'han desenterrat i examinat als 9 mesos.

#### **Anàlisi estadístic**

Per a avaluar si hi ha diferències estadísticament significatives entre tractaments s'ha realitzat l'anàlisi de la variància d'un factor (ANOVA) o bé el test t-Student per parells amb el mètode d'ajust "Holm" (nivell de significació  $\alpha=0,05$ ).

Tot l'anàlisi estadístic s'ha realitzat amb el paquet estadístic R v.2.9 (R Development Core Team, 2009).

Tos els valors d'error expressats en aquest treball corresponen a la desviació estàndard de la mesura.

## 6.3.- Resultats

### Anàlisi de sòls

Mostrem en les taules 6.1, 6.2 i 6.3 la mitjana dels resultats obtingut en les anàlisis de sòls productors de *P. eryngii* i *P. nebrodensis*. Es separen resultats de la soca UBCC-0985, en dunes de platja sobre *E. maritimum* (per tractar-se d'un hàbitat completament diferent), i de la soca UBCC-1273, aïllada a la Vall d'Aran, ja que la seva identificació resta en dubte.

% minerals - TOTALS										
Tàxon	Hoste	% Ca*	% Mg	% K	%Cu*	% Fe*	% Mn*	% Zn*	% P*	% S
<i>P. eryngii</i>	<i>E.</i>	8,803	1,366	0,881	0,00153	1,826	0,04603	0,00630	0,04063	0,06261
	<i>campestre</i>	±5,338	±2,600	±0,323	±0,00083	±0,724	±0,0194	±0,00329	±0,0185	±0,03250
<i>P. eryngii</i>	<i>E. maritimum</i>	2,935	1,954	1,009	0,00006	0,07541	0,00639	0,00245	0,02319	0,26535
<i>P. nebrodensis</i>	<i>C. ferulacea</i>	1,623	1,146	1,070	0,00441	3,711	0,207	0,01760	0,11928	0,10213
		±0,924	±0,574	±0,100	±0,00079	±0,548	±0,078	±0,00338	±0,0481	±0,03302
<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	N/D	31,182	1,755	0,0325	0,00306	4,833	0,07472	0,01249	0,08645	0,05041

% minerals - CIC								
Tàxon	Hoste	% Ca*	% Mg*	% K	%Cu	% Fe	% Mn	% Zn
<i>P. eryngii</i>	<i>E. campestre</i>	0,355	0,01210	0,02607	<0,0001	0,00078	0,00035	<0,0001
		±0,123	±0,00577	±0,01231		±0,00029	±0,00031	
<i>P. eryngii</i>	<i>E. maritimum</i>	0,123	0,01259	0,00263	<0,0001	0,00028	<0,0001	<0,0001
<i>P. nebrodensis</i>	<i>C. ferulacea</i>	0,624	0,06102	0,03050	<0,0001	0,00136	0,00032	<0,0001
		±0,245	±0,05647	±0,02078		±0,00107	±0,00036	
<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	N/D	0,331	0,01161	0,00765	<0,0001	0,00316	0,00085	<0,0001

Tàxon	Hoste	% C total	% N total *	C/N total	% C orgànic	% N orgànic	C/N orgànic	m.o.	pH*
<i>P. eryngii</i>	<i>E. campestre</i>	5,61	0,23	25,87	1,75	0,18			
		±2,77	±0,07	±13,66	±0,68	±0,07	9,64 ±0,69	3,02 ±1,18	8,02 ±0,26
<i>P. eryngii</i>	<i>E. maritimum</i>	11,88	<0,001	N/A	N/D	N/D	N/D	N/D	9,33
<i>P. nebrodensis</i>	<i>C. ferulacea</i>	8,65	0,83	10,41	N/D	N/D	N/D	N/D	
		±2,16	±0,20	±1,29					7,2 ±0,26
<i>P. eryngii</i> var. <i>ferulae</i>	N/D	4,83	0,52	9,29	3,70	0,43	8,60	6,38	6,06

**Taules 6.1-3:** Composició mitjana de sòls productors de *P. eryngii*. Els asteriscs (\*) indiquen diferències significatives ( $p < 0.05$ ) entre les mostres corresponents a sòls de *P. eryngii* i *P. nebrodensis* (excloses les mostres de *P. eryngii* sobre *E. maritimum* - UBCC-0985 - i de *P. eryngii* var. *ferulae* sobre hoste no identificat - UBCC-1273 - per tractar-se d'una única mostra). Els errors s'expressen com a desviació estàndard.

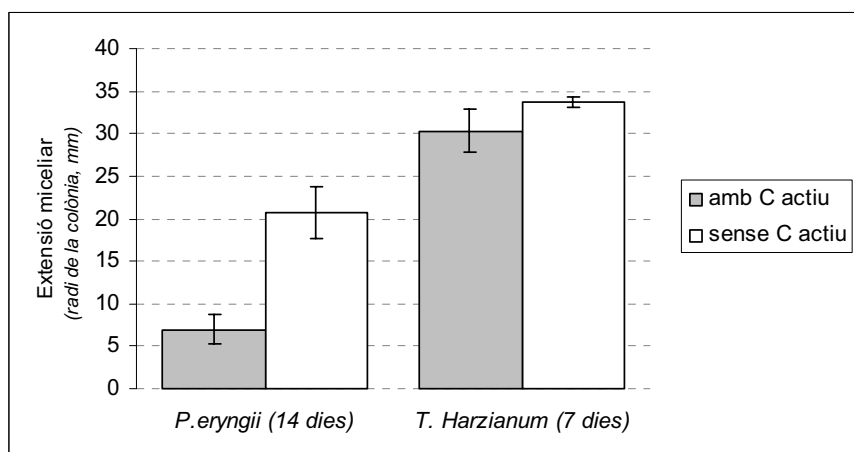
## Viabilitat esporal

El percentatge d'espores de *P. eryngii* germinades en l'assaig del test de Fries és molt reduït ( $2,4 \pm 0,7\%$  en la zona sense carbó actiu), molt probablement degut a una pèrdua de viabilitat esporal al llarg de la conservació. En tot cas, s'observa una inhibició estadísticament significativa ( $\alpha=0,05$ ) en la germinació, tant en els tractaments amb carbó actiu, com en les proximitats de les colònies del llevat (*Rhodotorula*), en tots tres casos nul·la, o inferior al 0,5% . A més de 2 dies des de la sembra el creixement massiu de les colònies de *P. eryngii* impedeix el recompte de possibles noves espores germinades.

## Efecte del carbó actiu en la competitivitat vers *Trichoderma harzianum*

En les nostres condicions d'assaig, el carbó actiu dóna lloc a una forta inhibició del creixement de *P. eryngii* in vitro (figura 3 i taula 6.4). En medi F20TA, el radi de la colònia de *P. eryngii* a la banda amb carbó actiu és molt menor al radi oposat, mentre que en medi F0TA, la presència de carbó actiu inhibeix totalment l'emergència de miceli a partir del punt d'inòcul.

*T. harzianum* també presenta una inhibició del creixement estadísticament significativa en presència del carbó actiu, però molt menor respecte a *P. eryngii*, en tots dos medis de cultiu. En medi F0TA, el creixement és visiblement menys dens. La presència de carbó actiu n'estimula l'esperulació en tots els casos.



**Fig.6.3:** Efecte del carbó actiu en el creixement in vitro (extensió miceliana, radi en mm) de *P. eryngii* i *T. harzianum*, en medi F20TA (20 g fructosa/l).

	F20TA		F0TA	
	<i>P. eryngii</i> (14 dies)	<i>T. harzianum</i> (7 dies)	<i>P. eryngii</i> (14 dies)	<i>T. harzianum</i> (7 dies)
<b>costat amb C actiu</b>	7 ±1,8	30,3 ±2,5	0	19,5 ±2,4
<b>costat sense C actiu</b>	20,8 ±3	33,8 ±0,6	0	21,8 ±2,4

**Taula 6.4:** Radis (en mil·límetres) de les colònies de *P. eryngii* i *T. harzianum* en l'assaig en càpsules amb mitja superfície coberta amb carbó actiu.

Pel que fa a la interacció in vitro entre *Trichoderma* i *P. eryngii* en presència o absència d'una franja de carbó actiu, no s'observen diferències en l'agressivitat de *Trichoderma* sobre *Pleurotus eryngii*. En tots els casos, la franja de carbó actiu inhibeix la progressió del creixement de *P. eryngii* mentre que *Trichoderma* l'ultrapassa. En tots els casos *Trichoderma* sobrepassa el marge de la colònia de *Pleurotus* i l'envaeix. No observem cap reacció macroscòpica en la zona de confrontació d'aquestes, ni per augment de creixement, ni per formació d'un halo de competència (no hi ha discontinuïtat entre ambdues colònies).

## Disseny de sistemes d'inòcul

### SISTEMES D'INOCULACIÓ MITJANÇANT SUSPENSIONS I FUSTA COLONITZADA

Tots els sistemes d'inoculació mitjançant suspensions micelianses, tant en test, sobre fragments de rels adultes, com a camp, de forma dirigida a les arrels de plantes en parcel·les naturals, han resultat fallits. L'ús d'alginat com a espessant que facilita l'aplicació directa sobre les arrels tampoc ha donat bons resultats, ja que es deshidrata amb excessiva facilitat i acaba formant una crosta de difícil rehidratació.

L'ús de fusta colonitzada també ha donat lloc a resultats negatius en tots els intents d'infecció de rels de card panical en test. En retirar el fragment de fusta al cap d'uns dies, es pot veure com un tènue miceli de *P. eryngii* ha emergit del fragment de fusta, aglomerant les partícules del sòl al voltant d'aquesta, però unes setmanes més tard el miceli desapareix i la fusta ennegreix, colonitzada per la microbiota present al sòl.

### INOCULACIÓ MITJANÇANT IMMOBILITZACIÓ EN ALGINAT

Bona part dels procediments d'inoculació mitjançant tècniques d'immobilització en perles d'alginat també han resultat fallits. En la majoria de casos, les perles d'alginat es deshidraten ràpidament un cop en contacte amb el terra. En assecar-se superficialment, es forma una capa d'alginat més deshidratat que impedeix el correcte desenvolupament del fong a inocular. Els intents de reduir aquest efecte de deshidratació afegint resines de poliacrilamida també han resultat ineficaços. A més, al ser un tipus d'inòcul molt humit és propens a la contaminació per bacteris i llevats en la seva preparació.



El sistema desenvolupat per a generar perles complexes amb una llavor petita com a nucli i dues capes concèntriques d'alginat amb composicions diferents ha donat bons resultats a nivell de producció, tot i que cal ajustar bé els diàmetres en el capçal descrit per a evitar embussaments per part de les llavors. Tot i que en el nostre cas hem inoculat les perles *a posteriori*, el procediment és compatible amb encapsular llavors ja colonitzades pel fong. El concepte de les dues capes concèntriques permet afegir esmenes en forma de nutrients insolubles en la capa interior d'alginat, mentre que en la capa exterior – pensat per actuar de barrera- es podien afegir agents biostàtics que actuessin de barrera al desenvolupament de microorganismes de l'exterior. Malauradament, aquest sistema també és sensible a l'efecte de deshidratació abans esmentat, i no hem trobat un producte o procediment per a poder aplicar recobriments plàstics sobre les perles d'alginat, que al nostre entendre podrien haver millorat significativament els resultats.

En canvi, el sistema d'immobilització de serradures molturades en perles d'alginat sí ha permès infectar rels d'*Eryngium campestre* en test, tot i que amb resultats irregulars segons l'assaig. Atribuïm aquesta irregularitat en els resultats obtinguts a diferències en el grau de colonització de la perla d'alginat entre els diferents assaigs. En aquest sistema d'inoculació, l'alginat no actua tant com a hidrogel sinó com a adhesiu, ja que les serradures i segó molturats es troben en una concentració molt elevada i són les que actuen de matriu. Les perles resultants es colonitzen bé, amb mínimes incidències de contaminacions en la seva preparació. A més, es poden fabricar les perles, deshidratar-les abans de ser inoculades amb *P. eryngii* i conservar-les indefinidament fins al seu ús. D'aquesta manera es poden rehidratar amb tampó fosfat Sörensen pH7 abans d'inocular-les i colonitzar-les (tot i que la perla perd una part important de la seva resistència mecànica).

Aquest procediment d'immobilització de serradures i segó, modificat amb l'addició de glicerol (10%) i la mateixa solució estoc de vitamines emprada per al medi F20TA (que es pot afegir, al rehidratar les perles), permet la criopreservació de les soques de *P. eryngii* en ultracongelador a -28°C amb taxes de recuperació properes al 100% (Guarc, Y., Lanau, J. M. et al., 2003), tal i com hem pogut comprovar mitjançant el procediment de congelació - descongelació repetida proposat per Kitamoto, Y., Suzuki, A. et al., 2002).

La variant de perles poroses per la reacció de NaHCO<sub>3</sub> amb àcid acètic ha donat lloc a un producte ferm i esponjós alhora, amb nombroses cavitats a l'interior que en teoria haurien facilitat el desenvolupament del nostre fong. Tot i això, la neutralització final de les perles és difícil i sovint dóna problemes en la colonització pel fong, pel que finalment s'ha descartat aquest prototip.

## INOCULACIÓ MITJANÇANT LLAVORS

Al contrari de l'esperat, l'ús de llavors colonitzades ha resultat ser el procediment més efectiu a l'hora d'aconseguir creixement en sòls no estèrils i obtenir infeccions de plantes de card panical (vegeu resultats i discussió més endavant).

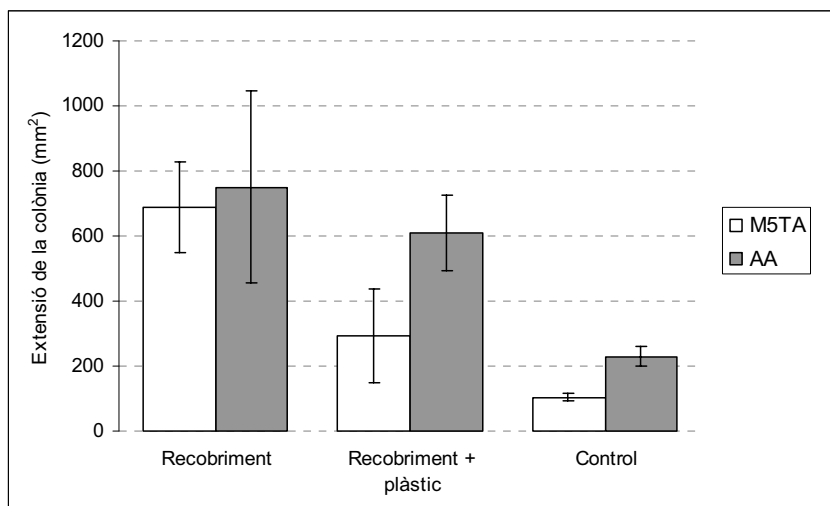
Per a estandarditzar al màxim les condicions d'assaig per a tots els tractaments, s'ha emprat el mateix procediment per als diferents tipus de llavors estudiades, tant pel que fa a la seva preparació com als temps d'incubació. Això ha donat lloc a graus d'hidratació de la llavor i a nivells de colonització diferents. Les veges s'han hidratat menys que la resta de llavors per la seva mida, i en conseqüència es colonitzen més lentament que no pas la colza, amb una proporció volum/superfície molt menor, o que el sègol, que no té una coberta que actui de barrera, una composició amb més nutrients fàcilment assimilables i que per tant s'hidrata més fàcilment. Aquestes diferències en la colonització podrien haver condicionat en gran mesura els resultats obtinguts en medis no estèrils.

### **Pel·letitzat de llavors colonitzades**

Dels dos recobriments comercials testats, el recobriment "Europill" ha resultat el més adient, ja que el recobriment "tomato" acaba desprenent-se de la llavor colonitzada a conseqüència de la humitat que conté.

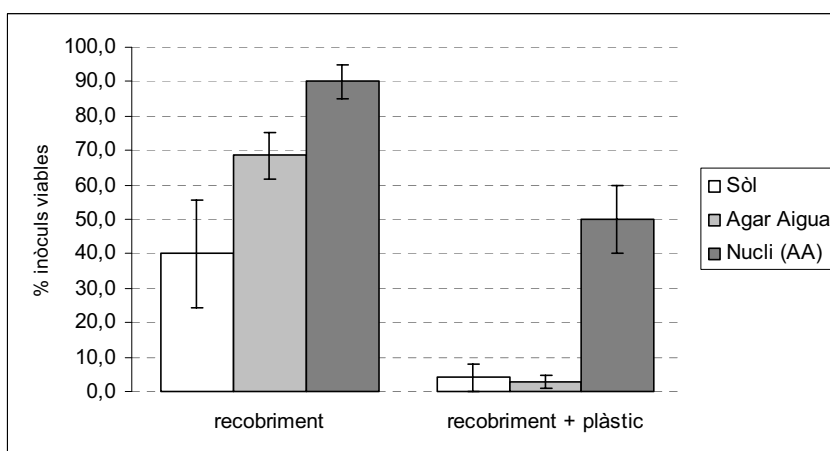
Les proves de creixement de *P. eryngii* en agar amb i sense els recobriments estudiats (Europill amb i sense recobriment plàstic) han donat lloc a colònies amb una densitat macroscòpicament similar, pel que es pot emprar l'àrea de les colònies com a indicador de creixement fiable. Tots els medis (M5TA i AA, vegeu figura 4) esmenats amb els components del recobriment donen lloc a més creixement que els respectius controls, pel que es conclou que *P. eryngii* pot créixer a partir d'algun dels seus components, probablement els adherents. El recobriment amb tractament plàstic ha donat lloc a creixements inferiors al recobriment sol (diferències estadístiques només en medi M5TA), pel que creiem que té un efecte fungistàtic en el creixement de *P. eryngii*.

Per al pel·letitzat ha estat necessari deshidratar en part les llavors colonitzades, fins a vora el 30% de contingut en aigua. Físicament, el resultat és molt satisfactori, obtenint perles resistents, regulars, de superfície llisa i tacte sec, i permetria la seva aplicació a camp de forma extensiva amb l'ajut d'un sembrador.



**Fig.6.4:** Creixement in vitro de *P. eryngii* en medi M5TA i agar aigua (AA) esmenats amb la matriu dels pel·letitzats testats ('Europill' amb i sense tractament plàstic comercial).

Tot i que s'ha sol·licitat a l'empresa que es desinfectés prèviament l'utilatge, les instal·lacions industrials no estan preparades per a treballar de forma asèptica i han incorporat contaminacions en la superfície i en el material de recobriments. Al conservar el producte en nevera durant uns dies abans de la seva aplicació, la humitat residual afavoreix el desenvolupament d'aquestes contaminacions en la superfície del recobriments, i la viabilitat davalla dràsticament.



**Fig.6.5:** Viabilitat de l'inòcul un cop aplicat el pel·letitzat amb argiles (no estèril), en sòl humit, en medi agar aigua, o en medi agar aigua recuperant la llavor de l'interior. Els controls sense pel·letitzat (100% de viabilitat) s'han omès per claredat.

En el nostre assaig, les llavors recobertes han perdut part de la viabilitat (es pot aïllar de nou a *P. eryngii* en un 90% de llavors colonitzades, un cop extret el recobriment); tot i això, a conseqüència de les contaminacions en el recobriment només un 40% de les llavors recobertes han donat lloc a miceli prou vigorós de *P. eryngii* com per colonitzar un sòl humit no estèril, i un 68,6% en agar aigua.

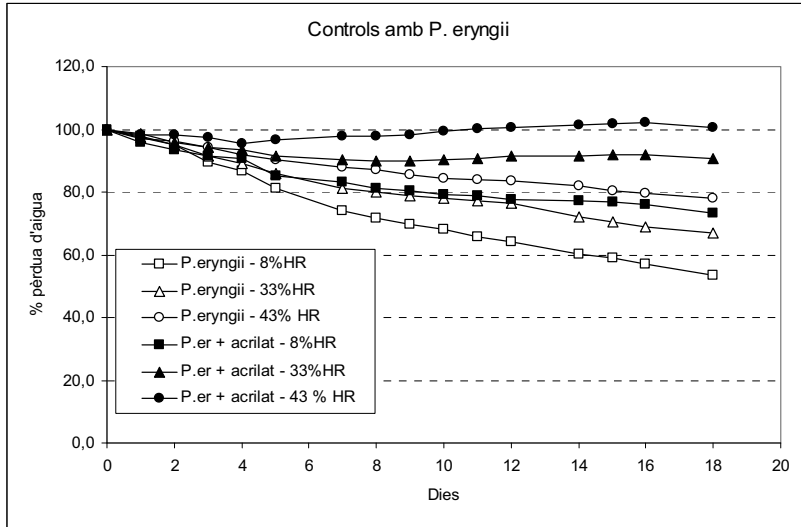
El recobriment amb tractament plàstic ha minvat de forma radical la seva viabilitat, i només es pot recuperar el miceli de *P. eryngii* en un  $50,0 \pm 9,8$  % de les llavors. D'aquestes, només s'observa una emergència vigorosa del miceli de *P. eryngii* en menys del 5% de les llavors recobertes.

### Recobriment plàstic

El recobriment de les llavors colonitzades amb acrilats ha permès l'emergència de miceli a partir de les llavors colonitzades amb *P. eryngii* tant en medi d'aïllament (M5TA amb antibiòtic i fungicida) com en medi de creixement (F20TA), en el 100% de les rèpliques (7 dies). Els controls sense inocular presenten una clara resistència a les contaminacions externes quan s'exposen en un ambient no estèril (Fig 6). En les proves de deshidratació en humitats controlades, també s'observa una millora en la taxa de deshidratació de la llavor propera al 20% als 18 dies en totes les humitats relatives estudiades (Fig 7).



**Fig.6.6:** Diferència en el grau de contaminació de llavors de colza (no colonitzades amb *P. eryngii*) exposades en un entorn no estèril durant 7 dies, segons si han estat recobertes amb (sobre) o sense (sota) pintura acrílica.



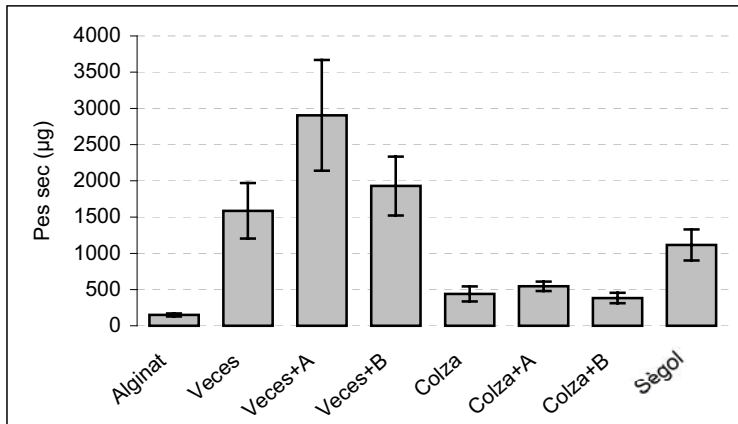
**Fig.6.7:** Corba de deshidratació (% de la humitat en el inòcul) per a llavors de colza colonitzades amb *P. eryngii* a humitats relatives diferents, amb i sense recobriment acrílic (pintura acrílica amb base aquosa).

### Caracterització d'inòculs seleccionats in vitro i en sòl

De les tres llavors seleccionades, les veces són amb diferència, el suport que ha donat lloc a més biomassa miceliana en condicions in vitro, seguit del sègol, la colza i finalment les perles d'alginat i serradures. Els dos recobriments plàstics (A: base de pintura acrílica, B: polímer acrílic per a ús sanitari en aerosol) no han reduït en cap cas la capacitat del miceli per a emergir del gra d'inòcul en agar sense nutrients. En el cas de les veces, el recobriment A dona lloc a un augment significatiu de la biomassa resultant ( $\alpha=0,05$ ), en comparació amb el control (sense recobriment, Fig. 8). Les mesures de l'àrea de les colònies presenten un patró molt similar, però amb desviacions estàndard molt més elevats (dades no mostrades).

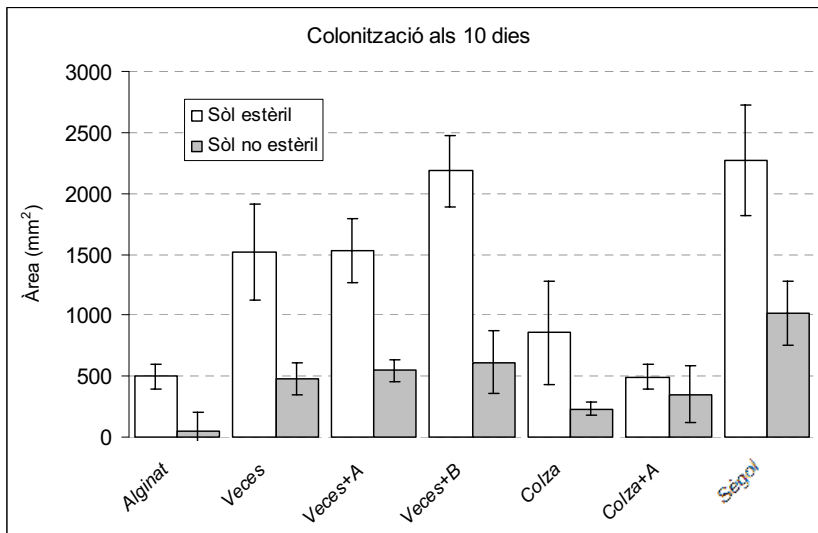
En les proves de creixement sobre sòl no hem pogut incorporar el tractament de llavors de colza amb recobriment B, degut a problemes en la preparació d'aquest inòcul.

No s'ha aïllat *Trichoderma spp.* en la mostra de sòl emprada en els nostres assaigs. Les proves de creixement sobre sòl mostren una inhibició molt marcada en el desenvolupament de *P. eryngii* en el sòl no estèril als 10 dies d'incubació (Fig. 9 i 10). En el sòl estèril, les colònies són grans i laxes, amb un comportament equivalent al que observem sobre agar, mentre que en sòls no estèrils, el miceli es desenvolupa de manera concentrada al voltant de la llavor, i s'estén molt menys en el sòl (Fig. 10). Tot i això, no hi ha signes de contaminació en cap tractament.



**Fig.6.8:** Biomassa miceliana de *P. eryngii* (pes sec estimat mitjançant anàlisi d'imatge) a partir d'una unitat d'inòcul en condicions in vitro (agar aigua, sense nutrients, 9 dies). A i B es refereixen als dos recobriments plàstics estudiats, descrits als materials i mètodes.

La capacitat de produir biomassa per unitat d'inòcul en el sòl no sempre es correspon a la capacitat de produir biomassa en condicions in vitro (agar sense nutrients). En totes les proves en sòl han estat les llavors de sègol i no les veces les que han generat colònies amb més extensió en superfície que la resta de tractaments. Per altra banda, les perles d'alginat amb serradures han donat lloc a colonitzacions molt dèbils en tots els tractaments.



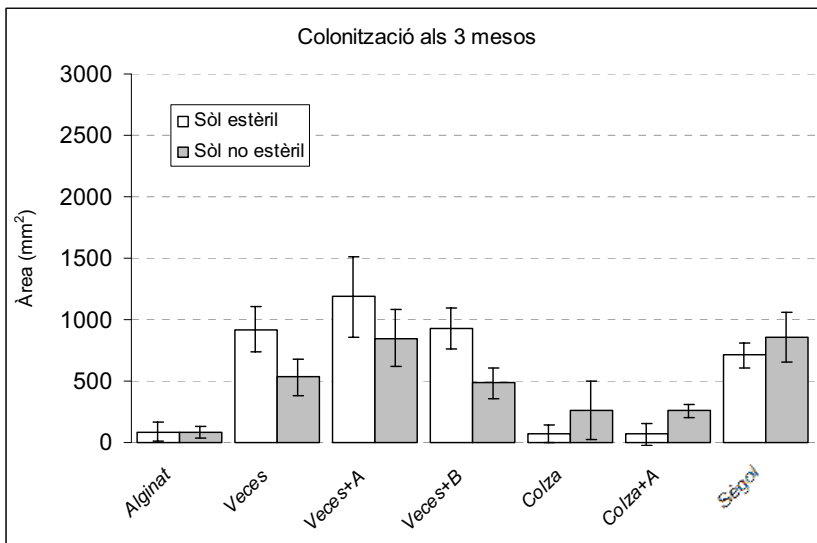
**Fig.6.9:** Colonització en superfície (àrea) sobre sòl esterilitzat i no esterilitzat als 10 dies.



**Fig.6.10:** Colonització sobre sòl esterilitzat (dreta) i no esterilitzat (esquerra) als 10 dies. De dalt a baix: colza, veçes i sègol.

Els recobriments aplicats sobre les llavors de veça i de colza no han alterat significativament ( $\alpha=0,05$ ) la capacitat de colonització del sòl per part de *P. eryngii* a curt termini, tot i que en el cas de les veces els recobriments eren excessivament gruixuts i han retardat o fins i tot bloquejat la producció de miceli en algunes de les unitats d'inòcul. En sòl estèril, el recobriment B fins i tot ha donat lloc a més extensió miceliana que el respectiu control ( $\alpha=0,05$ ).

Si observem les mateixes rèpliques a llarg termini (incubació a 3 mesos, fig. 11 i 12), els resultats varien notablement. L'àrea colonitzada pel miceli de *P. eryngii* en els tractaments amb sòl estèril davallen significativament, assolint en la majoria de casos nivells estadísticament similars als tractaments amb sòl no estèril. En aquest últim cas, en canvi, els nivells de superfície colonitzada es mantenen constants respecte a la incubació a 10 dies. Les unitats d'inòcul dels tractaments amb veces i recobriments plàstics (A i B) que no havien generat miceli de *P. eryngii* han acabat desenvolupant-se correctament en el sòl estèril, però s'han contaminat en sòl no estèril, pel que les mesures de l'àrea colonitzada captades per anàlisi d'imatge en aquests dos tractaments no es poden tenir en compte. En canvi, no hi ha hagut cap contaminació en el cas de les llavors de colza recobertes amb acrilat.



**Fig.6.11:** Colonització en superfície (àrea) sobre sòl esterilitzat i no esterilitzat als 3 mesos. Els valors per a les llavors de veça amb recobriment (A i B) sobre sòl no estèril són esbiaixades degut a la presència de contaminacions.





**Fig.6.12:** Colonització sobre sòl esterilitzat (dreta) i no esterilitzat (esquerra) als 3 mesos. De dalt a baix: colza, veces i sègol.

En aquest experiment, les perles d'alginat amb serradures i segó també s'han contaminat, ennegrint-se de forma molt similar a les proves preliminars amb fusta abans esmentat (depressors linguals). Aquest resultat és contradictori amb els nostres experiments preliminars mitjançant perles d'alginat, en els que, si bé la capacitat de producció de biomassa per part del miceli de *P. eryngii* segueix essent més petita que en el cas de les llavors, les perles no es contaminen al ser disposades en sòl no estèril, aconseguint fins i tot infeccions de rels de plantes d'*Eryngium campestre*. El temps de colonització de les perles previ a la inoculació és probablement el factor que causa aquesta disparitat de resultats, ja que s'ha emprat un mateix temps de colonització per a tots els inòculs, i en el cas de les perles d'alginat (amb pocs nutrients fàcilment assequibles per al fong), aquest pot haver estat insuficient.

### **FORMACIÓ DE CORDONS MICELIANS**

El fenomen més sorprenent en les rèpliques incubades a 3 mesos ha estat l'aparició de cordons micelians<sup>10</sup>, a coneixement de l'autor no descrits amb anterioritat per a *Pleurotus eryngii*. Els cordons micelians formats en tots els tractaments presenten un tropisme evident vers els altres inòculs colonitzats, i acaben connectant les diferents unitats entre sí. Alguns cordons micelians també cerquen els marges de la càpsula de Petri, a on els nivells de CO<sub>2</sub> són més baixos.

Aquests cordons micelians només han aparegut en les rèpliques sobre sòl no estèril incubades durant 3 mesos. Han aparegut en petites quantitats en els inòculs a base de veves o de colza (vegis fig. 12), mentre que ho han fet de forma massiva en el cas de l'inòcul a base de sègol i de la colza recoberta amb acrilat (fig. 13). Aquest segon cas és especialment rellevant, ja que deixa palès que no hi ha cap correlació entre la formació de cordons micelians i la quantitat de biomassa generada per l'inòcul. Els cordons sovint es ramifiquen i resulta impossible quantificar-los, però sí es pot quantificar el nombre de

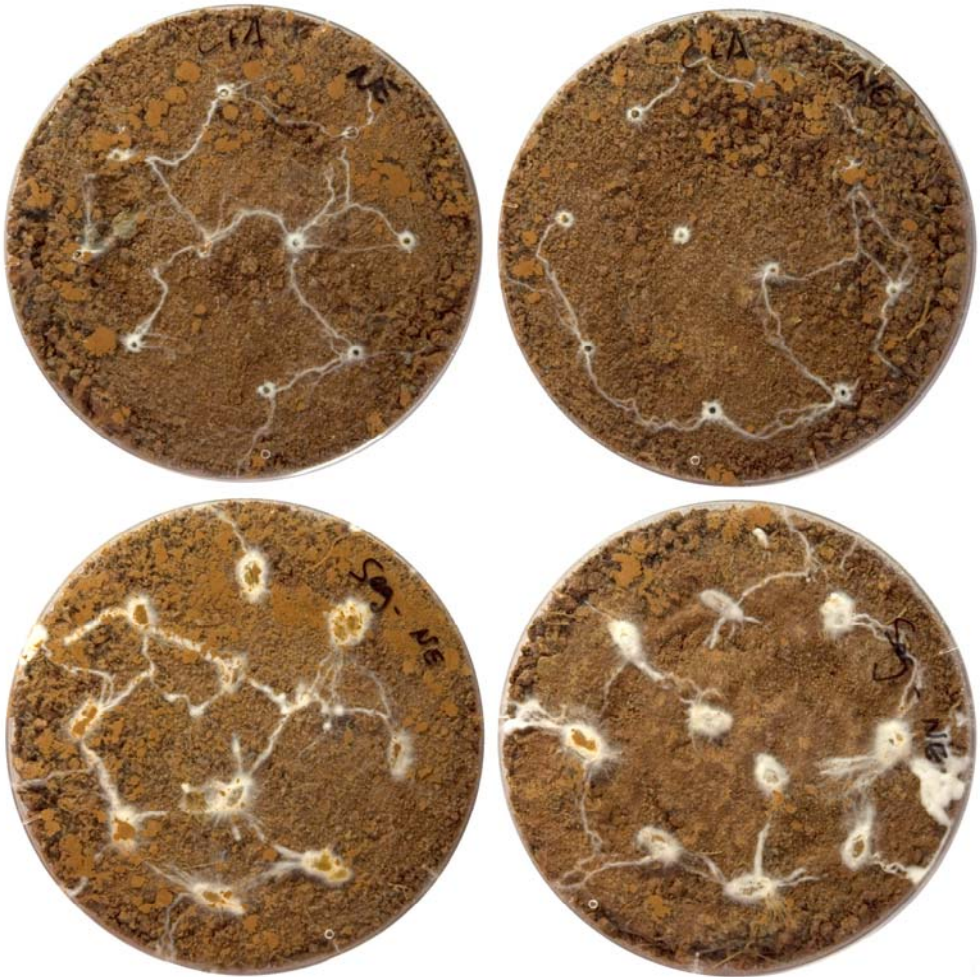
---

<sup>10</sup> En la bibliografia actual hi ha una manca de consens respecte l'ús dels termes *cordó micelià* (en anglès myceliar cord) i *rizomorf* (en anglès, rhizomorph), sovint considerats sinònims. Actualment al Diccionari Terminològic de l'Institut d'Estudis Catalans (Termcat) només hi consta el terme *rizomorf*, i s'empra l'expressió "cordó de miceli" en la seva definició. Nogensmenys, en aquest estudi diferenciem les dues menes d'estructures tal com s'exposa a Boddy, L., 2009, donat que ens permet definir les estructures observades amb més precisió.

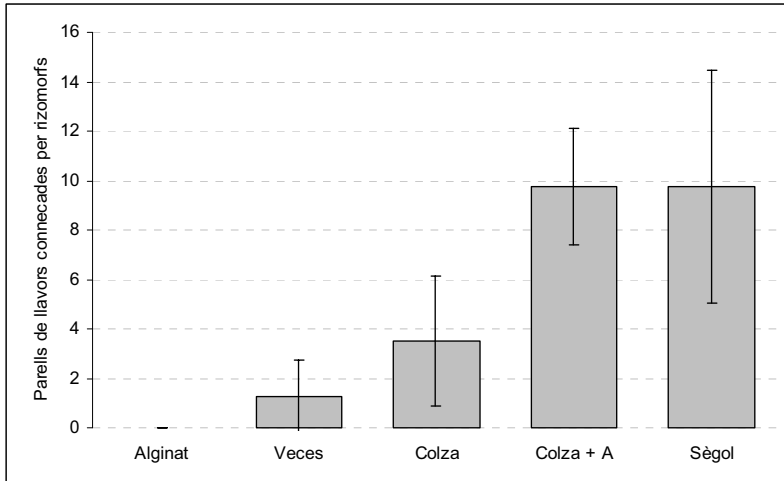
Així doncs, emprarem el terme *rizomorf* per a les estructures que en la seva maduresa presenten un còrtex diferenciat, endurit i de vegades melanitzat quan són madurs, i que es creixen apicalment com un òrgan ben definit, com el cas dels rizomorfs d'*Armillaria* spp. o *Marasmius androsaceus*. Per contra, emprarem el terme *cordó micelià* per a referir-nos a estructures linears més simples, formades per agregats micelians que en la seva maduresa també poden presentar un còrtex diferenciat, però mai endurit ni melanitzat, i que per comptes de presentar un creixement apical presenten un marge micelià difús format per hifes separades, cadascuna de les quals s'estén de manera independent, cas de *Stropharia caerulea* o *Phanaerochaete chrysosporium*.

parells de llavors connectades entre sí per cordons micelians com a mesura de l'eficàcia en la colonització (fig. 14).

Els cordons micelians formats a partir de les llavors de colza són fins però clarament marcats i tenen capacitat de cobrir distàncies proporcionalment grans. En canvi, els cordons formats per les llavors de veça i sègol són més gruixuts. Destaquem que aquests dos darrers casos (amb més capacitat de generar biomassa) generen de forma esporàdica primordis, que no arriben a diferenciar teixits.



**Fig. 6.13:** Formació de cordons micelians sobre sòl no estèril. A dalt, colza recoberta amb acrilat (recobriments A). A sota, sègol, sense recobriments.



**Fig.6.14:** Recompte de llavors interconnectades per cordons micelians (sòl no estèril, 3 mesos incubació). Dues llavors connectades entre sí per més d'un cordó micelià es recompten com a un de sol. No es representen els tractaments de veces amb recobriments, degut a la presència de contaminacions.

## Infecció de plàntules i plantes adultes

### INFECCIÓ DE PLÀNTULES IN VITRO

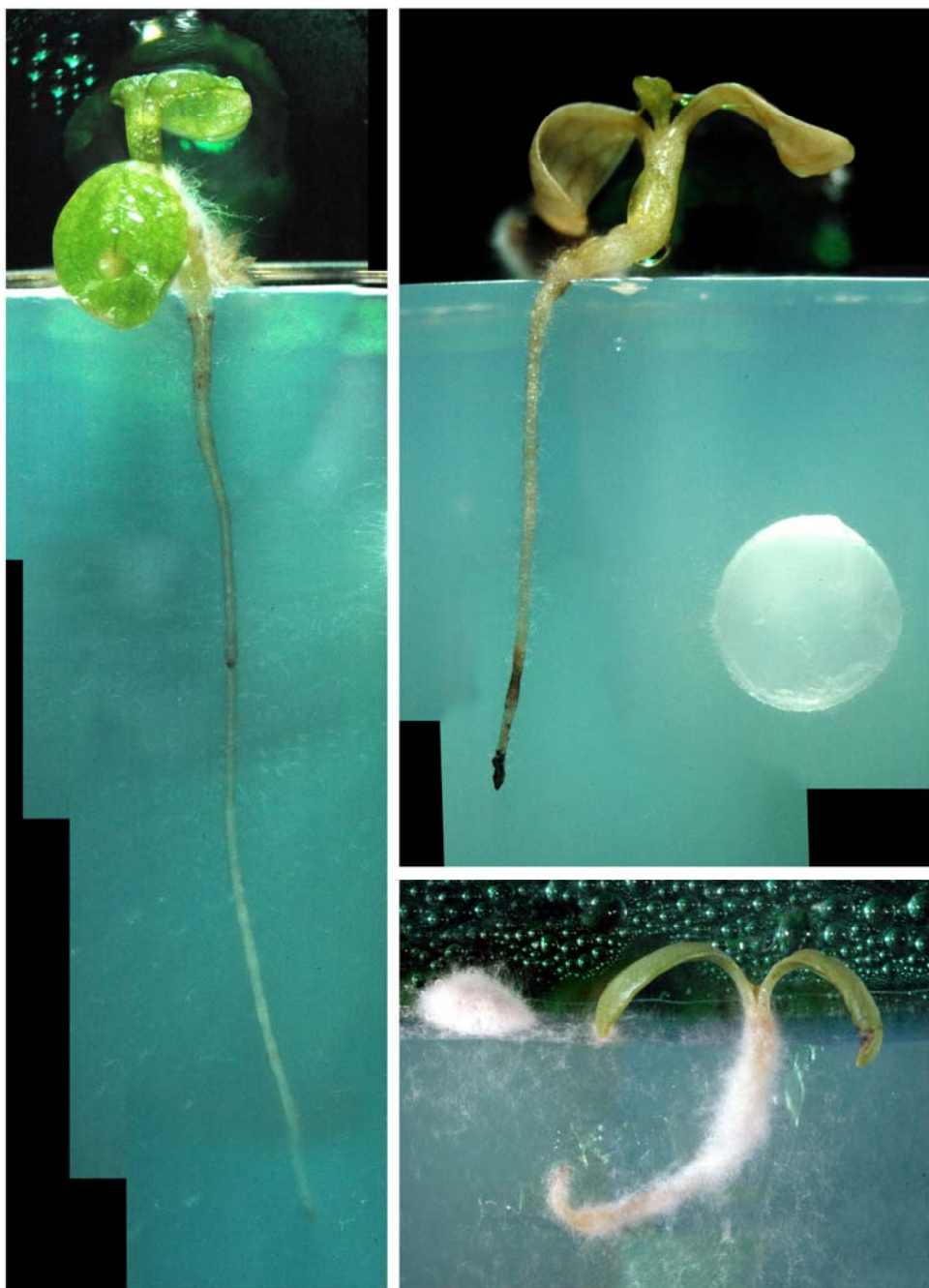
En l'assaig d'infecció de plàntules in vitro i en condicions estèrils, sobre medi Ingestad agar, totes les plàntules han resultat infectades per *P. eryngii*, tant a pH 6,5 com a pH 8. No s'observen diferències estadísticament significatives entre ambdós tractaments pel que fa al creixement de *P. eryngii* en superfície, ni tampoc s'observen diferències significatives en el radi en direcció a la plàntula respecte el radi oposat. Per altra banda, en els tractaments amb carbó actiu *P. eryngii* pràcticament no creix i no arriba a la planta. Es corroboren així els resultats d'inhibició per part del carbó actiu obtinguts en els assaigs enfrontats de *P. eryngii* amb *Trichoderma*.

En condicions estèrils, un cop *P. eryngii* arriba en contacte amb l'arrel de la plàntula, aquest la colonitza directament, sense formar-se estructures visibles sota l'estereoscopi, ni producció de pigments de cap mena en el medi. La densitat de la colònia tampoc no augmenta a les rodalies de la plàntula, de forma evident, com a mínim, fins que aquesta arriba a un estat d'invasió molt avançat. Al llarg dels primers dies es poden observar hifes que emergeixen de l'arrel, fent evident que el fong colonitza ràpidament tota la planta propagant-se per l'interior. Les plàntules afectades aturen el seu creixement. En aquest estadi, les fulles encara es mantenen verdes.

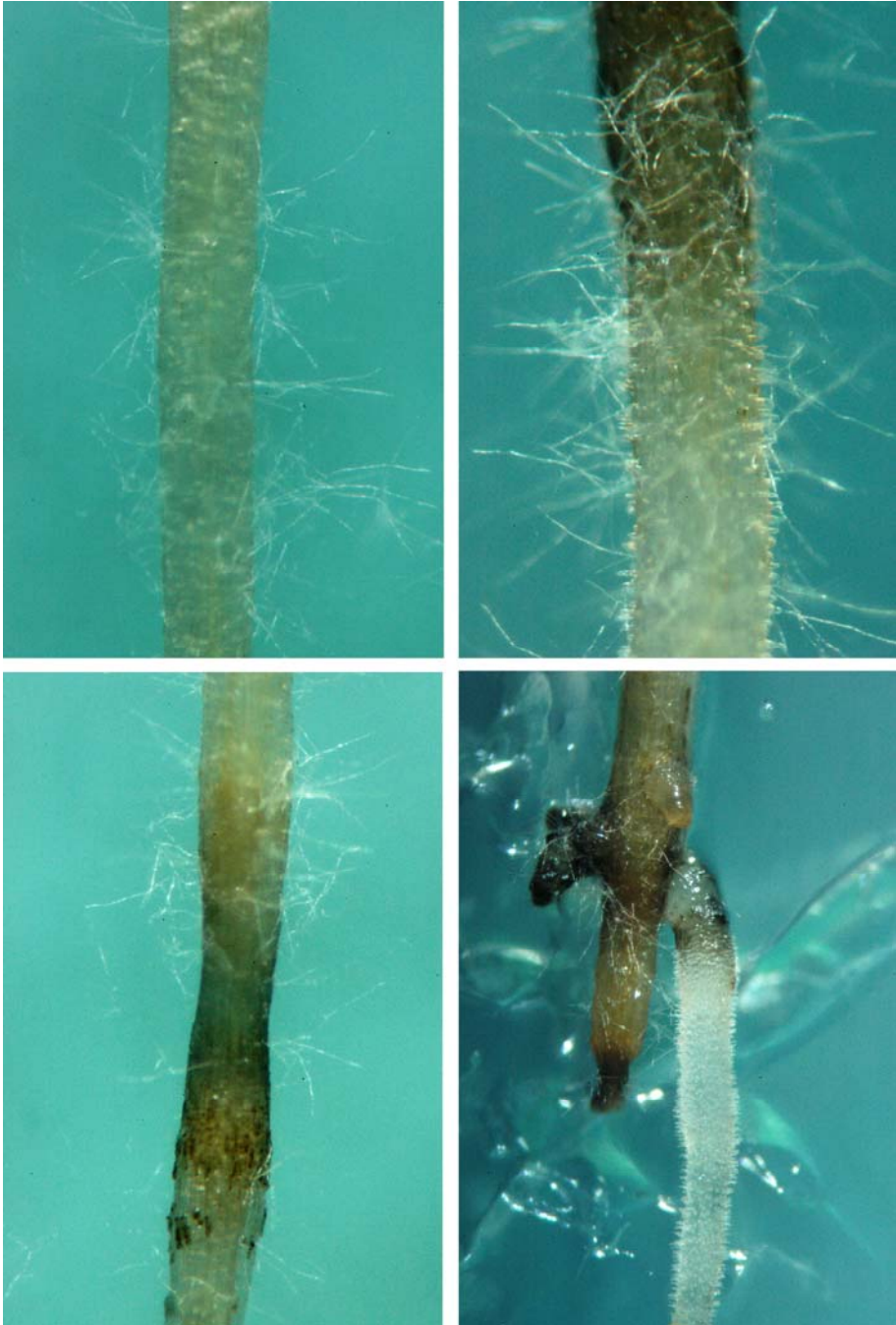
Al cap d'uns pocs dies es poden veure les primeres reaccions en la rel, primer en forma d'embruniment general (generalment de forma nítidament limitada fins al coll de la rel, fig. 15) i més tard, amb símptomes de necrosi localitzada en zones concretes de l'arrel, que acaben col·lapsant i estenent-se (fig. 16 i 17), donant lloc, finalment, a la mort de la plàntula. Les parts verdes de la planta no presenten símptomes de colonització pel fong en tot el procés.



**Fig.6.15:** Infecció in vitro de plàntules d'*E. campestre* en medi Ingestad agar.



**Fig.6.16:** Plàntules d'*Eryngium campestre* infectades per *P. eryngii* in vitro, en condicions estèrils. Les imatges han estat composades a partir de diverses captures amb un estereoscopi, amb punts focals diferents.



**Fig.6.17:** Detall de l'evolució de la colonització i necrosi de la rel de plàntules d'*E. campestre* infectades per *P. eryngii*, amb diferents graus d'invasió per part del fong. Molt esporàdicament algunes plàntules reaccionen generant rels laterals (a baix a la dreta), que amb el temps també acaben essent colonitzades.

### INFECCIÓ DE PLANTES JOVES EN SÒL NO ESTÈRIL

La inoculació de plantes joves en càpsules de Petri ha resultat en la infecció de totes les plàntules inoculades en un període de temps relativament breu. El miceli que emergeix dels grans d'inòcul presenta un comportament diferent en les rèpliques que contenen una planta jove d'*E. campestre*. En aquest tractament, després d'un breu creixement radial al voltant del gra d'inòcul, sovint es formen un o més cordons micelians en direcció a l'arrel de la planta. Als pocs dies d'entrar en contacte amb aquesta, el cordó micelià engruixeix, la planta comença a presentar símptomes de senescència, i en més de la meitat de les rèpliques, es generen primordis, sovint prop del primer punt de contacte del cordó micelià amb l'arrel (Fig. 6.18). En canvi, en cap cas no es formen cordons que connectin els dos grans d'inòcul entre sí, com sí ho han fet algunes rèpliques en els controls.

A diferència dels primordis que hem observat en les proves d'inoculació en sòl estèril vs. no estèril, en aquest cas els primordis van més enllà d'una simple conglomeració de hifes, i arriben a diferenciar un pïleu (barret) incipient. En les setmanes següents, l'estípit (cama) dels primordis s'allarga en direcció de l'orifici de la càpsula de Petri, però no arriben a madurar -probablement per manca d'un substrat prou abundant i de reserves suficients en l'arrel - i s'acaba descomponent amb el temps.

Mentrestant, les rels de la planta desenvolupen símptomes de colonització evident, amb miceli visible en la superfície de la rel sota l'estereoscopi, les fulles marceixen, i finalment les plantes moren. A llarg termini, les rels es descomponen per complet, i en cap moment acaben adquirint l'aspecte blanc per la presència de miceli de *P. eryngii* que sí s'observa en arrels adultes colonitzades, tant en les proves en test sobre rels trasplantades, com en condicions naturals.

Per contra, en les rèpliques control (sense *E. campestre*), les llavors de sègol acaben formant cordons micelians que connecten les dues llavors entre sí, però no exploren en cap cas la porció de la càpsula de Petri on hauria d'haver la planta. A més, en la majoria de rèpliques aquest cordons es formen de forma molt més tardana que en les rèpliques amb planta d'*E. campestre*.

### INFECCIÓ DE PLANTES ADULTES EN SÒL NO ESTÈRIL

En les proves d'infecció de fragments de rel adults d'*E. campestre* mitjançant llavors colonitzades hem aconseguit un 68,8% de rels clarament colonitzades per *P. eryngii*. Aquestes presenten les característiques habituals que hem observat a camp en les rels amb descomposició avançada a causa de la gírgola de panical: l'epidermis de l'arrel esdevé blanca per la presència de miceli encara actiu de *P. eryngii*, mentre que el còrtex queda totalment descompost i només es conserva la zona vascular més lignificada, completament colonitzada pel miceli del paràsit (fig. 21 i 22)

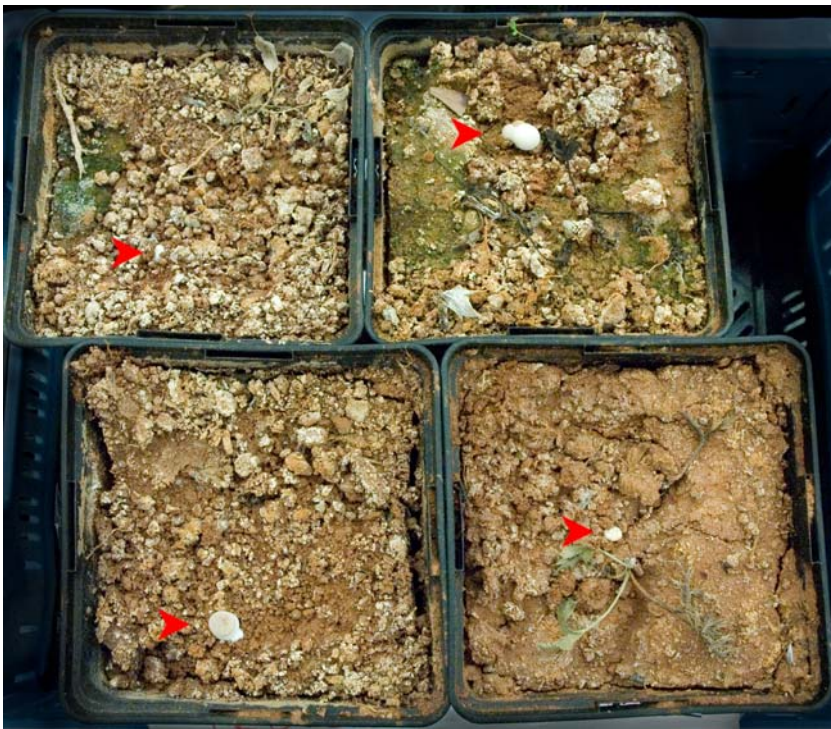




**Fig.6.18:** Infecció de plantes joves d'*Eryngium campestre* per part de *Pleurotus eryngii*, en sòl no estèril als 36 dies des de la inoculació. Observis la formació de cordons micelians dirigits a l'arrel de la planta (fletxes buides), els primers símptomes de senescència d'aquesta i la formació prematura de primordis diferenciats (fletxes plenes). A baix a l'esquerra, l'únic control sense planta que ha generat cordon micelians als 36 dies.

En la majoria de les rèpliques colonitzades s'han obtingut primordis i carpòfors de *P. eryngii* (Figura 19 i 20), a partir dels dos mesos des de la inoculació. Tots ells han diferenciat un pèileu incipient, però molts d'ells no han arribat a desenvolupar un carpòfor fèrtil, i si ho han fet, en general no s'han desenvolupat amb una mida i forma normals. Atribuïm aquest fet a la poca biomassa radicular que hem obtingut en l'arrelament de la planta (cal recordar que el sòl emprat és pobre en nutrients assequibles per a la planta, i no s'ha afegit cap adob). En la majoria de casos podem observar restes de l'inòcul, amb un estat de descomposició avançat (de vegades totalment corcat per l'acció d'insectes), però sovint amb miceli actiu de *P. eryngii*. El sòl dels testos es desengruna amb excessiva facilitat i només hem pogut observar indicis de cordons micelians en el sòl en una de les rèpliques.

La resta de rels d'*E. campestre* també han mort, però no han desenvolupat carpòfors i presenten una descomposició diferent. La rel desapareix del tot, deixant només la cavitat que ocupava i restes ennegrides de l'epidermis i les restes fibroses característiques del coll de l'arrel. Creiem que aquestes plantes no han sobreviscut més enllà de l'any i han estat descompostes pels fongs del sòl, fins i tot abans de ser inoculades amb la gírgola de panical. En desenterrar la planta, en cap d'aquests casos no observem restes de l'inòcul, i si n'hi ha, han estat colonitzades per altres fongs del sòl.



**Fig.6.19:** Infecció de rels d'*Eryngium campestre* adults en test: formació de primordis i carpòfors.



**Fig.6.20:** Infecció de rels d'*Eryngium campestre* adults en test: formació de primordis i carpòfors. A baix a la dreta carpòfor obtingut al inocular un gran nombre de plàntules joves.



**Fig.6.21:** Aspecte de les rels colonitzades. Les fletxes buides assenyalen el miceli present visible en el còrtex de l'arrel. Les fletxes plenes assenyalen les restes d'inòcul. Les rels s'han atansat a les restes d'inòcul en el moment de capturar les imatges.



**Fig.6.22:** Aspecte de les rels colonitzades obertes longitudinalment. La fletxa assenjala un primordi de *P. eryngii*.

---

## 6.4.- Discussió

### Variabilitat dels sòls on creix *P. eryngii*

S'ha caracteritzat la composició en minerals totals i solubles en els horitzó superior dels sòls on creixen les varietats tipus de *P. eryngii* i *P. nebrodensis*. Observem que els sòls on creix habitualment *P. eryngii* solen ser calcaris, amb pH al voltant de 8, i força pobres en matèria orgànica i nitrogen. Tot i això, creiem que l'acidesa del sòl no és un factor que condicioni el desenvolupament de *P. eryngii* var *eryngii*, ja que hem recollit bolets en localitats amb sòls més neutres o fins i tot àcids, com en el cas de la Vall d'Aran. Alguns recol·lectors habituals ens comenten també haver recollit el bolet en grans quantitats en parcel·les molt pasturades per vacum, possiblement degut a un millor desenvolupament dels *Eryngium* sobre els quals fructifica i al nitrogen dels fems i l'orina.

Els sòls on habita *P. nebrodensis* són terrenys de pH neutre, proper a 7 ( $7,2 \pm 0,26$ ). Si comparem les anàlisi per a ambdues espècies, observem diferències significatives en els nivells de Ca – que eren d'esperar per la diferència de pH- i també en alguns dels minerals totals que intervenen en el mecanisme de les ligninases, com el Cu, Mn i Zn, però no en la fase extractable. Malauradament no s'ha pogut determinar la matèria orgànica ni els %C %N orgànics en les mostres de *P. nebrodensis* per error. Tot i això, els C i N totals i l'abundor de vegetació en els prats de muntanya on hem trobat *P. nebrodensis* ens permeten deduir que aquests són més rics en matèria orgànica que en els estudiats per a *P. eryngii*, més si es té en compte que són més pobres en CaCO<sub>3</sub>, tal com es pot deduir pel pH i el Ca totals.

La mostra de sòl estreta a les rodalies de l'aïllat UBCC-1273, a la Vall d'Aran (*P. eryngii* cf. var. *ferulae*, de determinació incerta per la seva mida esporal, hàbit, i color blanquinós del barret) té un pH marcadament àcid típic dels sòls de la zona (pH 6,06), i no es pot assimilar amb claredat als sòls de *P. eryngii* ni de *P. nebrodensis* en base a la seva composició.

Finalment, és interessant observar la composició del sòl adjacent a les rels d'*E. maritimum* a on es desenvolupa *E. campestre*, com era d'esperar, molt pobre per a la majoria de sals minerals excepte K i S totals al tractar-se de sorra de platja. Els nivells de C total són molt elevats degut a la gran quantitat de petites restes de mol·luscs que acompanyen als grans de sorra. Malgrat que tampoc no s'ha pogut determinar els C i N orgànics per a aquesta mostra, els nivells indetectables de N fan evident la baixíssima composició de matèria orgànica en aquest sòl. Les soques de *P. eryngii* que viuen en aquest entorn han d'obtenir la pràctica totalitat de font d'aliment de les rels que parasiten. Tal i com hem pogut observar en les dunes de platja erosionades per temporals, les rels d'*E. maritimum*, molt engruixides i amb moltes reserves de nutrients i aigua, transcorren horitzontalment al arribar a fondàries d'1-2 m, formant una mena d'estrat amb una gran densitat d'arrels. És

possible que bona part de la propagació del fong d'una planta a una altra es produeixi en aquest estrat, on la probabilitat de contacte entre rels és molt alta.

## **Sistemes d'inoculació**

### **ÚS D'ESPORES PER A LA INOCULACIÓ**

Hem descartat l'ús de suspensions d'espores per a la inoculació de *P. eryngii* per diverses raons. En primer lloc, l'obtenció d'espores netes de contaminants i/o de restes de l'himeni en quantitats prou abundants com per a inocular conreus sencers resulta complex, i només es pot realitzar de forma pràctica obtenint carpòfors mitjançant un cultiu estàndard i extraient les espores mitjançant el triturat de l'himeni sencer. En segon lloc, hem observat que la viabilitat esporal davalla ràpidament amb el temps, i en dificulta la conservació durant dies. En tercer lloc, el desenvolupament inicial d'un miceli secundari en el sòl seria difícil, donada la manca d'una font de C i N que en permeti el creixement, pel que la inoculació s'haurà de fer de forma molt dirigida a les arrels i *a priori*, tindria un índex d'èxit molt baix. Finalment, el miceli dicariòtic resultant està condicionat per una meiosi, i fa molt difícil controlar les característiques del miceli, mentre que l'ús de miceli dicariòtic definitiu sí que permet la selecció de soques i un control més estricte sobre el procés.

En qualsevol cas, no hem observat cap fenomen d'autoinhibició esporal a partir del test de Fries.

### **CARBÓ ACTIU**

El carbó actiu és un compost capaç d'adsorbir un ampli espectre de compostos orgànics i inorgànics solubles. Els assaigs realitzats amb carbó actiu estaven encaratats a esbrinar si la presència d'aquest en el medi podria millorar la competitivitat de *P. eryngii* vers possibles antagonistes, donat el potencial que pot tenir en adsorbir metabòlits secundaris alliberats per aquests competidors, i de ser el cas, incorporar-lo en la formulació dels inòculs, especialment en els recobriments. Malauradament, sembla tenir l'efecte contrari, inhibint tant la germinació esporal com el creixement de *P. eryngii*, sobretot en entorns pobres en nutrients. La competitivitat de *P. eryngii* vers *Trichoderma sp.* tampoc no millora, ja que *P. eryngii* es veu més afectat que no pas l'antagonista. Per aquesta raó en descartem l'ús per a la formulació d'inòculs per a *P. eryngii* en entorns no estèrils.

### **SUSPENSIONS MICELIANES**

Com ja hem esmentat, és imprescindible la presència d'una font de C i N adequada per al desenvolupament micelià de fongs en sòls no estèrils. A jutjar pels resultats obtinguts en les proves d'inoculació mitjançant suspensions de miceli, *Pleurotus eryngii* no sembla capaç de desenvolupar-se a partir dels compostos orgànics presents en el sòl, pel que és necessari subministrar-li en el propi suport d'inoculació. Quelcom similar sembla

succeir en la seva capacitat per infectar rels de card panical; aquells procediments que no generen un miceli prou vigorós (com les suspensions micelïanes, o els inòculs amb base de fusta que hem assajat) mai no arriben a infectar la planta, fins i tot si l'inòcul es disposa en íntim contacte amb l'arrel de la mateixa.

### INOCULACIÓ MITJANÇANT FUSTA

No tots els suports sòlids colonitzats per *P. eryngii* són susceptibles de ser emprats per inocular-lo en sòls no estèrils. La fusta s'utilitza molt sovint en la inoculació de cultius exposats a l'exterior, com seria el cas del cultiu de shiitake sobre troncs, o de *Stropharia rugoso-annulata* sobre estella, ja que dona menys problemes a l'hora de contaminar-se gràcies al seu baix contingut de nitrogen, i atrau molt menys a insectes i rosegadors (Oei, P., 1996). Al contrari del que esperàvem, en els nostres assaigs aquest suport no ha donat bons resultants i es contamina fàcilment.

És possible que el grau de colonització de la fusta – més feble per ser molt més pobre en nutrients que en el cas de les llavors - sigui un factor clau i es requereixi assolir una biomassa micelïana crítica i/o tingui un temps de colonització òptim. Podem trobar alguns exemples per a altres basidiomicets: Zakaria, A. J. i Boddy, L., 2002 va emprar blocs de fusta per a la inoculació de *Resinicium bicolor* al sòl, obtenint millors resultats en blocs de fusta colonitzats a partir d'un inòcul crescut en agar extracte de malta (que actua d'esmena), i colonitzats durant 3 mesos, en comparació a 1 i 12 mesos d'incubació. Harold, S., Tordoff, G. M. et al., 2005 va detectar que *Hypholoma fasciculare*, es desenvolupa millor a partir de fusta colonitzada durant molt de temps. Cal ressaltar que encara que *P. eryngii* creix i és cultivable sobre fusta, no ho fa mai en condicions naturals, mentre que la fusta és l'hàbitat natural per a *Resinicium* i *Hypholoma* spp.

Finalment, la fusta nua és molt porosa, fet que pot afavorir l'entrada de contaminants i metabòlits secundaris presents en el sòl a l'interior del suport per capilaritat. El tipus de fusta i la forma dels depressors linguals emprats en el nostre estudi (amb una proporció volum/superfície molt petita) podrien no haver ajudat en aquest sentit.

### IMMOBILITZACIÓ EN HIDROGELS

De tots els sistemes d'inoculació estudiats, només hem aconseguit la infecció de plantes d'*E. campestre* en sòls no estèrils mitjançant llavors colonitzades i el procediment d'immobilització de serradures i segó en alginat.

Els sistemes d'immobilització en hidrogels són una tècnica molt versàtil i poc explorada per a inocular fongs, i per això l'hem volgut explorar a fons en el present estudi. En el nostre cas, permeten formular la composició de l'inòcul *ad hoc*, ja sigui a partir de compostos solubles, de suspensió dels components prèviament mòlts o fins i tot immobilitzant llavors senceres, sempre que siguin d'una mida prou petita. A més, hem aconseguit produir perles d'alginat amb dues capes concèntriques, de manera que es

podrien afegir altres components i/o microorganismes en la capa exterior d'alginat que actuessin de barrera contra competidors i afavorissin el creixement de *P. eryngii* en el sòl. El format resultant és molt manejable, i apte per a la sembra amb maquinària. Finalment, incorpora un contingut important d'aigua que a nivell teòric podria actuar de reservori disponible per al fong. Malauradament, hem comprovat que l'alginat presenta l'inconvenient de deshidratar-se amb molta rapidesa així que davalla la humitat relativa de l'entorn, impedingint alhora el desenvolupament del fong. No hem pogut resoldre per ara aquest greu inconvenient mitjançant un polímer alternatiu a l'alginat o un recobriments hidrofòbic que actuï de barrera contra la deshidratació.

Nogensmenys, el sistema d'immobilització de serradures no té aquest inconvenient, com a mínim de forma tant pronunciada. La raó principal és que la fusta i el segó, que es troben en la proporció més elevada possible que permet la formació de perles, actuen no només de font nutricional per al fong, sinó també com a matriu de suport, retenint part de l'aigua i mantenint l'estructura de la perla. Amb aquest procediment hem aconseguit la infecció de plantes adultes arrelades i de plantes d'un any en els nostres assaigs preliminars. Tot i això, els resultats obtinguts en la comparativa amb l'ús de llavors són inconsistents amb els primers i no hem obtingut creixements vigorosos a partir de l'inòcul. Creiem que el grau de colonització pot ser un factor clau i sigui necessari assolir una quantitat de biomassa crítica en el gra d'inòcul per a que *P. eryngii* sigui prou competitiu. El creixement de *P. eryngii* en serradures de fusta és més lent que sobre llavors hidratades i esterilitzades. Possiblement, amb l'addició d'una font de nutrients fàcilment assequibles i un temps d'incubació més llarg, s'obtidrien resultats molt més homogenis.

#### INÒCULS MITJANÇANT LLAVORS COLONITZADES

En tot cas, l'ús de llavors colonitzades per *P. eryngii* ha resultat ser amb molt, el millor procediment. Tot i que amb comportaments diferents, en tots tres casos –veces, colza i sègol – el suport no es contamina al ser aplicat en un sòl no estèril, i manté la capacitat de generar miceli que colonitzi l'entorn.

Hem incorporat les llavors de veça i de colza al nostre estudi per ser, a diferència del sègol, llavors esfèriques (fet que facilita l'aplicació de recobriments) i amb una testa o exosperma més resistent, que actuarà de barrera protectora mentre no haurà estat prou degradada pel basidiomicet. Per aquesta raó considerem important que en el procés de hidratació / esterilització les llavors no arribin a badar-se. Les llavors de colza, també s'han escollit per ser oleaginoses, amb un contingut de lípids al voltant del 40% (de Blas, C. et al, 1999) que *P. eryngii* pot emprar com a font d'energia per al seu desenvolupament, compensant en part la mida petita de la llavor. A més, aquesta mida petita facilita el pel·letitzat de la llavor. En el sentit oposat, hem escollit les llavors de veça per ser més grans, i per tant amb més nutrients per unitat d'inòcul.



Ben al contrari del que esperàvem, la llavor de sègol colonitzada és la que ha donat els millors resultats pel que fa a colonització de sòls no estèrils, amb una incidència de contaminacions gairebé nul·la i un gran vigor per part del miceli de *P. eryngii*. Aquest fet és sorprenent, tenint en compte la facilitat que tenen els inòculs a base de llavor de cereal per a contaminar-se -tant per fongs com per bacteris- quan s'utilitza en un cultiu industrial, ja que es tracta d'un suport amb molts nutrients fàcilment assequibles. De nou, creiem que un dels factors clau podria ser el grau de colonització del gra, en els nostres experiments força més avançat de l'habitual en el gra de sègol respecte al seu ús en cultius industrials, on el gra s'empra en la fase de creixement exponencial. D'aquesta manera el miceli hauria consumit bona part dels nutrients fàcilment assimilables, reduint el risc de contaminacions. Alhora encara manté una gran capacitat per a generar miceli, i un cop disposat al sòl aquesta capacitat de generar biomassa li permet desenvolupar ràpidament miceli al voltant del gra d'inòcul - i probablement la producció de més metabòlits secundaris -, que actuarien de protecció vers els organismes de l'exterior.

### **RECOBRIMENTS PLÀSTICS**

Un dels principals inconvenients a l'hora de fer servir llavors colonitzades com a inòcul es troba en la seva dificultat per a aplicar-les a camp de forma extensiva. El miceli que hi creix adhereix ràpidament les llavors entre elles, que s'han de desengrunar just abans de la seva aplicació. A més, les llavors són massa humides i no llisquen en la tolva d'una sembradora com ho faria una llavor. Especialment en el cas del sègol, les llavors s'han estovat molt per la degradació del fong i s'aixafen fàcilment. Una manipulació excessiva erosiona fàcilment el miceli superficial present i pot aixafar les llavors, malmetent-les i estimulant la contaminació per part d'altres microorganismes, pel que el procediment de sembra recomanable seria manual.

Al nostre parer, l'aplicació de polímers plàstics com a recobriment extern en inòculs - a coneixement de l'autor no proposat en la bibliografia precedent per a la inoculació de basidiomicets- pot facilitar sensiblement l'aplicació de llavors colonitzades a camp, donat que en millora la resistència mecànica i sobretot els confereix una superfície antiadherent, seca i més manipulable. És factible aplicar aquests recobriments sobre l'inòcul sense reduir significativament la capacitat de produir biomassa, tal i com hem comprovat en condicions *in vitro* i sobre sòls estèrils i no estèrils.

L'aplicació de recobriments d'aquesta mena poden tenir altres avantatges. En primer lloc, poden reduir significativament la taxa de deshidratació de l'inòcul si aquest es sotmet durant uns dies a humitats relatives baixes. En segon lloc confereixen hidrofobicitat en la superfície de l'inòcul, fent lo menys assequible a organismes competidors presents en l'exterior en els primers estadis de desenvolupament i evitant que bacteris i espores hi penetrin a l'interior per capilaritat.

Finalment, hem observat com el recobriment amb base acrílica pot estimular la formació de cordons micelians a partir de les unitats d'inòcul, fet que augmentaria l'eficàcia d'una

unitat d'inòcul per a colonitzar substrats adjacents. Malauradament es desconeixen per ara quins són els factors que estimulen la formació de cordons micelians en *P. eryngii*.

En el present estudi només hem incorporat recobriments amb base acrílica ja que cercàvem un producte comercial amb base aquosa, o en aerosol, que facilités l'aplicació sense risc a minvar la viabilitat del miceli de *P. eryngii*. Existeix però una gran diversitat de compostos que es podrien emprar amb aquesta finalitat (silicones, acrilats, resines de vinil acetat (Elvax), ceres...) i caldrà realitzar un estudi de materials i seleccionar aquells més idonis per la seva resistència mecànica, permeabilitat als gasos, i facilitat d'aplicació. En qualsevol cas, el recobriment haurà de ser prou fi i uniforme com per a que *P. eryngii* pugui travessar-lo amb facilitat; en l'assaig sobre veces un recobriment irregular i massa gruixut ha retardat l'emissió de miceli per part de *P. eryngii*, causant contaminacions. En el cas de polímers aplicats amb bases no aquoses (com en el cas de l'acrilat B emprat en el nostre estudi), caldrà aplicar-los mitjançant aerosols, per tal que el dissolvent s'evapori amb rapidesa i no afecti la viabilitat de *P. eryngii*.

Tot i que la dosi d'aplicació seria molt petita, la biodegradabilitat del polímer també és un factor a tenir en compte, entre d'altres, per raons mediambientals. Les resines i polímers acrílics són compostos força resistents a la degradació microbiana – avantatge del que ens servim -, i es degraden lentament en el sòl. *P. chrysosporium* i *P. ostreatus* poden degradar i mineralitzar compostos acrílics com la poliacrilamida (Mai, C., Schormann, W. et al., 2004; Han, C. F., Zheng, A. F. et al., 2006) solubilitzant-los i a la llarga, mineralitzant-los (Sutherland, G. R. J., Haselbach, J. et al., 1997), pel que l'ús de recobriments acrílics no hauria de suposar un problema en aquest sentit. *P. ostreatus* allibera lacases i peroxidases en mescles de sòl i copolímers d'acrilamida i àcid acrílic (Wolter, M., In der Wiesche, C. et al., 2002), i la limitació de nitrogen disponible i la presència de Mn<sup>2+</sup> són necessaris per a aquesta degradació en *P. chrysosporium* (Han, C. F., Zheng, A. F. et al., 2006), pel que sembla molt probable que les Mn-peroxidases del sistema ligninolític del fong – que també disposa *P. eryngii* - hi juguin un paper significatiu.

#### PEL·LETITZAT DE LLAVORS

El pel·letitzat de llavors amb matriu sòlida (*solid matrix seed pelleting*) és un altre procediment que podria facilitar l'aplicació de llavors colonitzades amb maquinària agrícola. A més, permetrien afegir altres components en forma de pols a la matriu del recobriment, ja sigui com a esmenes nutricionals, agents que actuïn de barrera contra les contaminacions (antibiòtics...) o fins i tot altres microorganismes beneficiosos (soques seleccionades de *Pseudomonas spp.*, etc.) que contribueixin a seleccionar la microbiota a favor del desenvolupament de *P. eryngii*. Al nostre coneixement, fins ara no havia estat proposat l'ús d'aquestes tècniques per a la inoculació de basidiomicets.

Malauradament no disposem de l'utillatge necessari per a l'aplicació d'aquests recobriments al nostre laboratori, pel que s'ha hagut d'encarregar el procés a una

empresa externa, qui es reserva part del procediment com a *know-how* propi. Les llavors recobertes han perdut una part important de la seva viabilitat, i el recobriment extern, que no s'ha pogut aplicar en condicions estèrils, es contamina amb facilitat al conservar les llavors pel·letitzades durant uns dies abans de la seva aplicació, fet que en minva dràsticament la viabilitat.

Malgrat aquests resultats negatius, creiem que aquest procediment té un potencial molt interessant, i se'n podrien millorar molt els resultats mitjançant una posta a punt, sobretot reduint la deshidratació de la llavor, i emprant llavors més grans (com la de sègol o les veces), que costarien més de deshidratar. També caldria poder aplicar el recobriment en condicions asèptiques, i seria adequat afegir un antibiòtic i/o antifúngic selectiu al recobriment, per a evitar la incorporació de contaminants en el mateix. Finalment, hem comprovat que *P. eryngii* pot desenvolupar-se a partir dels components del recobriment (que probablement empri com a agent adhesiu carboximetilcel·lulosa o altres fonts assequibles per al basidiomicet). Si bé aquests components podrien estimular el creixement de *P. eryngii*, també podrien resultar contraproductes, ja que també podria afavorir el creixement dels fongs competidors de l'exterior. De ser possible, seria recomanable identificar i substituir aquests components per agents més inaccessibles com a nutrient per la microbiota competidora.

## **Comportament de *P. eryngii* en el sòl**

Els nostres resultats mostren una evident fungistasi del sòl emprat en els nostres assaigs contra *P. eryngii*, condicionada a la presència de microorganismes present en el mateix.

És interessant observar com l'extensió de sòl colonitzada per *P. eryngii* retrocedeix en sòls estèrils al incubar les mostres a llarg termini, assolint superfícies colonitzades properes o fins i tot inferiors als tractaments sobre sòl no estèril. Probablement aquest retrocés es deu a una autòlisi del miceli menys dens a causa de l'esgotament dels nutrients que es translocaven des de l'inòcul. En canvi, en els tractaments sobre sol no estèril la superfície colonitzada es manté o fins i tot augmenta significativament respecte els tractaments crescuts durant 10 dies.

El fenomen més rellevant que hem observat en aquest assaig és la producció de cordons micelians per part de *P. eryngii*, no descrita fins ara en la bibliografia precedent. En les condicions estudiades, el patró de creixement d'aquests cordons micelians no presenta un patró de creixement radial i ramificat com el descrit per a altres basidiomicets saprotròfics com *Stropharia caerulea*, *Phanaerochaete velutina*, o *Hypholoma fasciculare*, entre d'altres (Donnelly, D. P. i Boddy, L., 2001), sinó que es formen amb un tropisme molt evident, vers les unitats d'inòcul més properes. Els cordons observats són formats per una agregació d'hifes molt simple, i no hem observat cordons madurs amb un còrtex diferenciat.

La formació de cordons micelians per part de *P. eryngii* sembla clarament vinculada a la presència de microorganismes en el sòl (només l'hem observat en els tractaments sobre sòl no estèril). Hem observat la formació d'aquests cordons micelians en totes les llavors, però la seva abundància varia força segons el tipus d'inòcul emprat. La formació de cordons no sembla estar vinculada a la quantitat de biomassa que pot generar cada unitat d'inòcul, ja que s'observen cordons abundants tant en el tractament amb sègol com en la colza recoberta amb acrilat, però no en els tractaments amb veces. Les llavors de colza amb recobriment acrílic arriben a interconnectar els diferents grans d'inòcul entre sí amb la mateixa eficàcia (mateix nombre d'unitats connectades) que els grans de sègol, però emprant una quantitat de biomassa molt menor.

Avui dia es coneix que les lacases participen en la formació d'agregats micelians com en els cordons micelians i rizomorfs (Burke, R. M. i Cairney, J. W. G., 2002). Probablement també hi intervinguin les hidrofobines, que entre d'altres funcions intervenen en els processos d'adhesió entre hifes (Wösten, H. A. B., 2001). Tot i això, els processos que n'indueixen i estimulen la formació són per ara poc coneguts. Tot i que no es coneixen avui dia hidrofobines descrites per a *P. eryngii*, sí se n'ha identificat com a mínim una seqüència molt similar a la hidrofobina AA-Pri2 de *Agrocybe aegerita* (Santos, C. i Labarere, J., 1999). Tenint en compte aquest fet, la ubiqüitat d'aquests enzims en els basidiomicets, i el rol que juguen en l'adhesió entre hifes i amb la paret cel·lular vegetal en la infecció de vegetals, és més que probable que *P. eryngii* n'excreti, com en el cas de *Pleurotus ostreatus*, que sí ha estat estudiat i per al que s'ha descrit tres hidrofobines, dues d'elles expressades en miceli vegetatiu (Ásgeirsdóttir, S. A., De Vries, O. M. H. et al., 1998; Peñas, M. M., Rust, B. et al., 2002).

En qualsevol cas, desconeixem per ara quins són els factors que indueixen la formació de cordons micelians, ni per quina raó el recobriment amb base de pintura acrílica sobre les llavors de colza n'ha activat d'una forma tant significativa la formació, respecte el tractament sense recobriment. Una possible hipòtesi seria que el recobriment hagi actuat de barrera reduint la difusió en el medi de possibles metabòlits secundaris que indueixen la formació de cordons micelians. Per altra banda, ja hem vist que el sistema ligninolític de fongs de podriment blanc com *P. eryngii* pot arribar a degradar compostos acrílics; els metabòlits secundaris fruit d'aquesta activitat enzimàtica també en podrien haver promogut la formació.

L'esgotament dels nutrients en el gra d'inòcul també podria ser un dels factors que estimuli la producció de cordons, ja que només observem cordons micelians evidents al incubar el basidiomicet a llarg termini. Es coneix que l'expressió de gens per a les hidrofobines està regulada per l'absència de fòsfor en *Pholiota nameko* (Peñas, M. M., Rust, B. et al., 2002), i de forma força universal per la manca de N en el cas de les lacases (Baldrian, P., 2006), fet que fa força versemblant aquesta hipòtesi.

Per altra banda, hem observat l'aparició de cordons a partir de llavors de sègol amb un tropisme evident vers la rel de plàntules d'*Eryngium campestre*, en sòls no estèrils. En aquest cas, la formació de cordons és més prematura, i solen dirigir-se directament des de la unitat d'inòcul fins la rel de la planta abans de formar-se entre les llavors d'inòcul. Aquest fet suggereix una possible estimulació de la formació de cordons i un quimiotropisme vers la presència d'exsudats de la mateixa. En les proves d'infecció de plàntules en condicions estèrils sobre agar no apareixen cordons, ni s'hi observa un creixement diferenciat per part de les colònies de *P. eryngii* en direcció a les plàntules d'*E. campestre*, pel que és probable que els microorganismes presents en la rizosfera de la planta també hi juguin un paper important. Alguns treballs precedents aporten evidències que recolzarien aquesta hipòtesi; per exemple, s'han aïllat soques bacterianes (*Pseudomonas spp.*) a partir de sòls de cobertura en cultius industrials que promouen el desenvolupament micelià i la formació de primordis de *P. eryngii* amb l'alliberació de metabòlits secundaris (Kim, M. K., Math, R. K. et al., 2007). A més, Castelnuovo, G. i Granetti, B., 1996 ha aïllat soques bacterianes a les proximitats de rels de *P. eryngii* i *P. ferulae* que inhibeixen el creixement de *Trichoderma spp.*, però no el de *P. eryngii*.

La evidència de formació de cordons, conjuntament amb la resta de resultats obtinguts ens permeten hipotetitzar sobre la biologia de *P. eryngii* a camp, per ara força desconegut. Al nostre entendre, el principal mecanisme de propagació de *P. eryngii* seria a través del sòl, mitjançant la formació de cordons que permetrien al basidiomicet colonitzar nous peus d'*E. campestre*. Aquests cordons es formarien preferentment en els horitzons superiors del sòl, a on es desenvolupa la major part de l'activitat microbiana, dirigint-se activament vers plantes no colonitzades i vers aquells substrats colonitzats per la mateixa soca. D'aquesta manera es formaria una xarxa que interconnecta els diferents peus d'*E. campestre* colonitzats, fet que permetria la translocació d'aigua i nutrients. Donada la seva condició de saprotrofic, probablement *P. eryngii* empra també restes de rels mortes i pugui infectar ocasionalment plantes vives de la flora acompanyant en el seu recorregut. La capacitat de translocació de nutrients entre els diferents peus infectats i la possibilitat d'infectar aquestes plantes explicaria les nostres troballes ocasionals sobre hostes no típics. La formació de cordons suposa un avantatge competitiu per al fong, ja que el fa més eficient a l'hora d'explorar el terreny i de translocar nutrients. A més, el fa més robust al dany, ja que la pèrdua d'una de les fonts de nutrients (per esgotament o a causa de competidors) o d'algunes connexions (p. ex., per l'efecte d'insectes fungívors) afecta molt menys a la capacitat de supervivència del conjunt (Boddy, L., Hynes, J. et al., 2009).

Aquest comportament explicaria també la capacitat de *P. eryngii* per a sobreviure durant anys en ambients erms, típicament assolellats i amb una pluviometria estival molt reduïda. En l'època seca, *P. eryngii* podria sobreviure en les rels colonitzades d'*E. campestre*, i refer la xarxa miceliana en temps humit gràcies al tropisme vers altres fraccions orgàniques colonitzades que hem observat.

Com és obvi, el segon mecanisme de propagació de *P. eryngii* es realitza a través d'espores. Aquest mecanisme permet a *P. eryngii* dispersar-se a distàncies més grans, tot i

que és de preveure que l'eficiència d'aquest mecanisme sigui molt reduïda; a jutjar pels nostres resultats la capacitat de supervivència de les espores de *P. eryngii* sembla ser força limitada. A més, cal tenir en compte que la majoria de les espores alliberades pel bolet cauen a poca distància del carpòfor, i que en condicions naturals, la viabilitat esporal en espores hialines davalla més del 95% subjectes a radiació UV en uns pocs dies (Kallio, T., 1973). A més, el miceli primari de *P. eryngii* - com la majoria de basidiomicets - té una capacitat de creixement molt limitada, i de formar-se un miceli secundari, aquest no serà capaç de sobreviure en el sòl durant gaire temps sense colonitzar un substrat d'on poder adquirir nutrients, ja que la seva capacitat d'extreure nutrients del sòl sembla ser molt limitada. Això explicaria que en les localitats on hem trobat *P. eryngii* aquest aparegui en erols limitats i no es dispersi amb facilitat a les poblacions de card panical properes.

Les rels d'*Eryngium campestre* arriben a grans profunditats en el subsòl. Hem observat com *P. eryngii* infecta i parasita la rel del card panical, colonitzant-la i degradant ràpidament els teixits menys lignificats. En tots els nostres assaigs les plantes infectades per *P. eryngii* moren, independentment de l'edat i l'estadi de desenvolupament de la planta, podent colonitzar fins i tot plàntules acabades de germinar. Ens és desconegut si *P. eryngii* té capacitat de colonitzar tota la rel del card panical o si només té capacitat per colonitzar-la fins a una certa fondària. En els nostres assaigs in vitro hem observat com les rels de card panical reaccionen ocasionalment a la colonització formant ramificacions a la rel principal, en general força rares en aquesta planta. Si aquest fenomen també ocorre en l'habitat natural, i *P. eryngii* no n'arribés a colonitzar les rels més fondes, la planta podria sobreviure a la colonització, ramificant les rels i formant nous peus. Això explicaria també la convivència de peus d'*Eryngium campestre* infectats i no infectats en una mateixa població, i el fet que un erol de *P. eryngii* hi pugui viure durant anys sense acabar consumint tots els hostes presents en la mateixa.

En les proves d'infecció de plàntules en sòl no estèril sovint s'han format primordis de *P. eryngii* tant bon punt els cordons entren en contacte amb l'arrel. Sembla probable que la fructificació de *P. eryngii* sigui estimulada per la presència d'exsudats i/o flora bacteriana present en la rizosfera d'*E. campestre*, i en condicions naturals aquests hi tinguin un paper rellevant, a més dels factors clàssics (llum, CO<sub>2</sub> i temperatura). De confirmar-se aquest extrem, s'explicaria el fet que amb comptades excepcions, *P. eryngii* fructifiqui només sobre els seus hostes típics.

### **Proposta d'un procediment de cultiu a camp**

La inoculació de fragments de rel d'*Eryngium campestre* arrelats en sòl mitjançant llavors colonitzades ha donat lloc a un percentatge important de rels infectades. La major part d'aquestes ha donat lloc a primordis o carpòfors, que nogensmenys no han arribat a desenvolupar-se i madurar correctament. Creiem que això és degut a la manca de biomassa radicular suficient - la rel principal dels *Eryngium* arrelats pràcticament no s'ha

desenvolupat -, de la mateixa manera com passaria en un cultiu industrial del bolet sobre un volum insuficient de substrat.

És possible doncs inocular i infectar rels de card panical en sòls no estèrils amb les tècniques al nostre abast i per tant fer viable cultivar *P. eryngii* directament a camp, sobre els seus hostes naturals. Resta encara molta recerca i posta a punt pendent per a fer-ne un sistema de cultiu econòmicament rendible, però en base al conjunt de resultats obtinguts, podem proposar un primer procediment de cultiu a partir del qual basar les futures recerques.

El cultiu de *P. eryngii* a camp es realitzaria preferentment sobre un cultiu d'*Eryngium campestre* o d'algun altre dels seus hostes típics, seleccionant en aquest cas la varietat corresponent del basidiomicet. El marc de plantació de l'hoste hauria de ser el més dens possible (p. ex. 10x10 plantes / m<sup>2</sup>, per tal d'afavorir la propagació del basidiomicet (vegis capítol 5 per a les consideracions sobre el cultiu d'*E. campestre*). L'hoste hauria de desenvolupar-se durant prou temps (possiblement més de 2 anys, en el cas d'*E. campestre*) i de manera que es generi una biomassa radicular abundant, ja que aquesta condicionarà en gran mesura la productivitat del cultiu.

La inoculació de *P. eryngii* es realitzaria a mitjans de tardor, mitjançant llavors colonitzades, preferentment sègol o llavor de colza, de forma dirigida a la proximitat de l'arrel o en una densitat prou elevada com per garantir que les unitats d'inòcul es situïn a distàncies no superiors als 5 cm de les rels de l'hoste, i amb una fondària de 5 a 10 cm. En el cas d'utilitzar llavor de colza colonitzada és recomanable aplicar un recobriment amb base acrílica segons s'ha descrit als materials i mètodes, ja que redueix el risc de deshidratació i sobretot sembla induir la formació de cordons a partir de les unitats d'inòcul. En primera instància, no seria recomanable esmenar el terreny amb adob o matèria orgànica durant la temporada prèvia a la inoculació, per tal de no afavorir el creixement de microorganismes competidors.

Des del moment de la seva inoculació és necessari mantenir el terreny amb una humitat relativament elevada durant els tres primers mesos, per tal d'afavorir el desenvolupament micelià de *P. eryngii* i la infecció de les plantes adjacents. De ser necessari, el sistema de rec més idoni seria per aspersió, i en cap cas localitzat o per degoteig, ja que convé mantenir la humitat homogènia en tot el terreny i afavorir la formació de cordons entre els diferents punts d'inòcul i amb les arrels de l'hoste. L'ús de tècniques d'ombregat també podria afavorir el procés. Si la colonització de *P. eryngii* fos òptima, els primers carpòfors ja podrien aparèixer als dos mesos – sempre que les condicions climatològiques ho permetessin –. Les produccions podrien allargar-se més enllà de la primera temporada, i fins i tot establir-se una parcel·la productora estable, sempre que els hostes hagin generat rels prou profundes i ben desenvolupades.

## Inconvenients crítics i recerca pendent.

Malauradament, el sistema de cultiu de *P. eryngii* proposat encara dista molt de poder ser un procediment fiable. Al nostre entendre hi ha encara tres factors clau que cal resoldre:

1.- Cal realitzar una posta a punt del sistema de cultiu dels hostes coneguts de *Pleurotus eryngii*.

La producció d'una biomassa radicular suficient és cabdal per a garantir una productivitat suficient de *P. eryngii*. Com ja hem exposat (Vegis discussió i conclusions al capítol 5) els hostes típics de les diferents varietats de *P. eryngii* són plantes fins ara no cultivades per l'home, i serà necessari optimitzar-ne el cultiu.

2.- Cal esbrinar si existeixen factors crítics que condicionin el desenvolupament de *P. eryngii* en sòls diferents i esbrinar quins són.

Els nostres assaigs han estat realitzats sobre sòl procedent d'una localitat productora de *P. eryngii*, i per tant conductor per al creixement del bolet. Nogensmenys, *P. eryngii* té una freqüència desproporcionadament reduïda en comparació a la d'*E. campestre* i no es desenvolupa en tots els hàbitats a on aquests es troba present. A més, hi ha indicis que la presència de *P. eryngii* podria ser afavorida per algunes pràctiques agrícoles, com el guaret, o la pastura d'oví i cabrum. Tot plegat fa pensar que hi ha altres factors que condicionen en gran mesura la capacitat de desenvolupament de la gírgola de panical, més enllà de la presència o absència dels seus hostes naturals. De ser així, no tots els terrenys de cultiu serien necessàriament adients per al cultiu del bolet, i fins i tot, els tractaments agronòmics emprats per al cultiu de les plantes hoste en podrien alterar la idoneïtat per al desenvolupament de *P. eryngii*. La composició i textura del sòl, la seva flora microbiològica, i la presència d'una determinada flora vegetal acompanyant són al nostre entendre els factors amb més risc d'afectar el desenvolupament de *P. eryngii*.

3.- Desconeixem quins són els factors que indueixen la formació de cordons micelians en *P. eryngii*.

En els nostres assaigs hem obtingut respostes molt diferents en el creixement de *P. eryngii*, i no tots els sistemes d'inoculació han donat lloc a cordons micelians en la mateixa proporció en un mateix sòl. La capacitat de formació de cordons sembla un factor clau a l'hora d'explicar la propagació de *P. eryngii* en el sòl, i sens dubte, per a l'efectivitat de la inoculació del bolet a camp, independentment de la idoneïtat del terreny per al desenvolupament del fong.



A banda de resoldre aquests tres factors crítics, també serà necessari optimitzar els processos, tant de cultiu de la planta hoste com en l'elaboració de l'inòcul i la seva aplicació a camp. Finalment, serà necessari realitzar un estudi de viabilitat econòmica del procediment de cultiu en base a un anàlisi de costos i la productivitat de plantacions pilot.

---

## 6.4.- Conclusions

Presentem en aquest treball un primer estudi sobre quins serien els procediments més idonis per a la inoculació de *P. eryngii* en el sòl, per tal de cultivar-lo sobre els seus hostes naturals, així com un estudi del seu comportament en el sòl i del procés d'infecció del seu hoste típic, *E. campestre*.

Presentem una primera aproximació dels rangs més habituals pel que fa al pH i contingut mineral a partir de 18 mostres de sòl on s'ha recol·lectat *P. eryngii* i *P. nebrodensis*. A grans trets, solen ser terrenys relativament pobres en matèria orgànica i nitrogen. Els sols on creix *P. nebrodensis* presenta diferències significatives en el percentatge de Ca i Cu totals (més elevats en les mostres on creix *P. eryngii*) i en els percentatges de C, N, Fe Mn, Zn i P totals i en el Ca i Mg de la fracció d'intercanvi catiònic respecte els sols estudiats per a *P. eryngii*. Aquest últim sol créixer en terrenys amb pH calcari (al voltant de 8,0), mentre que *P. nebrodensis* sol créixer en terrenys amb pH de caire neutre (vora 7,2).

La presència de carbó activat inhibeix *in vitro* la germinació esporal de *P. eryngii* i el creixement micelià del mateix, especialment en condicions de manca de nutrients. Tampoc no millora la capacitat de *P. eryngii* de competir vers *T. harzianum*, pel que en descartem la seva aplicació en sistemes d'inoculació de *P. eryngii* a camp.

Entre els sistemes considerats per a la inoculació de *P. eryngii* a camp (espores, suspensions micelïanes, fusta colonitzada, llavors colonitzades i immobilització de substrats en hidrogels), l'ús de llavors colonitzades és el procediment que ha donat millors resultats. Descartem l'ús d'espores per la seva ràpida pèrdua de viabilitat, i sobretot per que impedeixen l'ús de soques seleccionades, ja que el miceli dicariòtic resultant ve condicionat per una meiosi. Les nostres inoculacions mitjançant suspensions de miceli i fusta colonitzada no han donat lloc a infeccions sobre rels de card panical, fins i tot estant en íntim contacte amb l'arrel, pel que no les considerem bons candidats.

Les tècniques d'immobilització en hidrogels tenen un potencial interessant per a la formulació d'inòculs. La majoria de formulacions tendeixen però a deshidratar-se ràpidament, impeding l'emergència del miceli. Presentem una formulació a base de fusta i segó molturats i immobilitzades en perles d'alginat que evita aquest inconvenient en gran mesura, i a partir del qual hem obtingut infeccions de plantes d'*E. campestre* arrelades en test. Nogensmenys, el procediment és encara poc fiable, ja que en alguns casos es contamina o no té capacitat de colonitzar en sòls no estèrils, i encara requereix d'una posta a punt, optimitzant-ne el grau de colonització i la composició del substrat immobilitzat.

Dels tres tipus de llavors estudiats (veces, colza i sègol), les llavors de sègol són el suport per a la inoculació de *P. eryngii* que ha permès una millor colonització del sòl no estèril

en condicions in vitro. Les llavors de sègol han estat incubades més temps al que correspondria per al seu ús en cultius industrials, fet que pot haver millorat la seva resistència als contaminants presents al sol.

El sòl d'una localitat a on habita *P. eryngii* de forma natural ha donat lloc a una inhibició del creixement del basidiomicet respecte al mateix sòl esterilitzat (fungistasi). *P. eryngii* no s'expandeix a través del sòl no estèril com ho faria sobre el mateix sòl esterilitzat. En primera instància creix de forma densa i localitzada al voltant de l'inòcul, i a partir d'aquest punt pot formar cordons micelians que li serveixen per propagar-se de forma efectiva a través del sòl. A coneixement de l'autor és el primer cop que es descriuen aquests cordons com a sistema de propagació en el sòl per a *P. eryngii*.

Aquests cordons tenen un tropisme que els permet interconnectar de forma dirigida diverses unitats d'inòcul colonitzades per la mateixa soca de *P. eryngii* però separades entre sí. En la proximitat d'una rel de card panical no infectada, també té capacitat de propagar-se de forma dirigida vers l'arrel mitjançant cordons, infectant-la. Els cordons només es formen en sòls no estèrils. La quantitat de cordons que es formen varia molt en funció de la composició de l'inòcul emprat, i no depèn de la quantitat de biomassa que es poden arribar a produir. En les condicions del nostre assaig, un recobriment plàstic sobre la llavor de colza colonitzades n'ha estimulat la formació de forma significativa. Sembla evident que els microorganismes del sòl tenen un paper clau en la formació d'aquests cordons, però desconeixem quins són els factors que indueixen aquest comportament.

Totes les plantes infectades per *P. eryngii* acaben essent ràpidament colonitzades i moren, independentment de l'edat i de la fase de desenvolupament de la planta. *P. eryngii* no sembla colonitzar les parts verdes d'*E. campestre* vius. En sòls no estèrils, sovint es formen primordis de bolet sobre la planta al poc temps de ser infectada, pel que és probable que els exsudats o els microorganismes presents en la seva rizosfera n'indueixin la fructificació.

En base als resultats obtinguts formulem a nivell hipotètic un model de creixement de *P. eryngii* en el sòl, en el que els cordons hi tindrien un paper clau al permetre interconnectar peus de card panical colonitzats, translocar nutrients i colonitzar nous peus de card panical.

De la mateixa manera, proposem un primer procediment per al cultiu de *P. eryngii* a camp sobre els seus hostes naturals vius, en base a la informació recollida i els resultats obtinguts. Identifiquem tres factors limitants que caldrà investigar abans de fer-ne un sistema de cultiu fiable; en especial, la posta a punt del cultiu i producció de biomassa radicular dels seus hostes, esbrinar si existeixen factors microbiològics o edafològics que condicionin el desenvolupament de *P. eryngii* en sòls de diferent natura, i finalment, conèixer quins factors n'indueixen la formació de cordons micelians, per tal de potenciar-los.



# 7. Conclusions.

---

Resumim a continuació quines són les principals aportacions científiques en aquest treball.

- El grup *eryngii* està representat a Europa per *P. nebrodensis* i les varietats *P. eryngii* var. *eryngii*, *ferulae* i *elaeoselini*, totes elles amb mides esporals estadísticament diferents. No hem trobat raons que ens permetin diferenciar la varietat *thapsiae* sensu *Venturella et. al.* de *P. eryngii* var. *ferulae*.
- *Pleurotus eryngii* es troba representat als Països Catalans per les varietats *eryngii* i *ferulae*. Es tracta d'un bolet poc freqüent al Principat, tot i que la seva distribució sembla força estesa per tot el territori.
- Els carpòfors blancs del complex *eryngii* obtinguts a la Vall d'Aran presenten mides esporals similars a la varietat *ferulae* i un patró de creixement in vitro molt diferenciat, pel que es podria tractar d'un tàxon diferent.
- Els aïllats de les diferents varietats de *P. eryngii* tendeixen a créixer seguint uns patrons morfològics determinats. No s'ha pogut establir però llinars per als paràmetres morfològics mesurats que serveixin per diferenciar les diferents varietats.
- El pH del substrat no afecta la germinació de les llavors d'*Eryngium campestre* dins d'un rang de pH 6-9. La germinació de les llavors d'*Eryngium campestre* és irregular en cambra humida i en torba neutralitzada, però molt més estable en el sòl calcari d'una població d'*Eryngium* emprat en els nostre estudi.
- Les llavors d'*Eryngium campestre* recollides en poblacions naturals presenten un índex de germinació molt variable, entre el 65,3 i el 3,8 %. La incidència d'insectes fitòfags i paràsits en les inflorescències són la causa principal d'aquesta variabilitat. El moment òptim per a la recol·lecció de llavors es dona tot just assecar-se la inflorescència.
- Les llavors d'*Eryngium campestre* recollides a partir de les inflorescències no presenten fenòmens de dormància. Nogensmenys, un tractament de fred sobre les llavors hidratades indueix una dormància fisiològica en les llavors d'*Eryngium campestre*, fenomen no descrit anteriorment per a aquesta espècie.

- El sòl d'una parcel·la natural on viu *P. eryngii* pot causar una fungistasi sobre el desenvolupament de *P. eryngii*. Aquesta fungistasi està directament vinculada als microorganismes que hi creixen i desapareix al esterilitzar el sòl.
- *Pleurotus eryngii* pot propagar-se en aquests sòls no estèrils mitjançant cordons micelians. Aquests cordons presenten un tropisme evident vers altres substrats colonitzats per la mateixa soca i vers les arrels d'*E. campestre*, infectant-les. Aquestes estructures no havien estat descrites anteriorment per a *P. eryngii*.
- El sistema més idoni per a la inoculació de *P. eryngii* a camp és l'ús de llavors colonitzades. El seu grau de colonització pot influir molt en l'èxit de la inoculació.
- L'aplicació d'una pel·lícula acrílica sobre llavors de colza pot induir la formació de rizomorfs, millorant l'eficàcia en la inoculació.
- El cultiu de *P. eryngii* a camp és un sistema de cultiu viable, tal com demostra la obtenció de carpòfors sobre *E. campestre* arrelats en test. Identifiquem tres factors limitants que encara cal resoldre per a fer-lo fiable i econòmicament rendible:
  1. Cal seleccionar i posar a punt el cultiu de la planta hoste amb la finalitat d'obtenir biomassa radicular de forma eficaç.
  2. Cal identificar si existeixen factors edafològics i/o microbiològics en el sòl que puguin impedir o condicionar el desenvolupament de *P. eryngii* en un cultiu.
  3. Cal identificar quins són els factors que indueixen o estimulen la formació de rizomorfs de *P. eryngii* en el sòl.

## 8. Bibliografia.

---

- A'BEAR, A. D., BODDY, L., RASPOTNIG, G., i JONES, T. H. (2010): Non-trophic effects of oribatid mites on cord-forming basidiomycetes in soil microcosms. *Ecological Entomology* 35 (4): 477-484.
- ABDOLLAHZADEH, J., ASEF, M. R., i MIRMAHMOODI, T. (2007): The *Pleurotus eryngii* species-complex in Kurdistan region of Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 (17): 3006-3009.
- ABORISWILL, S. O. i CLANCY, K. J. (2002): A protocol for evaluation of the role of disinfectants in limiting pathogens and weed moulds in commercial mushroom production. *Pest Management Science* 58: 282-289.
- AEDO, C., CASTROVIEJO, S. et al. (2003). Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Araliaceae-Umbelliferae. Ed. Real Jardín Botánico-CSIC. Madrid. 498 pp.
- AGUASCA, M., LLISTOSELLA, J., SIQUIER, J. L., i CONSTANTINO, C. (1992): Contribució a la flora dels macromicets de l'illa de Mallorca. *Fol.Bot.Misc.* 8: 5-43.
- AITCHISON, J. E. T. (1888): The Botany of the Afghan Delimitation Commission. *Transactions of the Linnean Society of London. 2nd Series: Botany.* 3 (1): 1-150.
- AKYUZ, M. i KIRBAG, S. (2010a): Effect of various agro-residues on nutritive value of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi. *Tarim Bilimleri Dergisi* 16 (2): 83-88 (Abstract).
- AKYUZ, M. i KIRBAG, S. (2010b): Element contents of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. var. *eryngii* grown on some various agro-wastes. *Ekoloji* (74): 10-14 (Abstract).
- AKYUZ, M. i YILDIZ, A. (2008): Evaluation of cellulosic wastes for the cultivation of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. *African Journal of Biotechnology* 7 (10): 1494-1499.
- ANDERSSON, B. E., LUNDSTEDT, S., TORNBERG, K., SCHNÖRER, Y., ÅBERG, L. G., i MATTIASSON, B. (2003): Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (6): 1238-1243 (Abstract).
- ANDERSSON, B. E., WELINDER, L., OLSSON, P. A., OLSSON, S., i HENRYSSON, T. (2000): Growth of inoculated white-rot fungi and their interactions with the bacterial community in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, as measured by phospholipid fatty acids. *Bioresource Technology* 73 (1): 29-36.

- ARIMA, J., CHIBA, M., ICHIYANAGI, T., YABUTA, Y., MORI, N., i AIMI, T. (2010): Eryngase: A *Pleurotus eryngii* aminopeptidase exhibiting peptide bond formation activity. *Applied Microbiology and Biotechnology (Historical Archive)* 87 (5): 1791-1801.
- ARO, N., PAKULA, T., i PENTTILA, M. (2005): Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29 (4): 719-739.
- ÁSGEIRSDÖTTIR, S. A., DE VRIES, O. M. H., i WESSELS, J. G. H. (1998): Identification of three differentially expressed hydrophobins in *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *Microbiology* 144 (11): 2961-2969.
- ASSAVANIG, A., AMORNKITTICHAROEN, B., EKPAISAL, N., MEEVOOTISOM, V., i FLEGEL, T. W. (1992): Isolation, characterization and function of laccase from *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38 (2): 198-202.
- AYOTAMUNO, J. M., OKPARANMA, R. N., DAVIS, D. D., i ALLAGOA, M. (2010): PAH removal from Nigerian oil-based drill-cuttings with spent oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) substrate. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 8 (3-4 PART 2): 914-919 (Abstract).
- BAE, J., KIM, Y., I, JUNG, S., OH, Y., i KWAK, W. (2006): Evaluation on feed-nutritional value of spent mushroom (*Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii*, *Flammulina velutipes*) substrates as a roughage source for ruminants. *Journal of Animal Science and Technology* 48 (2): 237-246.
- BAEZA, A., GUILLÉN, F. J., i HERNÁNDEZ, S. (2002): Transfer of Cs-134 and Sr-85 to *Pleurotus eryngii* fruiting bodies under laboratory conditions: A compartmental model approach. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69 (6): 817-828.
- BAEZA, A., GUILLEN, J., PANIAGUA, J. M., HERNANDEZ, S., MARTIN, J. L., DIEZ, J., MANJÓN, J. L., i MORENO, G. (2000): Radiocaesium and radiostrontium uptake by fruit bodies of *Pleurotus eryngii* via mycelium, soil and aerial absorption. *Applied Radiation and Isotopes* 53 (3): 455-462.
- BALDRIAN, P. (2004): Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology* 50 (3): 245-253.
- BALDRIAN, P. (2006): Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215-242.
- BALDRIAN, P. (2008): Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology* 1 (1): 4-12.
- BALDRIAN, P. i GABRIEL, J. (2002): Copper and Cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters* 206: 69-74.
- BALDRIAN, P., WIESCHE, C., GABRIEL, J., NERUD, F., i ZADRAZIL, F. (2000): Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Applied and environmental microbiology* 66 (6): 2471-2478.



- BALLERO, M., MASCIA, E., RESCIGNO, A., i SANJUST, E. (1991): Impiego di *Pleurotus* per trasformare i polifenoli delle acque reflue di frantoio in proteine. *Micologia Italiana* (3): 39-41.
- BANCI, L., CAMARERO, S., MARTINEZ, A. T., MARTINEZ, M. J., PEREZ-BOADA, M., PIERATTELLI, R., i RUIZ-DUENAS, F. J. (2003): NMR study of manganese(II) binding by a new versatile peroxidase from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 8 (7): 751-760.
- BANERJEE, U. C., CHRISTI, Y., i MOO-YOUNG, M. (1993): Spectrophotometric determination of mycelial biomass. *Biotechnology Techniques* 7 (4): 313-316.
- BAO, D. P., ISHIHARA, H., MORI, N., i KITAMOTO, Y. (2004): Phylogenetic analysis of oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) based on restriction fragment length polymorphisms of the 5' portion of 26S rDNA. *Journal of Wood Science* 50 (2): 169-176.
- BAO, D. P., KINUGASA, S., i KITAMOTO, Y. (2004): The biological species of oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) from Asia based on mating compatibility tests. *Journal of Wood Science* 50 (2): 162-168.
- BAO, H. N. D., OSAKO, K., i OHSHIMA, T. (2010): Value-added use of mushroom ergothioneine as a colour stabilizer in processed fish meats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90 (10): 1634-1641.
- BARRASA, J. M., GUTIERREZ, A., ESCASO, V., GUILLEN, F., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (1998): Electron and fluorescence microscopy of extracellular glucan and aryl-alcohol oxidase during wheat-straw degradation by *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 325-332.
- BARRY, D. J., CHAN, C., i WILLIAMS, G. A. (2009): Morphological quantification of filamentous fungal development using membrane immobilization and automatic image analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 36 (6): 787-800.
- BAS, C. i BOECKOUT, T. (1998): *Pleurotaceae* Over. ex Kühner. *En: Flora Agaricina Neerlandica*, Pàg. 19 - 30. Ed. A.A.Balkema.
- BASKIN, C. C. i BASKIN, JERRY M. (1998). Seeds. Ecology, Biogeography and evolution of dormancy and germination. Ed. Academic Press.
- BASKIN, J. M. i BASKIN, C. C. (1979): Studies on the autecology and population biology of the weedy monocarpic perennial *Pastinaca sativa*. *Journal of Ecology* 67: 601-610.
- BASKIN, J. M. i BASKIN, C. C. (1990): Seed germination ecology of poison hemlock, *Conium maculatum*. *Canadian Journal of Botany* 68: 2018-2024.
- BATTARRA, G. A. (1759). *Fungorum agri ariminensis historia*. 38 pp.
- BATTIATO, A., NAPOLI, M., i SIGNORELLO, P. (1987): Osservazioni tassonomiche sul genere *Pleurotus* Fries (Agaricaceae) in Sicilia. *Boll. acc. Gioenia sci. nat.* 20 (330): 253-263.

- BAUM, T., NAVARRO-QUEZADA, A., KNOGGE, W., DOUCHKOV, D., SCHWEIZER, P., i SEIFFERT, U. (2011): HyphArea-Automated analysis of spatiotemporal fungal patterns. *Journal of Plant Physiology* 168 (1): 72-78.
- BAYRY, J., AIMANIANDA, V., GUIJARRO, J. I., SUNDE, M., i LATGÉ, J. P. (2012): Hydrophobins-unique fungal proteins. *PLoS Pathogens* 8 (5).
- BENJAMINI, Y. i HOCHBERG, Y. (1995): Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57 (1): 289-300.
- BENNETT, J. W. et al. (2001): Formulation of fungi for in situ bioremediation. *En: Fungi in Bioremediation*, Pàg. 97 - 112. Ed. Cambridge University Press.
- BENUCCI, G. M. N., GÓGÁN CSORBAI, A., BACIARELLI FALINI, L., BENCIVENGA, M., DI MASSIMO, G., i DONNINI, D. (2012): Mycorrhization of *Quercus robur* L., *Quercus cerris* L. and *Corylus avellana* L. seedlings with *Tuber macrosporium* Vittad. *Mycorrhiza* 22 (8): 639-646.
- BERG, B., STEFFEN, K. T., i MCCLAUGHERTY, C. (2007): Litter decomposition rate is dependent on litter Mn concentrations. *Biogeochemistry* 82 (1): 29-39.
- BERG, G., ROSKOT, N., STEIDLE, A., EBERL, L., ZOCK, A., i SMALLA, K. (2002): Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied and environmental microbiology* 68: 3328-3338.
- BEXTINE, B. R. i THORVILSON, H. G. (2002): Field applications of bait-formulated *Beauveria bassiana* alginate pellets for biological control of the red imported fire ant (*Hymenoptera: Formicidae*). *Biological Control* 31 (4): 746-752.
- BLENIS, P. V., CHOW, P. S., DUNCAN, I., i KNOWLES, N. R. (2004): Cyanide levels near fairy rings affect the growth of grasses and fungi. *Canadian Journal of Botany* 82 (9): 1324-1329.
- BLEVE, G., LEZZI, C., MITA, G., RAMPINO, P., PERROTTA, C., VILLANOVA, L., i GRIECO, F. (2008): Molecular cloning and heterologous expression of a laccase gene from *Pleurotus eryngii* in free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology (Historical Archive)* 79 (5): 731-741.
- BODDY, L., HYNES, J., BEBBER, D. P., i FRICKER, M. D. (2009): Saprotrophic cord systems: Dispersal mechanisms in space and time. *Mycoscience* 50 (1): 9-19.
- BOLTON, R. G. i BODDY, L. (1993): Characterization of the spatial aspects of foraging mycelial cord systems using fractal geometry. *Mycological Research* 97 (6): 762-768.
- BONAFÈ, F. (1979). Flora de Mallorca. Ed. Moll. Mallorca.
- BOYLE, C. D. (1995): Development of a practical method for inducing white-rot fungi to grow into and degrade organopollutants in soil. *Canadian Journal of microbiology* 41: 345-353 (Abstract).

- BOYLE, C. D., WIESNER, C., i RICHARDSON, A. (1998): Factors affecting the degradation of polyaromatic hydrocarbons in soil by white rot fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 30 (7): 873-882.
- BRESADOLA, G. (1899): Genre *Pleurotus*. En: *Funghi Magnerecci e Velenosi dell'Europa Media*, Pàg. 52 - 54. Ed. Libraio della R.Casa.
- BRESADOLA, G. (1906): *Funghi magnerecci, tavola 287*.
- BRESADOLA, G. (1928): *Iconographia Mycologica* vol. 6, tab. 286. Società Botanica Italiana, Museo Civico di Storia Naturale di Trento.
- BREWER, D., CALDER, F. W., MACINTYRE, T. M., i TAYLOR, A. (1971): Ovine ill-thrift in Nova Scotia: I. The possible regulation of the rumen flora in shee by the fungal flora of permanent pasture. *Journal of Agricultural Science* 76: 465-477 (Abstract).
- BUGG, T. D. H., AHMAD, M., HARDIMAN, E. M., i SINGH, R. (2011): The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Current opinion in biotechnology* 22 (3): 394-400.
- BUISSON, E., DUTOIT, T., THORRE, F., RÖMERMANN, C., i POSCHLOD, P. (2006): The implications of seed rain and seed bank patterns for plant succession at the edges of abandoned fields in Mediterranean landscapes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 115: 6-14.
- BURGUETE, A. (1995): Contribución al estudio de los hongos de la Sierra de Espadán (Castellón). *Butlletí de la Societat Micològica Valenciana* 1: 100.
- BURKE, R. M. i CAIRNEY, J. W. G. (1998): Carbohydrate oxidases in ericoid and ectomycorrhizal fungi: a possible source of Fenton radicals during the degradation of lignocellulose. *New Phytologist* 139: 637-645.
- BURKE, R. M. i CAIRNEY, J. W. G. (2002): Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 12 (3): 105-116.
- BYLEBYL, K., POSCHLOD, P., i REISCH, C. (2008): Genetic variation of *Eryngium campestre* L. (*Apiaceae*) in Central Europe. *Molecular Ecology* 17: 3379-3388.
- CAILLEUX, R., CERCEAU-LARRIVAL, M. TH., HAMEL, J. L., i JOLY, P. (1983): Étude d'une station de *Pleurotus eryngii* Dc. ex Fr.: Peuplement de panicauts et peuplement de pleurotes. *Bulletin du la Société Mycologique Française* 99 (2): 159-202.
- CALL, H. P. i MUECKE, I. (1997): History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator systems (Lignozym process). *Journal of Biotechnology* 53: 163-202.
- CAMARERO, S., BARRASA, J. M., PELAYO, M., i MARTINEZ, A. T. (1998): Evaluation of *Pleurotus* species for wheat-straw biopulping. *Journal of Pulp and Paper Science* 24 (7): 197-203.

- CAMARERO, S., IBARRA, D., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (2005): Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and environmental microbiology* 71 (4): 1775-1784.
- CAMARERO, S., RUIZ-DUENAS, F. J., SARKAR, S., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (2000): The cloning of a new peroxidase found in lignocellulose cultures of *Pleurotus eryngii* and sequence comparison with other fungal peroxidases. *FEMS Microbiology Letters* 191 (1): 37-43.
- CAMARERO, S., SARKAR, S., RUIZ-DUENAS, F. J., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (1999): Description of a versatile peroxidase involved in the natural degradation of lignin that has both manganese peroxidase and lignin peroxidase substrate interaction sites. *Journal of Biological Chemistry* 9: 10324-10330.
- CANDUSSO, M. i BASSO, M. T. (1995a): Analisi comparativa di *Pleurotus eryngii* e *P. nebrodensis*. *Documents mycologiques* 15: 119-128.
- CANDUSSO, M. i BASSO, M. T. (1995b): Tassonomia del genere *Pleurotus* (Fr.) Kummer. *Rivista di Micologia* 38 (3): 253-268.
- CARAMELO, L., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (1999): A search for ligninolytic peroxidases in the fungus *Pleurotus eryngii* involving alpha-keto-gamma-thiomethylbutyric acid and lignin model dimers. *Applied and environmental microbiology* 65 (3): 916-922.
- CARBONERO, E. R., GRACHER, A. H. P., SMIDERLE, F. R., ROSADO, F. R., SASSAKI, G. L., GORIN, P. A. J., i IACOMINI, M. (2006): A beta-glucan from the fruit bodies of edible mushrooms *Pleurotus eryngii* and *Pleurotus ostreatoroseus*. *Carbohydrate Polymers* 66 (2): 252-257.
- CARDONA, M.A. (1979). Enciclopèdia de Menorca. Botànica. 51 pp.
- CARL, P., 2006: Radial Profile Extended plugin for ImageJ v.1.0. URL: [http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/download/jars/Radial\\_Profile\\_Angle\\_Ext.jar](http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/download/jars/Radial_Profile_Angle_Ext.jar).
- CARREIRO, M. M., SINSABAUGH, R. L., REPERT, D. A., i PARKHURST, D. F. (2000): Microbial enzyme shifts explain litter decay responses to simulated nitrogen deposition. *Ecology* 81 (9): 2359-2365.
- CASTELNUOVO, G. i GRANETTI, B. (1996): Relationship between *Pleurotus* of Umbelliferae, *Trichoderma viride* and some bacterial strains in the natural environment. *Micologia Italiana* 25: 51-59.
- CETTO, B. (1979). Der grosse pilzführer I. Ed. BLV Verlagsgesellschaft. München, Bern, Wien. 669 pp.
- CHA, W. S., PARK, S. S., KIM, S. J., i CHOI, D. (2010): Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. *Bioresource Technology* 101 (16): 6475-6481.

- CHANG, S. T. (2005): Witnessing the development of the mushroom industry in China. *En: Proceedings 5th International conference on mushroom biology and mushroom products*, Pàg. 13 - 19.
- CHANG,S.-T. i MILES, PHILIP G. (2004). Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. *Ed. CRC Press*.451 pp.
- CHEN, J. i HUANG, J. (2004): Identification of *Gliocladium roseum*, the causal agent of brown spot of the king oyster mushroom *Pleurotus eryngii*. *Plant Pathology Bulletin* 13 (1): 17-26.
- CHINAN, V.C. i VENTURELLA, G. (2012): *Pleurotus eryngii* var. *elaeoselini*, first record from Romania. *Mycotaxon*, 122: 221-224.
- CHO, T. S., JI, S. T., KANG, T. S., i SHIN, M. G. (2004): Health food effective for hypertension and method for manufacturing the same. *Patent KR2004046313-A*
- CHOI, B. Y., PARK, H. J., HWANG, S. J., i PARK, J. B. (2002): Preparation of alginate beads for floating drug delivery system: effects of CO<sub>2</sub> gas-forming agents. *International Journal of Pharmaceutics* 239: 81-91.
- CHOI, J. H., KIM, S., SAPKOTA, K., PARK, S. E., i KIM, S. J. (2011): Expression and production of therapeutic recombinant human platelet-derived growth factor-BB in *Pleurotus eryngii*. *Applied biochemistry and biotechnology* .
- CHOI, Y. M., KU, J. B., CHONG, H. B., i LEE, J. (2005): Antioxidant activities and total phenolics of ethanol extracts from several edible mushrooms produced in Korea. *Food Science and Biotechnology* 14 (5): 700-703.
- CHOU, P. Y., HONG, C. H., CHEN, W. L., LI, Y. J., CHEN, Y. S., i CHIOU, R. Y. Y. (2006): Glass distilling collector applied for HCN recovery from submerged culture broth and fruiting body of *Pleurotus eryngii* for identification and quantification. *Journal of agricultural and food chemistry* 54 (5): 1551-1556.
- CHUNG, S. J., KIM, S., SAPKOTA, K., CHOI, B. S., SHIN, C., i KIM, S. J. (2011): Expression of recombinant human interleukin-32 in *Pleurotus eryngii*. *Annals of Microbiology* 61 (2): 331-338.
- CODINA I VIÑAS,J. (1908). Apuntes para la flora de La Sellera y su comarca. *Ed. Colegio de Médicos de la provincia de Gerona. Gerona. 100 pp.*
- CODINA I VIÑAS, J. i FONT I QUER, P. (1930): Introducció a l'estudi dels macromicets de Catalunya. *Cavanillesia* 3: 100.
- CODINA, J. (1924): Liste des champignons de La Sellera, province de Gerone (Espagne) et autres localités de Catalogne avec indication des noms vulgaires catalans. *Bulletin du la Societé Mycologique Française* 40.
- COHEN, R., HADAR, Y., i YARDEN, O. (2001): Transcript and activity levels of different *Pleurotus ostreatus* peroxidases are differentially affected by Mn<sup>2+</sup>. *Environmental Microbiology* 3 (5): 312-322.

- COHEN, R., PERSKY, L., i HADAR, Y. (2002): Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl.Microbiol.Biotechnol* 58: 582-594.
- COMES,O. (1878). Funghi del Napolitano, parte I e II: Basidiomiceti (con tre tavole). (Estratta dall'Annuario della N. Scuola Sup. Di Agricoltura in Furtici, Vol. I). Ed. Stabilimento Tipografico del Cav. Francesco Giannini. Napoli.
- CONCA, A., GARCÍA, F., MARTÍNEZ, F. D. P., i MAHIQUES, R. (2003): Basidiomicets del Carrascar de la Font Roja (II). *Butlletí de la Societat Micològica Valenciana* 8: 193.
- CONCA, A., GARCÍA, F., MARTÍNEZ, F. D. P., i MAHIQUES, R. (2004): Basidiomicets del parc natural de la serra de Mariola (I). *Butlletí de la Societat Micològica Valenciana* 9: 321.
- CONNICK, W. J., BOYETTE, C. D., i MCALPINE, J. R. (1991): Formulation of mycoherbicides using a pasta-like process. *Biological Control* 1 (4): 281-287.
- CONSTANTINO,C. i SIQUIER, J. L. (1985). Petita guia dels bolets de les Balears. Ed. Govern Balear.
- CONSTANTINO,C. i SIQUIER, J. L. (1996). Els Bolets de les Balears. Ed. Micobalear C.B.379 pp.
- CORNER,E.J.H. (1981). Beihefte zur - Nova Hedwigia: The Agaric Genera *Lentinus*, *Panus* and *Pleurotus* with particular reference to Malaysian species. Ed. J.Cramer.
- CORTÉS MORAGREGA,C. i MONTÓN MARTÍNEZ, JOAN (2005). Bolets de les terres de Lleida. Ed. Institut d'Estudis Ilerdencs.
- COSTANTIN, J. (1921): Sur la biologie alpestre. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* 175: 537-540.
- COSTANTIN, J. (1923): Sur le Pleurote du Chardon bleu de la Vanoise. *Compte Rendu de l'Academie des Sciences, Paris* 177: 849-852.
- COSTANTIN, J. (1926): Attempts at acclimatization of *P. eryngii* on *Eryngium* and other Umbelliferae north of the Loire. *Arch Mus Hist Nat [Paris]* 1: 73-126 (Abstract).
- COSTANTIN, J. (1928): Apparition of the thistle ear on the maritime Panicaut. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences* 187: 860-862.
- COTXARRERA, L., TRIAS-GAY, M. I., STEINBERG, C., i ALABOUVETTE, C. (2002): Use of sewage sludge compost and *Trichoderma asperellum* isolates to supress *Fusarium* wilt of tomato. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 467-476.
- COURI, S., MERCÊS, E. P., NEVES, C. V., i SENA, L. F. (2006): Digital image processing as a tool to monitor biomass growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results. *Journal of Microscopy* 224: 290-297.
- CRIVET, S., FARNET, A. M., TAGGER, S., i LE PETIT, J. (2000): Annual variations of phenoloxidase activities in an evergreen oak litter: Influence of certain biotic and abiotic factors. *Soil Biology and Biochemistry* 32 (11-12): 1505-1513.

- CROAN, S. C. (2003): Utilization of treated Conifer wood chips by *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. species for cultivating mushrooms. *Mushrooms international* 91: 4-7.
- CROSS, D. i KENERLEY, C. M. (2004): Modelling the growth of *Trichoderma virens* with limited sampling of digital images. *Journal of Applied Microbiology* 97: 486-494.
- CROWTHER, T. W., BODDY, L., i JONES, T. H. (2011): Species-specific effects of soil fauna on fungal foraging and decomposition. *Oecologia* .
- CROWTHER, T. W., JONES, T. H., i BODDY, L. (2011a): Species-specific effects of grazing invertebrates on mycelial emergence and growth from woody resources into soil. *Fungal Ecology* 4 (5): 333-341.
- CROWTHER, T. W., JONES, T. H., BODDY, L., i BALDRIAN, P. (2011b): Invertebrate grazing determines enzyme production by basidiomycete fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (10): 2060-2068 (Abstract).
- D'ANNIBALE, A., RICCI, M., LEONARDI, V., QUARATINO, D., MINCIONE, E., i PETRUCCIOLI, M. (2005): Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnology and bioengineering* 90 (6): 723-731.
- DA SILVA RODRIGUES, L., KASUVA, M. C. M., i BORGES, A. C. (1999): Viability of ectomycorrhizal fungus mycelium entrapped in calcium alginate gel. *Mycorrhiza* 8 (5): 263-266.
- DANELL, E. (1994): *Cantharellus cibarius*: Mycorrhiza formation and ecology. *Acta Universitatis Uppsaliensis* 35: 1-75.
- DANIEL, O., SCHONHOLZER, F., i ZEYER, J. (1995): Quantification of fungal hyphae in leaves of deciduous trees by automated image analysis. *Applied and environmental microbiology* 61 (11): 3910-3918.
- DANIELSON, R. M. i DAVEY, C. (1973): The abundance of *Trichoderma* propagules and distribution of species in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 485-494.
- DAVIS, M. W., GLASER, J. A., EVANS, J. W., i LAMAR, R. T. (1993): Field evaluation of the lignin-degrading fungus *Phanaerochaete sordida* to treat creosote-contaminated soil. *Environmental science technology* 27: 2572-2576.
- DE BLAS, C., MATEOS, C. G. et al. (1999). Normas FEDNA para la formulación de piensos compuestos. Ed. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid. 496 pp.
- DE BOER, W., FOLMAN, L. B., SUMMERBELL, R. C., i BODDY, L. (2005): Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* 29 (4): 795-811.
- DE BOER, W., KLEIN GUNNEWIEK, P. J. A., i WOLDENDORP, J. W. (1998): Suppression of hyphal growth of soil -borne fungi by dune soils from vigorous and declining stands of *Amphiphila arenaria*. *New Phytologist* 138: 107-116 (Abstract).

- DE BOER, W., VERHEGGEN, P., KLEIN GUNNEWIEK, P. J. A., KOVALCHUK, G. A., i VAN VEEN, J. A. (2003): Microbial community composition affects soil fungistasis. *Applied and environmental microbiology* 69: 835-844 (Abstract).
- DE BOER, W., WAGENAAR, A. M., KLEIN GUNNEWIEK, P. J. A., i VAN VEEN, J. A. (2007): In-vitro suppression of fungi caused by combinations of apparently non-antagonistic soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 59: 177-185.
- DE CANDOLLE, A.P. i LAMARCK (1815). Flore Française. Paris.
- DE CASTRO MONTINI, R. M., DE SOUZA PASSOS, J. R., i FERREIRA DA EIRA, A. (2006): Digital monitoring of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) on agar media. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 90-95.
- DE LILLO, E. (1997): Observations on the host preferences of *Pediculaster mesembrinae* (Canestrini) (Acari: Siteroptidae). *Entomologica-Bari*. 31: 7-12.
- DE MARZO, L. i RANA, G. L. (2003): Notes on *Triplax rufipes* life cycle on *Pleurotus eryngii* in Apulia. *Micologia Italiana* 32 (1): 42-47.
- DE WIT, P. J. G. M., MEHRABI, R., VAN DEN BURG, H. A., i STERGIPOPOULOS, I. (2009): Fungal effector proteins: Past, present and future: Review. *Molecular Plant Pathology* 10 (6): 735-747.
- DELGADO, G., GUILLEN, F., MARTINEZ, M. J., GONZALEZ, A. E., i MARTINEZ, A. T. (1992): Light stimulation of aryl-alcohol oxidase activity in *Pleurotus eryngii*. *Mycological-Research*. 96: 984-986.
- DÍAZ, G., CARRILLO, C., i HONRUBIA, M. (2009): Production of *Pinus halepensis* seedlings inoculated with the edible fungus *Lactarius deliciosus* under nursery conditions. *New Forests* 38 (2): 215-227.
- DOBBS, C. G. i HINSON, W. H. (1953): A widespread fungistasis in soil. *Nature* 172 (4370): 197-199.
- DONG, X., ZHOU, W., ZHANG, J., QI, Y., GAO, Y., SHEN, J., i QIU, L. (2010): The effect of growth promotion and its mechanism on edible fungi by fluorescent *Pseudomonas*. *Shengtai Xuebao/ Acta Ecologica Sinica* 30 (17): 4685-4690 (Abstract).
- DONNELLY, D. P. i BODDY, L. (2001): Mycelial dynamics during interactions between *Stropharia caerulea* and other cord-forming saprotrophic basidiomycetes. *New Phytologist* 151: 691-704.
- DONNELLY, D. P., BODDY, L., i WILKINS, M. (1999): Image analysis - a valuable tool for recording and analysing development of mycelial systems. *Mycologist* 13 (3): 120-125.
- DWIVEDI, U. N., SINGH, P., PANDEY, V. P., i KUMAR, A. (2011): Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 68: 117-128.



- EGUCHI, F. i WATANABE, Y. (2002): Eryngii mushroom such as *Pleurotus eryngii* strain having specific decomposition number, useful for treating hypertension. *Patent JP2002176975-A*
- ERIKSSON, T. (1965): Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Physiol.Plant.* 18: 976-993.
- ESCANDELL, T. i ESCANDELL, J. (1999). Bolets de Menorca.
- EVANS, C. S., DUTTON, M. V., GUILLÉN, F. J., i VENESS, R. G. (1994): Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 235-240.
- FAROOQ, M., WAHID, A., i SIDDIQUE, K. H. M. (2012): Micronutrient application through seed treatments - a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12 (1): 125-142.
- FAURE, D., VEREECKE, D., i LEVEAU, J. H. J. (2009): Molecular communication in the rhizosphere. *Plant and Soil* 321 (1-2): 279-303.
- FEDERICI, E., LEONARDI, V., GIUBILEI, M. A., QUARATINO, D., SPACCAPELO, R., D'ANNIBALE, A., i PETRUCCIOLI, M. (2007): Addition of allochthonous fungi to a historically contaminated soil affects both remediation efficiency and bacterial diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77 (1): 203-211.
- FERRI, F. (1977): Inseminazione di *Pleurotus eryngii* var. *ferula* in pieno campo. *Micologia Italiana* 6 (3): 42-46.
- FINSCHOW, G. (1984). The Hague.
- FOLMAN, L. B., KLEIN GUNNEWIEK, P. J. A., BODDY, L., i DE BOER, W. (2008): Impact of white-rot fungi on numbers and community composition of bacteria colonizing beech wood from forest soil. *FEMS Microbiology Ecology* 63 (2): 181-191.
- FONT, X. 2012: Mòdul Flora i Vegetació. Banc de Dades de Biodiversitat de Catalunya. Generalitat de Catalunya i Universitat de Barcelona. URL: <http://biodiver.bio.ub.es/biocat/homepage.html>. Darrera consulta: 1/9/2012.
- FRICKER, M. D., BEBBER, D., i BODDY, L. (2008): Chapter 1 Mycelial networks: Structure and dynamics. 28 (C): 3-18.
- FRIES, E. (1821): *Agaricus eryngii* DC: Fr. *Systema Mycologicum* 1 (84).
- FRIES, N. (1966): Chemical factors in the germination of spores of basidiomycetes. *En: The fungus spore*, Pàg. 189 - 200. Ed. Butterworths Scientific Publications.
- FRIES, N. (1978): Basidiospore germination in some mycorrhiza-forming hymenomycetes. *Mycologia* 70 (3): 319-324.
- FU, C. C., SU, C. H., NAIR, G. R., SUNG, Y. S., i WU, W. T. (2010): Estimation of fungal biomass and lipid production by morphological characteristics of *Mucor rouxii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 110 (3): 367-371.

- FU, M., LIN, J., WU, Z., LIN, Q., i XIE, L. (2003): Screening of proteins anti-tobacco mosaic virus in *Pleurotus eryngii*. *Weishengwu Xuebao* 43 (1): 29-34 (Abstract).
- FUENTES, V. R., RODRÍGUEZ, N., i RODRÍGUEZ, C. A. (1996): La germinación del culantro (*Eryngium foetidum* L.). *Revista cubana de plantas medicinales* 1 (2): 31-33.
- FUI, H. Y., SHIEH, D. E., i HO, C. T. (2002): Antioxidant and free radical scavenging activities of edible mushrooms. *Journal of Food Lipids* 9 (1): 35-46.
- GALLO, M., AMONETTE, R., LAUBER, C., SINSABAUGH, R. L., i ZAK, D. R. (2004): Microbial community structure and oxidative enzyme activity in nitrogen-amended north temperate forest soils. *Microbial Ecology* 48 (2): 218-229.
- GAMUNDI BALLESTER, J. (1925): Hongos Comestibles de Mallorca. *Boletín Farmacéutico Militar* .
- GARBEVA, P. i DE BOER, W. (2009): Inter-specific interactions between carbon-limited soil bacteria affect behavior and gene expression. *Microbial Ecology* 58: 36-46.
- GARBEVA, P., HOL, W. H. G., TERMORSHUIZEN, A. J., KOWALCHUK, G. A., i DE BOER, W. (2011): Fungistasis and general soil biostasis - A new synthesis. *Soil Biology and Biochemistry* 43 (3): 469-477.
- GARBEVA, P., VAN VEEN, J. A., i VAN ELSAS, J. D. (2004): Assesment of the diversity and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiology Ecology* 47: 51-64.
- GARGANO, M. L., SAITTA, A., ZERVAKIS, G. I., i VENTURELLA, G. (2011): Building the jigsaw puzzle of the critically endangered *Pleurotus nebrodensis*: Historial collection sites and an emended description. *Mycotaxon* 115: 107-114.
- GIOIA, T., SISTO, D., RANA, G. L., i FIGLIUOLO, G. (2005): Genetic structure of the *Pleurotus eryngii* species-complex. *Mycological Research* 109 (1): 71-80.
- GONZÁLEZ, A. J., GONZÁLEZ-VARELA, G., i GEA, F. J. (2009): Brown blotch caused by *Pseudomonas tolaasii* on cultivated *Pleurotus eryngii* in Spain. *Plant Disease* 93 (6): 667.
- GRAMSS, G. (1981): New method for observation of soil-inhabiting fungal mycelia introduced into balanced plant-soil systems. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft, der Technologie und des Umweltschutzes* 136 (4): 317-323 (Abstract).
- GRAMSS, G. (2010): The universe of basidiomycetous ground fungi. *En: Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, Pàg. 218 - 229. Ed. Formatex.
- GRAMSS, G. i BERGMANN, H. (2008): Role of plants in the vegetative and reproductive growth of saprobic basidiomycetous ground fungi. *Microbial Ecology* 56 (4): 660-670.
- GRAMSS, G. i BERGMANN, H. (2007): Microbial competition, lack in macronutrients, and acidity as main obstacles to the transfer of basidiomycetous ground fungi into

(organically or heavy-metal contaminated) soils. *Journal of Basic Microbiology* 47 (4): 309-316.

GRAMSS, G. i MASCHER, R. (2011): Mutual influence of soil basidiomycetes and white mustard plants on their enzymatic and catabolic activities. *Journal of Basic Microbiology* 51 (1): 40-51.

GRAMSS, G., VOIGT, K. D., i BERGMANN, H. (2005): Factors influencing water solubility and plant availability of mineral compounds in the tripartite fairy rings of *Marasmius oreades* (Bolt.: Fr.) Fr. *Journal of Basic Microbiology* 45 (1): 41-54.

GRAMSS, G., VOIGT, K. D., i KIRSCHKE, B. (1999): Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation* 10 (1): 51-62.

GREEN, H. C. i CURTIS, J. T. (1950): Germination studies of wisconsin prairie plants. *Am.Midl.Nat.* 43: 186-194.

GREENSPAN, L. (1977): Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards - A, Physics and Chemistry* 81A (1): 89-96.

GUARC, Y., LANAU, J. M., i GRACIA, E. (2003): A new technique for fungal cryopreservation in alginate beads. *Proceedings of the XI BRG Workshop on Bioencapsulation*.Strasbourg.

GUILLEN, F. i EVANS, C. S. (1994): Anisaldehyde and veratraldehyde acting as redox cycling agents for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Pleurotus eryngii*. *Applied and environmental microbiology* 60 (8): 2811-2817.

GUILLEN, F., GOMEZ-TORIBIO, V., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (2000): Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 383 (1): 142-147.

GUILLEN, F., MARTINEZ, A. T., i MARTINEZ, M. J. (1990): Production of hydrogen peroxide by aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 32 (4): 465-469.

GUILLEN, F., MARTINEZ, A. T., MARTINEZ, M. J., i EVANS, C. S. (1994): Hydrogen-peroxide-producing system of *Pleurotus eryngii* involving the extracellular enzyme aryl-alcohol oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41 (4): 465-470.

GUILLEN, F., MUNOZ, C., GOMEZ-TORIBIO, V., MARTINEZ, A. T., i MARTINEZ, M. J. (2000a): Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied and environmental microbiology* 66 (1): 170-175.

GUILLEN, F., GOMEZ, T., V, MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (2000): 510 Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 383 (1): 142-147.

- GUILLEN, F., MARTINEZ, A. T., i MARTINEZ, M. J. (1992): Substrate specificity and properties of the aryl-alcohol oxidase from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* 209: 603-611.
- GUILLEN, F., MARTINEZ, M. J., MUNOZ, C., i MARTINEZ, A. T. (1997): Quinone redox cycling in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 339 (1): 190-199.
- GUILLEN, F., MUNOZ, C., GOMEZ, T., V, MARTINEZ, A. T., i MARTINEZ, M. J. (2000b): Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied-and-Environmental-Microbiology*.Jan., 66: 170-175.
- GUNDE-CIMERMAN, N. i CIMERMAN, A. (1995): *Pleurotus* Fruiting Bodies Contain the Inhibitor of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase--Lovastatin. *Experimental mycology* 19 (1): 1-6.
- GUTIÉRREZ, A. i MARTÍNEZ, A. T. (1996): Mecanismo de biodegradación de la lignina. *Revista Iberoamericana de Micología* 13: 18-23.
- GUTIERREZ, A., CAMELO, L., PRIETO, A., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (1994): Anisaldehyde production and aryl-alcohol oxidase and dehydrogenase activities in ligninolytic fungi of the genus *Pleurotus*. *Applied and environmental microbiology* 60: 1783-1788.
- GYÖRFI, J. i HAJDÚ, CS. (2007): Casing-material experiments with *Pleurotus eryngii*. *International Journal of Horticultural Science* 13 (2): 33-36.
- GYÖRFI, J., HAJDÚ, CS., MASZLAVER, P., i FEHERVARI-POCZIK, E. (2007): Research with covering materials on *Pleurotus eryngii*. *Kertgazdasag - Horticulture* 39 (2): 3-9.
- HALL, I. R. i WANG, Y. (1998): Methods for cultivating edible ectomycorrhizal mushrooms. *En: Mycorrhiza manual, Ed. Springer-Verlag.*
- HALMER, P. (2008): Seed technology and seed enhancement. *ISHS Acta Horticulturae 771: XXVII International Horticultural Congress - IHC2006: International Symposium on Seed Enhancement and Seedling Production Technology* 771: 17-26.
- HAMMOUDA, M. R. i BAKR, Z. Y. (1969): Some aspects of germination of desert seeds. *Phyton* 13: 183-201.
- HAN, C. F., ZHENG, A. F., i LI, D. P. (2006): Study on biodegradation of polyacrylamide. *Huanjing Kexue/Environmental Science* 27 (1): 151-153.
- HAN, E. H., HWANG, Y. P., KIM, H. G., CHOI, J. H., IM, J. H., YANG, J. H., LEE, H. U., CHUN, S. S., CHUNG, Y. C., i JEONG, H. G. (2011): Inhibitory effect of *Pleurotus eryngii* extracts on the activities of allergic mediators in antigen-stimulated mast cells. *Food and Chemical Toxicology* 49 (6): 1416-1425.
- HARLEY, J. L. i HARLEY, E. L. (1987): A check-list of mycorrhiza in the british flora. *New Phytologist* 105: 1-102.

- HAROLD, S., TORDOFF, G. M., JONES, T. H., i BODDY, L. (2005): Mycelial responses of *Hypholoma fasciculare* to collembola grazing: Effect of inoculum age, nutrient status and resource quality. *Mycological Research* 109 (8): 927-935.
- HARRINGTON, T. C. i RIZZO, D. M. (1999): Defining species in the fungi. *En: Structure and dynamics of fungal populations*, Pàg. 43 - 71. Ed. Kluwer Press.
- HASSAN, F. R. H., MEDANY, G. M., i ABOU HUSSEIN, S. D. (2010): Cultivation of the king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) in Egypt. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 4 (1): 99-105.
- HEATON, L., OBARA, B., GRAU, V., JONES, N., NAKAGAKI, T., BODDY, L., i FRICKER, M. D. (2012): Analysis of fungal networks. *Fungal Biology Reviews* 26 (1): 12-29.
- HEIM, R. (1960): Le Pleurote des umbelliferères en Iran. *Revue De Mycologie* 25: 242-247.
- HENNINGS, P. (1901): Beiblatt zur Hewidgia; Kleinere Mittheilungen: Aliquot Fungi Africae Borealis. *Hedwigia* 40 (4): 98-101.
- HENRIOT, A. i CHEYPE, J.L., 2010: Piximetre v.5.2. *ACH Logiciels* .
- HIGUCHI, T. (2004): Microbial degradation of lignin: Role of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences* 80 (5): 204-214.
- HILBER, O. (1977): Zur systematik der sektion *Pleurotus* Acta Sci. Nat. Mus. Bohem. Merid. *Ceske Budejovice* 17: 128-133.
- HILBER, O. (1982). Die Gattung *Pleurotus* (Fr.) Kummer unter besonderer Berücksichtigung des *Pleurotus eryngii* Formenkomplexes. Ed. Cramer J., Vaduz.
- HÖFER, C. i SCHLOSSER, D. (1999): Novel enzymatic oxidation of Mn<sup>2+</sup> to Mn<sup>3+</sup> catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Letters* 451: 186-190.
- HOFRICHTER, M. (2002): Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30 (4): 454-466.
- HOLKER, U., DOHSE, J., i HOFER, M. (2002): Extracellular laccases in ascomycetes *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma harzianum*. *Folia Microbiologica* 47 (4): 423-427.
- HONG, J. G., KANG, T. S., KONG, Y. J., PARK, Y. H., i SON, H. R. (2003): Preparation of anisaldehyde used in e.g. a flavoring agent comprises a biological method. *Patent* 2003-741815
- HONG, J., ZENG, R., LU, C., i TANG, H. (2003): Culture experiment of *Pleurotus eryngii* with different culture media. *Edible Fungi of China* 22 (2): 24.
- HONG, S. B., KIM, H. K., YOON, S. H., i GO, S. J. (2000): Molecular and morphological identification of *Trichoderma* isolates from *Pleurotus eryngii* farms. *Mycobiology* 28 (4): 230.
- INZENGA, G. (1863): Nuova specie di agarico del Prof. Giuseppe Inzenga. *Giornale Reale Istituto di Incoraggiamento Agricoltura Siciliana Palermo* 1: 161-164.

INZENGA, G. (1865). Funghi Siciliani. Centuria I. Ed. Stabilimento Tipografico di Francesco Lao. Palermo. 95 pp.

ITOH, K., FUJITA, M., KUMANO, K., SUYAMA, K., i YAMAMOTO, H. (2000): Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase. *Soil Biology and Biochemistry* 32 (1): 85-91.

JACOBSEN, J. V. i PRESSMAN, E. (1979): A structural study of germination in celery (*Apium graveolens* L.) with emphasis on endosperm breakdown. *Planta* 144: 241-248.

JESKE, T. i BRANDES, D. 2012: Untersuchungen zur Keimung von *Eryngium campestre* L. Institut für Pflanzenbiologie. Technische Universität Braunschweig. URL: <http://www.digibib.tu-bs.de/?docid=00042658>. Darrera consulta: 5/19/2012.

JO, W. S., REW, Y. H., KIM, S. H., YUN, J. T., i CHOI, B. S. (1999): Occurrence of bluish green mold of *Pleurotus eryngii* by *Penicillium corylophilum*. *Korean Journal of Mycology* 27 (6): 412-414.

JOHANSEN, C. L., COOLEN, L., i HUNIK, J. H. (1998): Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations. *Biotechnology progress* 14 (2): 233-240.

JOHNSON, L. (2008): Iron and siderophores in fungal-host interactions. *Mycological Research* 112 (2): 170-183.

JOLY, P., CAILLEUX, R., i CERCEAU, M. T. (1990): Pathological Male-Sterility, Element of Coadaptation between Populations of Fungi and of Host-Plants - a Model of the *Pleurotus* of Umbelliferae. *Bulletin De La Societe Botanique De France-Actualites Botaniques* 137 (2): 71-85.

JONES, C. (1996): 2-D Wavelet Packet Analysis of structural self-organization and morphogenetic regulation in filamentous fungi. *Complex Systems conference - From local Interactions to global phenomena* .

JOSELEAU, J. P., GHARIBIAN, S., COMTAT, J., LEFEBVRE, A., i RUEL, K. (1994): Indirect involvement of ligninolytic enzyme systems in cell wall degradation. *FEMS Microbiology Reviews* 13: 255-264.

JUNG, H. Y., BAE, I. Y., LEE, S., i LEE, H. G. (2011): Effect of the degree of sulfation on the physicochemical and biological properties of *Pleurotus eryngii* polysaccharides. *Food Hydrocolloids* .

KALLIO, T. (1973): Influence of ultraviolet radiation on the colony formation of *Fomes annosus* diaspores suspended in water. *Karstenia* 14: 5-8 (Abstract).

KAWAI, G. (2006): Novel hybrid strain of *Pleurotus eryngii* and *P. nebrodensis* or *P. ferulae*, being excellent in taste and quality and exhibiting short cultivation period, useful as edible product. Patent JP2006067930-A

- KAWAI, G., BABASAKI, K., i NEDA, H. (2008): Taxonomic position of a chinese pleurotus "Bai-Ling-Gu": it belongs to *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quel. and evolved independently in China. *Mycoscience* 49 (1): 75-87.
- KAWAI, J., INATOMI, S., i TSUCHIDA, T. (2010): Effects and safety of *Pleurotus eryngii* on body fat reduction in subjects with a body mass index between 24.5 and 35 kg/m<sup>2</sup>. *Japanese Pharmacology and Therapeutics* 38 (7): 645-657.
- KEUM, Y. S. i LI, Q. X. (2004): Copper dissociation as a mechanism of fungal laccase denaturation by humic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (4): 588-592.
- KIM, J. G., OH, G. O., KIM, S. W., KIM, H. G., KIM, J. Y., KOH, S. I., LEE, B. U., KIM, H. M., BAEK, J. H., RYOO, H. M., i WOO, G. M. (2004): *Pleurotus eryngii* extract, useful for the treatment of e.g. osteoporosis. *Patent JP2004-549894*
- KIM, J. I., KANG, M. J., IM, J., SEO, Y. J., LEE, Y. M., SONG, J. H., LEE, J. H., i KIM, M. E. (2010): Effect of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on insulin resistance and dyslipidemia in db/db mice. *Food Science and Biotechnology* 19 (1): 239-242.
- KIM, M. K., RYU, J. S., i LEE, Y. H. (2007): First report of *Pantoea* sp induced soft rot disease of *Pleurotus eryngii* in Korea. *Plant Disease* 91 (1): 109-109.
- KIM, M. K., MATH, R. K., CHO, K. M., SHIN, K. J., KIM, J. O., RYU, J. S., LEE, Y. H., i YUN, H. D. (2007): Effect of *Pseudomonas* sp. P7014 on the growth of edible mushroom *Pleurotus eryngii* in bottle culture for commercial production. *Bioresource Technology* 99 (8): 3306-3308.
- KIM, S., SAPKOTA, K., CHOI, B. S., i KIM, S. J. (2010): Expression of human growth hormone gene in *Pleurotus eryngii*. *Central European Journal of Biology* 5 (6): 791-799.
- KIM, S. W., KIM, H. G., LEE, B. E., HWANG, H. H., BAEK, D. H., i KO, S. Y. (2006): Effects of mushroom *Pleurotus eryngii* extracts on bone metabolism. *Clinical Nutrition* 25 (1): 166-170.
- KIRBAG, S. i AKYUZ, M. (2008a): Effect of various agro-residues on growing periods, yield and biological efficiency of *Pleurotus eryngii*. *Journal of Food Agriculture & Environment* 6 (3-4): 402-405.
- KIRBAG, S. i AKYUZ, M. (2008b): Evaluation of agricultural wastes for the cultivation of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi. *African Journal of Biotechnology* 7 (20): 3657-3661.
- KITAMOTO, Y., SUZUKI, A., SHIMADA, S., i YAMANAKA, K. (2002): A new method for the preservation of fungus in stock cultures by deep freezing. *Mycoscience* 43: 143-149.
- KLÁN, J. (1990): *Pleurotus eryngii* v Cechách. *Mykologické Listy* 10: 7-11.
- KLEIN, D. i EVELEIGH, D. E. (1998): Ecology of *Trichoderma*. En: *Trichoderma & Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics*, Pàg. 57 - 74. Ed. Taylor & Francis.

- KNOWLES, C. J. (1976): Microorganisms and cyanide. *Bacteriological Reviews* 40 (3): 652-654.
- KNOWLES, C. J. (1988): Cyanide utilization and degradation by microorganisms. *En: Cyanide compounds in Biology*, Pàg. 3 - 15. Ed. John Wiley & Sons, Ltd.
- KRISAI-GREILHUBER, I. i VOGLMAYR, H. (1995): *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* - A remarkable substrate specialist, new for Austria. *Documents mycologiques* 25: 239-247.
- KUNTZE (1898): *Revis.Gen.Pl.(Leipzig)* 3: 463-464.
- LAMAR, R. T., DAVIS, M. W., DIETRICH, D. M., i GLASER, J. A. (1994): Treatment of a pentachlorophenol- and creosote-contaminated soil using the lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida*: A field demonstration. *Soil Biology and Biochemistry* 26 (12): 1603-1611.
- LAMAR, R. T., EVANS, J. W., i GLASER, J. A. (1993): Solid-phase treatment of a pentachlorophenol-contaminated soil using lignin-degrading fungi. *Environmental science technology* 27: 2566-2571.
- LAMAR, R. T., LESTAN, D., SMITH, C. E., i DIETRICH, D. M. (2000): Fungal Inoculum preparation. *Patent US/6143549*
- LANDINI, G., 2004: Convex Hull Plus for ImageJ v.1.2. URL: <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/convexhullplus.zip>.
- LANG, E., ELLER, G., i ZADRAZIL, F. (1997): Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. *Microbial Ecology* 34 (1): 1-10.
- LANG, E., KLEEBERG, I., i ZADRAZIL, F. (1997): Competition of *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* with soil microorganisms during lignocellulose decomposition. *Bioresource Technology* 60 (2): 95-99.
- LANG, E., NERUD, F., i ZADRAZIL, F. (1998): Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 167 (2): 239-244.
- LANGVAD, F. (1999): A rapid and efficient method for growth measurement of filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* 37: 97-100.
- LANZLM. (1873). Il Fungo della Ferula. *Roma*.
- LANZI, M. (1874): Kleinere Mittheilungen. *Agaricus (Pleurotus) ferulae* M.Lanzi sp. nov. *Hedwigia* 6: 95.
- LAX, A., ROIG, A., i COSTA, F. (1986): A method for determining the cation-exchange capacity of organic materials. *Plant and Soil* 94 (3): 349-355.
- LECAULT, V., PATEL, N., i THIBAUT, J. (2009): An image analysis technique to estimate the cell density and biomass concentration of *Trichoderma reesei*. *Letters in applied microbiology* 48 (4): 402-407.



- LEE, N. H., IM, M. H., i CHOI, U. K. (2006): Calcium absorption by the fruitbody of Saesongi (*Pleurotus eryngii*) mushroom. *Food Science and Biotechnology* 15 (2): 308-311.
- LEE, S. W., KANG, J. W., KIM, J. Y., PARK, K. W., PARK, S. K., JOO, O. S., YEE, S. T., i SEO, K. I. (2010): Immuno-activities of extracts of tofu fermented with *Pleurotus eryngii* mycelia. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 39 (1): 25-30.
- LEE, Y. H., PARK, K. H., LEE, B. W., CHO, Y. U., CHOI, Y. J., i GAL, S. W. (2006): Antitumor sterol isolated from the fruiting body of *Pleurotus eryngii*. *Journal of Life Science* 16 (2): 282-288.
- LESTAN, D. i LAMAR, R. T. (1996): Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Applied and environmental microbiology* 62 (6): 2045-2052.
- LESTAN, D., LESTAN, M., i LAMAR, R. T. (1998): Growth and viability of mycelial fragments of white-rot fungi on some hydrogels. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 20: 244-250.
- LEUNG, P.-C. i POINTING, S. (2002): Effect of different carbon and nitrogen regimes on Poly-R decolorization by white-rot fungi. *Mycological Research* 106 (1): 86-92.
- LEWINSOHN, D., WASSER, S. P., RESHETNIKOV, S., V, HADAR, Y., i NEVO, E. (2002): The *Pleurotus eryngii* species-complex in Israel: Distribution and morphological description of a new taxon. *Mycotaxon* 2002 (81): 51-67.
- LIU, X., ZHOU, B., LIN, R., JIA, L., DENG, P., FAN, K., WANG, G., WANG, L., i ZHANG, J. (2010): Extraction and antioxidant activities of intracellular polysaccharide from *Pleurotus sp.* mycelium. *International Journal of Biological Macromolecules* 47 (2): 116-119.
- LLIMONA, X. i AGUASCA, M. (1991). Història natural dels Països Catalans. Ed. *Enciclopèdia Catalana. Barcelona.*
- LLIMONA, X. i BLANCO, M. J. (2000): Els fongs de Catalunya occidental segons les prospeccions recents. II. *Acta Botanica Barcinonensis* 46: 5-9.
- LLIMONA, X., VILA, J., AGUASCA, M., ÀNGEL, F., GRÀCIA, E., LLISTOSELLA, J., MARTÍN, M. P., MAYORAL, A., ROCABRUNA, A., SIERRA, D., i TABARÉS, M. (1995): El programa Biodiversitat Micològica de les Terres de Ponent. Notícia i primers resultats. *Revista de la Societat Catalana de Micologia* 18: 103-136.
- LLISTOSELLA, J. 2012: Mòdul Fongs. Banc de Dades de Biodiversitat de Catalunya. Generalitat de Catalunya i Universitat de Barcelona. URL: <http://biodiver.bio.ub.es/biocat/homepage.html>. Darrera consulta: 1/9/2012.
- LLISTOSELLA, J. i AGUASCA, M. (1990): Macromicets de l'illa de Menorca II. *Revista de la Societat Catalana de Micologia* 13: 27.
- LOOMIS, A. K., CHILDRESS, A. M., DAIGLE, D., i BENNETT, J. W. (1997): Alginate encapsulation of the white rot fungus *Phanaerochaete chrysosporium*. *Current Microbiology* 34: 127-130.

- MACFADDIN, J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. Ed. Lippincott Williams & Williams. Philadelphia. 182 pp.
- MADDAU, L., FRANCESCHINI, A., SERRA, S., i MARRAS, F. (2002): Studies on the gas phase during incubation of *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quel. *Micologia Italiana* 31 (1): 27-31.
- MAHIQUES, R. (1995): Fongs de Primavera a la Vall d'Albaida. *Butlletí de la Societat Micològica Valenciana* 1: 43.
- MAI, C., SCHORMANN, W., MAJCHERCZYK, A., i HÜTTERMANN, A. (2004): 783 Degradation of acrylic copolymers by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65 (4): 479-487.
- MALENÇON, G. i BERTAULT, R. (1975). Flore des champignons superieurs du Maroc: Agaricales. Ed. Institut Scientifique Cherifien et Faculte des Sciences de Rabat. Rabat.
- MANG, S. M. i FIGLIUOLO, G. (2010): Species delimitation in *Pleurotus eryngii* species-complex inferred from ITS and EF-1 $\alpha$  gene sequences. *Mycology* 1 (4): 269-280.
- MANZI, P., GAMBELLI, L., MARCONI, S., VIVANTI, V., i PIZZOFERRATO, L. (1999): Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study. *Food Chemistry* 65: 477-482.
- MANZI, P., MARCONI, S., AGUZZI, A., i PIZZOFERRATO, L. (2004): Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking. *Food Chemistry* 84: 201-206.
- MAO, X. (2000). The macrofungi in China. Ed. Henan Science and Technology, Zhengzhou. 66 pp. (en xinès).
- MARONGIU, P., MADDAU, L., FRISULLO, S., i MARRAS, F. (2005): A multigene approach for the taxonomic determination of *Pleurotus eryngii* isolates. *Fifth international conference on mushroom biology and mushroom products* 12.
- MARRAS, F., MADDAU, L., CORDA, P., i FRANCESCHINI, A. (1997): Studi su isolati di *Pleurotus eryngii* (D.C.: Fr) Quél della Sardegna e possibilità di utilizzo degli stessi in coltivazione intensiva. *Micologia Italiana* 26: 79-88.
- MARTENS, R. i ZADRAZIL, F. (1998): Screening of White rot fungi for their ability to mineralize polycyclic hydrocarbons in soil. *Folia Microbiologica* 43: 97-103 (abstract).
- MARTIN, A. C. (1946): The comparative internal morphology of seeds. *Am.Midl.Nat.* 36: 513-660.
- MARTINEZ, M. J., MUNOZ, C., GUILLEN, F., i MARTINEZ, A. T. (1994): Studies on homoveratric acid transformation by the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41 (5): 500-504.
- MARTINEZ, M. J., RUIZ-DUENAS, F. J., GUILLEN, F., i MARTINEZ, A. T. (1996): Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* 237 (2): 424-432.

- MARTINSEN, A., SKJAK-BRAEK, G., i SMIDSRØD, O. (1989): Alginate as immobilization material: I. Correlations between chemical and physical properties of alginate. *Biotechnology and bioengineering* 33: 79-89.
- MATEO-ALVAREZ, B. (2004): *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* 28: 407.
- MAYR, E. (1963). Populations, species, and evolution. Ed. *Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts*.
- MAZUMDER, M. A. J., BURKE, N. A. D., SHEN, F., POTTER, M. A., i STÖVER, H. D. H. (2009): Core-cross-linked alginate microcapsules for cell encapsulation. *Biomacromolecules* 10 (6): 1365-1373.
- MEHLICH, A. (1938): Uses of triethanolamine acetate-barium hydroxide buffer for the determination of some base exchange properties and lime requirements of soil. *Soil Science Society of America Journal* 3: 162-166 (Abstract).
- MENAL, R. (1983): *Pleurotus eryngii* (DC.ex Fr.) Quél. En: *Bolets de Catalunya, Làmines de la Societat Catalana de Micologia*, Ed. *Societat Catalana de Micologia*.
- MINCHIN, P. R. (1987): An evaluation of relative robustness of techniques for ecological ordinations. *Vegetatio* 69: 89-107.
- MIR, G. i MELIS, J. (2008): *Revista de la Societat Catalana de Micologia* 30: 85.
- MIRANSARI, M. (2011): Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (4): 917-930.
- MIYAZAKI, H., GEMMA, H., KOSHIMIZU, N., SATO, M., ITO, I., SUDA, T., CHIDA, K., i NAKAMURA, H. (2003): Hypersensitivity pneumonitis induced by *Pleurotus eryngii* spores - a case report. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 41 (11): 827-833.
- MIZUTANI, T., INATOMI, S., INAZU, A., i KAWAHARA, E. (2010): Hypolipidemic effect of *Pleurotus eryngii* extract in fat-loaded mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 56 (1): 48-53.
- MIZUTANI, T., INATOMI, S., KURASHIMA, E., i TSUCHIDA, T. (2008): Suppressive effect of *Pleurotus eryngii* extract on postprandial serum triacylglycerol elevation. *Japanese Pharmacology and Therapeutics* 36 (9): 817-823.
- MOEN, M. A. i HAMMEL, K. E. (1994): Lipid peroxidation by the manganese peroxidase of *Phanaerochaete chrysosporium* is the basis for phenanthrene oxidation by the intact fungus. *Applied Environmental Microbiology* 60: 1956-1961.
- MONTEZUMA-DE-CARVALHO, J., PAIVA, J., i PIMENTA, M. C. S. (1984): Effect of cold storage on seed viability of aromatic plants from the Portuguese flora. *EUCARPIA International Symposium on Conservation of Genetic Resources of Aromatic and Medicinal Plants. Oeiras, Portugal* (Abstract).

- MOONMOON, M., UDDIN, M. N., AHMED, S., SHELLY, N. J., i KHAN, M. A. (2010): Cultivation of different strains of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) on saw dust and rice straw in Bangladesh. *Saudi Journal of Biological Sciences* 17 (4): 341-345.
- MOORE, R.P. (1985). Manual de ensayos al tetrazolio. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 92 pp.
- MORGAN, P., LEE, S. A., LEWIS, S. T., SHEPPARD, A. N., i WATKINSON, R. J. (1993): Growth and biodegradation by white-rot fungi inoculated into soil. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 279-287.
- MORI, K., KOBAYASHI, C., TOMITA, T., INATOMI, S., i IKEDA, M. (2008): Antiatherosclerotic effect of the edible mushrooms *Pleurotus eryngii* (Eringi), *Grifola frondosa* (Maitake), and *Hypsizygus marmoreus* (Bunashimeji) in apolipoprotein E-deficient mice. *Nutrition Research* 28 (5): 335-342.
- MOU, C., CAO, Y., i MA, J. (1987): A new variety of *Pleurotus eryngii* and its cultural characters. *Acta Mycologica Sinica* 6: 153-156.
- MUÑOZ, C., GUILLEN, F., MARTINEZ, A. T., i MARTINEZ, M. J. (1997a): Induction and characterization of laccase in the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Current Microbiology* 34 (1): 1-5.
- MUÑOZ, C., GUILLEN, F., MARTINEZ, A. T., i MARTINEZ, M. J. (1997b): Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn<sup>2+</sup> oxidation. *Applied and environmental microbiology* 63 (6): 2166-2174.
- NAKAMURA, M., IKETANI, A., i SHIOI, Y. (2011): A survey of proteases in edible mushrooms with synthetic peptides as substrates. *Mycoscience* 52 (4): 234-241.
- NG, T. B. i WANG, H. X. (2004): A novel ribonuclease from fruiting bodies of the common edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides* 25 (8): 1365-1368.
- NGAI, P. H. K. i NG, T. B. (2006): A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 (6): 1185-1191.
- NIKOLAEVA, M. G. (1977): Factors controlling the seed dormancy pattern. En: *The Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, Pàg. 51 - 74. Ed. North-Holland.
- O'BRIEN, M. A. (1948): The Control of Humidity by Saturated Salt Solutions. *J.Sci.Instrum.* 25: 73-76.
- OBATAKE, Y., MURAKAMI, S., MATSUMOTO, T., i FUKUMASA, N. Y. (2003): Isolation and characterization of a sporeless mutant in *Pleurotus eryngii*. *Mycoscience* 2003 (44): 33-40.
- OELP, P. (1996). Mushroom cultivation - With special emphasis on appropriate techniques for developing countries. Ed. Tool Publications. Leiden.

- OEI, P. 2007: Cultivating the King Oyster Mushroom, *Pleurotus eryngii*. URL: [www.mushroombusiness.com/content/articles/detail/217/cultivating-king-oyster-mushrooms-pleurotus-eryngii#](http://www.mushroombusiness.com/content/articles/detail/217/cultivating-king-oyster-mushrooms-pleurotus-eryngii#).
- OFFNER, J. i HEIM, R. (1927): Distribution géographique d'un champignon méditerranéo-atlantique. *Compte Rendu Sommaire des séances de la Société de Biogéographie* 25: 58-60.
- OHGA, S. (1999): Suitability of bamboo powder for the sawdust-based cultivation of edible mushrooms. *Mushroom Science and Biotechnology* 7 (19): 22.
- OHGA, S. (2000): Influence of wood species on the sawdust-based cultivation of *Pleurotus abalonus* and *Pleurotus eryngii*. *Journal of Wood Science* 46 (2): 175-179.
- OHGA, S. i ROYSE, D. J. (2004): Cultivation of *Pleurotus eryngii* on umbrella plant (*Cyperus alternifolius*) substrate. *Journal of Wood Science* 50 (5): 466-469 (Penn State Univ, Dept Plant Pathol, University Pk, PA 16802 USA.).
- OKADA, H., HARADA, H., i KADOTA, I. (2005): Fungal-feeding habits of six nematode isolates in the genus *Filenchus*. *Soil Biology and Biochemistry* 37 (6): 1113-1120.
- OKANO, K., FUKUI, S., KITAO, R., i USAGAWA, T. (2007): Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on in vitro digestibility and chemical composition. *Animal Feed Science and Technology* 136 (3-4): 240-247.
- OKE, F. i ASLIM, B. (2011): Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. *Food Chemistry* 128 (3): 613-619.
- OKEKE, B. C., SMITH, J. E., PATERSON, A., i WATSON-CRAIK, I. A. (1996): Influence of environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil by *Lentinula edodes* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45 (1-2): 263-266 (Abstract).
- OLSSON, S. (1994): Uptake of glucose and phosphorous by growing colonies of *Fusarium oxysporum* as quantified by image analysis. *Experimental mycology* 18: 33-47.
- ORIA DE RUEDA, J. A., MARTÍNEZ DE AZAGRA, A., i SALVADOR NEMOZ, L. (1991): Ecología y productividad de *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Qué. y *Cantharellus cibarius* Fr. en España. *Boletín Sociedad Micológica de Madrid* 15: 6-12.
- OTIENO, W., JEGER, M., i TERMORSHUIZEN, A. (2003): Effect of infesting soil with *Trichoderma harzianum* and amendment with coffee pulp on survival of *Armillaria*. *Biological Control* 26 (3): 293-301.
- PALAZÓN LOZANO, F. (2001). Setas para todos. Ed. Editorial Pirineo.
- PALIZI, P., GOLTAPPEH, E. M., POURJAM, E., i SAFAIE, N. (2009): Potential of oyster mushrooms for the biocontrol of sugar beet nematode (*Heterodera schachtii*). *Journal of Plant Protection Research* 49 (1): 27-33.

- PALMIERI, G., GIARDINA, P., BIANCO, C., SCALONI, A., CAPASSO, A., i SANNIA, G. (1997): A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry* 272 (50): 31301-31307.
- PALMIERI, P., BIANCO, C., FONTANELLA, B., i SANNIA, G. (2000): Purification, characterization and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied Environmental Microbiology* 67: 2754-2759.
- PALMIERI, P., GIARDINA, P., BIANCO, C., FONTANELLA, B., i SANNIA, G. (2000): Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Environmental Microbiology* 66: 920-924.
- PANCORBO, F. i RIBES, M. A. (2010): Setas de dunas mediterráneas. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* 34: 271-294.
- PELAEZ, F., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (1995): Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation. *Mycological Research* 99: 37-42.
- PEÑAS, M. M., RUST, B., LARRAYA, L. M., RAMÍREZ, L., i PISABARRO, A. G. (2002): Differentially regulated, vegetative-mycelium-specific hydrophobins of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology* 68 (8): 3891-3898.
- PENG, J. T., PAI, S., LIN, A., i CHEN, M. W. (1999): Production of trehalose - comprises growing fungus of species *Pleurotus eryngii* in medium and purifying trehalose produced by fungus. *Patent US 5858735*
- PENG, J. T., JENE-TUNG, C., i TSAI, Y.-F. (2002): Effect of rice Bran on the production of different King oyster mushroom strains during bottle cultivation.
- PENG, J. (1997): Study on the effects of single and mixed sawdusts of different origins on the production of *Pleurotus eryngii*. *Journal of Agricultural Research of China* 46 (1): 51-59.
- PÉREZ DE GREGORIO, M. À. i VIDAL, J. M. (1994): Aportació al coneixement dels macromicets de l'illa de Mallorca I. *Revista de la Societat Catalana de Micologia* 16-17: 145-162.
- PHILIPPOUSSIS, A., ZERVAKIS, G., i DIAMANTOPOULOU, P. (2001): Bioconversion of agricultural lignocellulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aegerita*, *Volvariella volvacea* and *Pleurotus spp.* *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 191-200.
- PILÁT, A. (1935). Atlas des champignons de l'Europe, vol.2. *Pleurotus* Fries. *Praha*.
- PRESSMAN, E., NEGBI, M., SACHS, M., i JACOBSEN, J. V. (1977): Varietal differences in light requirements for germination of celery (*Apium graveolens* L.) seeds and the effects of thermal and solute stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 4: 821-831.
- PURNOMO, A. S., MORI, T., KAMEI, I., NISHII, T., i KONDO, R. (2010): Application of mushroom waste medium from *Pleurotus ostreatus* for bioremediation of DDT-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 64 (5): 397-402.

QUÉLET, L. (1872): Les champignons du Jura et es Vosges Bd.1. *Mém.Soc.Émul.Montbéliard* : 2-112.

QUÉLET,L. (1886). Enchiridion fungorum in Europa media et praesertim in Gallia vigentium. *Lutetiae*. 148 pp.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009: R: A language and environment for statistical computing *R Foundation for Statistical Computing (Vienna, Austria)*. URL: <http://www.R-project.org>.

RADTKE, C., COOK, W. S., i ANDERSON, A. (1994): Factors affecting antagonism of the growth of *Phanerochaete chrysosporium* by bacteria isolated from soils. *Applied Microbiology and Biotechnology* 41 (2): 274-280 (Abstract).

RANA, G. L., BACCI, L., FERRI, F., FILIPPI, C., MARRAS, F., MARZIANO, F., i SISTO, D. (1998): Recenti acquisizioni sulla coltivazione e sulle aversità del cardonzello (*Pleurotus eryngii*). *Micologia Italiana* 27: 43-53.

RASBAND, W.S., 1997: ImageJ v.1.39r. *National Institutes of Health (Bethesda, Maryland, USA)*. URL: <http://rsb.info.nih.gov/ij>.

RAVASH, R., SHIRAN, B., ALAVI, A. A., BAYAT, F., RAJAEI, S., i ZERVAKIS, G. I. (2010): Genetic variability and molecular phylogeny of *Pleurotus eryngii* species-complex isolates from Iran, and notes on the systematics of Asiatic populations. *Mycological Progress* 9 (2): 181-194.

READ, D. B., BENGOUGH, A. G., GREGORY, P. J., CRAWFORD, J. W., ROBINSON, D., SCRIMGEOUR, C. M., YOUNG, I. M., ZHANG, K., i ZHANG, X. (2003): Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. *New Phytologist* 157 (2): 315-326.

REDEMBAUGH, M. K. i REYES, Z. (1987): Artificial seed coat for botanic seed analogs. *Patent US4715143*

REESLEV, M. i KJOLLER, A. (1995): Comparison of biomass dry weights and radial growth rates of fungal colonies on media solidified with different gelling compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (12): 4236-4239.

RITZ, K. i CRAWFORD, J. (1990): Quantification of the fractal nature of colonies of *Trichoderma viride*. *Mycological Research* 94: 1138-1141.

RO, H. S., KANG, E. J., YU, J. S., LEE, T. S., LEE, C. W., i LEE, H. S. (2007): Isolation and characterization of a novel mycovirus, PeSV, in *Pleurotus eryngii* and the development of a diagnostic system for it. *Biotechnology Letters* 29 (1): 129-135.

RODRÍGUEZ ARMAS, L., BELTRAN TEJERA, E., BAÑARES BAUDET, A., i GONZÁLEZ LUIS, M. D. (1998): Adiciones a la flora micológica canaria. *Documents mycologiques* 17 (72): 65-71.

RODRÍGUEZ COUTO, S. i TOCA HERRERA, J. L. (2006): Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* 24 (5): 500-513.

- RODRÍGUEZ ESTRADA, A. E., JIMENEZ-GASCO, M., i ROYSE, D. J. (2009): Improvement of yield of *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* by substrate supplementation and use of a casing overlay. *Bioresource Technology* 100 (21): 5270-5276.
- RODRÍGUEZ ESTRADA, A. E., JIMENEZ-GASCO, M. D. M., i ROYSE, D. J. (2010): *Pleurotus eryngii* species complex: Sequence analysis and phylogeny based on partial EF1 $\alpha$  and RPB2 genes. *Fungal Biology* 114 (5-6): 421-428.
- RODRÍGUEZ ESTRADA, A. E., LEE, H. J., BEELMAN, R. B., JIMENEZ-GASCO, M. M., i ROYSE, D. J. (2009): Enhancement of the antioxidants ergothioneine and selenium in *Pleurotus eryngii* var. *eryngii* basidiomata through cultural practices. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 (9): 1597-1607.
- RODRÍGUEZ ESTRADA, A. E. i ROYSE, D. J. (2005): Determination of *Pseudomonas tolaasii* threshold concentrations required to produce symptoms of bacterial blotch disease in *Pleurotus eryngii*. *Fifth international conference on mushroom biology and mushroom products* 12: 379-382.
- RODRÍGUEZ ESTRADA, A. E. i ROYSE, D. J. (2007): Yield, size and bacterial blotch resistance of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hulls/oak sawdust supplemented with manganese, copper and whole ground soybean. *Bioresource Technology* 98 (10): 1898-1906.
- RODRÍGUEZ ESTRADA, A. E. i ROYSE, D. J. (2008): *Pleurotus eryngii* and *P. nebrodensis*: from the wild to commercial mushrooms (specialty mushrooms). *Mushroom news* .
- RODRÍGUEZ, E., NUERO, O., GUILLÉN, F. J., MARTÍNEZ, A. T., i MARTÍNEZ, M. J. (2004): Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil Biology & Biochemistry* 36 (6): 909-916.
- RODRÍGUEZ, E., RUIZ-DUEÑAS, F. J., KOOISTRA, R., RAM, A., MARTÍNEZ, A. T., i MARTÍNEZ, M. J. (2008): Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the pel3 encoded protein. *Journal of Biotechnology* 134 (1-2): 9-19.
- ROMAINE, C. P. i MARLOWE, A. (1994): Intact seed-based delayed-released nutrient supplement for mushroom cultivation. *Patent* 5291685
- ROMAINE, C. P. i SCHLAGNHAUFER, B. (1992): Characteristics of a Hydrated, Alginate-Based Delivery System for Cultivation of the Button Mushroom. *Applied Environmental Microbiology* 58 (9): 3060-3066.
- ROTHROCK, C. S. i GOTTLIEB, D. (1984): Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Canadian Journal of microbiology* 30: 1440-1447 (Abstract).
- RUIZ-DUEÑAS, F. J., CAMARERO, S., PEREZ, B. M., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (2001): A new versatile peroxidase from *Pleurotus*. *Biochemical Society Transactions* 29: 116-122.



- RUIZ-DUEÑAS, F. J., GUILLEN, F., CAMARERO, S., PEREZ-BOADA, M., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (1999a): Regulation of peroxidase transcript levels in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Applied and environmental microbiology* 65 (10): 4458-4463.
- RUIZ-DUEÑAS, F. J., GUILLEN, F., CAMARERO, S., PEREZ, B. M., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (1999b): 524 Regulation of peroxidase transcript levels in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Applied and environmental microbiology* 65 (10): 4458-4463.
- RUIZ-DUEÑAS, F. J. i MARTÍNEZ, M. J. (1996): Enzymatic activities of *Trametes versicolor* and *Pleurotus eryngii* implicated in biocontrol of *Fusarium oxysporum* f sp *lycopersici*. *Current Microbiology* 32 (3): 151-155.
- RUIZ-DUEÑAS, F. J., MARTINEZ, M. J., i MARTINEZ, A. T. (1999): Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*. *Molecular Microbiology* 31 (1): 223-235.
- RUSS, J. (2007). The Image Processing Handbook. Ed. CRC Press - Taylor & Francis Group, LLC. NY. 817 pp.
- RUSSO, A., FILIPPI, C., TOMBOLINI, R., TOFFANIN, A., BEDINI, S., AGNOLUCCI, M., i NUTI, M. (2003): Interaction between gfp-tagged *Pseudomonas tolaasii* P12 and *Pleurotus eryngii*. *Microbiological Research* 158 (3): 265-270.
- RYAN, J. W. i JUEN, D. R. (1988): Crosslinked silicone coatings for botanical seeds. *Patent US4753035*
- SABER, M. (1990): Contribution to the knowledge of agaricales, pleurotoid in habit in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 26: 29-40.
- SACCARDO, P.A. (1887). *Silloge fungorum omnium hucusque Cognitorum*.
- SACCARDO, P.A. (1891). *Silloge fungorum omnium hucusque Cognitorum*.
- SAIKAI, T., TANAKA, H., FUJI, M., SUGAWARA, H., TAKEYA, I., TSUNEMATSU, K., i ABE, S. (2002): Hypersensitivity pneumonitis induced by the spore of *Pleurotus eryngii* (Eringi). *Internal Medicine* 41 (7): 571-573.
- SALMONES, D., GAITÁN-HERNÁNDEZ, R., PÉREZ, R., i GUZMÁN, G. (1997): Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre crecimiento micelial y productividad. *Revista Iberoamericana de Micología* 14: 173-176.
- SÁNCHEZ, A. M., AZCÁRATE, F. M., ARQUEROS, L., i PECO, B. (2002): Volumen y dimensiones como predictores del peso de semilla en especies herbáceas del centro de la península ibérica. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 59 (2): 249-262.
- SÁNCHEZ, F., HONRUBIA, M., i TORRES, P. (2000): Cultural characteristics of some ectomycorrhizal fungi in pure culture. *Revista Iberoamericana de Micología* 17 (4): 127-134.

- SANJUST, E., POMPEI, R., RESCIGNO, A., RINALDI, A., SCRUGLI, S., i BALLERO, M. (1994): Olive milling wastewater as a substrate for growth of four *Pleurotus* species. *Micologia Italiana* 23: 119-121.
- SANLIER, S. H., GIDER, S., i KÖPRÜLÜ, A. (2013): Immobilization of laccase for biotechnology applications. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 41 (4): 259-263 (Abstract).
- SANTOS, C. i LABARERE, J. (1999): Aa-Pri2, a single-copy gene from *Agrocybe aegerita*, specifically expressed during fruiting initiation, encodes a hydrophobin with a leucine-zipper domain. *Current-Genetics*. June, 35: 564-570.
- SAWA, S. (2001). Eringi: antei saibai no jissai to hanbai riyo. *Ed. Nossan Gyosan Bunka Kyokai. Tòquio*. 157 pp.
- SCANU, A. (2009): La fungicoltura nel terralbese.
- SHEEL, T., HOFER, M., LUDWIG, S., i HOLKER, U. (2000): Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54 (5): 686-691.
- SCHICK, Z. L. i TIEN, M. (1997): The roles of veratryl alcohol and oxalate in fungal lignin degradation. *Journal of Biotechnology* 53: 93-102.
- SCHILLING, A. (1987). (inèdit).
- SCHLOSSER, D. i HOFER, C. (2002): Laccase-catalyzed oxidation of Mn<sup>2+</sup> in the presence of natural Mn<sup>3+</sup> chelators as a novel source of extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and its impact on manganese peroxidase. *Applied and environmental microbiology* 68 (7): 3514-3521.
- SCHOUTEN, A., WAGEMAKERS, L., STEFANATO, F. L., VAN DER KAAIJ, R. M., i VAN KAN, J. A. L. (2002): Resveratrol acts as a natural profungicide and induces self-intoxication by a specific laccase. *Molecular Microbiology* 43 (4): 883-894.
- SEABY, D. (1998): *Trichoderma* as a weed mould or pathogen in mushroom cultivation. *En: Trichoderma & Gliocladium*, Pàg. 267 - 285. *Ed. Taylor & Francis*.
- SEUNG-HUN, Y. i GUN-SIK, H. (2000): Integrated Control of Green Mould in Oyster Mushroom 1-5. *MushWorld Information Center (www.mushworld.com)* .
- SHEN, J. et al. (2005): The exploitaton and cultivation of *Pleurotus nebrodensis* in China. *En: Proceedings 5th international conference on mushroom biology and mushroom products*, Pàg. 354 - 359.
- SHIBATA, T., KUDOU, M., HOSHI, Y., KUDO, A., NANASHIMA, N., i MIYAIRI, K. (2010): Isolation and characterization of a novel two-component hemolysin, erylysin A and B, from an edible mushroom, *Pleurotus eryngii*. *Toxicon* 56 (8): 1436-1442.
- SHIMIZU, K., YAMANAKA, M., GYOKUSEN, M., KANEKO, S., TSUTSUI, M., SATO, J., SATO, I., SATO, M., i KONDO, R. (2006): Estrogen-like activity and prevention effect of

bone loss in calcium deficient ovariectomized rats by the extract of *Pleurotus eryngii*. *Phytotherapy Research* 20 (8): 659-664.

SHUTTE, B. J. (2002). Embryo and pericarp contributions to seed dormancy of *Eryngium yuccifolium* Michx. (*Apiaceae*) and techniques for dormancy removal. Ed. *Ohio State University*.

SIGOILLOT, C., CAMARERO, S., VIDAL, T., RECORD, E., ASTHER, M., PEREZ-BOADA, M., MARTINEZ, M. J., SIGOILLOT, J. C., ASTHER, M., COLOM, J. F., i MARTINEZ, A. T. (2005): Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology* 115 (4): 333-343.

SIQUIER, J. L. i CONSTANTINO, C. (1982): Aportación de nuevas especies a la flora micológica de la Isla de Mallorca. *Butlletí de la Societat d'Història Natral de les Balears* 26: 162.

SIQUIER, J. L. i CONSTANTINO, C. (1995): Contribution to the mycological knowledge of the Balearic Islands. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* 20: 17.

SIQUIER, J. L. i LILLO, F. (1994): Contribution to the mycological knowledge of the Natural Park of the Cabrera Archipiélago (Balearic Islands, Spain). *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid* 19: 203.

SIQUIER, J. L. i SALOM, J. C. (2003): Contribució al coneixement micològic de les Illes Balears, XI. *Revista de la Societat Catalana de Micologia* 25: 38.

SIQUIER, J. L., SALOM, J. C., ESPINOSA, J., i SERRA, A. (2011): Notes corològiques sobre la flora micològica d'Eivissa (Illes Balears, Espanya). II. *Revista de la Societat Catalana de Micologia* 33: 74.

SISTO, D., FAGGIANO, S., i MANNERUCCI, F. (1998): Nuovi substrati per la coltivazione del cardoncello (*Pleurotus eryngii*). *Micologia Italiana* 27: 53-60.

SLÉZEC, A.-M. (1984): Variabilité du nombre chromosomique chez les pleurotes des ombellifères. *Canadian Journal of Botany* 62: 2610-2617.

SNAJDR, J. i BALDRIAN, P. (2006): Production of lignocellulose-degrading enzymes and changes in soil bacterial communities during the growth of *Pleurotus ostreatus* in soil with different carbon content. *Folia Microbiologica* 51 (6): 579-590 (abstract).

SONG, C. H., YANG, B. K., LIM, S. K., i JEONG, Y. T. (2007): Endo-biopolymers produced from submerged mycelium culture of *Pleurotus eryngii*, capable of inhibiting proliferation of tumor cancer cells, and increasing activity of natural killer cells in spleen. *Patent KR2007001502A*

STAJIC, M., PERSKY, L., FRIESEM, D., HADAR, Y., WASSER, S. P., NEVO, E., i VUKOJEVIC, J. (2006a): Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology* 38 (1-2): 65-73.

STAJIC, M., PERSKY, L., HADAR, Y., FRIESEM, D., DULETIC-LAUSEVIC, S., WASSER, S. P., i NEVO, E. (2006b): Effect of copper and manganese ions on activities of laccase and peroxidases in three *Pleurotus* species grown on agricultural wastes. *Applied biochemistry and biotechnology* 128 (1): 87-96.

STAJIC, M. i VUKOJEVIC, J. (2010): Interaction of trace elements and ligninolytic enzymes in *Pleurotus eryngii*. *Biological Trace Element Research* .

STAJIC, M., VUKOJEVIC, J., i DULETIC-LAUUEVIC, S. (2009): Biology of *Pleurotus eryngii* and role in biotechnological processes: A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 29 (1): 55-66.

STAMETS, P. (1993). Growing gourmet and medicinal mushrooms. Ed. Ten Speed Press. Berkeley. 552 pp.

STANDARDI, A. i MICHELI, M. (2013): Encapsulation of in vitro-derived explants: An innovative tool for nurseries. 11013: 397-418 (Abstract).

STEFFEN, K. T., SCHUBERT, S., TUOMELA, M., HATAKKA, A., i HOFRICHTER, M. (2007): Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi. *Biodegradation* 18 (3): 359-369.

STERGIOPOULOS, I. i DE WIT, P. J. G. M. (2009): Fungal effector proteins. 47: 233-263 (Abstract).

STIJVE, T. i DE MEIJER, A. A. R. (1999): Hydrocyanic acid in mushrooms, with special reference to wild-growing and cultivated edible species. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 95 (9): 366-373.

STOCKTON, M. i HORGAN, P. (1993): Analysis of the radial growth in selected pedigrees of *Agaricus bisporus*. *Cultivated Mushroom Research (CMR) Newsletter* 1 (2): 38-43.

STROPNIK, TRATNIK, i SELJAK (1988): Naše Gobje Bogastvo (Ljubljana). *Bogastvo (Ljubljana)* : 427.

SUTHERLAND, G. R. J., HASELBACH, J., i AUST, S. D. (1997): Biodegradation of crosslinked acrylic polymers by a white-rot fungus. *Environmental Science and Pollution Research* 4 (1): 16-20.

SYNYTSYA, A., MÍCKOVÁ, K., SYNYTSYA, A., JABLONSKÝ, I., SPEVÁČEK, J., ERBAN, V., KOVÁŘIKOVÁ, E., i COPÍKOVÁ, J. (2009): Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate Polymers* 76 (4): 548-556.

TAHTAT, D., MAHLOUS, M., BENAMER, S., KHODJA, A. N., OUSSEDIK-OUMEHDI, H., i LARABA-DJEBARI, F. (2013): Oral delivery of insulin from alginate/chitosan crosslinked by glutaraldehyde. *International Journal of Biological Macromolecules* 58: 160-168.

TAN, Q. 2011: Cultivation of *Pleurotus nebrodensis*. *Edible Fungi Institute Shanghai Academy of Aricultural Sciences*.

TAYLOR, A., KLEIN, D. E., i WHITLOW, T. H. (1998): SMP: Solid Matrix Priming of seeds. *Scientia Horticulturae* 37: 1-11.

TEJEDOR, F. (2009): Aportaciones al Catálogo Micológico Valenciano (IV). Epigeos novedosos y nuevos datos corológicos de especies ya citadas. *Butlletí de la Societat Micològica Valenciana* 14: 98.

TEN HAVE, R., WIJNGAARD, H., ARIËS-KRONENBURG, N. A. E., STRAATSMA, G., i SCHAAP, P. J. (2003): Lignin degradation by *Agaricus bisporus* accounts for a 30% increase in bioavailable hollocellulose during cultivation on compost. *Journal of agricultural and food chemistry* 51: 2242-2245.

THURSTON, C. F. (1994): The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140 (1): 19-26.

TIMONEN, S., FINLAY, R., OLSSON, S., i SÖDERSTRÖM, B. (1996): Dynamics of Phosphorous translocation in intact ectomycorrhizal systems: non-destructive monitoring using a  $\beta$ -scanner. *FEMS Microbiology Ecology* 19: 171-180.

TLALKA, M., BEBBER, D. P., DARRAH, P. R., WATKINSON, S. C., i FRICKER, M. D. (2008): Quantifying dynamic resource allocation illuminates foraging strategy in *Phanerochaete velutina*. *Fungal genetics and biology* 45 (7): 1111-1121.

TOBAR, V., NOTARIO, A., i CASTRESANA, L. (2010): *Tarnania fenestralis* (Meigen, 1818) (Diptera: Micetophilidae) associated with the fungus *Pleurotus eryngii* (DC.) Quél. *Investigacion Agraria Sistemas y Recursos Forestales* 19 (3): 299-305.

TORDOFF, G. M., BODDY, L., i JONES, T. H. (2006): Grazing by *Folsomia candida* (Collembola) differentially affects mycelial morphology of the cord-forming basidiomycetes *Hypholoma fasciculare*, *Phanerochaete velutina* and *Resinicium bicolor*. *Mycological Research* 110 (3): 335-345.

TORNBERG, K., BAATH, E., i OLSSON, S. (2003): Fungal growth and effects of different wood decomposing fungi on the indigenous bacterial community of polluted and unpolluted soils. *Biology and Fertility of Soils* 37 (3): 190-197.

TORTA, L. (1994): Prime indicazioni sull'impiego dei residui di potatura del nocciolo (*Corylus avellana* L.) come sustrato colturale di *Pleurotus* spp. *Micologia-Italiana*. 23: 25-28.

TREPAT, E. i VILASECA, A. (2010a). Camins ramaders de Catalunya: eixos principals (1:500 000). Ed. Institut Cartogràfic de Catalunya i Fundació del Món Rural.

TREPAT, E. i VILASECA, A. (2010b). Camins ramaders i transhumància a Catalunya. Ed. Fundació del Món Rural.

TSAI, S. Y., HUANG, S. J., LO, S. H., i MAU, J. L. (2008): Antioxidant properties of several culinary-medicinal mushrooms during postharvest storage. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 10 (3): 245-253.

TSAI, S. Y., HUANG, S. J., LO, S. H., WU, T. P., LIAN, P. Y., i MAU, J. L. (2009): Flavour components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry* 113 (2): 578-584.

TSURUOKA, H., MATSMOTO, K., NISHIMORI, Y., KENJO, Y., i HARUKUNI, R. (2003): Cosmetic for preventing and treating aging of skin, comprises preset amount of homogenate or dried extract of *Pleurotus eryngii*, belonging to Basidiomycetes. *Patent JP10158144-A*

TUCKER, B., RADTKE, C., KWON, S. I., i ANDERSON, A. J. (1995): Suppression of bioremediation by *Phanerochaete chrysosporium* by soil factors. *Journal of Hazardous Materials* 41 (2-3): 251-265.

TUCKER, K. G., KELLY, T., DELGRAZIA, P., i THOMAS, C. R. (1992): Fully automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. *Biotechnology progress* 8 (4): 353-359.

UNGER, F. i KOTSCHY, T. (1865). Die Insel Cypern: ihrer physischen und organischen Natur nach mit rücksicht auf ihre frühere geschichte, geschildert. *Viena*. 598 pp.

URBANELLI, S., DELLA ROSA, V., FANELLI, C., FABBRI, A. A., i REVERBERI, M. (2003): Genetic diversity and population structure of the Italian fungi belonging to the taxa *Pleurotus eryngii* (DC.:Fr.) Quel and *P. ferulae* (DC.:Fr.) Quel. *Heredity* 2003 (90): 253-259.

URBANELLI, S., DELLA ROSA, V., PUNELLI, F., PORRETA, D., REVERBERI, M., FABBRI, A. A., i FANELLI, C. (2007): DNA-Fingerprinting (AFLP and RFLP) for genotypic identification in species of the *Pleurotus eryngii* complex. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74: 592-600.

VAJNA, B., NAGY, A., SAJBEN, E., MANCZINGER, L., SZIJÁRTÓ, N., KÓDÓR, Z., BORDÓS, D., i MÁRIALIGETI, K. (2010): Microbial community structure changes during oyster mushroom substrate preparation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86 (1): 367-375.

VARELA, E., MARTINEZ, A. T., i MARTINEZ, M. J. (1999): Molecular cloning of aryl-alcohol oxidase from the fungus *Pleurotus eryngii*, an enzyme involved in lignin degradation. *Biochemical Journal* 341: 113-117.

VASSILEV, N., VASSILEVA, M., AZCON, R., i MEDINA, A. (2001): Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in a soil-plant system. *Journal of Biotechnology* 91: 237-242.

VENTURELLA, G. (2000): Typification of *Pleurotus nebrodensis*. *Mycotaxon* 75: 229-231.

VENTURELLA, G. (2002): On the real identity of *Pleurotus nebrodensis* in Spain. *Mycotaxon* 2002 (84): 445-446.

VENTURELLA, G., ZERVAKIS, G., i LA ROCCA, S. (2000): *Pleurotus eryngii* var. *elaoselini* var. nov. from Sicily. *Mycotaxon* 76: 419-427.

- VENTURELLA, G., ZERVAKIS, G., i SAIITTA, A. (2002): *Pleurotus eryngii* var. *thapsiae* var. nov. from Sicily. *Mycotaxon* 81: 69-74.
- VERZANI, J. 2002: Simple R - Using R for Introductory Statistics. *Department of Mathematics, College of Staten Island, City University of New York*. URL: <http://www.math.csi.cuny.edu/Statistics/R/simpleR>.
- VIDAL, J.M., PÉREZ DE GREGORIO, M.À. et al. (1999). Bolets de les comarques gironines. Ed. *Caixa de Girona*.
- VILA, J., ROCABRUNA, A., TABARÉS, M., CORTÉS, C., HOYO, P., i LLIMONA, X. (2000): Noves dades (1998-2000) sobre els fongs del Parc Nacional d'Aigüestortes i Estany de Sant Maurici i àrees pròximes. V *Jornades sobre Recerca al Parc Nacional d'Aigüestortes i Estany de Sant Maurici*, v. 5.
- WALMSLEY, C. A. i DAVY, A. J. (1997): Germination characteristics of single beach species, effects of seed ageing and implications for vegetation restoration. *Journal of Applied Ecology* 34: 131-142.
- WANG, F., GUO, C., i LIU, C. Z. (2013): Immobilization of *Trametes versicolor* cultures for improving laccase production in bubble column reactor intensified by sonication. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 40 (1): 141-150.
- WANG, H. X. i NG, T. B. (2004): Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides* 25 (1): 1-5.
- WANG, H. X. i NG, T. B. (2006): Purification of a laccase from fruiting bodies of the mushroom *Pleurotus eryngii*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69 (5): 521-525.
- WASSER, S. (2002): Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (3): 258-274.
- WASSER, S. P. (2011): Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 89 (5): 1323-1332.
- WATANABE, Y. W., EGUCHI, F., i SCHNAPPS, K. K. (1999): Anti-hyperlipemic for treating and preventing hyperlipidemia, comprises eryngii mushroom, such as *Pleurotus eryngii* extract or dry powder, as active ingredient. *Patent JP2001064194-A*
- WATKINSON, S. C., BODDY, L., BURTON, K., DARRAH, P. R., EASTWOOD, D., FRICKER, M. D., i TLALKA, M. (2005): New approaches to investigating the function of mycelial networks. *Mycologist* 199 (1): 11-17.
- WATSON, A. G. i FORD, E. J. (1972): Soil fungistasis: a reappraisal. *Annual Review of Phytopathology* 10: 327.
- WESSELS, S.C. (2007): The contribution of sheep zoochory to the conservation and restoration of target plant communities in isolated sand ecosystems. *Tesi doctoral*, 163 pp. *Darmstadt University of Technology*.

- WINDER, R. S., WHEELER, J. J., CONDER, N., OTVOS, I. S., NEVILL, R., i DUAN, L. (2003): Microencapsulation: A strategy for formulation of inoculum. *Biocontrol Science and Technology* 13: 155-169.
- WOLTER, M., IN DER WIESCHE, C., ZADRAZIL, F., HEY, S., HASELBACH, J., i SCHNUG, E. (2002): Biological degradability of syntetic superabsorbent soil conditioners. *Landbauforschung Volkenrode* 52 (1): 43-52.
- WOOD, J., TORDOFF, G. M., JONES, T. H., i BODDY, L. (2006): Reorganization of mycelial networks of *Phanerochaete velutina* in response to new woody resources and collembola (*Folsomia candida*) grazing. *Mycological Research* 110 (8): 985-993.
- WÖSTEN, H. A. B. (2001): Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology* 55: 625-646 (Abstract).
- YAN, P. S. i JIANG, J. H. (2005): Preliminary research of the RAPD molecular marker-assisted breeding of the edible basidiomycete *Stropharia rugoso-annulata*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21 (4): 559-563.
- YANAGIBASHI, H., MATSUOKA, D., HIRAMA, J., MIYAMOTO, T., NISHIBORI, K., i OHDAIRA, Y. (2005): Effects of wavelength of light stimuli on the bio-electric potential and the morphogenetic properties of *Pleurotus eryngii*. *Journal of Science and High Technology in Agriculture* 17 (4): 175-181.
- ZADRAZIL, F. (1975): Influence of CO<sub>2</sub> concentration on the mycelium growth of three *Pleurotus* species. *Applied Microbiology and Biotechnology (Historical Archive)* 1 (4): 327-335.
- ZADRAZIL, F. i PUNIYA, A. K. (1995): Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. *Bioresource Technology* 54: 85-87.
- ZAKARIA, A. J. i BODDY, L. (2002): Mycelial foraging by *Resinicium bicolor*: Interactive effects of resource quantity, quality and soil composition. *FEMS Microbiology Ecology* 40 (2): 135-142.
- ZAVARZINA, A. G., LEONTIEVSKY, A. A., GOLOVLEVA, L. A., i TROFIMOV, S. YA. (2004): Biotransformation of soil humic acids by blue laccase of *Panus tigrinus* 8/18: An in vitro study. *Soil Biology and Biochemistry* 36 (2): 359-369.
- ZERVAKIS, G., MONCALVO, J.-M., i VILGALYS, R. (2004): Molecular phylogeny, biogeography and speciation of the mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. *Microbiology* 150: 715-726.
- ZERVAKIS, G. i BALIS, C. (1996): A pluralistic approach in the study of *Pleurotus* species with emphasis on compatibility and physiology of the European morphotaxa. *Mycological-Research*. 1996 (100): 717-731.
- ZERVAKIS, G., VENTURELLA, G., i PAPADOPOULOU, K. (2001): Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species complex as



determined by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. *Microbiology Reading* 147 (11): 3183-3194.

ZERVAKIS, G., YIATRAS, P., i BALIS, C. (1996): Edible mushrooms from olive oil mill wastes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38: 237-243.

ZHANG, J. et al. (2005): The cultivars of *Pleurotus nebrodensis* in China. En: *Proceedings 5th international conference on mushroom biology and mushroom products*, Pàg. 350 - 353.

ZHANG, J., JINHUANG, C., BUN NG, T., i WANG, H. (2006): Genetic polymorphism of *Ferula* mushroom growing on *Ferula sinkiangensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 304-309.

ZHANG, S., BAO, Q., XU, J., i ZHU, J. (2005): Studies on growth conditions and cultivation characteristics of *Pleurotus eryngii*. *Journal of Plant Resources and Environment* 14 (1).



# 9. Annex

## Macros emprades per a l'anàlisi d'imatge.

### 9.1.- Macros per a la neteja d'imatges

```
// *****
// **                               MACRO: AI Batch Neteja                               ***
// *****
// *** Automatitza la neteja imatges de colònies fúngiques per a l'anàlisi ***
// *** d'imatge. ***
// *** Normalitza imatges respecte un blanc ***
// *** ***
// *** OBSERVACIONS ***
// *** - El blanc s'ha de dir Blanc.tif i estar al mateix directori. ***
// *** - Demana directori origen i directori destí. Si son el mateix ***
// *** sobreescrirà les imatges. ***
// *** - Cal ajustar els valors del cercle que delimita la càpsula de petri ***
// *** - Accions: Elimina la corona de la càpsula >Invert >Median >Resta ***
// *** blanc invertit>Invert>desa ***
// *** - Desa una còpia processada i invertida del blanc com a White.tif ***
// *** - Funciona amb Image J v.1.42 ***
// *****

macro "AI-BatchNeteja" {
  dir = getDirectory("Choose a Directory ");
  destí = getDirectory("On deso els resultats");
  list = getFileList(dir);
  setBatchMode(true);

  for (i=0; i<list.length; i++) {
    path = dir+list[i]; // "path" és el nom del fitxer que es processa
    showProgress(i, list.length);

    // obre el fitxer
    if (!endsWith(path, ".tif")) open(path);
    if (nImages>=1) {

      // neteja el fitxer
      makeOval(780, 180, 1500, 1600); // **** Ajustar aquests paràmetres a cada cas
      run("Clear Outside");
      run("Select None");
      run("Invert");

      // Median2x2
      run("Median...", "radius=2"); //*** ELIMINAR les barres si es vol aplicar

      // si el fitxer es un blanc desa el fitxer de referència
      if (endsWith(list[i], ".B.tif")) saveAs("Tiff", dir+"White.tif");

      // si no, obre el fitxer de referència i a la resta
      else {
        open(dir+"White.tif");
        run("Image Calculator...", "image1=["+list[i]+"] operation=Subtract
image2=[White.tif] create");
        run("Invert");
        saveAs("Tiff", destí+list[i]);
        close();
        close()
      }
    }
  }
}
```

---

## 9.2.- Macros per a la mesura de la densitat integrada

```
// *****
// ***                               MACRO: Batch Mesura (v2.1)          ***
// *****
// *** Macro per mesurar la biomassa (Densitat integrada) a tot un directori ***
// *** OBSERVACIONS                                                    ***
// *** - Demana l·lindars mínim i màxim entre els que cal mesurar        ***
// *** - Permet calibrar abans les imatges (cal tenir el patró en un txt) ***
// *** - Permet escalar la imatge                                         ***
// *** - Es recomana no tenir altres fitxers en el directori seleccionat ***
// *** - Funciona amb Image J v.1.42                                     ***
// *****

macro "Batch Mesura" {
    lower=0;
    upper=255;

//Pregunto al usuari el threshold (per defecte el existent o bé 0-255)

Dialog.create("Llindar mínim");
Dialog.addNumber("Threshold mínim",lower);
Dialog.show();
lower=Dialog.getNumber();

Dialog.create("Llindar màxim");
Dialog.addNumber("Threshold màxim",upper);
Dialog.show();
upper=Dialog.getNumber();

//Afegeixo al registre el llindar emprat
//print ("Threshold situat a "+lower+" "+upper);
//Pregunto el directori a mesurar

    dir = getDirectory("Escull el directori a mesurar");
    list = getFileList(dir);

// Pregunta si calibro

Dialog.create("Calibrem?");
Dialog.addMessage ("Threshold establert a "+lower+" "+upper);
Dialog.addCheckbox ("Calibrar",1)
Dialog.show();
calibro=Dialog.getCheckbox();

// Executo Measure a tots els fitxers del directori al Threshold especificat
// i si no s'ha calibrat, calibrem

    for (i=0; i<list.length; i++) {
        path = dir+list[i];
        showProgress(i, list.length);
        if (!endsWith(path,"/")) open(path);
        if (nImages>=1) {
            if (calibro==1) {
                Dialog.create("ATENCIÓ!");
                Dialog.addMessage ("Recorda marcar la casella global!!");
                Dialog.show();
                run("Calibrate...");
                close();
                calibro=0;
            }

            if (i==0) {
                lower=calibrate(lower);
                upper=calibrate(upper);
            }
            setThreshold (lower, upper);
            run("Measure");
            close(); }
    }
}
```

### 9.3.- Macro per a la mesura de la biomassa i paràmetres morfològics

```
// *****
// **                               MACRO: AI-BatchMorfeu (v.7.2)          ***
// *****
// *** Mesura la densitat integrada i una vintena de paràmetres morfològics ***
// *** en cinc corones de densitat diferents (llindars editables), a partir ***
// *** d'imatges de colònies de fongs in vitro.                            ***
// ***                                                                    ***
// *** OBSERVACIONS                                                         ***
// ***                                                                    ***
// *** - Les imatges han d'estar netes (només la imatge de la colònia sobre ***
// *** un fons blanc                                                         ***
// *** - La macro processa totes les imatges d'un directori (Tiff 8 bit)    ***
// *** - Aboca els resultats a un fitxer log, que caldrà desar (valors      ***
// *** separats pel símbol @)                                               ***
// *** - Funciona amb Image J v.1.43f                                       ***
// ***                                                                    ***
// *****

// *** Operacions prèvies: ***
// setBatchMode(true); //accelera el procés, però dona problemes segons la versió d'IJ
// (bug)

// Prepara les condicions de partida

run("New... ", "name=Registre type=Table width=10000 height=1000 menu");
run("Set Measurements...", "area mean standard min perimeter feret's integrated limit
display redirect=None decimal=4");

//reset inicial de variables :

unit="";
pw=0;
ph=0;
pd=0;
calibro=0;
escalo=0;

// Reset inicial de les variables a calcular per cada llindar:

AreaTotal=0;
PromigTotal=0;
DOMax=0;
IntDenTotal=0;

Area=0;
Promig=0;
Desvest=0;
IntDen=0;
IntArea=0;
IntPromig=0;
IntIntDen=0;
Perim=0;
HullArea=0;
HullPerim=0;
Feret=0;

HullCirc=0;
DiamArea=0;
DiamPerim=0;
AreaPerim=0;
CoefVar=0;
Solidesa=0;
Compact=0;
Concav=0;
Convex=0;
Sharp=0;
Circ=0;
```

```

rois=0;
resultats=" ";

// Declarar vars

Llindars = newArray(0, 50, 100, 150, 200, 253); // Escriu aquí els llindars que vols fer servir
LlindarMax = 253;
MidaObjMin = 0.020;

// *** Rutina a tots els fitxers d'un directori: ***

// Pregunta el directori a mesurar

dir = getDirectory("Escull el directori a mesurar");
list = getFileList(dir);

for (i=0; i<list.length; i++) {
    path = dir+list[i];
    showProgress(i, list.length);
    if (!endsWith(path,"/")) open(path);
    if (nImages>=1) { // rutina a cada fitxer del dir

        // Rutina al començar la llista

        if (i==0) {

            // Pregunta si cal escalar

            getPixelSize(unit, pw, ph, pd); // si hi ha escala, ho té en compte

            Dialog.create("CAL ESCALAR?");
            Dialog.addCheckbox ("Vull posar l'escala ara",1);
            Dialog.show();
            escalo=Dialog.getCheckbox();

            if (escalo==1) {
                Dialog.create("Unitats");
                Dialog.addString("Unitats",unit);
                Dialog.show();
                unit=Dialog.getString();

                Dialog.create("mida d'un píxel");
                Dialog.addNumber("1px= X "+unit+"s:",pw);
                Dialog.show();
                pw=Dialog.getNumber();
                ph=pw;
                escalo=0;
            }
        }

        // Fa que l'escala sempre sigui global per evitar problemes amb ConvexHullPlus

        run("Set Scale...", "distance=1 known="+pw+" pixel=1 unit="+unit+" global");

        // Adquireix la mida d'imatge mínima a escala

        Dialog.create("mida mínima de partícula");
        Dialog.addNumber("Quadrat de X píxels de costat", 3);
        Dialog.show();
        Costat=Dialog.getNumber();

        newImage("Untitled", "8-bit White", 400, 400, 1);
        makeRectangle(150, 284, Costat, Costat);
        run("Fill");
        run("Measure");
        MidaObjMin=pow(getResult("Perim.)/4, 2);
        close();

        // Pregunta si cal calibrar

        Dialog.create("Calibrem?");
    }
}

```

```

Dialog.addCheckbox ("Calibrar",1);
Dialog.show();
calibro=Dialog.getCheckbox();
if (calibro==1) {
    Dialog.create("ATENCIÓ!");
    Dialog.addMessage ("Recorda marcar la casella global!!");
    Dialog.show();
    run("Calibrate...");
    close();
}

// Imprimeix escala, unitats, capçalera resultats, etc.

print("[Registre]","Unitats: "+unit+" Escala: 1 px= "+pw+" Mida objecte
mínima: "+MidaObjMin);
print("[Registre]","");
print("[Registre]","@AreaTotal@PromigTotal@DOMax@IntDenTotal@LLINDARS-
ML@AreaML@PromigML@DesvestML@IntDenML@FractalML@IntAreaML@IntPromigML@IntIntDenML@PerimML
@HullAreaML@HullPerimML@FeretML@HullCircML@DiamAreaML@DiamPerimML@AreaPerimML@CoefVarML@S
olidesaML@CompactML@ConcavML@ConvexML@SharpML@CircML@LLINDARS-
L@AreaL@PromigL@DesvestL@IntDenL@FractalL@IntAreaL@IntPromigL@IntIntDenL@PerimL@HullAreaL
@HullPerimL@FeretL@HullCircL@DiamAreaL@DiamPerimL@AreaPerimL@CoefVarL@SolidesaL@CompactL@
ConcavL@ConvexL@SharpL@CircL@LLINDARS-
M@AreaM@PromigM@DesvestM@IntDenM@FractalM@IntAreaM@IntPromigM@IntIntDenM@PerimM@HullAreaM
@HullPerimM@FeretM@HullCircM@DiamAreaM@DiamPerimM@AreaPerimM@CoefVarM@SolidesaM@CompactM@
ConcavM@ConvexM@SharpM@CircM@LLINDARS-
D@AreaD@PromigD@DesvestD@IntDenD@FractalD@IntAreaD@IntPromigD@IntIntDenD@PerimD@HullAreaD
@HullPerimD@FeretD@HullCircD@DiamAreaD@DiamPerimD@AreaPerimD@CoefVarD@SolidesaD@CompactD@
ConcavD@ConvexD@SharpD@CircD@LLINDARS-
MD@AreaMD@PromigMD@DesvestMD@IntDenMD@FractalMD@IntAreaMD@IntPromigMD@IntIntDenMD@PerimMD
@HullAreaMD@HullPerimMD@FeretMD@HullCircMD@DiamAreaMD@DiamPerimMD@AreaPerimMD@CoefVarMD@S
olidesaMD@CompactMD@ConcavMD@ConvexMD@SharpMD@CircMD");
print("[Registre]","");

// Estableix els llindars en funció del valor de calibrat

LlindarMax=calibrate(LlindarMax);
LlindarMin=calibrate(0);
}

// Mesures a tota la imatge

setThreshold (LlindarMin, LlindarMax);
run("Measure");

resultats=" ";
AreaTotal=getResult("Area");
PromigTotal=getResult("Mean");
DOMax=getResult("Max");
IntDenTotal=getResult("IntDen");

// **** Rutina base per mesurar entre llindars: ****

for (j=0; j<Llindars.length-1; j++) {

//reset (de nou) les variables a calcular per cada llindar:

Area=0;
Promig=0;
Desvest=0;
IntDen=0;
Fractal=0;
IntArea=0;
IntPromig=0;
IntIntDen=0;
Perim=0;
HullArea=0;
HullPerim=0;
Feret=0;

HullCirc=0;

```

```

DiamArea=0;
DiamPerim=0;
AreaPerim=0;
CoefVar=0;
Solidesa=0;
Compact=0;
Concav=0;
Convex=0;
Sharp=0;
Circ=0;

rois=0;

ThMin=calibrate(Llindars[j]); // Min NO es refereix a minima densitat
ThMax=calibrate(Llindars[j+1]);

// Mesura entre llindars

setThreshold (LlindarMin, ThMax);
run("Create Selection");

if (selectionType!=-1){

    run("Select None");
    run("Duplicate...", "title=seed.tif");

    setThreshold (ThMin, ThMax);
    run("Create Selection");

    if (selectionType!=-1){
        run("Select None");

        run("Measure");
        Area=getResult("Area");
        Promig=getResult("Mean");
        Desvest=getResult("StdDev");
        IntDen=getResult("IntDen");
    }

    // mesura fins al llindar màxim

    setThreshold (LlindarMin, ThMax);
    run("Measure");
    IntArea=getResult("Area");
    IntPromig=getResult("Mean");
    IntIntDen=getResult("IntDen");

    // Mesures a partir d'una còpia de la imatge binaritzada
    run("Make Binary", "thresholded remaining black");

    // Elimina soroll
    run("Median...", "radius=2");

    // mesura Dimensió Fractal:
    run("Duplicate...", "title=FD.tif");
    run("Outline");
    run("Fractal Box Count...", "box=2,3,4,6,8,12,16,32,64");
    Fractal=getResult("D");
    selectWindow("Plot");
    close();
    selectWindow("FD.tif");
    close();

// subrutina per mesurar la suma de tots els perímetres dels objectes en la imatge

roiManager("reset");
run("Select None");
setThreshold (LlindarMin, ThMax);
run("Analyze Particles...", "size="+MidaObjMin+"-Infinity
circularity=0.00-1.00 show=Nothing add"); // no inclou forats, mesurant-ne els
perímetres.

```



```

    rois=roiManager("count");
    conta=0;

    do{
        roiManager("select", conta);
        run("Measure");
        Perim=getResult("Perim.")+Perim;
        run("Clear Results");
        conta=conta+1;
    } while (rois>conta);

    roiManager("reset");
    run("Select None");
    setThreshold (LlindarMin, ThMax);

    // fi subrutina perímetre. Mesurem Convex Hull.

    run("Convex Hull Plus", "mode=[Convex Hull selection]");
    run("Fill");
    setThreshold (LlindarMin, ThMax);

    run("Measure");
    HullArea=getResult("Area");
    HullPerim=getResult("Perim.");
    Feret=getResult("Feret");
    close();
}

// Calcula les variables derivades d'aquestes:

HullCirc=12.5664*(HullArea/(HullPerim*HullPerim));
DiamArea= pow(1.2732*IntArea,0.5);
DiamPerim=Perim/3.1416;
AreaPerim=pow(Perim, 2)/ 12.5664;
CoefVar=pow(Desvest,2)/Promig;
Solidesa=IntArea/HullArea;
Compact=DiamArea/Feret;
Concav=HullArea-IntArea;
Convex=HullPerim/Perim;
Sharp=6.2832*(pow(IntArea/3.1416, 0.5));
Circ=12.5664*(IntArea/(Perim*Perim));

// Afegeix els resultats d'aquest llindar

resultats="@#"+ThMin+"-
"+ThMax+"#@"+Area+"@"+Promig+"@"+Desvest+"@"+IntDen+"@"+Fractal+"@"+IntArea+"@"+IntPromig
+"@"+IntIntDen+"@"+Perim+"@"+HullArea+"@"+HullPerim+"@"+Feret+"@"+HullCirc+"@"+DiamArea+"
@"+DiamPerim+"@"+AreaPerim+"@"+CoefVar+"@"+Solidesa+"@"+Compact+"@"+Concav+"@"+Convex+"@"
+Sharp+"@"+Circ+"@"+resultats;
}

// *** IMPRIMEIX RESULTATS A LOG ***

resultats="Imatge:"+list[i]+"#TOTS#@"+AreaTotal+"@"+PromigTotal+"@"+DOMax+"@"+IntDenTotal
+"@"+resultats+"@";
print("[Registre]", resultats);
close();
}
}
beep();

```

---

## 9.4.- Macros per a l'obtenció dels perfils radials

```
// *****
// **                               MACRO: Centra Colònia (v2.1)          ***
// *****
// *** Centra la imatge oberta a partir del centre de masses de      ***
// *** l'objecte més gran                                           ***
// ***                                                                ***
// *** OBSERVACIONS                                               ***
// *** - Treballa amb una única imatge ja netejada, sobre fons blanc ***
// *** - Funciona amb Image J v.1.42                               ***
// *****

macro "Centra colònia" {
  setBatchMode(true);

  NomImatge=getTitle();
  MidaImatgeX=getWidth();
  MidaImatgeY=getHeight();

  // Subrutina per mesurar l'objecte més gran

  run("Duplicate...", "title=seed.tif");
  //run("Threshold...");
  setThreshold(0, 170);
  run("Make Binary", "thresholded remaining black");
  run("Close-");

  // *****
  // **** Modificació de KeepLargestParticlePixel de G. Landini: ****
  run("Particles8 ", "show=Particles overwrite");
  ar=0;
  for (j=0; j<nResults; j++) {
    ca = getResult('Pixels', j);
    if (ca>ar) ar=ca;
  }
  run("Particles8 ", " show=Particles filter minimum="+ ar +" maximum="+ ar +"
  overwrite");
  // *** Fi de KeepLargestParticlePixel de G. Landini:          ****
  // *****

  //run("Threshold...");
  setThreshold(0, 170);
  run("Create Selection");
  run("ROI Manager...");
  roiManager("Add");
  close();
  roiManager("Select", 0);

  getVoxelSize(mida, mmida, mmmida unitat);
  run("Set Scale...", "distance=1 known=1 pixel=1 unit=cm global");

  run("Set Measurements...", " center fit feret's redirect=None decimal=4");
  run("Measure");
  Xcentre=getResult("XM");
  Ycentre=getResult("YM");

  run("Select All");
  //print(Xcentre, Ycentre)
  //print(MidaImatgeX, MidaImatgeY);

  run("Translate...", "x="+MidaImatgeX/2-Xcentre+" y="+MidaImatgeY/2-Ycentre);
  makeOval(MidaImatgeX/2, MidaImatgeY/2, 5, 5)
  run("Set Scale...", "distance=1 known="+mida+" pixel=1 unit="+unitat+" global");

  roiManager("Delete");
  run("Select None");}
```

```

// *****
// **                               MACRO: Batch Perfil Colònia (v1.2)          ***
// *****
// *** Incorpora les imatges d'un directori en una única imatge multicapa    ***
// *** Executa el plug-in "Radial Profile Angle"                             ***
// ***                               ***
// *** OBSERVACIONS                                                         ***
// ***                               ***
// *** - Requereix el Plugin "Radial Profile Angle"                         ***
// *** - Requereix la macro "Centra colònia" v.2.1                          ***
// *** - Es recomana processar nombres reduïts d'imatges (p. ex, un únic    ***
// *** tractament)                                                           ***
// *** - Funciona amb Image J v.1.42                                         ***
// *****

macro "AI-Batch Perfil Colonia" {

    dir = getDirectory("Choose a Directory ");
    list = getFileList(dir);
    numimgs = list.length;

    run("Image Sequence...", "open=["+dir+"] number="+numimgs+" starting=1 increment=1
scale=100 file= or= sort");

    setBatchMode(true);
    getVoxelSize(mida, mmida, mmmida unitat);
    run("Set Scale...", "distance=1 known=1 pixel=1 unit=cm global");

    MidaImatgeX=getWidth();
    MidaImatgeY=getHeight();

    for (i=0; i<nSlices; i++) {

        // Modificar en la següent línia la ubicació de la macro AI-centra colònia

        run("Run...", "run=[C:\\Archivos de programa\\ImageJ\\macros\\AI-centra
colonia.txt]");
        //roiManager("Delete");
        run("Next Slice [>]");
        run("Select None");
    }

    makeOval(MidaImatgeX/2-MidaImatgeY/2, 0, MidaImatgeY, MidaImatgeY);
    run("Set Scale...", "distance=1 known="+mida+" pixel=1 unit="+unitat+" global");
    run("Radial Profile Angle");

}

```

